NOUVELLES TECHNIQUES D'EXAMEN DES HELMINTHES :

Fixation ; coloration ; montage

Par J. BAILENGER (1) et E. NEUZIL (2)

La préparation des Helminthes en vue de leur identification et de leur conservation exige la mise en œuvre de procédés délicats compatibles avec la fragilité et la contractibilité de ces organismes.

L'ensemble des techniques que nous proposons s'adresse aux Trématodes, Cestodes, Nématodes et Acanthocéphales. Nous avons été guidés dans leur élaboration par les préoccupations suivantes :

- obtenir un relâchement maximum des vers et le maintenir au cours des différentes étapes de leur préparation ;
- réaliser des préparations suffisamment éclaircies ;
- conserver assez de relief pour garder les rapports topographiques normaux des différents organes.

Ainsi, l'identification des Helminthes sera facilitée par la mise en évidence des détails morphologiques externes et internes, et les diverses mensurations effectuées sur la préparation correspondront à celles que l'on peut réaliser sur l'animal vivant.

Fixation

La fixation correcte des Helminthes doit s'effectuer sur un animal en relâchement complet, relâchement particulièrement difficile à obtenir chez les Trématodes et les Cestodes. L'emploi du menthol avant le temps de fixation, préconisé par Abdel-Malek [1], semble avoir donné à cet auteur des résultats satisfaisants, mais la faible solubilité de cette substance en phase aqueuse ne permet pas d'amener au contact du parasite une quantité suffisante de cet anesthésique et a pour conséquence de prolonger le temps nécessaire à la « relaxation ».

(1) Laboratoire de Zoologie et Parasitologie de la Faculté de Médecine et Pharmacie de Bordeaux.

(2) Centre de Recherches de Biologie Préventive de la Sécurité Sociale.

Pour obtenir des dispersions aqueuses concentrées de menthol, nous nous sommes adressés aux propriétés solubilisantes d'agents superficiellement actifs non ionisés ; parmi ces dernières substances, les dérivés polyoxyéthyléniques des esters gras d'anhydride de sorbitol, ou « tweens » (3), produits dont la toxicité apparaît particulièrement faible, se montrent adaptés aux problèmes posés par la solubilisation aqueuse de substances non hydrosolubles, dans des conditions physiologiques [11, 10]. Le menthol se dissout facilement dans le tween 80 (ester oléique), et la solution limpide ainsi obtenue, mise en présence d'eau, fournit à son tour une dispersion limpide parfaitement transparente lorsque le rapport menthol/tween 80 ne dépasse pas une valeur limite. Notre solution anesthésique correspond à la formule suivante :

Menthol	0,25 g.
Tween 80	5 g.
Eau q.s.p.	100 cc.

Cette solution, qui se conserve plusieurs mois à la température du laboratoire, contient, à volume égal, six fois plus de menthol que la solution aqueuse saturée ; cette dernière, à 20°, n'en renferme en effet que 0,04 gr. p. 100.

Quelques gouttes de notre solution tween-menthol, déposées sur une lame porte-objet ou dans un verre de montre, anesthésient rapidement les Helminthes ; le temps nécessaire au relâchement est évidemment en rapport avec la taille de l'animal, mais toujours plus court qu'avec la solution mentholée d'Abdel-Malek. L'anesthésie est immédiate avec *Hymenolepis nana*, un grand nombre de Nématodes (*Rhabditis macrocerca*, *Oswaldocruzia bialata*, *Enterobius vermicularis*, etc...) ; elle demande environ trente minutes avec *Dicrocoelium lanceolatum*.

Le relâchement parfait étant obtenu, on procède à la fixation proprement dite. Pour les Nématodes, l'alcool bouillant nous a toujours semblé un excellent fixateur, à la fois simple et efficace. Pour les autres Helminthes, le fixateur de Demke [7] nous semble supérieur aux autres réactifs classiques que nous avons expérimentés (formol, liquide de Bouin, etc...). La formule du liquide de Demke est la suivante :

Formol commercial	5 cc.
Acide acétique	5 cc.

(3) Ces produits, fabriqués par la Firme Atlas Powder Co, Wilmington, Del., U.S., nous ont été procurés par la Société des Produits pour l'Industrie et l'Agriculture, 11, rue de Provence, Paris (9^e).

Glycérol	10 cc.
Alcool éthylique	24 cc.
Eau distillée	46 cc.

Le fixateur est jeté bouillant sur les Helminthes en extension, maintenus de préférence, pour les spécimens les plus volumineux, entre deux lames porte-objet. On laisse ce fixateur agir 1 h. 1/2 à 2 heures, puis on lave le parasite à l'eau distillée ; une fixation plus longue ne présente d'ailleurs aucun inconvénient.

Coloration

La coloration classique au carmin chlorhydrique donne en général des résultats satisfaisants, à condition de suivre avec précision la marche de la coloration et la différenciation. Les Helminthes délicats s'accommodent cependant mal de l'alcool à 90° qui constitue le solvant de ce réactif.

Nous avons mis au point un colorant qui présente le double avantage d'être soluble en milieu aqueux et de ne nécessiter pratiquement aucune surveillance au moment de la différenciation. Ce colorant est préparé à partir du Noir Chlorazol E (British Drug Houses) ou du Noir Formique (Geigy) qui paraît lui être identique (4). Le Noir Chlorazol E, étudié dès 1937 par Cannon [4], se prête à des usages biologiques multiples : coloration de protozoaires [8], de petits crustacés [9], de diverses préparations végétales [6], colorations vitales [3]. Le Noir Chlorazol E fournit, avec les différents tissus, des teintes très variables, allant du noir franc au gris-vert et même au rouge ; cette dernière teinte proviendrait d'un colorant acide monoazoïque, impureté habituelle du Noir Chlorazol E qui a été isolée sous le nom de Rose Lignine [5].

Nous avons remarqué qu'un colorant rouge peut également être extrait du Noir Chlorazol E (ou du Noir Formique) par l'acide formique dilué. Il ne nous est pas encore possible d'affirmer l'identité du Rose Lignine et du colorant ainsi extrait (5) ; notons cependant que ce dernier produit présente aussi de fortes affinités tinctoriales pour la lignine (6).

La solution que nous utilisons pour la coloration des Helminthes se prépare en mettant en présence 5 gr. de Noir Formique, 100 cc.

(4) Les termes de Noir Eric EXOO et de Noir Pontamine E sont également des synonymes.

(5) Une étude chromatographique des constituants du Noir Chlorazol E, du Noir Formique et du Rose Lignine est actuellement en cours.

(6) Nous remercions M. G. Tempère, Chef de Travaux et Chargé de Cours à la Faculté, qui a bien voulu réaliser ces derniers essais.

d'eau distillée et 2 cc. d'acide formique ; on laisse en contact quatre à cinq jours, en agitant de temps à autre. On filtre et on recueille le filtrat qui présente une magnifique teinte rose carminée. L'acide formique utilisée va favoriser en outre ultérieurement l'éclaircissement de la préparation.

L'Helminthe est plongé dans le colorant pendant 30 à 45 minutes, selon sa taille ; au sortir du bain, on procède à un lavage rapide à l'eau distillée, puis on immerge la pièce dans de l'eau glycinée chlorhydrique (7) contenue dans un verre de montre. On laisse la solution s'évaporer partiellement à la température du laboratoire ou à l'étuve à 37° ; la différenciation s'effectue, tandis que l'Helminthe s'éclaircit. Si la coloration a été trop poussée et que la différenciation s'avère insuffisante, on effectue un deuxième bain d'eau glycinée chlorhydrique qu'on laisse s'évaporer à nouveau. Le ver est finalement lavé avec de l'eau glycinée à 10 p. 100 et l'on procède au montage.

Montage

Les Helminthes, colorés par le carmin chlorhydrique ou par notre procédé au Noir Formique, peuvent être déshydratés, puis montés classiquement au baume du Canada. Ce procédé de montage provoque malheureusement une rétraction importante de la pièce et atténue les détails de la structure externe et l'impression de relief. Pour pallier à ces inconvénients, nous avons mis au point un nouveau milieu de montage, d'utilisation très simple, basé sur les propriétés de l'alginate de sodium que nous avons déjà mises à profit [2]. Cette substance se présente sous la forme d'une poudre de couleur blanc-crème, qui donne avec l'eau des solutions limpides et fortement visqueuses ; ces solutions, par addition d'un sel de calcium, forment un gel transparent d'alginate de calcium : c'est le gel qui est utilisé comme milieu de montage ; la consistance du gel est réglée par la concentration en alginate, qui doit être fixée en fonction de la viscosité de sa solution aqueuse ; d'autre part, on évite la déshydratation et la rétraction consécutives du gel en ajoutant à la solution d'alginate de sodium une quantité convenable de glycérol, mais un excès de cette dernière substance amènerait une exsudation fâcheuse. Après de multiples essais, nous sommes arrivés à la formule ci-dessous, qui nous a fourni d'excellents résultats (8) :

(7)	Acide chlorhydrique, d = 1,18	0,5 cm ³
	Glycérol	10 cm ³
	Eau, q.s.p.	100 cm ³

(8) Nous avons utilisé pour nos préparations l'alginate de sodium Prolabo. La concentration en alginate indiquée est susceptible de devoir être modifiée

Alginate de sodium	0,75 g.
Eau	30 g.
Glycérol	25 g.

Il est important de dissoudre dans un premier temps l'alginate dans l'eau, à la température ambiante ou plus rapidement au bain-marie à 50°, et de n'ajouter qu'ensuite le glycérol à la solution aqueuse : l'alginate ne se dissout en effet que très lentement dans le mélange eau-glycérol. Cette préparation se conserve sans précautions particulières, à la température du laboratoire. Il est nécessaire de la laisser reposer quelques jours avant l'emploi pour permettre le départ des bulles d'air emprisonnées dans la solution visqueuse au moment de sa préparation.

L'Helminthe coloré est disposé dans une grosse goutte de solution d'alginate glycériné, sur une lame soigneusement dégraissée. On le recouvre d'une lamelle également dégraissée, dont la face inférieure a été préalablement garnie d'une goutte de solution chlorocalcique phéniquée (9). On exerce une légère pression sur la lamelle dès qu'elle arrive au contact de la goutte d'alginate, tandis que se forme une pellicule transparente d'alginate de calcium. La préparation est alors abandonnée pendant quatre à cinq jours à la température du laboratoire pour permettre une déshydratation partielle du gel. Il faut se garder de vouloir hâter cette déshydratation en mettant la préparation à l'étuve, ce qui amènerait la séparation du glycérol du gel.

Si la quantité d'alginate employée a été suffisante, la lamelle se trouve alors bordée d'un bourrelet de gel d'alginate de calcium glycériné que l'on élimine en le découpant avec une lame de rasoir ; on lave ensuite la préparation en la passant sous un filet d'eau et

avec des produits de provenance différente (correspondant donc à des substances de poids moléculaire différent) de manière à obtenir des solutions présentant une viscosité comparable.

(9) Chlorure de calcium anhydre	5 gr.
Phénol	1 gr.
Eau distillée	100 cm ³

PLANCHE I

FIG. 1. — *Oswaldocruzia filiformis*. Extrémité antérieure

FIG. 2. — *Oswaldocruzia filiformis*. Bourse caudale

FIG. 3. — *Prosotocus*. « Papilles » cuticulaires

FIG. 4. — *Prosotocus*. Epines cuticulaires

FIG. 5. — *Prosotocus*. Œufs

FIG. 6. — *Prosotocus*. Œuf et musculature vaginale

on l'essuie très soigneusement avec du papier filtre, de manière à enlever toute trace d'eau et de glycérine au contact du verre. On lute enfin la lamelle : le vernis à ongles ordinaire nous a donné des résultats satisfaisants.

Notre technique de montage présente enfin un autre avantage sur la méthode au baume du Canada : sa réversibilité, qui permet la récupération de la pièce sans lui causer aucune altération. Cette opération s'effectue, après élimination du lut par l'acétone, par action d'une solution aqueuse de sulfate de sodium à 10 p. 100, qui liquéfie le gel d'alginate de calcium en le transformant en alginate de sodium.

Les photographies qui accompagnent cet article illustrent les qualités de notre milieu de montage ; elles ont été prises sur des préparations montées depuis deux ans. On remarquera la netteté des détails de la cuticule céphalique et de la bourse caudale d'*Oswaldocruzia filiformis* ; les œufs de Trématodes n'apparaissent nullement collabés et leur mensuration correcte est donc possible ; notons également la présence d'épines et de « papilles » chez le *Prosotocus* (10) ; les qualités « conservatrices » du montage à l'alginate glycéroiné et le respect des caractères morphologiques ressortent enfin très clairement de l'examen comparatif de deux anneaux de *Tænia saginata*, fixés et colorés dans les mêmes conditions : l'un d'eux, monté à l'alginate, a conservé sa taille primitive ($20,5 \times 9$ mm., largeur déterminée au niveau du pore génital), tandis que l'autre, monté au baume du Canada, ne mesure plus que $18,5 \times 5,5$ mm.

RÉSUMÉ

Nous apportons de nouvelles techniques d'examen des Helminthes qui améliorent les procédés usuels de fixation, de coloration et de montage :

(10) L'un de nous (J. B.) reviendra ultérieurement sur ces caractères anatomiques.

PLANCHE II

FIG 7. — *Hymenolepis nana*. Scolex

FIG. 8. — *Tænia saginata*. Anneau mûr coloré par le colorant extrait du Noir formique et monté :

- à gauche : à l'alginate de sodium glycéroiné ;
- à droite : au Baume du Canada.

1° Le relâchement complet des vers est obtenu grâce à l'emploi d'une dispersion aqueuse concentrée de menthol.

2° Un nouveau colorant, préparé à partir du Noir Chlorazol E, se montre très approprié à la coloration des Helminthes.

3° Le montage à l'alginate de sodium glycérimé fournit des préparations dans lesquelles les dimensions des animaux, les détails morphologiques et le relief sont parfaitement respectés.

Les photographies illustrant ce travail ont été développées au laboratoire de M. le Professeur Castagnou que nous remercions pour l'amabilité avec laquelle il a mis à notre disposition l'équipement remarquable de son service microphotographique.

BIBLIOGRAPHIE

1. ABDEL-MALEK (E. T.). — Menthol Relaxation of Helminths before Fixation. *J. Parasitology*, 37, 1951, 321.
2. BAILLENGER (J.), NEUZIL (E.) et LE HIR (A.). — Utilisation de l'alginate de sodium dans les techniques de montage biologique. *C.R. Soc. Biol.*, 145, 1951, 574.
3. BAKER (J. R.). — Chlorazol Black E as a Vital Dye. *Nature*, 147, 1941, 744.
4. CANNON (H. G.). — A New Biological Stain for General Purposes. *Nature*, 139, 1937, 549.
5. CANNON (H. G.). — On Chlorazol Black E and some other New Stains. *J. Roy. Microscop. Soc.*, 61, 1941, 88.
6. DARROW (M. A.). — A Simple Staining Method for Histology and Cytology. *Stain Technology*, 15, 1940, 67.
7. DEMKE (D. O.). — Staining and Mounting Helminths. *Stain Technology*, 27, 1952, 135.
8. DOBELL (C.). — Researches on the Intestinal Protozoa of Monkeys and Man. *Parasitology*, 30, 1938, 198.
9. HARDING (J. P.). — A Simple Instrument for Dissecting Minute Organisms. *J. Roy. Microscop. Soc.*, 59, 1939, 19.
10. NEUZIL (E.). — Contribution expérimentale à l'étude des propriétés physico-chimiques et biologiques de substances superficiellement actives non ionisées. *Th. Doct. Sc.*, Bordeaux, 1952.
11. NEUZIL (E.) et MARQUEVIELLE (J.). — Technique de solubilisation physiologique de substances non hydrosolubles. *J. de Physiologie*, 42, 1950, 691.

(Chaire de Parasitologie de la Faculté de Médecine de Bordeaux.
Directeur : Prof. R. Sigalas).

FIG. 7
(*Ci-contre*)

FIG. 8
(*Ci-dessous*)