Etude de l'endoparasitisme expérimental de *Trichomonas vaginalis* chez la Souris

IV. Etude histochimique des lésions chez les animaux parasités

par J.-G. GOBERT, M. TRUCHET et J. SAVEL

Laboratoire de Parasitologie de la Faculté de Pharmacie de Paris (P^r R. CAVIER)
4, avenue de l'Observatoire, F 75 - Paris, 6^e.

Résumé

Les auteurs étudient, à l'aide de techniques histochimiques, les modifications engendrées par le parasitisme au niveau des constituants glucidiques, protidiques et lipidiques des cellules hépatiques et pancréatiques.

On note, au niveau du foie et du pancréas, une réaction inflammatoire typique : infiltration histiocytaire ou leucocytaire et présence de substance fibrinoïde de nature glycoprotéique complexe.

On constate dans le foie parasité une déplétion importante du glycogène, même au niveau de territoires non immédiatement au contact des parasites. Ceux-ci se comportent comme une véritable « pompe » à glycogène dont l'effet se fait sentir à distance.

A noter également la richesse du parasite en lipides complexes.

Summary

By histochemical technics, the A.A. pointed out the changes generated by parasitism in glucidic, protidic and lipidic components of hepatic and pancreatic cells.

A typical inflammatory reaction appears in liver and pancreas, and a histiocytic and leucocytic infiltration, together with a fibrinoid complex of glycoprotein composition, are observed. An important depletion of glycogen is patent in the infested liver, even in territories non immediately in touch with the parasites. Those behave like a glycogen pump which is effective distantly. The abundance of lipid complexes in parasites structure is also conspicuous.

Nous avons vu (8,9) dans quelles conditions expérimentales l'endoparasitisme de *Trichomonas vaginalis* chez la Souris était capable de provoquer, au niveau des différents viscères, des lésions qui sont la preuve de l'agressivité que ce flagellé peut développer vis-à-vis d'un biotope exceptionnel, alors que, dans sa localisation vaginale habituelle, il ne détermine que des désordres relativement modestes.

Nous avons entrepris l'étude histochimique de ces lésions dans le but de préciser les effets qu'exerce *Trichomonas vaginalis* dans les organes qu'il parasite, en particulier foie et pancréas, au niveau de leurs constituants glucidiques, protidiques et lipidiques.

I. — Matériel et méthodes :

Les résultats que nous rapportons concernent le foie et le pancréas d'animaux parasités avec *Trichomonas vaginalis* souche S₁₃ rendue pathogène par passage sur l'animal et repiquée sur milieu de Magara avant utilisation.

Nous avons travaillé avec neuf souris femelles Swiss Webster, âgées de six semaines et d'un poids moyen de 20 g au moment de l'infestation. Celle-ci a été effectuée avec 550.000 flagellés préalablement lavés dans du soluté isotonique de glucose et inoculés au sein de 0,8 ml de ce soluté.

Les animaux sont sacrifiés 25 jours plus tard ; les foies et les pancréas porteurs de lésions macroscopiques sont traités en vue de leur étude histochimique. Faute de pouvoir décrire les différents protocoles opératoires, nous indiquerons seulement les références des techniques que nous avons utilisées.

ETUDE DES GLUCIDES.

L'ensemble des substances de nature glucidique est caractérisé par la réaction P. A. S. Parmi les divers constituants de ce groupe, on distingue les glucides complexes acides ou neutres, grâce à la propriété métachromatique.

Pour le P. A. S., la fixation est menée selon la technique de Lison (14) avec le réactif de Rossmann. La réaction proprement dite est faite selon les indications de Mac Manus (15) et de Hotchkiss (13). Les préparations témoins sont traitées avec l'amylase salivaire d'après la technique de Lison (14).

ETUDE DES PROTIDES.

Elle est fondée :

— sur la détection du radical $-NH_2$ par la méthode à la ninhydrine - Schiff d'après la technique de Yasuma et Ichikawa (20) et par la réaction à l'azométhine [Weiss, Tsou, Seligman (19)] ;

— sur la détection des amino-acides à radicaux cycliques, soit par la diazoreaction [Danielli (4)], la réaction de Millon à l'acétate mercurique selon Mirsky, Pollister et Ris (17), la réaction de Glenner (7) au paradiméthylaminobenzaldéhyde ;

— sur la détection des protéines à radicaux $-SH$ par la réaction au disulfure de 2,2' - dihydroxy 6,6' - dinaphtyle [Barnett et Seligman (2)], ou par la réaction au tétrazolium qui vaut aussi bien pour les radicaux $-SH$ et $-S-S-$ [Barnett et Seligman (1)].

ETUDE DES LIPIDES.

Elle se borne aux lipides complexes qui résistent aux manipulations de fixation et d'inclusion.

Elle comporte une fixation par le bichromate de potassium [Chou (3)] et une coloration par le Noir Soudan selon la technique de Lison (14).

II. — Résultats.**A. — CONSTITUANTS GLUCIDIQUES.****• Dans le foie.**

A la différence du tissu hépatique sain qui montre la richesse habituelle en glycogène, réparti dans le cytoplasme en mottes qui disparaissent sous l'action de l'amylase salivaire, le tissu hépatique parasité permet d'observer les images microscopiques suivantes :

Les flagellés semblent occuper d'abord la partie périphérique du foie (photo 1), ce qui confirme les observations histologiques ; ils apparaissent sous la forme de petites cellules, fortement P. A. S. positives, réaction qui disparaît après contact avec la salive, ce qui identifie au glycogène la réserve glucidique de *Trichomonas vaginalis*.

PHOTO 1 ($\times 120$). — On observe, de la périphérie vers l'intérieur, des flagellés, puis des cellules fibroblastiques et des flaqes de substance orangée, ensuite des amas de cellules plus sombres, représentant l'infiltration histiocytaire et enfin des hépatocytes bien délimités, mais dépourvus de glycogène

PHOTO 4 ($\times 120$). — Image de pénétration des flagellés en profondeur à partir de la périphérie.
— Déplétion glycogénique des hépatocytes situés au voisinage de la zone infestée

PHOTO 5 ($\times 1.100$). — Flagellé inclus dans une cellule

PHOTO 2 ($\times 50$). — Remarquer de la périphérie vers le centre : — le tissu hépatique nécrosé avec des flaques de substance orangée ; — la couche de leucocytes ayant subi la dégénérescence granuleuse ; — les quelques files de flagellés ; — la couche de cellules fibroblastiques + de la substance fibroïde — les hépatocytes dépourvus de glycogène, puis les hépatocytes normaux.

PHOTO 3 ($\times 320$). — Même préparation que la précédente. Observer, de gauche à droite, les leucocytes dégénérés, les flagellés, les cellules fibroblastiques avec des macrophages et quelques hépatocytes dépourvus de glycogène.

PHOTO 6 ($\times 50$). — Tissu pancréatique très parasité — œdème important — Grande quantité de tissu fibrinoïde

PHOTO 7 ($\times 120$). — Alignement de flagellés rangés en « palissade »

PHOTO 8 ($\times 800$). — Même préparation montrant les flagellés (colorés en rouge), la substance orangée et les cellules fibroblastiques

PHOTO 9 ($\times 320$). — Couloir de pénétration des flagellés, au sein du tissu pancréatique

En avant des flagellés (photos 1), donc vers l'intérieur du foie, on observe la présence de cellules fibroblastiques et de flaques d'une substance qui a pris une coloration orangée (sans doute sous l'influence de l'orangé G). Enfin, des amas de cellules plus sombres apparaissent comme enclavés au milieu de quelques cellules hépatiques. Plus loin, dans le parenchyme, on rencontre des hépatocytes bien délimités mais dépourvus de glycogène ; il s'agit certainement là d'une conséquence de l'infestation de l'organe, remarquable également par le fait qu'elle se produit dans une zone déjà relativement éloignée des formes parasites. L'ensemble de ces observations permet de conclure à l'organisation d'une défense de la part du foie parasité. Celle-ci est le fait des cellules fibroblastiques et de l'infiltration leucocytaire et histiocytaire. La substance qui se répand en flaques orangées juste en avant des flagellés est, elle aussi, un élément de ce tableau sur la nature duquel nous reviendrons plus loin.

Une image très typique correspond à un aspect de « front » ou de « bataille rangée » (photo 2 et photo 3) ; on observe, disposés en couches :

- le tissu hépatique nécrosé, avec présence de larges flaques de substance fibroïde de couleur orangée ;
- une couche de leucocytes ayant subi la dégénérescence granuleuse ;
- quelques files de flagellés, régulièrement alignés et faisant face à :
 - une couche de cellules fibroblastiques au milieu de traînées de substance fibroïde rose ;
 - des hépatocytes encore intacts mais privés de leur contenu glycogénique.

Ce n'est que dans les points les plus éloignés de cette zone d'affrontement qu'il est possible d'observer des cellules parfaitement intactes encore pourvues de leur glycogène. Ces trois dernières zones, parenchyme sain, parenchyme sans glycogène, cellules fibroblastiques, sont infiltrées de formes histiocytaires qui viennent sans doute participer à la défense de l'organe.

Ces images, qui témoignent d'une réaction parfaitement organisée, sont à rapprocher, mutatis mutandis, de celles que décrivent Frost et Honigberg après infestation par voie sous-cutanée (5).

La pénétration parasitaire au sein du parenchyme hépatique peut cependant revêtir d'autres aspects ; c'est ainsi que la photo 4 illustre une invasion qui provient toujours de l'extérieur mais semble avoir trouvé rapidement une zone de moindre résistance qui lui a permis de s'infiltrer en coin, très en avant dans le tissu. On n'observe qu'une médiocre réaction fibroblastique et les histiocytes sont absents.

Comme il est habituel de le constater, les hépatocytes situés au voisinage de la zone d'invasion ont subi une déplétion glycogénique d'autant plus complète qu'ils sont situés plus près des flagellés.

Il est assez rare d'observer un flagellé inclus dans une cellule. Nous avons cependant pu saisir ce phénomène sur la photographie 5. Elle confirme les observations des auteurs qui ont montré cette présence à l'intérieur des cellules de foie d'embryon de Poulet en culture. Honigberg et Ewalt (12), en effet, décrivent la présence de *Trichomonas* dans les macrophages et les cellules épithéliales.

En ce qui concerne ce qui précède, toutes les épreuves de contrôle, contact avec la salive, épreuve à l'eau distillée, témoin P.A.S. sans oxydation, établissent que les substances P.A.S. positives sont bien constituées par du glycogène et que la substance fibrinoïde, insensible à l' α -amylase salivaire, possède une structure glucidique non glycogénique.

• *Dans le pancréas.*

En contraste avec les acini bien organisés de la partie exocrine d'un pancréas sain, le pancréas parasité est le siège d'une désorganisation profonde du tissu, sous l'influence d'une infiltration générale par les flagellés (photo 6). Dans les zones moins touchées, on observe un œdème important et, partout, la substance fibrinoïde est présente en quantité importante.

Il est à peu près évident que le pancréas est abordé de l'extérieur : à cet égard, les photos 7 et 8 sont particulièrement représentatives. Elles montrent un alignement de flagellés, rangés en palissade, semblables à ceux que nous avons déjà observés et décrits et que Frost et Honigberg (23) avaient eux-mêmes retrouvés.

Ce même aspect se retrouve dans la photo 9, mais, cette fois, avec un profil circulaire. Cette image doit correspondre sans doute à la coupe transversale d'un « couloir » de pénétration. On observe, alentour, l'habituelle présence de substance fibrinoïde.

En ce qui concerne les réactions décelant les mucopolysaccharides, nous avons noté l'absence de métachromasie sur nos coupes de foie et de pancréas pour les M.P.S. à groupements SO_3H et COOH ; il ne semble donc pas qu'il s'agisse de mucopolysaccharides acides si bien que la substance fibrinoïde présente aussi bien dans le foie que dans le pancréas paraît être constituée de mucopolysaccharides neutres.

B. — CONSTITUANTS PROTIDIQUES.

Quelle que soit la réaction utilisée, les images observées montrent la présence de substances protidiques au niveau des zones particulièrement parasitées et infiltrées de substance fibrinoïde. La localisation précise des réactions a pu être obtenue en effectuant chaque fois, sur deux coupes identiques, dans un cas la réaction désirée, dans l'autre une réaction P.A.S.

• *Foie :*

Le tissu hépatique sain ne fournit que des réactions faibles et uniformes dues aux protides constitutifs. Pour le tissu hépatique parasité, nous avons pu lire les résultats fournis par :

- la réaction à la ninhydrine-Schiff (rad. NH_2) ;
- la diazoréaction (rad. cycliques) ;
- la réaction de Glenner (rad. cycliques) ;
- la réaction au tétrazolium (rad. soufrés).

Dans tous les cas, sur les préparations de foie parasité, les réactions s'affirment au niveau des zones très atteintes par le parasitisme et riches en substance fibrinoïde ; tout le reste correspond à une réaction négative fournie par les hépatocytes encore sains,

même s'ils sont appauvris en glycogène ; dans ce cas, d'ailleurs, les colorations du fond apparaissent un peu plus soutenues que sur les coupes de foie normal et ceci s'explique sans doute par la disparition du glycogène.

• *Pancréas* :

Nous pouvons faire à ce niveau des observations analogues. Les colorations témoins sont uniformes, en général assez soutenues à cause sans doute de la présence des grains de zymogène.

Les réactions fortement positives sont, là encore, le fait des zones fortement parasitées et infiltrées et sont surtout localisées au niveau des plages de substance fibrinoïde.

C. — CONSTITUANTS LIPIDIQUES.

Les préparations colorées au Noir Soudan montrent la présence de lipides complexes au niveau des zones parasitées ainsi que des gouttelettes des mêmes lipides dans le cytoplasme des flagellés (photo 10).

PHOTO 10 ($\times 1.200$). — Même préparation montrant un flagellé coloré au Noir Soudan

III. — Discussion.

La réaction P.A.S., jumelée à l'épreuve de l' α -amylase salivaire, a permis de mettre en évidence :

— l'importance de la teneur en glycogène de *Trichomonas vaginalis*. Ce fait constitue la vérification cytochimique des résultats obtenus grâce à des dosages biochimiques

par plusieurs auteurs et rapportés par Michaels (69) où le glycogène représente environ 20 p. cent du poids sec de la cellule.

— le « tropisme glycogénique » que présente *Trichomonas vaginalis*. Abordant le foie par l'extérieur, ce que confirme l'histologie, le flagellé provoque à son contact, et même à distance la déplétion glycogénique des hépatocytes. Ce phénomène est d'autant plus net et généralisé que le parasitisme est plus important.

Ce phénomène histologique est à rapprocher de la baisse de la glycémie chez les souris très parasitées comme nous l'avons constaté par ailleurs.

— la fragilité du pancréas vis-à-vis de l'invasion des flagellés. Le tissu pancréatique est rapidement altéré et dissocié de telle sorte que les images réactionnelles en couches successives que nous venons de décrire sont bien moins nettes dans cet organe que dans le foie.

Il semble que ce soit au niveau des plages d'infiltrat fibrinoïde que les groupements protidiques détectables se trouvent concentrés.

IV. — Conclusion.

— La présence de *Trichomonas vaginalis* dans le foie et le pancréas détermine une réaction inflammatoire typique dont nous avons décrit plus haut les principaux éléments : infiltration histiocytaire ou leucocytaire et présence de substance fibrinoïde.

— On constate dans le foie parasité un appauvrissement important des hépatocytes en glycogène au profit, tout au moins en partie, des flagellés qui se présentent comme une sorte de « pompe » à glycogène.

— L'abord, par le parasite, des organes par la périphérie semble bien confirmé.

— L'étude histochimique nous apprend que la substance fibrinoïde est constituée en partie par des mucopolysaccharides neutres.

— En ce qui concerne les protides et les lipides, l'étude histochimique a permis de les localiser surtout au niveau des zones parasitées.

— Le flagellé semble lui-même très riche en lipides complexes ;

— La substance fibrinoïde a une structure complexe de nature glycoprotéique ; la partie protéique peut contenir les formations aussi variées que les cycles indole ou pyrrole, le radical phénol ou les groupements —SH et —S—S—.

Bibliographie

1. BARNETT (R.-J.) et SELIGMAN (A.), 1954. — *J. Nat. Cancer. Inst.*, 14, 769, in Lison (*op. cit.*).
2. — et —, 1952. — *J. Nat. Cancer Inst.*, 13, 215, in Pearse (*op. cit.*).
3. CHOU (J.-T.-Y.), 1957. — *Quart. J. Micro. Sc.*, 98, 47-59 et 431, in lison (*op. cit.*).
4. DANIELLI (J.-F.), 1947. — *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 1, 101 (variante Burstone 1955).
5. FROST (J. K.) et HONIGBERG (B. M.), 1962. — Comparative pathogenicity of *Trichomonas vaginalis* and *Trichomonas gallinae* to mice. II. — Histopathology of subcutaneous lesions. *J. Parasit.*, 48, 898-918.

6. GABE (M.), 1968. — *Techniques histologiques*, Masson Ed., Paris.
 7. GLENNER (G.-G.), 1957. — *J. of Histochem and cytochem*, 5, 297, in Pearse (*op. cit.*).
 8. GOBERT (J.-G.), 1970. — Contribution à l'étude de l'endoparasitisme expérimental de *Trichomonas vaginalis*. Thèse d'Etat en Pharmacie.
 9. —, GEORGES (P.), GOBERT (N.), SAVEL (J.), 1969 a. — Etude de l'endoparasitisme expérimental de *Trichomonas vaginalis* chez la Souris. I. Conditions d'installation et obtention de lésions viscérales avec diverses souches du Flagellé. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 6, 677, 686.
 10. —, —, SAVEL (J.), GENET (P.) et PIETTE (M.), 1969 b. — Etude de l'endoparasitisme expérimental de *Trichomonas vaginalis* chez la Souris. II. Etude cytologique et histologique. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 6, 687, 696.
 11. —, — et —, 1969 c. — Etude de l'endoparasitisme expérimental de *Trichomonas vaginalis* chez la Souris. III. Essais d'installation d'une souche réfractaire de *Trichomonas vaginalis*. Interprétation des résultats. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 6, 697, 708.
 12. HONIGBERG (B.-M.) et EWALT (A.-C.), 1963. — Preliminary observation on pathogenicity of *Trichomonas vaginalis* in cell culture. *Progress in Protozool.*, 368, 569.
 13. HOTCHKISS (R. D.), 1948. — *Arch. Bioch.*, 16, 131, in Lison (*op. cit.*).
 14. LISON (L.), 1960. — *Histochimie et cytochimie animales*, 3^e éd., vol. I et II, Gauthier-Villars Ed., Paris.
 15. MAC MANUS (J. E. A.), 1946. — *Nature*, 158, 202, in Lison (*op. cit.*).
 16. MICHAELS (B. M.). — Chemotherapy of Trichomoniasis. *Advances in Chemotherapy*, 3, 39, 108.
 17. MIRSKY, POLLISTER et RIS, 1946. — In Lison (*op. cit.*).
 18. PEARSE (A. G. E.), 1960. — *Histochemistry* Churchill Ed., 2^e éd., Londres.
 19. WEISS, TSOU et SELIGMAN, 1954. — *J. Histochem and cytochem*, 2, 29, in Gabe (*op. cit.*).
 20. YASUMA (A.) et ICHIKAWA (J.), 1953. — *Labor. Clin. Med.*, 41, 296, in Pearse (*op. cit.*).
-