

MISE EN ÉVIDENCE  
DES PROTOZOAIRES ET DES SPIROCHETES SANGUICOLES,  
EN GOUTTE ÉPAISSE, EN PRÉSENCE D'HÉMATIES NUCLÉÉES,  
PAR LE TAUROCHOLATE DE BLEU DE MÉTHYLÈNE

Par H. SIMONS

On sait que, chez les animaux à sang froid et les oiseaux, la recherche des trypanosomes, *Haemoproteus*, *Plasmodium*, etc., dans les gouttes épaisses de sang, par les procédés usuels, est rendue extrêmement difficile, ou même impossible, parce que les hématies nucléées se colorent très intensément et, se superposant aux parasites, les cachent à l'observateur. Les parasites non endoglobulaires, comme les trypanosomes et les spirochètes, peuvent être aperçus accidentellement, mais là seulement où les hématies sont fortuitement séparées ou ne forment qu'une couche mince.

Au cours de mes recherches sur l'action de la saponine et du taurocholate de sodium sur les spirochètes et les trypanosomes, en présence des colorants d'aniline, tout en relevant dans la littérature un certain nombre d'observations complètement erronées, j'ai découvert un procédé très commode et très sûr pour mettre en évidence les protistes sanguicoles, malgré la présence des hématies nucléées.

Ce procédé repose sur le fait qu'en présence du bleu de méthylène, le taurocholate de sodium, à haute concentration dans une solution saline isotonique avec le sang, diminue considérablement la colorabilité des noyaux des hématies, tandis que le cytoplasme des leucocytes reste assez bien et celui des parasites très bien colorable. Comme principal objet d'étude, j'ai employé, grâce à l'amabilité du professeur Brumpt, le *Plasmodium gallinaceum*. J'ai examiné le sang des poulets infectés par ce parasite, soit pur, soit mélangé artificiellement avec du sang de souris infectées de trypanosomes ou de spirochètes sanguicoles.

Voici comment on procède pour la coloration des gouttes épaisses :

ANNALES DE PARASITOLOGIE, T. XVI, n° 3. — 1<sup>er</sup> mai 1938, p. 254-258.

**Procédé N° 1.** — 1. Préparer des gouttes aussi épaisses que possible (environ 25 mm<sup>3</sup> de sang étalé sur une surface de 0,8 à 1 cm<sup>2</sup>) et les dessécher à l'air ou à 34-37°.

2. **Colorant.** — Préparer le colorant en mélangeant 2 cm<sup>3</sup> de solution à 10 p. 100 de taurocholate de sodium (Hoffmann-La Roche) dans de l'eau physiologique simple ou citratée, avec 8 cm<sup>3</sup> de solution saturée de bleu de méthylène dans le même milieu isotonique : assurer l'homogénéité du mélange en agitant fortement. On peut employer soit le bleu de méthylène médicinal, soit le bleu pour histologie ou bactériologie. Il se forme, dans le mélange, du taurocholate de bleu de méthylène, composé presque insoluble dans l'eau, facilement soluble dans l'alcool, grasieux et très adhérent au verre, mais assez soluble dans un excès de taurocholate de sodium, ce qui est le cas dans notre mélange.

3. **Coloration.** — Déposer, avec une pipette, 3 ou 4 gouttes du colorant sur la goutte épaisse placée bien horizontalement. Etaler le liquide en couche mince au moyen d'une aiguille ou de tout autre objet et laisser agir exactement pendant 30 secondes, mais pas plus, autrement le cytoplasme des parasites serait trop attaqué.

4. Après les 30 secondes, verser l'excès de colorant, chasser soigneusement le colorant avec un jet d'eau distillée ou d'eau ordinaire, absorber l'excès d'eau avec du papier filtre et déposer une lamelle.

5. *Examiner* la préparation avec un fort objectif à sec.

On voit immédiatement les *Plasmodium* de la poule dont le pigment ressort nettement et est toujours entouré d'une zone de cytoplasme plus ou moins étendue et intensément colorée en bleu sombre. Cette zone est très distincte des noyaux des hématies et du cytoplasme leucocytaire, colorés en bleu pâle ou incolores. Le noyau des parasites n'est pas visible, même pas en colorant ensuite par le Giemsa. On peut cependant, dans une préparation au taurocholate de bleu de méthylène bien réussie, distinguer immédiatement les gamètes volumineux des schizontes par la forme de l'aire cytoplasmique. Comme le débutant peut facilement confondre les inclusions cristalloïdes des leucocytes éosinophiles avec le pigment, il est recommandé d'employer la légère modification suivante (procédé n° 2), qui donne des préparations de plus longue conservation.

**Procédé N° 2.** — Après avoir rejeté le mélange de bleu de méthylène, et sans laver à l'eau, verser goutte à goutte, 3 ou 4 fois, en reje-

tant immédiatement le liquide à chaque fois, une solution aqueuse d'éosine à 0,5 ou 1 p. 1.000 (Eosin wasserloeslich, gelblich de Gruebler, Leipzig). Différencier ensuite goutte à goutte, par un mélange à parties égales de glycérine et d'eau ordinaire, jusqu'à ce que le liquide coule à peine rosé. Absorber l'excès de liquide avec du papier filtre et déposer une lamelle que l'on peut luter. Les préparations ainsi obtenues sont particulièrement bien contrastées et les granulations éosinophiles des leucocytes se distinguent admirablement du pigment noir des parasites. Dans le sang périphérique d'un poulet, même très fortement infecté, je n'ai encore jamais observé de pigment dans les leucocytes.

Bien que cette méthode ne permette pas de mettre en évidence les noyaux des parasites, sa grande utilité pour les recherches de morphologie, de biologie et de thérapeutique est évidente. Grâce à elle, on a la possibilité de s'assurer que de grandes séries d'animaux à sang froid ou d'oiseaux ne sont pas porteurs d'infections naturelles à hémospories, avant de les inoculer avec une souche parasitaire pure. De plus, au cours des expériences de chimiothérapie, on peut savoir, en quelques minutes, s'il y a encore quelques plasmodies d'oiseaux en circulation dans le sang périphérique. Par exemple, pour une poule infectée avec le *Plasmodium gallinaceum*, chez laquelle, avec l'objectif à immersion, on n'avait trouvé, en frottis, aucun parasite dans 50 champs, j'ai pu, dans plusieurs gouttes épaisses et en quelques minutes, ou même souvent instantanément, trouver 1 ou 2 parasites avec un fort objectif à sec. On doit prendre comme règle de chercher toujours le pigment si facile à voir et de mettre au point le cytoplasme avec l'objectif à immersion.

*Trypanosomes.* — Avec ce nouveau procédé, les trypanosomes sont de même faciles à trouver en présence des hématies nucléées. Faute de matériel, j'ai utilisé un mélange artificiel de sang de poule et de sang de souris inoculée avec le trypanosome du mal de Caderas. Le cytoplasme présente des granulations bleues, le noyau apparaît comme une vésicule claire, dans laquelle on voit presque toujours un nucléole central ou excentrique ; la membrane nucléaire est très nette. La membrane ondulante n'est pas colorée, mais ses contours sont bien visibles.

*Spirochètes.* — On voit très bien leur forme et ils sont nettement colorés en bleu, mais, de même que pour les trypanosomes, la coloration n'est jamais aussi intense que pour les plasmodies.

*Remarques.* — 1. Pour les trypanosomes et les spirochètes, on ne peut employer que le procédé n° 1.

2. La grande avidité du cytoplasme des plasmodies pour le taurocholate de bleu de méthylène pourrait être très utile au cours des recherches sur la chimiothérapie. En effet, on peut admettre que la différence dans la colorabilité du cytoplasme serait plus nette avec cette méthode qu'avec le Giemsa. Malheureusement, les circonstances ne m'ont pas permis d'étudier ce sujet.

**Procédé N° 3.** — Dans le cas où on doute de la nature d'un parasite d'animal à sang froid ou d'oiseau (animal ou parasite nouveau), il peut être très important de savoir si ce parasite est extra ou intraglobulaire. Là encore, le taurocholate de bleu de méthylène rend de grands services. On fixe incomplètement, on laisse se produire une légère lyse par l'action du mélange de colorant et de taurocholate et on différencie par le taurocholate pur.

Voici comment on procède :

1. *Fixer* les gouttes épaisses pendant une minute au plus dans l'alcool méthylique. Il n'est pas nécessaire d'employer un produit pur, l'alcool méthylique « technique » suffit parfaitement.

2. *Chasser* avec précaution l'alcool par un jet de pissette d'eau ordinaire. Rejeter l'excès d'eau et sécher le pourtour de la préparation avec du papier filtre.

3. *Colorer* par le taurocholate de bleu de méthylène comme dans le procédé n° 1.

4. *Laver* à l'eau, etc., comme dans le procédé n° 2.

5. *Différencier* en 15 à 20 secondes, en faisant tomber une à une 4 gouttes de solution à 10 p. 100 de taurocholate de sodium dans l'eau physiologique.

6. *Rejeter* le liquide et verser goutte à goutte une solution d'éosine comme dans le procédé n° 2.

On doit voir très distinctement les noyaux incolores ou presque incolores des hématies sur lesquels tranchent le pigment et le cytoplasme bleu des hémospories.

**Procédé N° 4.** — On obtient les plus beaux résultats, quand on a le temps, au moyen du taurocholate de bleu de méthylène à l'état naissant.

Colorer d'abord les gouttes épaisses par la méthode panoptique de Pappenheim (May-Grünwald-Giemsa). Le Giemsa doit agir pendant 30 minutes ; après lavage à l'eau distillée, appliquer les temps 5 à 6 du procédé n° 3. Le taurocholate de bleu de méthylène à l'état naissant, provenant du bleu de méthylène du colorant de

Giemsa, est immédiatement fixé par le cytoplasme des hémospories, tandis que les noyaux des hématies sont complètement, ou presque complètement, décolorés. Les propriétés cytolytiques, déjà connues, de la solution concentrée de taurocholate de sodium [Neufeld et v. Prowazek (1907), Neufeld et Haendel (1908)] jointes à l'action éclaircissante de la glycérine, permettent, avec les procédés 3 et 4, d'examiner des gouttes épaisses de 30 à 40  $\mu$ , faites avec du sang à hématies nucléées. Avec les procédés 1 et 2, la forme des hématies n'est pas conservée, mais on peut examiner des gouttes de 80  $\mu$  d'épaisseur. Dans tous les cas, il faut employer, pour l'éclairage, une source lumineuse puissante.

La solution à 10 p. 100 de taurocholate de sodium dans l'eau physiologique peut se conserver plusieurs semaines à la glacière. Il est cependant bon de n'en préparer à la fois que 5 à 10 cm<sup>3</sup>, à moins qu'on ait à colorer un grand nombre de préparations. Le mélange taurocholate-bleu de méthylène paraît pouvoir se conserver plusieurs mois. Il se forme souvent à la surface une pellicule constituée par le sel colorant non dissous. Il n'est pourtant pas nécessaire de filtrer, car, lorsqu'on travaille correctement, il ne se produit jamais de précipités gênants dans les préparations.

Malgré le prix élevé du taurocholate de sodium, ces quatre procédés peuvent être utilisés dans tous les laboratoires, car chaque préparation ne revient qu'à quelques centimes.

Je tiens, en terminant, à remercier le professeur Brumpt de l'aimable hospitalité qu'il a bien voulu m'accorder dans son laboratoire, le Dr Langeron de ses judicieux conseils et la Maison Hoffmann-La Roche du don généreux d'une grande quantité de taurocholate de sodium.

#### BIBLIOGRAPHIE

- NEUFELD (F.) et HAENDEL. — Beiträge zur Kenntnis der Wirkung verschiedener blutlösender Gifte, insbesondere des taurocholsäuren Natriums und der Seife. *Arb. kaiserl. Gesundheitsamt*, XXVIII, 1908, p. 572-584.
- NEUFELD (F.) et v. PROWAZEK. — Ueber die Immunitätserscheinungen bei der Spirochaetenseptikaemie der Hühner und über die Frage der Zugehörigkeit der Spirochäten zu den Protozoen. *Arbeiten kaiserl. Gesundheitsamt*, XXV, 1907, p. 494-504.

*Institut de Parasitologie de la Faculté de médecine de Paris*  
(Directeur : Prof. E. Brumpt).