

more helpful. The key to the problem would appear to be contained in factors which lead to the disappearance of virulence, for motility can be preserved after virulence has disappeared. Owing to the importance of the treponemal immobilization test as a diagnostic tool, and to the fact that motility is required for its reading, much of the research on the survival of *T. pallidum* has been linked with motility rather than with virulence. Studies of the factors which can prolong the virulence of *T. pallidum* outside the body—or which can increase it once it has begun to fade—would appear to be an essential first step. Such studies should include morphological, immunological and biochemical investigations to ascertain what happens to the treponeme when it becomes avirulent, and to what extent virulence is linked with reproduction.

At the same time there remains some confusion as to the identity of the cultured treponemes and as to whether they are only saprophytic incidental organisms—which many believe—or whether they are actually derived from *T. pallidum*. Some treponemes have been grown originally from syphilitic lesions and further investigations of such organisms are required during their primary isolation, rather than after months or years in the test-tube, to ascertain whether their early immunological and serological properties are the same as they have been shown to be later in their life, or whether they are any closer to those of virulent *T. pallidum*. Should they prove closer, this work could be combined with the studies of virulence factors to discover whether any virulence could be instilled or restored.

On the assumption that virulence is linked with

antigenicity, and on the analogy that the availability of the venom is of infinitely greater value for scientific study than the possession of the whole snake, a continuance of studies of the antigenic structure of treponemes, and their isolation by fractionation and other procedures, are most desirable, as these also may ultimately provide indirect methods by which virulence could be tested without the cumbersome and time-consuming experiments involving animal inoculations. Also, biochemical studies of the enzyme and other systems involved in the metabolism of both virulent and non-virulent organisms may provide useful information—not only, however, between cultured and animal strains of *T. pallidum* but particularly between virulent *T. pallidum* and motile known *T. pallidum* which has come to lose its virulence.

Although work on these general lines has been proceeding slowly, it requires that the ultimate goal of the successful culture of virulent *T. pallidum* outside the body, with all of its entailed implications, be kept in mind—particularly in view of the discouraging experiences of the past. On some previous occasions (e.g., when the introduction of cardioliipin retarded the investigations of antigens in the Reiter treponeme, and when the need for the study of the survival of motility became more important than the study of virulence for the performance of the treponemal immobilization test), research has tended to be diverted into other more immediately profitable channels. As virulence can already be preserved for years in the frozen state, the problem of maintaining virulent *T. pallidum* in some sort of culture outside the human or animal host should not be insoluble.

20. RÉSUMÉ

Bien que l'identification définitive de *Treponema pallidum* comme agent causal de la syphilis et de *T. pertenue* comme agent causal du pian remonte à une soixantaine d'années, de nombreuses obscurités subsistent en ce qui concerne ces organismes. Les techniques modernes de microscopie électronique ont révélé de nouveaux détails morphologiques, dont certains — par exemple la présence d'une couche externe et du « filament axial » — avaient vu leur existence annoncée par des études antérieures.

On a en particulier démontré le pléomorphisme des souches cultivées de *T. pallidum*. Les nombreuses

formes aberrantes décrites au cours des années semblent sous la dépendance de stress provoqués par le milieu et ont été produites même dans des organismes morts. Bien qu'un certain nombre de chercheurs aient postulé l'existence d'un cycle vital, la plupart des auteurs les plus modernes estiment qu'il n'y a rien qui prouve la véracité d'une telle assertion, que l'organisme se dédouble par fission transverse et que les formes anormales résultent simplement de pressions exercées par le milieu.

Il y a de sérieuses raisons — cliniques et expérimentales — de penser qu'un stade ultramicroscopique

pique de *T. pallidum* peut exister. Cependant les recherches en vue d'obtenir la preuve expérimentale de l'existence d'un tel stade se sont soldées par un échec. Chez l'homme comme chez l'animal, la présence d'un agent infectieux peut être démontrée par l'inoculation à l'animal, lorsque les méthodes directes d'observation n'ont pu mettre en évidence de tréponèmes visibles. Après avoir longtemps cherché, certains observateurs ont noté leur présence en petit nombre, et d'après les indications que l'on possède il est impossible de postuler — il n'est d'ailleurs pas nécessaire de le faire — l'existence certaine d'un stade infravisible.

Bien des problèmes majeurs de syphiligraphie — y compris celui de la morphologie et celui de la possibilité de formes infravisibles — pourraient être rapidement et effectivement élucidés par une culture *in vitro* réussie de *T. pallidum* virulents. L'on a fait de très nombreuses tentatives dans ce sens et bien qu'on ait prétendu dans très peu de cas avoir obtenu des succès, ceux-ci n'ont pu être ni renouvelés ni maintenus. Les succès mêmes obtenus par certains auteurs ont été mis en doute. Et les tréponèmes ainsi cultivés ont eux-mêmes bientôt fait de perdre leur virulence.

Certaines souches de tréponèmes (par exemple celles de Reiter et d'autres) qui, sur le plan morphologique, ressemblent à *T. pallidum* et sont présentés comme ayant été cultivés à partir de lésions syphilitiques ont été maintenues au laboratoire pendant plusieurs années. Quelle qu'ait été leur véritable nature à l'origine, ces organismes ressemblent maintenant, du point de vue immunologique, à des tréponèmes saprophytes et ne sont virulents ni pour l'homme ni pour les animaux. Au cours des années, des méthodes simplifiées de culture ont été mises au point et l'on connaît dans les détails ce qui est nécessaire à la croissance des organismes (anaérobiose, besoins en amino-acides et autres matières azotées, vitamines, etc.).

La culture de tissu ou la culture sur œuf n'a pas jusqu'ici réussi à obtenir mieux qu'une survie temporaire de *T. pallidum* virulent, bien que les souches cultivables non virulentes poussent aussi bien dans les cultures de tissus que dans l'œuf tué.

La dessiccation (même lors d'une congélation) et la chaleur ont une influence défavorable sur la survie de *T. pallidum* virulent, mais à des températures normales et en anaérobiose la survie accompagnée de mobilité a pu être obtenue pendant deux mois dans des tissus; mais la virulence s'est perdue. La virulence peut être conservée, aussi bien pour *T. pallidum* que

pour *T. pertenue*, à des températures très basses; c'est ainsi que des organismes virulents ont été maintenus à des températures de -70°C à -80°C pendant des périodes dépassant neuf ans. A la suite d'études sur les besoins de croissance des souches cultivées, des milieux de survie ont été mis au point; dans ces milieux, certains tréponèmes peuvent survivre quelques semaines mais, même là, la survie n'est pas plus longue que celle que l'on obtient dans les tissus naturels lorsque les conditions sont les meilleures.

S'il a été impossible de cultiver *T. pallidum* ou *T. pertenue* virulents en dehors du corps, l'on a par contre obtenu d'excellents résultats au laboratoire chez l'animal vivant qui, une fois infecté, peut le demeurer pendant des années ou pendant toute sa vie. Des souches dont on a démontré qu'elles sont toujours virulentes pour l'homme ont été maintenues, par des passages en séries sur l'animal, pendant près d'un demi-siècle. L'animal de choix est le lapin, car de façon régulière il présente des lésions cliniques où l'on trouve à la fois la syphilis et le pian; il a cependant l'inconvénient d'être un hôte pour une maladie vénérienne naturelle de l'animal causée par *T. cuniculi* dont la morphologie ressemble à celle de *T. pallidum*. Récemment le hamster a été préféré pour le maintien des tréponèmes du pian. La souris blanche et le rat présentent une infection asymptomatique et l'on doit utiliser le lapin ou le hamster comme indicateurs de la présence d'une telle infection. D'autres animaux (en particulier le cobaye) ont une action intermédiaire.

Bien que l'on ait, grâce à des recherches sur l'animal de laboratoire, beaucoup appris sur *T. pallidum* et les organismes associés, nos connaissances avanceraient beaucoup plus certainement et beaucoup plus rapidement si l'on pouvait maintenir expérimentalement, en dehors du corps, *T. pallidum* virulent.

En ce qui concerne les recherches futures, le passé peut servir utilement de guide. Plusieurs efforts concertés en vue de l'obtention d'une culture directe de *T. pallidum* virulent ont déjà échoué, et une attaque de flanc paraît plus indiquée. La clé du problème semble se trouver parmi les facteurs qui entraînent la disparition de la virulence, car la motilité peut être conservée après que la virulence a disparu. A cause de l'importance du test d'immobilisation du tréponème pour le diagnostic, une grande partie des recherches sur la survie de *T. pallidum* se sont orientées vers la motilité plutôt que vers la virulence. Un premier pas — tout à fait essentiel — consisterait à effectuer des études sur les facteurs susceptibles de prolonger la virulence de *T. pallidum*

à l'extérieur du corps — ou de l'augmenter lorsqu'elle a commencé à diminuer. De telles études devraient comprendre des recherches morphologiques, immunologiques et biochimiques pour déterminer de façon certaine ce qui se passe chez le tréponème lorsqu'il perd sa virulence et dans quelle mesure la virulence est liée à la reproduction.

En même temps subsiste une certaine incertitude sur l'identité des tréponèmes cultivés et sur le point de savoir s'il s'agit seulement d'organismes saprophytes accidentels (beaucoup le pensent) ou s'ils sont réellement dérivés de *T. pallidum*. Certains tréponèmes ont été cultivés à l'origine à partir de lésions syphilitiques et des recherches nouvelles devront être faites au moment de cet isolement plutôt que d'attendre des mois ou des années de séjour dans un tube à essai pour savoir si leurs propriétés immunologiques et sérologiques précoces sont identiques à celles qu'ils possèdent à une époque plus tardive ou au contraire se rapprochent davantage de celles de *T. pallidum* virulent. Si ce rapprochement était prouvé, un tel travail devrait s'accompagner d'études sur les facteurs de la virulence, afin de savoir si une virulence peut être induite ou restaurée.

En partant de l'hypothèse que la virulence est liée à l'antigénicité et en se souvenant que pour une étude scientifique il est infiniment plus important de pouvoir disposer du venin d'un serpent que du serpent tout entier, l'on doit souhaiter la poursuite des études sur la structure antigénique du tréponème et sur leur isolement par la méthode du fractionnement ou par d'autres techniques; de telles recherches pourraient aboutir à la mise au point de méthodes d'épreuve de la virulence sans être obligé de faire appel aux expériences longues et compliquées d'inoculation à l'animal. Des études biochimiques sur les enzymes et sur les autres systèmes intervenant dans le métabolisme des organismes — virulents comme non virulents — pourraient fournir d'utiles renseignements non seulement sur les rapports entre les souches cultivées et les souches animales de *T. pallidum* mais encore entre *T. pallidum* virulent et *T. pallidum* mobile mais ayant perdu sa virulence.

Du fait que la virulence peut être maintenue, grâce à la congélation, pendant plusieurs années, le problème le plus important qui est celui de la culture de *T. pallidum* virulent en dehors du corps ne devrait pas être insoluble.

21. CUMULATIVE LIST OF REFERENCES

- Adams, D. K., Cappell, D. F. & McCluskie, J. A. W. (1928) Cutaneous spirochaetosis due to *T. cuniculi* in British rabbits. *J. Path. Bact.*, **31**, 157-61
- Addamiano, L. & Babudieri, B. (1957) Research on spirochaetal strains isolated in Jordan. *Bull. Wld Hlth Org.*, **17**, 483-5
- Ajello, G., Portnoy, J., Logan, L. & Olansky, S. (1954) Studies on the *Treponema pallidum* immobilization (TPI) test: IV. A simplified method of preparing the modified basal medium. *Amer. J. Syph.*, **38**, 288-94
- Akatsu, S. (1917) The influence of carbohydrates on the cultivation of spirochetes. *J. exp. Med.*, **25**, 375-80
- Akatsu, S. (1921) [Histopathology of the scrotal chancre]. *Z. Jap. mikrobiol. ges.*, **15**, 205, 477, 845 (in Japanese, cited by Matsumoto, 1930)
- Aksjanzew-Malkin, S. (1933) Die Oberflächenzüchtung der *Spirochaeta pallida*. *Zbl. Bakt., I Abt. Orig.*, **129**, 405-11
- Albrecht, B. (1941) Methodisches zur Differenzierung von Kulturspirochäten (Ein weiterer Beitrag zur Spirochätenvakzine Hilgermann). *Derm. Wschr.*, **112**, 351-5
- Albrecht, B. (1941) Methodisches zur Differenzierung von Kulturspirochäten (Schlusswort zu Hilgermanns vorstehenden Bemerkungen). *Derm. Wschr.*, **113**, 927-9
- Amawashi, M. (1956) On antigenic activities of aqueous extract of mechanically disintegrated *S. pallida*. *Ann. Tuberc. (Tenri)*, **7**, 77-82
- Angulo, J. J., León y Blanco, F. & Rake, G. (1948) A morphologic study of the Cuban form of *T. carateum* (Brumpt), the agent of pinta, with the help of the electron microscope. *Bact. Proc.*, **17**
- Angulo, J. J., Watson, J. H. L. & Olarte, J. (1950) Artifacts, with other non-specific appearances, resembling virus particles and the so-called filamentous forms of influenza and fowl-pest viruses in human skin tissue fluid examined with the electron microscope. *J. Bact.*, **60**, 129-38
- Angulo, J. J., Watson, J. H. L., Wedderburn, C. C., León y Blanco, F. & Varela, G. (1951) Electronmicrography of treponemes from cases of yaws, pinta and the so-called Cuban form of pinta. *Amer. J. trop. Med.*, **31**, 458-78
- Antoni (1921) Studien über die Morphologie der Spirochaeta pallida nach Beobachtungen im Dunkelfeld. *Arch. Derm. Syph. (Berl.)*, **129**, 70-3
- Aristovskij, V. M. (1935) [Methods of cultivating *Spirochaeta pallida* to obtain large quantities of antigenic material]. *Sovetsk. Vrač. Gaz.*, **7**, 135
- Aristovskij, V. M. (1940) [An apparatus for cultivating anaerobes]. *Sovetsk. Vrač. Ž.*, **9**, 1