**NOUVELLE METHODE D'ENRICHISSEMENT
POUR CERTAINS SPIROCHÈTES SANGUICOLES
AU MOYEN DU TAUROCHOLATE DE BLEU DE MÉTHYLÈNE**

Par **H. SIMONS**

Pour la recherche et le diagnostic de certains protozoaires sanguicoles (trypanosomes, plasmodies, spirochètes, etc.), il serait d'une très grande importance de pouvoir isoler les parasites du suc des tissus et des organes, de telle sorte que, même en employant de grandes quantités de matériel, on puisse finalement les obtenir isolés. En ce qui concerne les trypanosomes, on sait qu'il est facile d'obtenir ce résultat en centrifugeant le sang. La chose est déjà plus difficile pour les spirochètes et encore plus pour les plasmodies du paludisme.

Hoefer (1919) est arrivé pour le sang presque à la solution idéale de ce problème. Sur 10 cm³ (ou plus) de sang citraté, il fait agir à l'étuve à 37°, dans un tube à centrifuger, un système hémolytique spécifique pour le sang à examiner. Après épuisement, ce système hémolytique, préparé par la méthode sérologique habituelle, est remplacé une ou plusieurs fois, après élimination à la pipette du liquide surnageant et mise en suspension du sédiment, jusqu'à ce qu'on obtienne seulement un culot blanchâtre. En observant une technique sérologique spéciale, qu'on trouvera décrite dans le mémoire original, on arrive finalement à avoir un culot dans lequel « à côté de quelques leucocytes résistants et de noyaux, il n'y a que des parasites, protozoaires, et bactéries, d'ailleurs très peu altérés, car ils ont toujours été en suspension dans un liquide isotonique ».

Hoefer a employé ce procédé avec de bons résultats pour le diagnostic de la tierce et de la récurrente pendant la guerre mondiale.

Je recommande vivement l'étude de sa méthode, qui, malheureusement, ne figure dans aucun manuel international de microtechnique ou de parasitologie, parce qu'on y trouvera aussi beaucoup d'autres indications utiles pour les parasitologues. Une des raisons pour lesquelles ce procédé d'enrichissement des parasites sanguicoles a été méconnu, est la complication incommode résultant de la nécessité d'avoir toujours prêt un système hémolytique à la fois spéci-

fique pour un sang donné et en même temps pas trop actif, de manière à ne pas dissoudre les parasites.

Au cours de recherches encore inédites sur l'action de la saponine et du taurocholate de sodium sur les trypanosomes et les spirochètes sanguicoles, en présence de couleurs d'aniline, j'ai découvert une méthode extrêmement simple pour déceler les spirochètes du type récurrent, dans le sang, le liquide cérébro-spinal, l'urine, la bile, les organes parenchymateux et le système nerveux central, presque électivement en préparations fraîches. Ce procédé repose sur une observation faite occasionnellement par Neufeld et v. Prowazek et par Neufeld et Haendel au cours de leurs recherches sur les trypanosomes et les spirochètes sanguicoles. Ils ont remarqué que des solutions concentrées de sels biliaires, particulièrement de taurocholate de sodium, non seulement hémolysent les hématies, mais aussi les autres cellules du sang, ainsi que celles des organes parenchymateux, tels que la rate, le foie, les reins, de même que celles de l'épiploon (*omentum*) ou de la paroi intestinale. Si j'avais ajouté foi aux autres indications de ces chercheurs, ainsi qu'à une étude postérieure de von Prowazek sur *Spirochaeta recurrentis* et *S. gallinarum* et surtout aux travaux de Noguchi sur *S. recurrentis*, je n'aurais jamais découvert cette méthode si simple et si sûre !

Tous ces chercheurs ont cru notamment que le taurocholate de sodium en solution à 10 p. 100 lysait les spirochètes étudiés par eux ou les détruisait entièrement (Noguchi pour *S. recurrentis*, 1918, 1928). Comme je l'ai déjà démontré, il y a plusieurs mois, dans le laboratoire du Prof. Mesnil à l'Institut Pasteur, puis au cours d'une étude très approfondie dans le laboratoire du Prof. Brumpt à la Faculté de Médecine, ces faits ne concordent pas avec ce qu'on observe pour *S. gallinarum*, *S. duttoni*, *S. persica*, *S. turicatae* et pour le spirochète de Babylone actuellement étudié par le Prof. Brumpt. Même après des jours et des semaines, les spirochètes sont peu attaqués et sont bien loin d'être dissous.

Mon procédé repose, d'une part, sur la non existence de la lyse ou sur l'attaque très lente des spirochètes nommés ci-dessus, par le taurocholate de sodium à 10 p. 100 et, d'autre part, sur la facilité de la lyse dans ce réactif chimique de toutes les variétés de cellules énumérées plus haut.

Recherche des spirochètes dans le sang. — On utilise pour le sang et pour tous les organes et sucs d'organes indiqués plus loin une modification de la formule que j'ai brièvement donnée dans ces *Annales* (1938) pour la recherche des protozaires parasites en

goutte épaisse, dans du sang renfermant des hématies nucléées (1). On mélange 2 cm³ de solution à 10 p. 100 de taurocholate de sodium (Hoffmann-La Roche), en eau citratée ou dans la solution physiologique, avec 1 cm³ d'une solution saturée de bon bleu de méthylène dans la solution physiologique. Ce mélange peut se conserver pendant des mois dans un petit tube bien bouché, surtout à la glacière. Il renferme du taurocholate de bleu de méthylène dissous dans un excès de taurocholate de sodium.

Pour s'exercer à pratiquer la méthode, on se sert de sang nettement positif pour un des spirochètes susnommés. On porte sur une lame 2-4 anses (de 2 mm. de diamètre) de la solution colorante et une égale quantité de sang, en ayant soin de déposer les gouttes séparément et de les mélanger rapidement. En quelques secondes, il se forme une mucosité épaisse, filante, présentant une tendance nette à la dessiccation. On couvre d'une lamelle et on examine. Sur le fond clair, on voit déjà, avec un fort objectif à sec et en diaphragmant correctement, les spirochètes nettement colorés en bleu délicat, tandis que tous les autres éléments cellulaires ont disparu. En diaphragmant fortement et surtout avec un objectif à immersion et le fond noir, on observe que les spirochètes ne sont jamais libres, mais toujours englobés dans les cordons muqueux (2). Je pourrais donc désigner ce procédé sous le nom de « concentration muqueuse ».

Si on passe à du sang renfermant une très petite quantité de spirochètes, on peut, grâce à cette concentration muqueuse, rassembler les spirochètes en un point très limité de la lame. Pour cela, on dépose les gouttelettes de colorant et de sang très près les unes à côté ou au-dessous des autres et on les mélange sur la plus petite surface possible. Grâce à cette méthode, j'ai pu, par exemple, une demi-heure ou une heure après inoculation intrapéritonéale à des souris de 1/2 cm³ d'une suspension très riche en spirochètes, retrouver *S. duttoni* dans le sang périphérique. Cette méthode s'est montrée en outre sûre et rapide pour l'examen du sang de cobayes et de chats inoculés avec le spirochète de Babylone et *S. persica*, de rats porteurs de *S. turicatae* ; avec un chien porteur d'une infection très

(1) *Ann. de paras.*, XVI, 1938, p. 255. La solution originale que je cite n'a qu'une faible teneur en taurocholate. Elle n'agit pas d'une manière aussi électorale, parce que les réticulocytes sont encore conservés assez longtemps ; aussi la mucosité formée est-elle moins visqueuse.

(2) La formation de mucus aux dépens des leucocytes et d'autres éléments nucléés, par l'action du taurocholate de sodium à 10 p. 100, a déjà été décrite par Neufeld et von Prowazek (*loc. cit.*, p. 502) et par Neufeld et Händel (*loc. cit.*, p. 574, 578), mais sans que ces auteurs en aient reconnu l'importance pour le diagnostic des spirochètes.

faible à *S. canis*, j'ai décélé deux spirochètes au fond noir en moins de deux minutes. Tandis que les travailleurs, dans le laboratoire du Prof. Brumpt, doivent chercher souvent longtemps avec l'ancienne méthode des gouttes épaisses colorées au Giemsa, j'ai obtenu des résultats positifs en moins d'une à deux minutes pour tous les spirochètes ci-dessus nommés. Au point de vue quantitatif, la nouvelle méthode de concentration muqueuse des spirochètes tient le milieu entre la préparation fraîche et la goutte épaisse. Un autre grand avantage de cette méthode est l'énorme économie de temps et de matériel (1). Si le résultat est négatif, on fera une goutte épaisse colorée au Giemsa ou par ma méthode rapide au bleu à la saponine (1938), ce qui est excellent pour un diagnostic clinique rapide, médical ou vétérinaire. Si on examine, par exemple, au fond noir, une préparation fraîche épaisse, faite avec 3-4 anses de sang renfermant des spirochètes, on remarque, surtout à l'immersion, outre l'inconvénient des courants de liquide, une diffraction très gênante de la lumière sur les hématies. De plus, lorsque les spirochètes sont très peu nombreux, l'observation *in vivo* est troublée par leurs mouvements et par leur tendance à se cacher entre les piles d'hématies ou à s'enrouler.

La nouvelle méthode, au contraire, rend possible l'examen de plusieurs gouttes de sang dans des préparations de surface relativement faible (lamelles carrées de 18 mm.), parce que, sauf les spirochètes, tous les éléments cellulaires disparaissent, à l'exception de leurs traces dont nous parlons ci-dessous. En même temps, les parasites sont fortement fixés en place par les cordons de mucus, ce qui permet d'explorer la préparation avec la même sûreté qu'un frottis.

Très souvent les préparations réussissent en mélangeant parties égales de sang et de solution colorante. Tantôt on peut mettre un peu plus de sang, une autre fois, il est nécessaire qu'il y ait un peu plus de colorant. Cela dépend de l'état du sang, de l'espèce animale et, avant tout, de la température du laboratoire. Si on obtient rapidement une formation de mucus ayant tendance à se dessécher en quelques secondes, la préparation est réussie. Macroscopiquement, elle doit être nettement bleue, surtout si on travaille avec le fond noir.

J'ai nommé ce procédé méthode *presque* élective d'enrichissement, parce que tous les éléments cellulaires non parasitaires sont morphologiquement détruits, mais ne disparaissent pas sans laisser de

(1) Avec 3 cm³ de colorant au taurocholate, on peut faire 800-1.000 diagnostics rapides de gouttes de sang renfermant des spirochètes nommés ci-dessus et 10-15 secondes suffisent pour faire une préparation.

traces. Par exemple on trouve toujours des formations coccoïdes ou bactérioides, qui, en dehors des souillures bactériennes du colorant, proviennent naturellement des granulations leucocytaires. Elles ne troublent pas la recherche des spirochètes.

Les parasites et les granulations libérées des leucocytes paraissent, sur le fond noir, d'un bleu rouge brillant. Cette apparence s'explique, d'après un renseignement aimablement communiqué par la maison Carl Zeiss (Jena), par une dispersion anormale de la lumière. Cette circonstance et le fait que ni dans le sang, ni dans d'autres liquides tissulaires, ni par la méthode de recherche dans les organes qui va être décrite, il ne se produit de *pseudospirochètes* au sens de Kimura, Pettit, etc., font de cette méthode un procédé idéal pour le diagnostic et la recherche des spirochètes sanguicoles nommés plus haut.

Si on désire enrichir en spirochètes plusieurs cm³ de sang au moyen de ce procédé, il faut opérer comme il suit :

Dans un tube à centrifuger à fond effilé, on mélange par exemple 2 cm³ de sang avec 1 cm³ de solution physiologique citratée et, tout en remuant, on ajoute 1/2 cm³ de colorant au taurocholate. Puis on centrifuge fortement pendant 2 minutes et on aspire le liquide clair presque jusqu'au niveau du sédiment légèrement muqueux. On ajoute alors goutte à goutte de la solution colorante, tout en remuant avec un mince agitateur, jusqu'à ce que la mucosité soit colorée en vert-bleu foncé et soit devenue assez visqueuse, ce qui arrive après addition de 1/2 à 1 cm³ de solution colorante. On examine alors au fond noir plusieurs préparations, faites chacune avec 4 à 6 anses de sédiment muqueux.

Liquide céphalo-rachidien. — Pour les préparations fraîches, on opère comme pour le sang. Pour enrichir, on centrifuge le liquide non dilué, après addition d'un tiers de son volume de colorant, et on procède comme pour le sang. Mais, à cause de la pauvreté en éléments cellulaires, le mucus est moins visqueux qu'avec le sang. Il m'est arrivé, en mélangeant 2 anses de liquide céphalo-rachidien de souris infectées avec *S. duttoni* et tuées à l'acmé de leur infection, avec 2 anses de solution colorante, de déceler des spirochètes assez nombreux ; l'expérience ne réussissait pas lorsque l'infection sanguine était faible ou moyenne.

Urine. — On opère comme pour le liquide céphalo-rachidien.

Bile. — On ajoute un volume double de solution colorante et on centrifuge très fortement pendant 5 minutes. Avec *S. duttoni*, je n'ai

jamais trouvé de spirochètes chez les souris, mais j'ai acquis la certitude que, dans des mélanges artificiels de sang et de bile on peut déceler des spirochètes même très rares.

On peut, au moyen de ce colorant, observer, chez tous ces spirochètes, un *phénomène photodynamique* très particulier. Pour cela, il est utile d'employer un condensateur alternatif à fond clair et fond noir. On met au point les spirochètes à l'immersion sur fond clair et on éclaire le microscope avec une source lumineuse puissante, sans intercaler de verre dépoli d'aucune sorte, pendant une heure et plus ; la coloration bleue des spirochètes ne change pas. On peut s'en assurer facilement en passant au fond noir, avec lequel les spirochètes continuent à paraître rouge vif. Si on laisse ensuite ce point de la préparation ou un autre, soumis pendant 5-20 minutes consécutives à l'éclairage du fond noir, les parasites se décolorent, ainsi que les bactéries et les granulations cellulaires, qui deviennent irréversiblement incolores. La maison Zeiss, faute de matériel de spirochètes, n'a pu reproduire cette expérience et par conséquent fournir une explication de ce curieux effet du fond noir. Il va de soi que ce phénomène ne peut s'expliquer par une dispersion anormale.

Cet effet ne peut pas non plus être produit par la formation d'une leucobase ou par la plus forte concentration lumineuse du fond noir, car il n'a pas lieu avec ma nouvelle méthode au bleu de méthylène-saponine et il est spécial au taurocholate de bleu de méthylène. On peut laisser les préparations pendant plusieurs jours à la lumière, sans qu'elles pâlisent. Pour les préparations d'organes, la décoloration au fond noir se produit souvent en quelques secondes, de sorte qu'on peut penser à un processus enzymatique. L'étude de ce phénomène peut avoir de l'intérêt pour les personnes spécialisées dans les questions de la lumière et des fermentations.

Recherche des spirochètes dans les organes frais. — Laver des tranches, aussi minces que possible, de rate, de foie, de reins, etc., dans la solution physiologique, pour les bien débarrasser du sang. On dissocie avec des aiguilles acérées de petits fragments de ces tranches, dans une goutte pas trop grosse de colorant, sur une lame, et on triture jusqu'à consistance muqueuse. On écarte les parties non dissoutes et on examine au fond noir. Lorsqu'on étudie des organes, il faut que la mucosité soit colorée en bleu foncé ; si cela est nécessaire, on ajoute encore une ou deux anses de colorant. La dissolution des cellules nerveuses du cerveau et de la moelle exige une action très longue, des tranches extrêmement minces, une trituration soigneuse et un excès convenable de réactif.

Si on veut rechercher la teneur en parasites du sang des organes, on appuie et écrase légèrement dans le colorant la surface de section tenue avec une pince, ou bien on triture dans le colorant, avec un agitateur à extrémité aplatie, des fragments d'organes ou de moelle osseuse. Pour traiter de plus grandes quantités d'organes, on broie ces derniers dans un mortier sans addition de liquide, puis, sans interrompre le broyage, on ajoute lentement le colorant au taurocholate, jusqu'à ce qu'on obtienne une mucosité bleu foncé.

Remarque. — Ce procédé ne convient que pour des organes frais. Il ne réussit pas avec *Spirochaeta pallida* et *S. icterohaemorrhagiae* qui sont rapidement attaqués par les solutions concentrées de taurocholate. (Noguchi, 1918).

BIBLIOGRAPHIE

- HOEFER (P. A.). — Eine Anreicherungs-methode zum Nachweis spärlicher intra- und extrazellulärer Blut (Zell-) Parasiten. *Ztbl. f. Bakteriöl.*, I. Abt., Orig., LXXXIII, 1919, p. 601-605.
- KIMURA (R.). — Ueber die sog. Pseudospirochäten. *Folia hæmatol. Arch.*, XXXII, 1926, p. 297-299.
- NEUFELD (F.) und HAENDEL. — Beitræge zur Kenntniss der Wirkung verschiedener blutloesender Gifte, insbesondere des taurocholsauren Natriums und der Seife. *Arb. kais. Gesundh.-Amt*, XXVIII, 1908, p. 572-584.
- NEUFELD (F.) und VON PROWAZEK. — Ueber die Immunitätserscheinungen der Spirochaetenseptikæmie der Hühner und ueber die Frage der Zugehörigkeit der Spirochaeten zu den Protozoen. *Arb. kais. Gesundh.-Amt*, XXV, 1907, p. 494-504.
- NOGUCHI (H.). — Morphological characteristics and nomenclature of *Leptospira* (*Spirochaeta*) *icterohaemorrhagiae* (Inada and Ido). *Journ. exper. Med.*, XXVII, 1918, p. 575-592.
- The spirochetes. Dans : JORDAN (E. O.) and FALK (I. S.), *The newer knowledge of bacteriology and immunology*. Chicago, 1928, p. 452-497.
- PETTIT (A.). — Contribution à l'étude des spirochétidés, Vanves, 1928, Tome premier (I, II, III).
- PROWAZEK (S. von). — Einfluss hæmolytischer Stoffe auf Spirochaeten (*Spiro-nemacea*). *Ztbl. f. Bakteriöl.*, I. Abt., Orig., LXVI, 1912, p. 424-426.
- SIMONS (H.). — Nouvelle méthode de coloration et de diagnostic des protozoaires sanguicoles dans les gouttes épaisses. *Bull. Soc. path. exot.*, XXXI, 1938, p. 100-106.
- Mise en évidence des protozoaires et des spirochètes sanguicoles en goutte épaisse, en présence d'hématies nucléées, par le taurocholate de bleu de méthylène. *Ann. Paras.*, XVI, 1938, p. 254-258.

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