NOUVELLES APPLICATIONS
DU MÉLANGE COLORANT SAPONINE-BLEU DE METHYLÈNE
A L'ETUDE DES PROTOZOAIRES SANGUICOLES

Par H. SIMONS

Dans une note précédente (1938), j'ai montré l'importance du mélange saponine-bleu de méthylène pour le diagnostic des trypanosomes et des spirochètes dans les gouttes épaisses.

Ce colorant est susceptible d'autres applications pour la recherche et le diagnostic des protozoaires sanguicoles.

Agglutination post-mortem. — Si l'on mélange du sang renfermant des trypanosomes ou des spirochètes avec 5 à 10 parties de ce colorant, on observe un phénomène remarquable. Si on abandonne le mélange de sang et de colorant dans d'étroits tubes à essai, on ne trouve plus, au bout d'environ 12 heures, même dans le cas d'infections très fortes, qu'un très petit nombre de parasites, alors qu'ils étaient très nombreux au moment où le mélange a été effectué. J'avais cru d'abord à une lyse des parasites, mais, en agitant les tubes, j'ai constaté ce résultat surprenant que les parasites avaient formé, avec les leucocytes et le stroma des hématies, des îlots bleus presque homogènes et plus ou moins volumineux. Ces îlots sont formés par agglutination *post-mortem* et sont souvent assez volumineux pour apparaître comme un fin précipité, visible en inclinant les tubes et en les éclairant convenablement.

Les spirochètes, par exemple *S. duttoni*, qui se trouvent au bord des îlots, sont faciles à reconnaître avec un fort objectif à sec. Les trypanosomes se révèlent par leur silhouette, même au centre des îlots, lorsque l'éclairage est bien réglé. Si l'on ajoute, au bord de la lamelle recouvrant la préparation de ces îlots d'agglutination dans le colorant original, quelques gouttes d'acide acétique à 0,1 pour 100, on obtient une différenciation : les stromas sont presque entièrement décolorés, les leucocytes deviennent bleu pâle, les spirochètes et les trypanosomes bleu plus ou moins foncé.

On peut suivre la formation de ces îlots d'agglutination en

ANNALES DE PARASITOLOGIE, T. XVI, n° 4. — 1^{er} juillet 1938, p. 334-340.

chambre humide ou en faisant des prélèvements dans les tubes. Le phénomène commence déjà au bout de 3 à 6 heures. Toutes les phases d'accroissement des îlots peuvent être particulièrement bien suivies dans les tubes qu'on doit, bien entendu, remuer aussi peu que possible. On voit d'abord un stroma d'une seule hématie s'attacher à un trypanosome ou à un spirochète, puis, l'un après l'autre, il en est de même pour beaucoup. D'autres parasites et des leucocytes s'y joignent et de nouveaux stromas s'ajoutent. Il n'est pas rare de trouver des îlots géants qui occupent presque tout le champ de l'objectif à immersion ; ils se forment surtout lorsqu'on laisse les tubes en repos pendant plusieurs jours. Au bout de quelques jours, les îlots adhèrent souvent si fortement aux parois des tubes qu'on ne peut plus les détacher en secouant et qu'il faut employer pour cela un long fil ou une aiguille.

Il est probable que ces îlots d'agglutination naissent par suite d'une attraction de nature électrique entre parasites, leucocytes et stromas. Les phénomènes d'adhérence dus à la saponine et aux plaquettes qui s'y dissolvent doivent jouer aussi un rôle. La résistance de ces îlots est surprenante : on peut s'en convaincre facilement en tapotant sur la lamelle avec une aiguille.

Il se forme des îlots analogues avec une culture de *Spirochæta ictero-hæmorrhagiæ* en sérum salé de lapin : on opère en petits tubes comme plus haut. On peut déjà voir, avec un fort objectif à sec, les spirochètes qui sont au bord des îlots ; chez ces spirochètes ou ceux qui flottent encore librement dans le liquide, on peut très souvent voir la rayure spiralée même sur le fond clair. La formation des îlots résulte ici de la lente précipitation des caillots albumineux du sérum par le colorant.

Spirochæta ictero-hæmorrhagiæ. — Dans ces conditions, le colorant à la saponine doit produire, chez les spirochètes de Weil, une très rapide et très bonne colorabilité, car on sait que cet organisme est réfractaire à la coloration par les couleurs d'aniline lorsqu'il n'a pas subi une fixation ou un mordantage préalables.

Si on mélange une anse de culture en sérum avec 4-6 anses de colorant, les spirochètes sont immédiatement tués et presque aussitôt nettement colorés en bleu, ce qu'on peut déjà voir sur fond clair avec un fort apochromat. Les formes en C, en S et en « cin-tre » des spirochètes sont bien conservées. A ma demande, le Professeur agrégé Mollaret a mélangé une goutte de sang normal de cobaye avec une anse de culture en sérum. 4-6 anses de solution colorante, mélangées avec une anse du mélange de sang

et de culture en sérum, ont permis de voir presque instantanément le spirochète sur le fond clair.

Le colorant convient très bien aussi pour la recherche du spirochète de Weil dans l'urine. On mélange 50 cm³ d'urine normale avec 0 cm³, 5 d'une culture en sérum riche en spirochètes. On prélève à la pipette 2 cm³ du mélange auxquels on ajoute environ 8 fois leur volume de colorant et on centrifuge énergiquement pendant 2 minutes. On trouve facilement les spirochètes dans le culot, même sur fond clair : dans ce cas encore, les spirochètes ont été presque immédiatement tués et colorés par la solution colorante. Les « Plasmaspiralen » de Zuelzer (1918, 1921) se détendent et sont généralement très visibles même sur fond clair.

Piroplasmes. — Des préparations extemporanées d'une infection double à *P. bigeminum* et *P. argentinum* chez un bovin ont donné de très belles images. On mélange une anse de sang avec 4-6 anses de colorant. Les parasites piriformes se détachent de suite très nettement, même avec un fort objectif à sec, en montrant leur cytoplasme bleu foncé sur le stroma incolore. Leur noyau apparaît comme un point bleu très foncé. Des gouttes très épaisses, traitées par ma nouvelle méthode rapide, réussissent admirablement. On procède comme je l'ai indiqué dans ma première communication (1938) pour les trypanosomes et les spirochètes. La simplicité et la rapidité avec lesquelles on peut exécuter des préparations extemporanées et des gouttes épaisses rendent ce procédé très précieux pour les recherches en série en médecine vétérinaire. Probablement, le colorant peut convenir aussi pour le diagnostic des anaplasmes.

Pour le diagnostic des piroplasmes, Lestoquard (1926, p. 14) a rejeté la goutte épaisse « qui, ici, est sans utilité et même plutôt nuisible ». Cette opinion est valable, d'après mes constatations, pour les préparations colorées au Giemsa. Au contraire, ma méthode du bleu à la saponine rend de grands services dans ce cas, comme l'ont montré les observations du Prof. Brumpt sur les chiens. Ma méthode rapide (1938, p. 103-104) peut aussi être employée.

Emploi comme liquide conservateur pour le diagnostic. — Le sang renfermant des spirochètes récurrents ou *ictero-hæmorrhagiæ*, des trypanosomes, du *Schizotrypanum cruzi*, des *Hæmoproteus*, des *Plasmodium gallinaceum* et *relictum*, des piroplasmes, etc., mélangé immédiatement avec 5-10 fois son volume de solution de saponine-bleu de méthylène, paraît conserver longtemps les parasites dans un état suffisant pour permettre le diagnostic (d'après mon expé-

rience, plus de 6 mois). Ce fait a une très grande importance pour les expéditions et pour les recherches épidémiologiques en masse sur les spirochètes, trypanosomes et piroplasmes chez l'homme, le gros bétail, le gibier, les rongeurs, les oiseaux, etc., car on peut alors, en cas de besoin, prélever une assez grande quantité de sang (quelques cm³), puis centrifuger et examiner le mélange au laboratoire. On peut déceler ainsi des infections extrêmement faibles, comme trois exemples le montreront plus loin. Il faut remarquer qu'à cause du phénomène de l'agglutination *post-mortem* auquel sont sujets ces parasites, il est nécessaire d'agiter vigoureusement le mélange avant de centrifuger. Lorsque le mélange a séjourné longtemps dans les tubes, il faut gratter la paroi de ceux-ci, après les avoir vidés, avec un agitateur dont l'extrémité est recouverte de caoutchouc, après y avoir versé un peu de solution physiologique ; on réunit ensuite ce liquide au premier. Dans certains cas, on peut centrifuger à part ce liquide de lavage et en avoir un bon résultat, à cause des îlots d'agglutination.

Plaquettes. — Le Prof. P. Chevallier (Hôpital Cochin, Paris), à qui j'ai fait la démonstration d'une préparation fraîche au bleu à la saponine, m'a aimablement signalé qu'il était particulièrement intéressé par l'aspect remarquable des plaquettes sanguines (en forme de navette) et qu'il n'avait jamais vu une conservation aussi naturelle de la forme de ces éléments. Il y a donc lieu d'étudier la question des plaquettes au moyen de cette technique. A l'occasion de mes recherches sur le sang des animaux, pour mon premier mémoire, j'ai déjà fait des observations analogues, mais je n'ai pas attribué de valeur à l'aspect de ces éléments, parce que je ne suis pas spécialiste en hématologie.

Emploi comme liquide de numération. — La solution colorante saponine-bleu de méthylène est un liquide de dilution idéal pour la numération des parasites, leucocytes et surtout des réticulocytes, avec une chambre de 0 mm., 1 de profondeur. Les réticulocytes de tous les mammifères examinés et de l'homme se colorent immédiatement et montrent des filaments bleus ; on peut distinguer toutes sortes de types qui intéressent particulièrement les hématologistes (1). La délicatesse et en même temps la netteté avec laquelle est mise en évidence la structure réticulaire surpassent de beaucoup ce qu'on obtient avec le bleu de crésyl brillant. Dans certains

(1) Ces éléments se colorent très bien aussi sur de bons frottis, non fixés, entre lame et lamelle, au moyen de notre colorant : dans ces préparations on peut facilement établir un pourcentage des réticulocytes.

cas, on peut compter dans la même préparation les parasites, les polynucléaires, les lymphocytes et les réticulocytes avec une dilution au dixième, pourvu que les parasites ne soient pas trop nombreux. Pour compter les spirochètes et les piroplasmes, il faut employer, à la place d'une lamelle spéciale épaisse, une lamelle mince ordinaire, pour pouvoir travailler avec un fort système à sec. Les pelotons d'agglutination de spirochètes vivants qui apparaissent, par exemple pour *S. duttoni*, au moment où l'infection est à son plus haut point, se dénouent très bien dans la solution colorante à la saponine. Ainsi j'ai pu, par exemple, avec la souche de *S. duttoni* de l'Institut Pasteur, compter jusqu'à 680.000 spirochètes par millimètre cube dans le sang périphérique de la souris.

Procédé par centrifugation. — Dans mon premier mémoire, j'avais déjà indiqué que la méthode de centrifugation de Martin et Lebœuf (1908) et ses modifications présentent cet inconvénient que lorsqu'il n'y a qu'un très petit nombre de trypanosomes, ceux-ci peuvent être très facilement perdus. Si on renonce à inoculer le sédiment, car les expériences sur les animaux sont souvent très longues, et si on centrifuge dans la solution saponine-bleu de méthylène, on obtient pour le diagnostic des résultats très rapides et remarquablement satisfaisants.

Par exemple, à 25 cm³ de sang de mouton défibriné, on ajoute 1 cm³ d'une suspension de trypanosomes du nagana dans l'eau physiologique citratée. Cette suspension, après numération dans la cellule à compter, doit renfermer 100 trypanosomes au mm³; on la prépare en partant d'une suspension plus concentrée. Ces 26 cm³ de mélange sont centrifugés pendant 3 minutes à 4.000 tours; on aspire ensuite les trois-quarts du liquide surnageant, puis on complète au volume primitif avec le colorant à la saponine, on agite fortement pour bien mélanger et on centrifuge de nouveau comme précédemment. On prélève dans le sédiment 10 anses (de 2 mm. de diamètre) que l'on transporte sur une lame et, avec une fine plume à dessin, on puise 50 gouttelettes qu'on dépose sur une lamelle, puis on examine en goutte pendante. Après 5 minutes d'examen avec un objectif à sec moyen, on retrouve déjà 3 trypanosomes et cela avec seulement 6 minutes de centrifugation pour une concentration primitive d'à peu près 4 trypanosomes par centimètre cube.

J'ai obtenu d'aussi bons résultats avec une concentration double pour le sang de souris renfermant du *Spirochaeta duttoni* et en opérant de même avec 25 cm³ de sang de mouton comme milieu de dilution.

Chez un chien mort d'une très forte infection expérimentale par *Piroplasma canis*, j'ai prélevé, aussitôt après la mort, exactement 0 cm³, 5 de sang que j'ai dilué à 1 pour 2.000.000 avec de la solution physiologique citratée. J'ai centrifugé fortement pendant 5 minutes 1 cm³ de cette dilution, après addition de 5 cm³ de solution colorante. Quatre anses de sédiment très compact ont montré, en moins d'une demi-minute, avec un fort objectif à sec, quelques formes parasitaires typiques.

De plus, 1 cm³ de la même dilution a été additionné de 5 cm³ de solution physiologique citratée, et, après le même temps, deux anses de sédiment ont été mélangées sur une lame avec 4 anses de solution colorante. Au bout d'environ une minute, quelques parasites ont de même été trouvés.

En pratique, je conseille d'employer cette dernière méthode pour tous les parasites endoglobulaires en opérant comme il suit. On centrifuge quelques centimètres cubes de sang citraté, on aspire le mieux possible le sérum et on lave par centrifugation avec un milieu isotonique quelconque, pour faire ensuite plusieurs préparations extemporanées avec le sédiment très compact. Lorsque le sérum a été très complètement enlevé, on peut toujours mélanger 2-3 anses de sédiment avec la même quantité de solution colorante, car alors il n'y a plus à craindre que l'hémolyse soit troublée par une combinaison de la saponine avec la cholestérine du sérum.

Remarque microtechnique. — La saponine employée pour ma première communication m'a été aimablement donnée par le Professeur Schoen (de l'Institut Pasteur de Paris) ; ce produit, comme il a été reconnu plus tard, remontait à 10 ans. Avec trois préparations plus récentes du commerce, la coloration des leucocytes et des parasites en préparation extemporanée a été plus lente et le stroma des hématies était un peu contracté. On peut obvier à cet inconvénient en laissant mûrir à l'étuve à 34-37° C., pendant un ou deux jours, en flacon bouché au liège, une solution à 10 pour 100 de saponine dans la solution physiologique citratée, comme il a été indiqué précédemment. On centrifuge fortement pour se débarrasser des microorganismes et on amène à la concentration voulue en ajoutant de la solution citratée, du bleu de méthylène et du formol, comme je l'ai indiqué dans ma première note. Bien entendu, au lieu de solution physiologique citratée, on peut prendre de la solution physiologique simple ; toutefois, pour les travaux en dehors du laboratoire, la première est préférable à cause de son pouvoir anticoagulant. L'âge de la préparation de saponine n'a aucune importance pour la préparation des gouttes épaisses.

Autant que je puis en juger jusqu'ici, la solution de saponine peut se conserver pendant 4 à 5 mois. Ensuite, le pouvoir hémolytique et le pouvoir colorant commencent à diminuer ; cependant on peut encore employer le colorant pendant plusieurs semaines en doublant ou en triplant la durée de son action, qui est très courte lorsqu'il est frais.

Il est intéressant de noter encore que Rost, il y a bien des années (1910), a déjà trouvé que, si on hémolyse du sang de grenouille dans 10 cm³ de liquide de Locke avec 0 cm³, 5 de saponine (à 0,5 pour 100) et si on ajoute une goutte d'un colorant d'aniline, la coloration du noyau des hématies se produit brusquement (l. c. p. 391). Garmus a observé des faits analogues (1912, p. 226-227).

BIBLIOGRAPHIE

- GARMUS (A.). — Fortgesetzte Untersuchungen ueber die physiologische Permeabilitaet der Zellen. IV. Die Permeabilitaet und das Scheidevermoegeen der Druesenzellen fuer Farbstoffe und eine neue Methode vitaler Beobachtung. *Zeitschrift für Biologie*, LVIII, 1912, pp. 185-236.
- LESTOQUARD (F.). — *Les piroplasmes du mouton et de la chèvre*, Alger, 1926, p. 104.
- ROST (F.). — Ueber Kernfaerbung an unfixierten Zellen und innerhalb des lebenden Tieres. *Pflueger's Archiv*, CXXXVII, 1910, pp. 359-421.
- SIMONS (H.). — Nouvelle méthode de coloration et de diagnostic des protozoaires sanguicoles dans les gouttes épaisses. *Bull. Soc. Path. Exot.*, XXXI, 1938, pp. 100-106.
- ZUELZER (M.). — Beiträge zur Kenntnis der Morphologie und Entwicklung der Weil'schen Spirochaete. *Arb. kaiserl. Gesundh. Amt*, LI, 1918, p. 159-179.
- Biologische und systematische Spirochaetenuntersuchungen (8. Tagung der Freien Vereinigung fuer Mikrobiologie in Jena 1920). *Zentralbl. f. Bakteriologie*, I. Abtlg. Orig., LXXXV, 1921, pp. 154-167.

Institut de parasitologie de la Faculté de médecine de Paris

(Directeur : Prof. E. Brumpt).