

50376
1965
84

FACULTE DES SCIENCES DE LILLE

50376
1965
84

DIPLOME D'ETUDES SUPERIEURES

(Sciences Naturelles)

Liliane L O G A

CONTRIBUTION A L'ETUDE HISTOCHIMIQUE
D'UNE GREGARINE

Présenté en juin 1965
devant la commission d'examen



Jury d'examen

M. DURCHON, Président

R. DEFRETIN

Examineurs

E. VIVIER

S O M M A I R E

INTRODUCTION	p. 1
MATERIEL	p. 2
HISTORIQUE	p. 3
TECHNIQUES	p. 11
PRELEVEMENT DES PIECES	p. 11
FIXATEURS	p. 11
INCLUSION	p. 12
COUPES ET COLLAGE	p. 12
REACTIONS HISTOCHIMIQUES	p. 12
OBSERVATIONS ET DISCUSSIONS	p. 22
RECHERCHE DES GLUCIDES	p. 22
RECHERCHE DES LIPIDES	p. 24
RECHERCHE DES PROTIDES	p. 25
RECHERCHE D'ENZYMES	p. 28
CONCLUSION	p. 30
BIBLIOGRAPHIE	p. 31

I N T R O D U C T I O N

Les Grégarines dont la forme végétative était connue depuis 1843 - (MINGAZZINI) n'ont fait l'objet que de peu de travaux en cytochimie.

Nous allons essayer de contribuer à l'étude histochimique d'une Grégarine, afin d'apporter quelques clartés sur la nature des différents éléments du cytoplasme, que nous révèle la microscopie électronique.

M A T E R I E L

Notre étude portera sur une Grégarine : *Lecudina tuzetae* Schrevel, parasite du tube digestif d'une Annélide Polychète *Nereis diversicolor* O. F. Müller, récoltée dans le petit port de Boulogne.

SCHREVEL (1963) en a fait la diagnose. Il a décrit des trophozoïtes de forme massive, possédant une protubérance antérieure hémisphérique, de nature ectoplasmique qui repose sur un endoplasme granuleux, dans la région moyenne ovoïde. Celle-ci contient un noyau sphérique, à position centrale ou latérale.

La zone antérieure est décrite en tant qu'appareil de fixation du parasite.

Ces parasites, dits "Monocystidés", sont situés soit entre la basale et l'épithélium intestinal, soit dans la lumière intestinale.

HISTORIQUE

Peu de travaux ont jusqu'à présent été publiés à propos de l'étude histochimique chez les Grégarines.

Le cytoplasme des Grégarines est rempli de granulations que HENLE (1845) considérait comme des corpuscules calcaires, tandis que STEIN les croyait de nature grasseuse.

BUTSCHLI en 1871 est le premier auteur qui reconnaît la nature de ces granulations. Il étudie l'action des acides minéraux à diverses concentrations et dans des conditions différentes de température, il note l'insolubilité des granules dans l'alcool et l'éther, fixe la réaction de l'iode qui les colore en brun rouge, coloration passant au violet par l'action de l'acide sulfurique et conclut en les rapprochant de substances amyloïdes.

SCHNEIDER (1875) reconnaît l'action de l'iode sur ces granulations. Il remarque chez "*Clepsidrina ovata*" et plus rarement dans "*Clepsidrina blattarum*" des gouttelettes de graisse d'un beau jaune d'or apparaissant après la sortie des spores".

FRENZEL (1885) pense pouvoir démontrer que les granulations des Grégarines sont de nature albuminoïde.

BUTSCHLI (1885) montre que la réaction de Millon est négative. Par action de la salive à 40°, les granulations se transforment en un sucre réduisant la liqueur de Fehling. Il conclut à l'existence d'une substance de réserves voisine du glycogène : le paraglycogène.

MAUPAS (1886) reconnaît que les granules existent dans un grand nombre de Grégarines. Par l'action de l'eau, ils peuvent se gonfler et sont formés de couches concentriques stratifiées. A la lumière polarisée, ils présentent une croix de polarisation semblable à celle de l'amidon végétal. MAUPAS propose alors de désigner ces granules sous le terme de zooamylon.

SCHNEIDER (1887) trouve dans *Clepsidrina granulosa* et *Stephanocephalus iuli*, des granulations réfringentes colorables au carmin comme le nucléole.

HENNEGUY (1893) étudie *Monocystis agilis*. Le paraglycogène présente une zone centrale non colorée dans chaque grain.

Le mémoire de FRENZEL (1892), première étude détaillée sur l'organisation des diverses parties d'une Grégarine marque une date importante de cet historique. L'auteur fait ses recherches sur six espèces et établit la liste des substances formant le corps :

- 1°- l'alcéoline, trame des alvéoles, insoluble dans les acides, bases, la salive, sans action sur l'iode, colorée par le carmin, qui serait de nature albuminoïde
- 2°- la paralvéoline imprégnant l'alvéoline mais dissoute par la salive à 42°, se rapprocherait des substances celluloses
- 3°- le paraglycogène
- 4°- des gouttelettes de graisse dans le protomérite de certaines Grégarines.

LEGER (1904) indique la présence de corps chromatides caractérisés par leurs affinités pour les colorants basiques nucléaires chez *Gregarina maculata* et *Stylorhynchus longicollis* et remarque qu'il faut les considérer comme des déchets du noyau.

DRZEWIECKI (1904) trouve des corps amyloïdes et des chromidies dans *Monocystis porrecta*.

KUSCHAKEWITSCH (1907) signale l'existence de paraglycogène dans le cytoplasme de Grégarines parasites du *Tenebrio molitor*.

COMES (1907) décrit chez *Stephophora iuli* une zone périnucléaire où se font les échanges du noyau au cytoplasme, et qui serait riche en diastases.

HESSE (1909) indique l'existence de paramylon chez les Monocystidés.

HIRSCHER (1914) trouve dans *Monocystis ascidia* des mitochondries en granulations répandues dans le cytoplasme mais plus abondantes autour du noyau.

GOODRICH et FIXELL-GOODRICH (1920) décrivent dans *Gonospora minchini* de petits corps colorables par l'hématoxyline et la fuchsine qui rappellent les lamelles mucoïdes trouvées dans *Nina gracilis* par DUBOSCQ et LEGER.

Dans sa thèse publiée en 1926, JOYET-LAVERGNE apporte quelques clartés sur la nature, la structure et l'évolution des différents éléments d'un Sporozoaire.

Parmi les caractères qui lui ont servi à distinguer le chondriome, il faut citer la sensibilité des mitochondries à l'acide acétique, à l'alcool et à la chaleur. Au point de vue des colorants, les affinités des mitochondries sont très variables : le fer dans l'hématoxyline ferrique est bien retenu par le chondriome mais n'est pas assez électif ; la fuchsine plus élective n'est cependant pas non plus spécifique car elle colore aussi les albuminoïdes et le noyau. Le chondriome serait un complexe lipo-protéique, fait déjà signalé par MAYER et SCHAEFFER (1910).

Sous le nom d'appareil de Golgi, il range les formations révélées par la méthode osmique et la méthode à l'argent, qui sont plus sensibles aux acides, plus osmiophiles, plus argentophiles que le chondriome et aussi plus grosses et moins nombreuses dans le cytoplasme où elles sont réparties plus irrégulièrement. Les affinités de l'appareil de Golgi pour l'acide osmique, sa résistance à l'action des solvants des graisses sont deux raisons qui rendent assez plausible l'hypothèse d'une constitution lipoïde de l'appareil. Cependant les méthodes de recherches des lipoïdes ne donnent pas l'appareil de Golgi ; en effet, plus sensible aux acides que les mitochondries, il n'est en général pas conservé. CIACCIO (1912), en parlant des com-

binaisons stables entre les protéines et les lipoides dit "il n'est pas possible de les déceler par les réactifs des graisses". Les résultats négatifs obtenus concordent avec l'hypothèse de la constitution lipoprotéique de l'appareil de Golgi, qui ne semble d'ailleurs pas rigoureusement constante selon WEIGL (1912) et CAJAL (1914).

Le paraglycogène : ses caractères ont été indiqués précédemment. JOYET-LAVERGNE affirme qu'aucune coloration spécifique n'a été décelée et que ses affinités pour les colorants sont toujours faibles. A celle pour le violet de gentiane, il faut ajouter celle qu'il manifeste pour le bleu de méthyle, réaction qui doit être complétée par celle de l'iode pour constituer une méthode de recherche du paraglycogène. Son existence a été reconnue dans un grand nombre de Grégarines. Il constitue la masse la plus importante du cytoplasme d'un sporadin ou d'un céphalin et se présente sous forme de sphérules dont la taille augmente légèrement avec la croissance de la Grégarine. Chaque sphérule possède un hile central, zone très réfringente, rappelant l'aspect de certains hiles d'amidon végétal (MOLLIARD, 1921).

HENNEGUY (1883) a montré sa forme en croix colorable dans la Grégarine *Monocystis agilis*.

Les lipoides et les graisses

JOYET-LAVERGNE en reconnaît l'existence dans les Grégarines. L'étude chimique chez *Nina gracilis* fait apparaître leurs affinités pour le Soudan III, le Scharlack R et la chlorophylle. Parmi les réactions de lipoides, la coloration par le bleu de toluidine (LOISEL, 1903) la teinte grise que donne l'acide osmique (CIACCO, 1910) sont des caractéristiques de lipoides des Sporozoaires. Comme les phosphatides, ils se colorent en bleu par le Nilblau et leur insolubilité dans l'acétone les rapproches des lécithines.

Les graisses neutres se colorent en noir par l'acide osmique et elles ne sont pas insolubilisées par les fixateurs chromiques, elles sont solubles dans les solvants des graisses en particulier dans l'acétone.

Chez *Nina gracilis*, les granules lipoides sont à l'extrémité antérieure du cytoplasme du sporozoïte ; à la périphérie du deutomérite et dans le protomérite chez le céphalin.

Etant donné la variété des types étudiés, JOYET-LAVERGNE considère les lipoides comme constituant un élément fondamental du cytoplasme.

Les réserves albuminoïdes

Des diverses méthodes utilisées pour les déterminer, c'est le réactif de Millon qui aurait donné les meilleurs résultats. Ces réserves albuminoïdes contiennent une assez grande teneur de phosphore et JOYET-LAVERGNE les a appelées "réserves albuminoïdes phosphorées". Dans la double coloration safranine et violet de gentiane, le chromiome retient ce dernier colorant tandis que les albuminoïdes sont teintées par la safranine. La masse albuminoïde constitue une réserve peu abondante dans le cytoplasme. Les corpuscules ovoïdes sont pourvus d'une calotte mitochondriale.

Chez *Stylorhynchus longicollis* l'origine nucléaire de ces réserves est très nette.

Les réserves albuminoïdes et les chromidies

JOYET-LAVERGNE désigne comme chromidie toute formation cytoplasmique d'origine nucléaire, qui par un ensemble de caractères chimiques la rapproche nettement de la chromatine. Ainsi chez les Grégaires, on peut dire que les réserves albuminoïdes sont de véritables chromidies.

La volutine, que MEYER (1904) considère comme un dérive de l'acide nucléique est selon JOYET-LAVERGNE difficile à distinguer des chromidies.

L'alvéoline qui constitue fréquemment la trame du cytoplasme est une substance albuminoïde fondamentale ayant des affinités pour les colorants plasmatiques. Sur elle, se disposent les éléments du chondriome. L'alvéoline de FRENZEL (1892) est donc le résultat de la coagulation de deux substances distinctes : le chondriome et une substance albuminoïde. Elle se présente sans forme définie, comme un fluide dans tout le cytoplasme.

Ainsi JOYET-LAVERGNE décrit dans le cytoplasme d'une Grégarine 6 éléments distincts :

- 1°- le hyaloplasme ou protoplasme fondamental
- 2°- le chondriome
- 3°- les éléments de Golgi
- 4°- le paraglycogène
- 5°- les lipoïdes et les graisses
- 6°- les réserves albuminoïdes phosphorées.

Dans son traité de zoologie, GRASSE signale des sphérules protéiques encombrant sur le vivant le cytoplasme hyalin du sporozoïte chez *Porospora* sur les préparations fixées, le cytoplasme contient des mitochondries granuleuses sauf dans la région antérieure et outre l'appareil de Golgi, il renferme aussi quelques granules de nature lipidique.

Chez les trophozoïtes, la structure cytologique varie peu. Sous l'ectocyte, l'endoplasme ou endocyte est riche en enclaves vivantes et surchargé de deutoplasme quand il appartient à un trophozoïte âgé. Le chondriome des jeunes trophozoïtes se compose exclusivement de "mitochondries granuleuses" et chez les plus âgés de chondriomites et de chondriocontes.

L'appareil de Golgi des sporozoïtes prend l'aspect de dictyosomes typiques en écailles avec substances chromophile et chromophile dispersées dans le cytoplasme.

Les enclaves paraplasmiques

Le paraglycogène découvert et dénommé par BUTSCHLI représente l'élément essentiel de la Grégarine. En outre, l'endoplasme contient des granules que les anciens auteurs nommaient chromidies et qui sont :

- a- des chromidies vraies faits de volutine, ayant une réaction plasmale positive
- b- des grains protidiques décrits par JOYET-LAVERGNE
- c- des grains lipidiques correspondant à des phosphatides et des graisses neutres.

Le noyau

Chez le Sporozoïte, il contient deux grains de chromatine situés aux antipôles. L'antérieur devient un corps arrondi faiblement colorable par les colorants basiques.

Tous les nucléoles de Grégarines ne paraissent pas avoir la même composition chimique. Les uns se colorent comme ceux des Méta-zoaires, les autres se teignent légèrement par le vert de méthyle acétique. Le suc nucléaire tient en suspension divers granules colorables qui seraient les produits figurés de la désintégration des nucléoles. Alors que la réaction nucléaire de FEULGEN est positive pour le noyau des sporozoïtes et des jeunes trophozoïtes, elle devient négative pour celui des gros trophozoïtes et des sporadins.

La sexualisation des plasmas (GRASSE)

Ce sont LEGER et DUBOSCQ (1909) qui ont créé la notion de sexualisation du cytoplasme. Il existe dans une espèce donnée une différence constante entre les deux gamontes associés. Des grains cyanophiles apparaissent plus gros dans l'un que dans l'autre des conjoints. Dans plusieurs espèces, les sporadins encore libres se teignent différemment pour un même colorant vital : les uns ont une teinte jaunâtre, les autres rouge, témoignant pour les premiers une réaction alcaline

les autres acide. JOYET-LAVERGNE (1926) a montré que les différences de colorabilité ne tiennent pas à des inégalités de pH mais de rH, dûes à des teneurs inégales de glutathion. Mais RIES (1937) a montré que le noyau souvent très riche en glutathion demeure à peu près indifférent dans les processus d'oxydo-réduction.

Le chondriome des Grégarines mâles est nettement plus basophile et plus abondant que celui des femelles. Les dictyosomes sont plus nombreux dans le sexe mâle que dans le sexe opposé qui contient davantage de grains lipidiques. Les grains cyanophiles sont des réserves protidiques jusqu'à 2 de diamètre chez le mâle. Dans le gamonte femelle, les réserves protidiques grossissent, sont peu colorables et ont jusqu'à 4 .

La quantité de paraglycogène est à peu près la même dans les deux conjoints, mais les sphérules sont nettement plus grosses chez la femelle que chez le mâle.

La nature chimique des substances sexuelles cytoplasmiques serait à préciser.

T E C H N I Q U E S

I - PRELEVEMENT DES PIÈCES

Les échantillons de *Nereis diversicolor* sont placés, un quart d'heure environ, dans un bain de MS 222 qui les anesthésie. Sous binoculaire, on dissèque l'animal pour mettre en évidence l'intestin dont on prélève un fragment de la zone postérieure. Celui-ci ouvert longitudinalement est observé à plus fort grossissement ou placé entre lame et lamelle sur la platine du microscope. S'il présente des petites boules blanchâtres dans sa lumière ou attachées à la paroi, il s'agit de Grégariines : l'intestin est donc parasité. On prélève alors soit des portions d'intestin isolé, soit des fragments de ver dans les 2/3 postérieurs de l'animal.

II - FIXATEURS

Les portions d'intestin isolées ayant au plus 5 mm sont fixées directement. Les fragments de ver sont fixés d'abord pendant 5 minutes. On leur enlève alors les parapodes et des portions de ver de 5 mm sont coupées et remises dans du fixateur frais. Le temps de fixation est variable selon le fixateur utilisé, lui-même fonction de la réaction histochimique qui sera réalisée par la suite.

On utilise :

- le formol à 10 % pour la mise en évidence de protides, de glucides et de lipides
- le carnoy (deux heures de fixation), solution de chloroforme d'alcool absolu et d'acide acétique cristallisable, pour les histones et le glycogène
- l'alcool à 30° glacé et l'acétone absolu dans le cas de phosphatases basique et acide respectivement.

III - INCLUSION DES PIÈCES

1- à la paraffine

Les pièces déshydratées par passages successifs dans l'alcool à 95°, puis 100°, sont imprégnées par deux bains de toluène et mises pendant une nuit dans un bain de paraffine à l'étude (50°). Les blocs sont obtenus au moyen des barres de Leuckart.

2- à la gélatine pour les coupes à congélation

25 g de gélatine en feuilles sont ajoutées à 10 cc d'eau et placées une heure à l'étuve (50°). La solution obtenue est filtrée sur de la gaze à l'étuve (37°).

Les pièces fixées au formol baignent dans le filtrat, pendant une nuit à l'étuve (37°). Les blocs obtenus au moyen de moules en verre glycérinés sont gardés dans une solution de formol à 10 %.

IV- COUPE ET COLLAGE DES PIÈCES

Les coupes ont 6 à 7 μ d'épaisseur.

V - REACTIONS HISTOCHIMIQUES

A- Recherche des protéines

1- Protéines totales par le bleu de bromophénol mercurique

+ Modifications de BONHAG

- Les pièces sont déparaffinées par 3 bains successifs de toluène, puis d'alcool absolu et 96° (comme avant toute coloration).

- puis plongées dans la solution colorante, dont la composition est : 1 % HgCl_2 + 0,05 % de bleu de bromophénol dans une solution aqueuse à 2 % d'acide acétique - pendant 2 heures à température ordinaire.

- rincées 5 minutes dans une solution acide acétique 0,5 %

- plongées dans l'alcool butylique tertiaire (qui évite le rajustage de pH pour obtenir le bleu.

- Le montage des lames et lamelles s'effectue après passages successifs dans 3 bains d'alcool à 96° et absolu et 3 bains de toluène, au baume du Canada en général.

2- Protéines basiques. Démonstration par la méthode de ALFERT et GESCHWIND (1953)

Pour éviter le décollement des coupes, celles-ci sont colodionnées après déparaffinage.

La préparation est traitée 15 minutes au bain-marie bouillant par une solution à 5 % d'acide trichloracétique.

Laver dans 3 bains d'alcool à 70°, 10 minutes chacun, puis à l'eau distillée.

On colore 30 minutes dans une solution à 0,1 % de Fast Green F.C.F. ajustée à pH 8-8,1 au moyen de soude à 1 % utilisée goutte à goutte.

On lave 5 minutes à l'eau distillée et passe directement à l'alcool à 96° avant de monter.

3- Détermination des radicaux électropositifs totaux (amino + guanidyl + imidazol) par l'acidophilie totale

+ Procédé de DEITCH (1955)

- Colorer 15 minutes par une solution à 1 % de jaune naphtol S (sel dipotassique de l'acide 2.4-dinitro-1 naphtol-7 sulfonique) dans l'acide acétique à 1 %.

- Sans laver, les préparations sont différenciées dans de l'acide acétique 1 % pendant 15 à 24 heures, puis essorées sur papier filtre et déshydratées par l'alcool butylique tertiaire (qui n'extraît pas le colorant au contraire de l'alcool éthylique).

- Après passage au xylol, elles sont montées au baume. La différenciation a pour objet l'élimination de l'excès de colorant lié de manière lâche au moment de la coloration. Elle atteint rapidement un équilibre stable.

4- Radicaux amino. Démonstration par la réaction de désamination oxydative. Réaction à la ninhydrine-Schiff.

+ Procédés de YASUMA et ICHIKAWA (1953)

- Les coupes déparaffinées venant de l'alcool absolu sont traitées par une solution à 0,5 % de ninhydrine pendant 5 à 24 heures à la température de 37°C ; et lavées quelques minutes à l'eau courante.

- Les préparations trempent ensuite pendant 30 minutes dans le réactif de Schiff et sont rincées dans 3 bains successifs d'eau sulfureuse fraîchement préparée (eau distillée + bisulfite de sodium + acide chlorhydrique normal) de deux minutes chacun.

- Après rinçage à l'eau distillée, elles sont montées au baume.

Les radicaux aminés libres sont colorés en rouge.

5- Radicaux SH - Démonstration par le ferricyanure ferrique

+ Procédé de CHEVREMONT et FREDERIC (1943)

- Les préparations sont traitées pendant 3 fois 6 à 8 minutes dans 3 bains successifs du réactif suivant fraîchement préparé et filtré : solution à 0,1 % de ferricyanure de potassium 25 ml

+ solution à 0,1 % de sulfate ferrique 75 ml

Le réactif ne se conserve que quelques heures et doit être abrité de la lumière vive.

- Lavées longuement à l'eau, les coupes sont montées de préférence à l'huile de cèdre car le baume du Canada détruit en quelques semaines la coloration du bleu de Prusse.

Un résultat positif est marqué par des granules bleus ou par un précipité colloïdal bleu donnant l'impression d'une coloration diffuse.

6- Radicaux SS + SH. Mise en évidence par le tétrazolium alcalin

+ Procédé de GOMORI (1956)

Les préparations traitées une nuit par le mélange suivant :

- thioglycérol 3 ml

- eau distillée 40 ml

- tampon borate 0,5 M pH 8,5-9 , 10 ml

Elles sont ensuite lavées et incubées 1 à 2 heures à 50° C dans la solution préparée comme suit : à une solution de 1 g de cyanure de potassium dans 10-15 ml d'eau, contenant une goutte de phénolphthaléine, on ajoute de l'acide acétique M (environ 6 %) jusqu'à décoloration (15 ml sont environ nécessaires), puis 20 ml de tampon borate 0,5 M, pH 8,5-8,8 et enfin une solution de 25 mg de chlorure de néotétrazolium dans 5 ml d'alcool.

Filtrée, cette solution se conserve.

7- Radicaux phénol (= reste tyrosine). Démonstration par la réaction de Millon.

a- Procédé de BENSLEY et GERSCH (1933)

Ce réactif a l'avantage de s'employer à froid et donne une réaction colorée durable au contraire de certains autres réactifs :

- on dilue 400 cc d'acide nitrique concentré à 1 l. au moyen d'eau distillée. La solution repose 48 heures et on la dilue alors de nouveau au 1/10e.

- La solution d'acide nitrique à 4 % ainsi obtenue est additionnée de cristaux de nitrate mercurique en grand excès et abandonnée plusieurs jours jusqu'à complète saturation.

- On filtre, et à 400 ml de la solution précédente, on ajoute 3 ml de la solution initiale à 40 % d'acide nitrique et 1,4 g de nitrite de sodine.

- Les coupes, plongées pendant plusieurs heures dans ce réactif présentent au bout de 3 heures en général une intensité suffisante.

Les protéines sont colorées en rouge ou en rose.

b- Procédé de SERRA et QUEIROZ-LOPES (1945)

- Les préparations sont plongées 30 minutes à 60° dans le réactif suivant : sulfate mercurique 7,5 g + chlorure mercurique 5,5 g + sulfate disodique 7 g + eau distillée 35 ml + acide sulfurique 12,5 ml ; et après dissolution, on complète à 100 ml.

- Le réactif est refroidi et laissé à température ordinaire pendant 10 minutes, puis dilué de moitié par addition d'un égal volume d'eau distillée.

- La coloration est développée par addition de quelques gouttes de solution fraîche M de nitrite de sodium. Elle atteint son maximum en 3 minutes.

SERRA et QUEIROZ-LOPES montent la préparation et observent dans la glycérine pure, LISON à l'huile de cèdre obtient de bons résultats.

c- Histones. Démonstration par le Millon différentiel.

+ Procédé de MIRSKY, FOLLISTER et RIS (1946)

Les tissus sont fixés au Carnoy. La teneur en protéine totale est déterminée sur des préparations traitées par le Millon trichloracétique ; la teneur en protéine non histone sur des préparations traitées par le Millon sulfurique.

a- Détermination par le Millon sulfurique

Les coupes trempent dans 10 ml de réactif A dans une boîte de Pétri couverte et mise à l'étude (30°)

Réactif A

- dans 100 ml d'acide sulfurique à 10 %, on dissout 10 g de sulfate mercurique. Pour l'emploi, la solution mère est diluée avec une égale quantité d'eau.

- après 5 minutes, on ajoute 0,5 ml d'une solution à 1 % de nitrite de sodium. On laisse apparaître la coloration pendant 25 minutes ; on lave à l'eau 10 minutes. Les coupes sont montées.

b- détermination par le Millon trichloracétique

On procède comme précédemment mais en employant au lieu du réactif A, le réactif B fraîchement préparé : on dilue 5 ml d'acide trichloracétique à 60 % (conservé à la glacière) avec 5 ml d'eau et 0,5 g d'acétate mercurique.

L'excès de réactif est éliminé sur la lame qui est lavée dans 3 bains successifs d'alcool éthylique à 70° pendant 15 minutes au total, sans passer par l'eau ou les alcools moins concentrés qui altèrent souvent les préparations.

B- Recherche des glucides

1- Glucides contenant le radical Glycol Démonstration par la réaction à l'acide périodique - Schiff (PAS).

a- Réaction de PAS en milieu aqueux (coloration nucléaire glychémalun fond : vert lumière)

+ Procédé de Mac MANUS (1946)

- Les coupes à la paraffine amenées à l'eau d'après la technique habituelle sont traitées 5 minutes par une solution à 0,5 % d'acide périodique, puis lavées à l'eau distillée.

- On les soumet ensuite 15 minutes par le réactif de Schiff.

- Rincées 2 minutes chaque fois dans trois bains successifs d'acide sulfureux et lavées à l'eau courante, les préparations sont montées au baume.

Le matériel PAS-positif est coloré en rouge pourpre.

b- Réaction de PAS en milieu acétique

Mac MANUS en 1948 et MOWRY en 1954 ont observé que l'acide périodique en solution dans l'acide acétique glacial donne, dans certains cas, des réactions plus intenses que lorsqu'il est utilisé en solution aqueuse.

Le procédé est le même que dans celui de Mac MANUS mais l'acide périodique est utilisé en solution à 0,5 % dans l'acide acétique glacial.

2- Mise en évidence du radical Glycol. Démonstration par la réaction acide chromique-Schiff (réaction de Bauer).

La technique a été mise au point par LISON (1949) en vue de la recherche du glycogène.

- Les pièces sont fixées au Carnoy.

- Les coupes déparaffinées sont plongées 2 minutes dans une solution à 1 % de celloïdine dans un mélange à parties égales d'éther anhydre et d'alcool absolu et séchées verticalement 1 minute.

- La celloïdine est durcie au passage des lames pendant 3 minutes dans l'alcool à 70° et rinçage à l'eau.

- Les préparations sont traitées 1 heure par une solution à 4 % d'acide chromique, lavées 5 minutes à l'eau courante.

- Elles trempent ensuite dans le réactif de Schiff, sont rincées 3 minutes dans 3 bains successifs d'eau sulfureuse, puis lavées 5 minutes à l'eau courante et passées dans l'alcool à 70° et 90°. On dissout le collodion par un séjour de 3 minutes dans l'alcool-éther. Les coupes sont montées au baume du Canada.

Le matériel Bauer positif est rouge pourpre.

3- Glycogène. Démonstration par la réaction au PAS-Dimédon.

+ Procédé de BULMER (1959)

Dans ce procédé, le glycogène est mis en évidence par la réaction du PAS. Un traitement par le dimédon pratiqué entre l'acide périodique et le réactif de Schiff supprime la coloration des substances PAS-positives autres que le glycogène.

Les préparations collodionnées sont traitées 10 minutes par l'acide périodique à 0,5 %, lavées à l'eau courante et après passage par la série montante des alcools, elles trempent dans une solution à 5 % de dimédon dans l'alcool absolu pendant 3 heures à 60° C.

- Rincées à l'eau, elles sont plongées dans le réactif de Schiff 10 minutes.

4- Coloration par le carmin de Best

- On colore fortement au glychémalun qui permet de donner au noyau une teinte violette et après différenciation dans l'alcool chlorhydrique on traite les préparations par le carmin de Best étendu (carmin de Best 2 volumes + ammoniacale 3 volumes + alcool méthylique 3 volumes). On les différencie alors dans un mélange alcool méthylique + éthylique + eau distillée pendant 5 minutes. Elles sont montées au baume.

Le glycogène est coloré en rouge.

5- PAS-salive. Identification du glycogène par la digestion de la ptyaline ou par l'amylase (LILLIE, 1954)

Ce test s'effectue sur des préparations non collodionnées, traitées 15 à 30 minutes par de la salive en récipient fermé et humidifié à 37° C. Lavées à l'eau et déshydratées par les alcools de titres croissants jusqu'à l'alcool absolu, elles sont collodionnées et traitées par la réaction du P.A.S.

Le glycogène n'apparaît plus dans la préparation.

6- Détermination de mucopolysaccharides acides par le Bleu Alcian, combiné avec une coloration de fond éosine + orangé G

Les mucopolysaccharides acides sont révélés en bleu.

Le noyau en orangé et le fond rose.

7- Le muci-carmin MASSON (1910)

Les préparations sont d'abord traitées au Glychémalun, lavées à l'eau, puis colorées quelques minutes à froid par le jaune de méthane en solution aqueuse à 5 % dans l'eau acétifiée à 5 %. Elles sont ensuite lavées et mises 2 heures à froid dans le muci-carmin de MAYER à 10 %.

Les mucopolysaccharides sont rouges sur fond jaune, les noyaux violets.

C- Recherche des lipides

1- Les lipides en général

Les coupes après congélation sont transférées de l'eau dans l'alcool à 55° pendant 30 secondes, puis colorées 15 minutes dans une solution à saturation de noir Soudan B dans l'alcool à 55°. ou de Rouge Soudan. Elles sont ensuite rincées pendant 30 secondes dans l'alcool à 50°, l'eau distillée et montées dans la glycérine.

2- Les lipides à caractère acide. Démonstration par le bleu de Nil

Les coupes après congélation sont colorées 10 minutes dans une solution à 1 % de sulfate de bleu de Nil, lavées rapidement et différenciées dans l'eau acétique à 1 % jusqu'à teinte uniforme, elles sont rincées et montées à la glycérine.

Les lipides à caractère non acide sont colorés en rose, ceux à caractère acide en bleu de même que divers éléments basophiles non lipidiques.

D- Recherche des enzymes

Je me suis limitée à la détermination d'enzymes catasylant des réactions d'hydrolyse dans le groupe des Phosphatases, qui hydrolysent les esters phosphoriques, et parmi elles : les phosphomonoestérases.

1- Phosphatase alcaline. Procédé de GOMORI (1939) au calcium cobalt variante de DANIELLI (1946)

- Les coupes déparaffinées sont lavées et incubées à l'étuve à 37° pendant 2 à 48 heures dans le mélange suivant : glycérophosphate de sodium à 2 %, 20 ml + véronal sodique à 2 % 20 ml + nitrate de calcium à 2 % 10 ml ; eau distillée, 50 ml ; puis rincées dans une solution à 2 % de nitrate de calcium.

Traitées pendant 2 minutes par une solution à 2 % de nitrate de cobalt, elles sont rincées dans l'eau distillée et passées 1 minute dans une solution diluée de sulfure d'ammonium (5 à 10 gouttes de la solution commerciale dans 50 ml d'eau) et de nouveau rincées à l'eau courante avant de les monter au baume.

2- Phosphatase acide. Démonstration par le procédé de GOMORI au plomb
Variante de GOMORI (1950)

Les pièces sont fixées 24 heures en tout dans l'acétone absolu froid (0 à 4°) renouvelé 3 fois.

Les coupes déparaffinées par le toluène sont conduites ensuite dans l'eau en utilisant l'acétone au lieu de l'alcool comme intermédiaire (acétone absolu - acétone à 35° - acétone à 70° - eau distillée).

Elles sont alors incubées 20 à 24 heures en moyenne et jusqu'à 48 heures à l'étuve (37°) dans un mélange filtré de 5 ml de solution stock I avec 50 ml de solution II

- Solution I : tampon à l'acétate 0,05 M, pH 5 contenant 1,2 g de nitrate de plomb par litre

- Solution II : solution 0,1 M (environ 3 %) de glycérophosphate de sodium.

Rincées 30 minutes dans l'eau distillée renouvelée 6 à 8 fois afin d'éliminer tout excès de sel de plomb, et passées dans le sulfure d'ammonium dilué, elles sont de nouveau rincées et montées au baume.

OBSERVATIONS ET DISCUSSIONS

I - RECHERCHE DES GLUCIDES

Selon LISON, il n'y a pas de doute actuellement que la plupart des substances PAS-positives présentent, soit des polysaccharides, soit des fractions glucidiques. On constate que l'endoplasme de la Grégarine est bourré de grains rouges pourpres dont la densité atteint un maximum au contact de l'ectoplasme et du noyau qui en sont dépourvus (fig. 1).

Le carmin de Best révèle l'existence de glycogène sous forme de sphérules d'un rouge intense, plus nombreuses en périphérie et dans la région qui sépare le noyau de la zone d'attache ectoplasmique du parasite. Elles limitent au sein de l'endoplasme des plages d'un rouge plus pâle où sont encore disséminées d'autres sphérules, semblables aux premières. L'ectoplasme et le noyau donnent un résultat négatif et sont bleu-violacé. Cette méthode sûre colore le glycogène, difficile à déceler, mais aussi d'autres éléments : la mucine, la fibrine, les corps amyloïdes (fig. 2).

La réaction de Bauer permet de mieux caractériser le glycogène et de le séparer des substances qui se colorent aussi par le Carmin de Best. LANGERON se base pour affirmer cela "qu'il y a rarement coexistence de plusieurs polysaccharides". Nous observons une image analogue à la précédente pour la localisation du colorant.

Aucune réaction histochimique (PAS-Bauer ...) n'est vraiment spécifique pour le glycogène. Le contrôle s'effectue au moyen de la digestion salivaire qui dissout intégralement le glycogène en un temps fort court. La grégarine semble vide et ne présente plus qu'une membrane limitante externe et un noyau alors que dans l'épithélium intestinal environnant subsistent d'autres glucides.

Avec le bleu Alcian (fig. 3) on montre l'existence de mucopolysaccharides acides, sous forme de gros grains bleus, plus abondants dans la zone postérieure et à la limite périphérique de l'endoplasme. L'ectoplasme et la zone antérieure semblent dépourvus de ces formations. Cependant après la réaction au muci-carmin spécifique des mucopolysaccharides acides, révélés ici en rouge, c'est l'ectoplasme et la zone antérieure qui donnent le maximum de coloration en une granulation plus dense (fig. 4).

Les trophozoïtes possèdent donc une réserve glucidique très importante localisée essentiellement dans l'endoplasme. L'ectoplasme et le noyau en sont dépourvus bien qu'il faille faire une réserve à propos de la réaction au muci-carmin qui témoignerait en faveur de mucopolysaccharides acides dans la zone de fixation du parasite. Cette réserve glucidique se compose essentiellement de glycogène en sphérules et d'autres substances glucidiques, des mucopolysaccharides acides en particulier.

JOYET-LAVERGNE (1926) décrit des sphérules de paraglycogène dont "le centre de la sphérule prend l'aspect d'une zone plus brillante et plus colorée" après la coloration au bleu de méthyle par la méthode de MANN. Il a complété cette réaction par celle de l'iode et constate "que les sphérules de paraglycogène sont colorées par l'iode, le corps central apparaît incolore bordé par une fine raie noire. Peu à peu, on assiste à la décoloration de la sphérule l'iode venant se condenser dans le hile qui bientôt apparaît en noir sur une sphérule incolore". De ces faits, il en déduit que "la structure du paraglycogène est analogue à celle d'un grain d'amidon". Cependant, il précise "j'ai cherché à le déceler par diverses méthodes classiques de recherches du glycogène : de FISCHER (1905), de BEST (1906), VASTARINI (1909) et MAYER (1909) ; les résultats ont été négatifs".

Or, nous avons précédemment observé que la réaction au carmin de BEST donne un excellent résultat positif.

En outre, GRASSE (1953) signale que "le paraglycogène se rapproche beaucoup par sa composition et sa structure de l'amidon" et "que par sa masse il représente une partie importante de la grégarine".

Les réactions histochimiques ne peuvent nous montrer la présence de hile dans les sphérules. Cependant, nous pouvons penser que la masse principale de la grégarine possède les caractères histo-chimiques du glycogène.

II - RECHERCHE DES LIPIDES

Les colorants utilisés pour la mise en évidence des lipides ne sont pas ionisés et non ionisables. La coloration qu'ils communiquent se fait par un mécanisme purement physique de dissolution où n'interviennent pas de réactions entre groupes ionisés. Ils sont solubles dans les corps gras et leurs solvants, mais insolubles dans l'eau. Les méthodes démontrent l'existence de radicaux hydrophobes, qui est un des caractères essentiels des lipides et d'eux seuls.

Cependant, les réactions de détermination des lipides n'ont pas été très probantes, en particulier celles avec le noir Soudan B et le bleu de Nil. On peut en trouver les causes grâce à CAIN (1947) qui, s'appuyant sur les travaux de KAUFMANN et LEMMANN (1926) et sur ses propres recherches, conclut qu'on peut distinguer au moyen du bleu de Nil, les lipides neutres colorés en rouge, les acides gras et les phospholipines en bleu. Mais les lipides à l'état solide ne se colorent pas : il faut opérer à chaud vers 60° C. D'autre part, les acides gras ne se colorent en bleu qu'en solutions très diluées de bleu de Nil, car avec les solutions fortes seul l'acide oléique se colore intensément. Or, les coupes n'ont pas été traitées à chaud et il est possible que le colorant n'était pas assez dilué.

Néanmoins, la coloration au Rouge Soudan (fig. 5) permet de déceler la présence de granules rouges ayant souvent une zone concave moins chromophile. Parfois, les granules sont moins nets et le cytoplasme présente une coloration plus diffuse. L'ectoplasme reste incolore.

JOYET-LAVERGNE (1926) signale chez *Gregarina polymorpha* que chez "certaines formes intra-épithéliales, les granules ne sont pas très distincts, le cytoplasme est alors imprégné de lipoides" et de même chez *Gregarina cuneata*.

On peut cependant penser que les lipides comme les glucides entrent parmi les réserves des grégarines.

III - RECHERCHE DES PROTIDES

Nous avons étudié les réactions des protéines totales puis nous avons essayé de les déterminer par des réactions de plus en plus spécifiques.

Si la méthode du BIURET, spécifique des liaisons peptidiques, s'est révélée négative, d'autres ont donné des résultats plus démonstratifs, en particulier celle avec le bleu de bromophénol mercurique qui désigne les protéines totales. Les grégarines soumises à son action présentent des zones d'intensité différentes (fig. 6-7). La coloration se localise fortement sur l'ectoplasme ; le noyau et son nucléole en particulier et s'atténue sur l'endoplasme. Sur celui-ci, elle se concentre en un réseau granuleux entre les mailles duquel persistent de petites alvéoles incolores. La densité des grains de ce réseau décroît au fur et à mesure que l'on s'éloigne de l'ectoplasme et croît de nouveau dans la zone périnucléaire. Ils sont nettement plus petits que les sphérules de glycogène. On remarque parfois des tâches plus sombres et éparses dans l'endoplasme. La zone antérieure dite de fixation très dense montre un aspect fibrillaire marqué par des lignes plus sombres. D'autre part à la périphérie, la grégarine possède des prolongements ectoplasmiques très chromophiles.

Nous avons observé des résultats presque identiques en traitant les préparations à la ninhydrine-Schiff et au Fast Green. La ninhydrine est spécifique des radicaux aminés révélés en rouge. Selon SERRA et QUEIROZ-LOPES (1945) l'intensité de coloration varie avec la nature de l'acide-amino et de sa liaison avec les peptides. Elle

se porte essentiellement sur l'ectoplasme périphérique, la zone antérieure plus étendue et l'endoplasme comme précédemment (fig. 8). Mais comme pour le Fast Green, elle ne met pas le nucléole en évidence. Avec celui-ci, de petites plages périnucléaires se concentrent dans l'endoplasme (fig. 9).

Les formes libres présentent une zone effilée très colorée souvent opposée au noyau (fig. 10).

La méthode du Fast-Green (fig. 9, 10, 11) est spécifique de protéines basiques. Les acides nucléiques qui souvent entrent en compétition avec elles pour la capture du colorant ont été extraits à chaud par l'acide trichloracétique à 5 %, A pH 3, la fixation du colorant par les protéines basiques est influencée par le nombre et la position des groupes carboxyles qui existent alors sous forme d'anions. L'intensité de la coloration n'exprime donc pas le nombre total de groupes basiques dans la protéine mais seulement le fait qu'il y a excès de groupes basiques sur les groupes acidiques.

Nous observons des images identiques après traitement au jaune naphthol S en milieu acide (DEITCH, 1955) qui met en évidence les radicaux basiques (imidazol + amino + guanidyl) (fig. 12-13). En effet quand une protéine (LISON, 1960) est placée dans une solution très acide, tous les radicaux carboxyles passent à l'état non ionisé, et les radicaux basiques à l'état ionisé. La protéine fixe des anions et la capacité totale de fixation de ces anions, dépend uniquement du nombre total des groupes basiques ionisés. Elle est indépendante de l'anion. Par conséquent en solution très acide, la capacité de coloration par les colorants acides (dont la partie colorée est l'anion) dépend seulement du nombre de groupes basiques.

En essayant d'identifier les protéines, les réactions n'ont pas été démonstratives. La détection des radicaux SS et SH selon la méthode de GOMORI (1956) est nulle. Cependant LISON (1960) indique que sa sensibilité est bonne. Le sel de tétrazoliu en présence du

cyanure de potassium réduit les SS en SH (BARNETT et SELEGMAN, 1952 ; PEARSE, 1953). Une alcalinité élevée est nocive mais à pH $<$ à 11, le cyanure réduit mal les groupes SS d'où un prétraitement réducteur par le thioglycérol. Rien n'a été coloré malheureusement.

Cependant, le test de CHEVREMONT et FREDERICQ basé sur la réduction du ferricyanure ferrique incolore, en ferrocyanure ferrique ou bleu de Prusse, par l'action du radical SH donne un résultat. La coloration se localise uniquement dans l'ectoplasme et le noyau en un précipité colloïdal bleu très fin. Cette méthode qui est une adaptation d'une technique de MASON (1930) pour l'estimation du glutathion réduit n'est pas spécifique des groupes SH mais est aussi positive avec nombre de substances à caractère réducteur comme les propigments mélaniques et les granules des cellules argentaffines de l'intestin.

Les réactions de MILLON pour la mise en évidence d'histones et le liquide de MILLON pour les radicaux aromatiques ont été négatives.

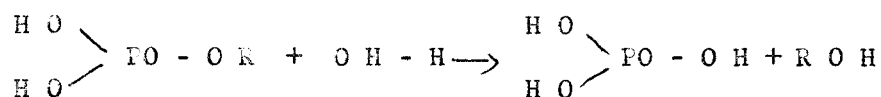
Ces résultats nous montrent la présence de protéines basiques essentiellement, localisées dans l'ectoplasme, la membrane nucléaire et le suc nucléaire, la zone de fixation et quelques plages périnucléaires où elles semblent très abondantes. L'endoplasme en est moins riche et les protides y forment un réseau alvéolaire plus net dans les formes intraépithéliales (fig. 9) que dans les formes libres (fig. 10) où ils sont en fines granulations et paraissent plus nombreux. Le nucléole positif au bleu de bromophénol, négatif aux autres réactions, contient donc des protéines non basiques.

JOYET-LAVERGNE (1926) signale l'existence de réserves albuminoïdes peu abondantes chez les Grégarines et parmi "les éléments qui se rapprochent de ces réserves, l'alvéoline de FRENZEL (1892)". Son étude histologique lui a permis d'arriver à une plus grande précision : "elle montre que la trame des alvéoles est constituée par une substance albuminoïde fondamentale". Elle correspond au réseau que nous avons décrit dans l'endoplasme. L'alvéoline serait donc de nature protidique basique par la présence de radicaux amino, guanidyl et imidazol surtout.

IV - RECHERCHE DES ENZYMES PHOSPHATASES

Après le traitement de GOMORI, dans le cas de la phosphatase basique, les trophozoïtes présentent leur ectoplasme et noyau colorés en noir ainsi qu'une zone dite de fixation (fig. 14). Dans le cas de la phosphatase acide, la coloration se porte aussi dans l'endoplasme de façon assez diffuse (fig. 15).

Les phosphatases ou phosphomonoestérases catalysent l'hydrolyse des monoesters de l'acide orthophosphorique en acide phosphorique et alcool ou phénol.



R désigne le radical organique.

Ces enzymes qui agissent sur les substrats de constitution la plus diverse pourvu qu'elles renferment la liaison phosphorique caractéristique sont dites "non spécifiques".

La technique de GOMORI pour la phosphatase basique utilise la capture de l'ion phosphate par l'ion calcium au moment de sa libération par l'enzyme. Elle est désignée comme "méthode de Gomori au calcium". Le phosphate libéré précipite sous forme de phosphate de calcium. Après l'incubation dans une solution de glycérophosphate de sodium tamponnée à pH 9,4 par un tampon véronal sodique et additionnée de nitrate de calcium, le phosphate de calcium est visualisé par transformation successive en phosphate de cobalt, puis en sulfure de cobalt. La suite des réactions comprend donc trois temps successifs dont le premier est l'incubation et les deux autres sont des temps de visualisation.

- I Glycérophosphate \longrightarrow Glycérine + phosphate de Ca
- II Phosphate de Ca + nitrate de Co \longrightarrow phosphate de Co
- III Phosphate de Co + sulfure de NH_4 \longrightarrow sulfure de cobalt

Selon LISON, la méthode de GOMORI souffre de défauts au point de vue localisation et les réactions positives observées dans le noyau ne sont pas une preuve suffisante.

Pour la phosphatase acide, la méthode est semblable mais l'ion phosphorique libéré par l'enzyme ne peut être précipité sous forme de phosphate de calcium soluble au pH 4,7 du milieu. La précipitation est assurée sous forme de phosphate de plomb qui est finalement visualisé en sulfure de plomb noir.

C O N C L U S I O N

Cette contribution à l'étude histochimique de la Grégarine *Lecudina tuzetae* permet de mettre en évidence :

- la nature des réserves endoplasmiques essentiellement glycogénique et lipidique, englobées dans les mailles d'une trame alvéolaire à caractère protidique basique.

- la présence de protéines basiques dans l'ectoplasme, la zone de fixation et le noyau ; de protéines non basiques dans le nucléole

- la localisation de la phosphatase basique surtout dans l'ectoplasme et le noyau qui seraient ainsi le siège de phénomènes d'hydrolyse.

Il semble qu'il y ait une grande ressemblance entre les phénomènes d'absorption du trophozoïte et l'absorption des cellules intestinales qu'il parasite.

B I B L I O G R A P H I E

- ALFERT M. et GESCHWIND I. - 1953 - A selective staining method for the basic proteins of cell nuclei. (Proc. Nation. Acad. Sc., 39 (10) 991-999)
- BARNETT R.J. et SELEGMAN A.M. - 1952 - Demonstration of protein bound sulfhydryl and disulfide groups by two new histochemical methods. (J. Nat. Cancer Inst., 13, 215-316)
- BAUER H. - 1932 - Z. Zellforsch. Mikr. Anat., 15, p. 225
- BULMER D. - 1959 - Dimedon as an aldehyde blocking reagent to facilitate the histochemical demonstration of glycogen. (Stain Technology, 34, 95-98)
- BUTSCHLI O. - 1885 - Bemerkungen über einen dem glycogen verwandten Körper in den Gregarinen. (Zeitschf. für Biol., Bd XXI)
- CAIN A.J. - 1950 - The histochemistry of lipids in animals. (Biol. Rev., Cambridge Philosoph. Soc., 25, 73-112)
- CAJAL S.R. - 1914 - Algunas variaciones fisiológicas y patológicas del aparato reticular de Golgi. (Trav. de Lab. de Inv. Biol., Madrid, t XII)
- CIACCIO C. - 1910 - Contributo alla distribuzione ed alla fisio-patologia cellulare dei lipodi. (Arch. f. Zellforsch., Bd V)
- DEITCH A.D. - 1955 - Microspectrophotometric study of the binding of the anionic dye, naphtol yellow S, by tissue sections and by purified proteins. (Lab. Invest., 4, 324-351)
- DRZEWIECKI W. - 1904 - Ueber vegetative Vorgänge im Kern und plasma der Gregarinen. (Arch. f. Protist., Bd III)
- FRENZEL J. - 1885 - Ueber einige in Seethieren lebende Gregarinen. (Arch. f. mik. Anat., Bd XXIV)

- GOODRICH E. and PIXELL-GOODRICH H. - 1920 - *Gonospora minchinii* n. sp. a Gregarine inhabiting the egg of *Arenicola*. (Quart. Journ. of micr. Sc., vol. LXV)
- GRASSE P.P. - 1953 - *Traité de Zoologie*, tome I, fasc. II, 551-639
- HENLE - 1845 - Ueber die Gattung Gregarina. (Arch. f. Anat. und Physiol.)
- HENNEGUY F. - 1888 - Formation des spores de la Grégarine du Lombric. (Ann. de Micrographie, t I)
- HESSE E. - 1909 - Contribution à l'étude des Monocystidées des Oligochètes. (Arch. Zool. exp. et gén., 5e ser., t III)
- HIRSCHER J. - 1914 - Ueber Plasmatructuren in den Tuniciaten Spongien und Protozoen Zellen. (Anat. Anzeig Bd XLVII, 289-311)
- JOYET-LAVERGNE Ph. - 1926 - Sur le cytoplasme des Protozoaires. (Arch. d'Anat. Microsc., t XXII, 3-120)
- KUSCHAKEWITCH S. - 1907 - Beobachtungen über vegetative, degenerative und germinative Vorgänge bei Gregarinen des Mehlwurmdarms. (Arch. f. Protist., supp. I)
- LEGER L. et DUBOSCQ O. - 1904 - Nouvelles recherches sur les Grégarines et l'épithélium intestinal des Trachéates. (Arch. f. Protist., Bd IV)
- LILLIE R.D. - 1954 - *Histopathologie technic and practical histochemistry* (2nd Edn Blakiston, N. Y.)
- LISON L. - 1949 - Sur la réaction de Bauer appliquée à la recherche histo-chimique du glycogène. (C. R. Soc. Biol., 143, 117)
- LISON L. - 1960 - *Histochimie et cytochimie animales*. Gauthiers-Villars, Paris.
- LOISEL G. - 1903 - Essai sur la technique microchimique comparative de la lécithine et des graisses neutres. (C. R. Soc. Biol., p. 703)
- MAC MANUS J.F.A. - 1946 - Histological demonstration of mucin after periodic acid. (Nature, 158, 202)

- MAUPAS - 1886 - Sur les granules amyliacés du cytosome des Grégarines.
(C. R. Acad. Sc., t CII, p. 120)
- MAYER - 1909 - Zur färbung des Glycogens. (Zeitsch. f. Wiss. Mik., Bd XXIV)
- PEARSE A.G.E. - 1961 - Histochemistry theoretical and applied. J. et A.
Churchill, London
- SCHNEIDER A. - 1875 - Contribution à l'étude des Grégarines des Insectes
de Paris et de Roscoff. Thèse, Paris
- SCHNEIDER A. - 1887 - Grégarines nouvelles ou peu connues. (Tablettes
Zool. Poitiers, t II)
- SCHREVEL J. - 1964 - Contribution à l'étude de trois Grégarines parasites
d'Annélides Polychètes. (Arch. de Zool. exp. et gén. t 104, fasc 2
extrait, 126-141)
- STEIN F. - 1843 - Ueber die natur der gregarinen. (Arch. f. Anat. und.
Physio., p. 132)
- WEIGL R. - 1912 - Der Golgi, Kopsch'sche Apparat. (Bull. Internat. Acad.
Sc. Cracovie, ser. B, p. 417)

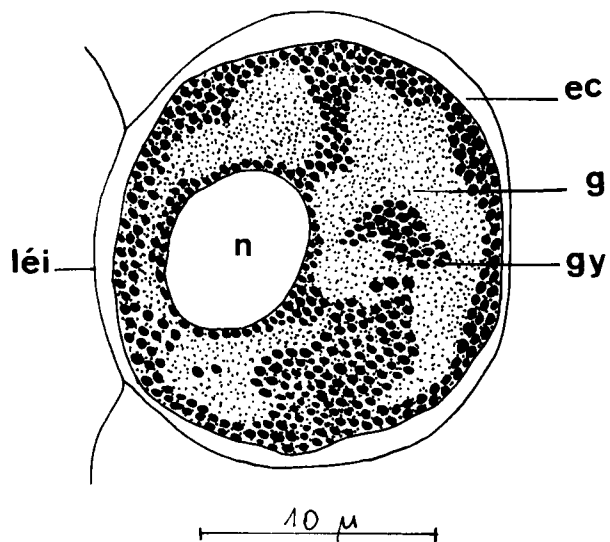


Fig. 1 - Réaction au PAS -
Mac Manus

Coupe transversale d'une
forme intra-épithéliale.

Recherche des glucides

e : ectoplasme

n : noyau

g : glucides

gy : glycogène

Léi : limite de l'épithé-
lium intestinal

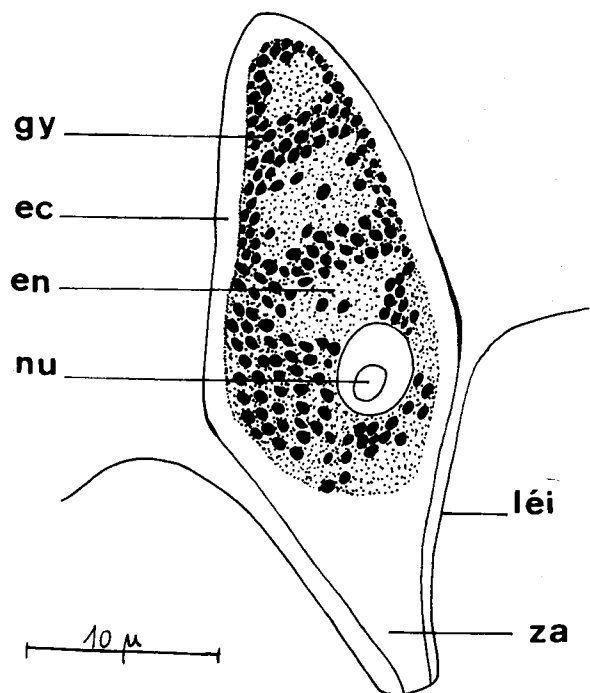


Fig. 2 - Réaction au Carmin
de Best :

Recherche du glycogène

en : endoplasme

za : zone antérieure



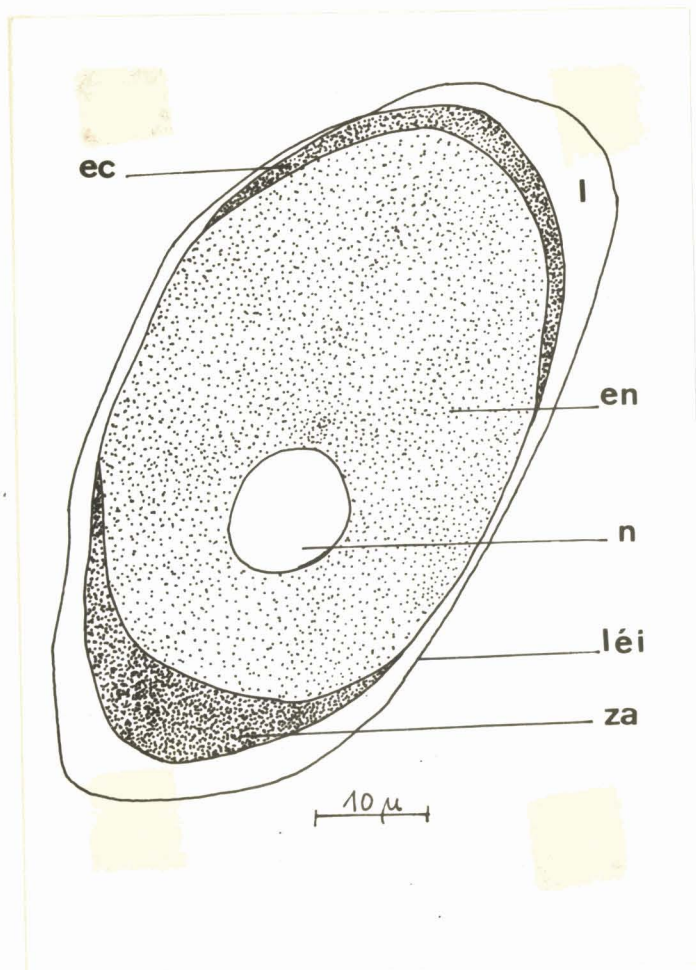


Fig. 4 - Réaction au Muci-carmin

Recherche des mucopolysaccharides acides.

Forme intraépithéliale.

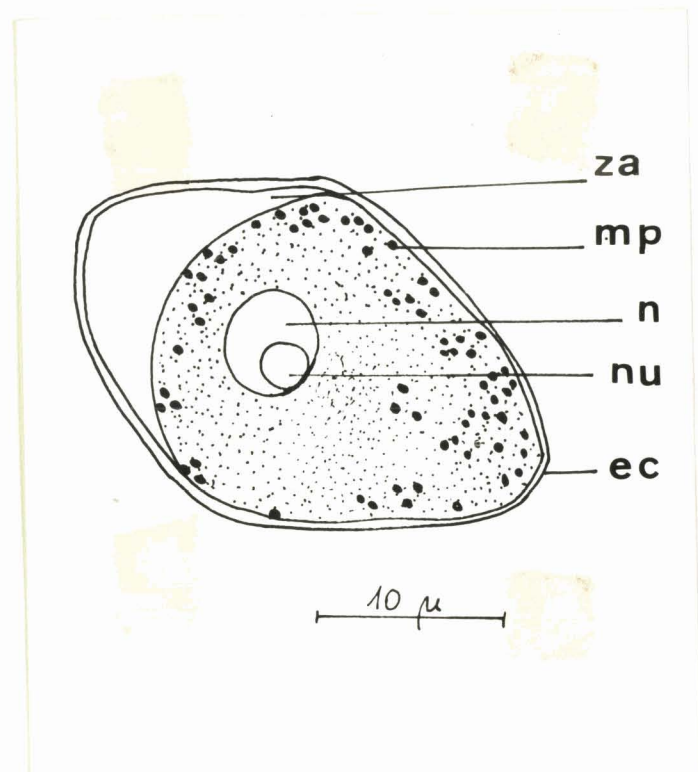
L : lacune

Fig. 3 - Réaction au bleu Alcian.

Forme libre

nu : nucléole

m.p : mucopolysaccharides acides



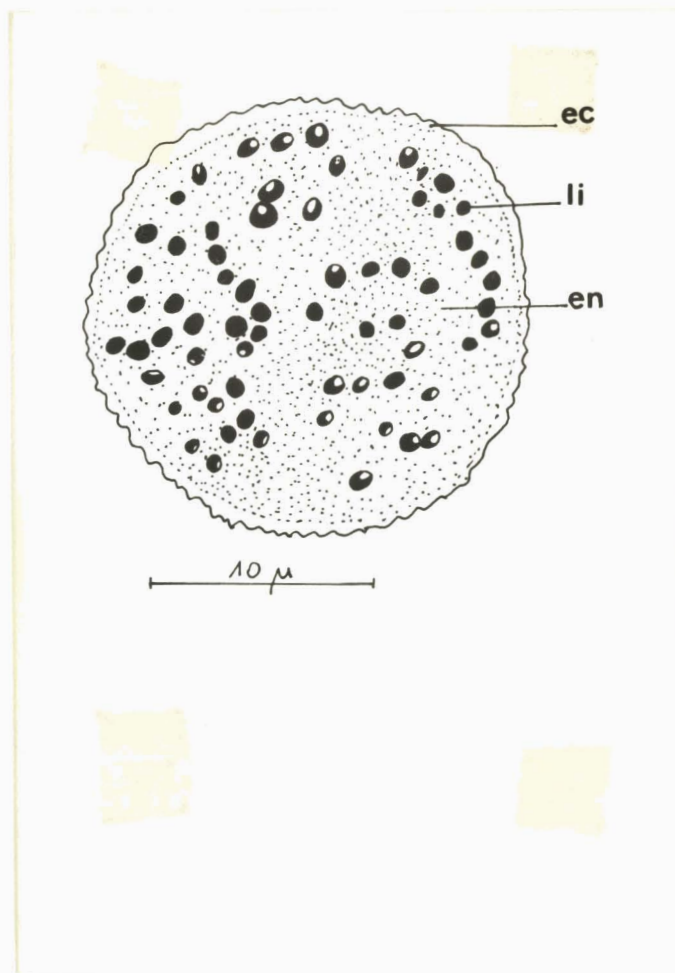


Fig. 5 - Réaction au Rouge Soudan. Coupe transversale.

li : granules lipidiques

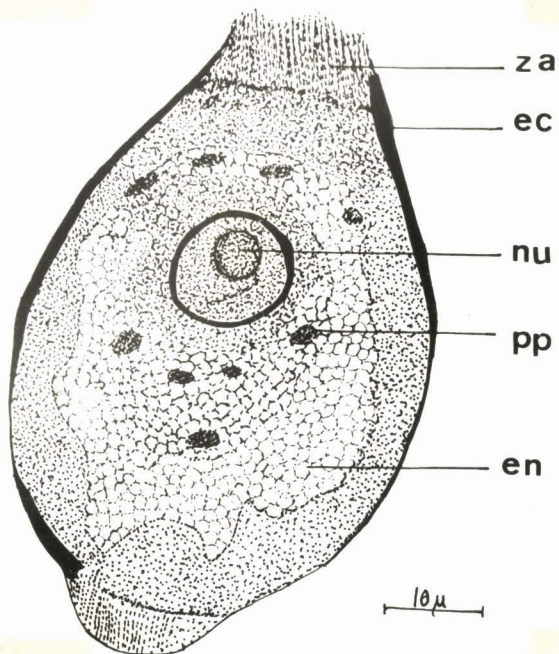


Fig. 6 - Réaction au bleu de Bromophénol.

Recherche des protéines
totales

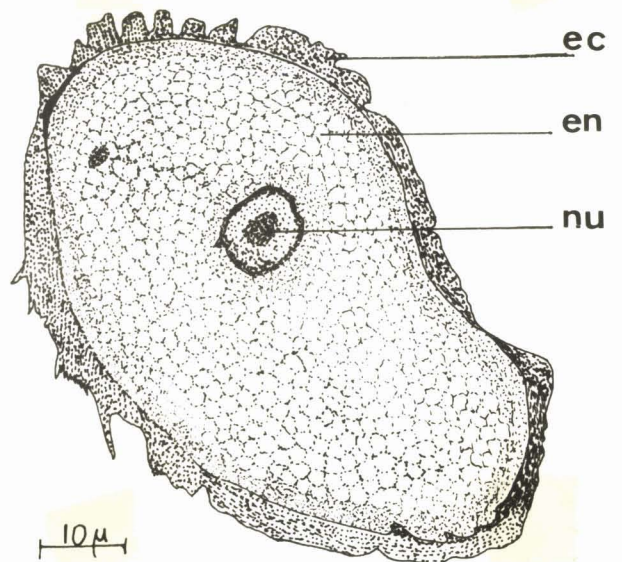
Forme libre

p.p : plages périnucléaires
protéiniques



Fig. 7 - Réaction au bleu de Bromophénol.

Forme libre



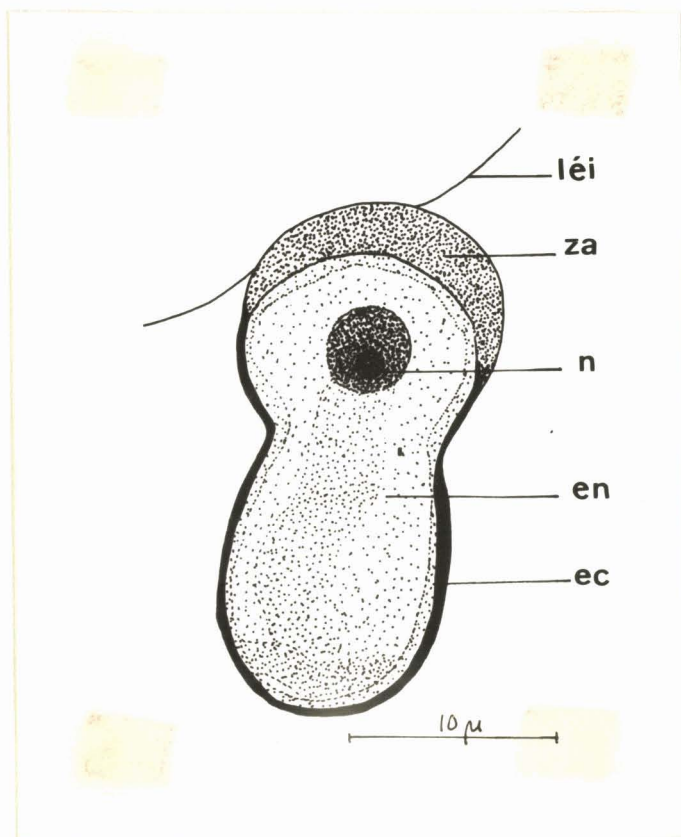


Fig. 2- Réaction à la ninhydrine - Schiff.

Recherche des radicaux amino.

l'épithélium : limite de l'épithélium intestinal

Za : zone antérieure

n : noyau

en : endoplasme

ec : ectoplasme



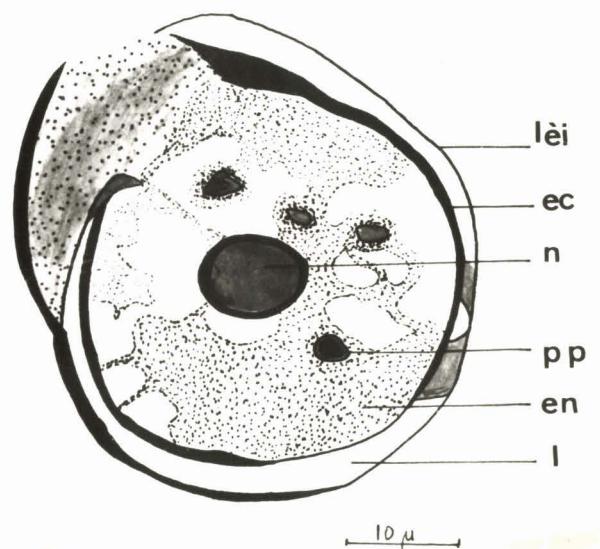
Fig. 3 - Réaction au Fast Green

Recherches des protéines basiques

Coupe transversale d'une forme intra-épithéliale.

l : lacune

pp : plages protéiniques périnucléaires.



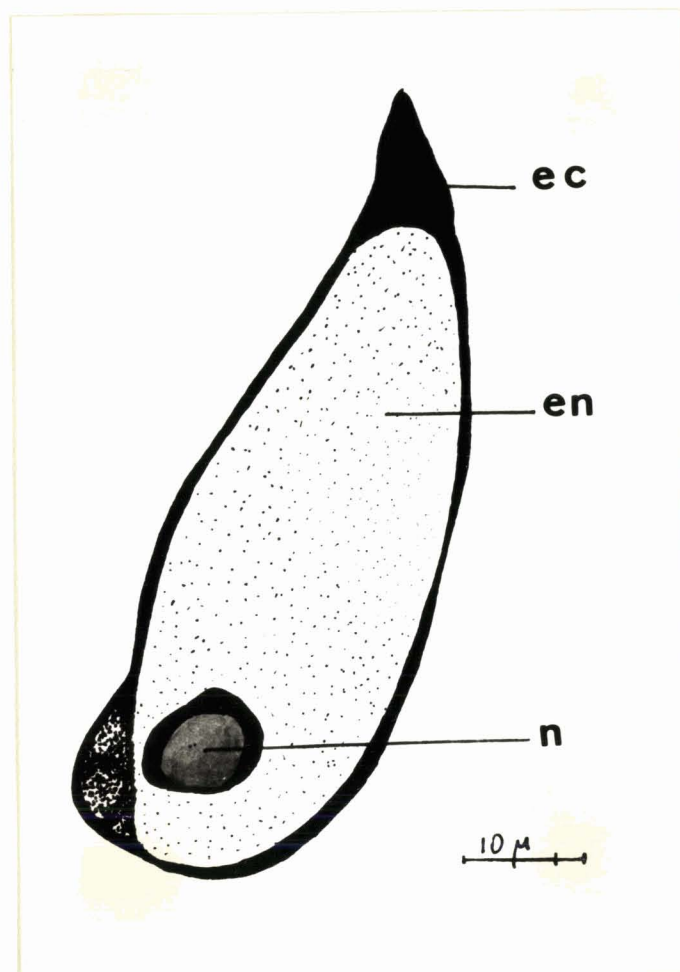


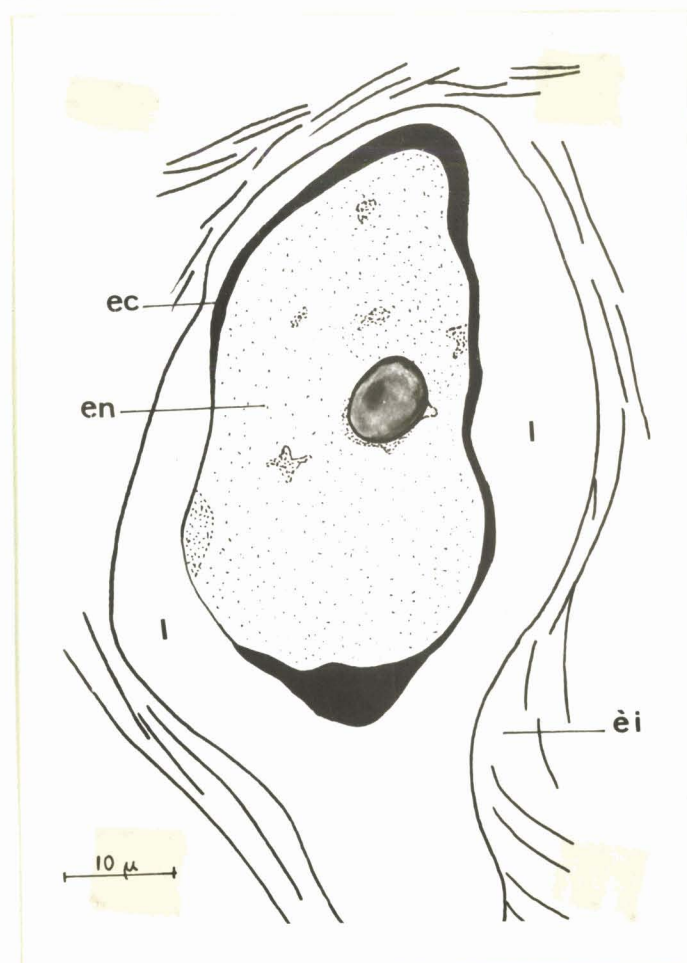
Fig. 10 - Réaction au
Fast Green.

Forme libre



Fig. 11 - Réaction au Fast
Green.

Coupe longitudinale
d'une forme intraépithéliale



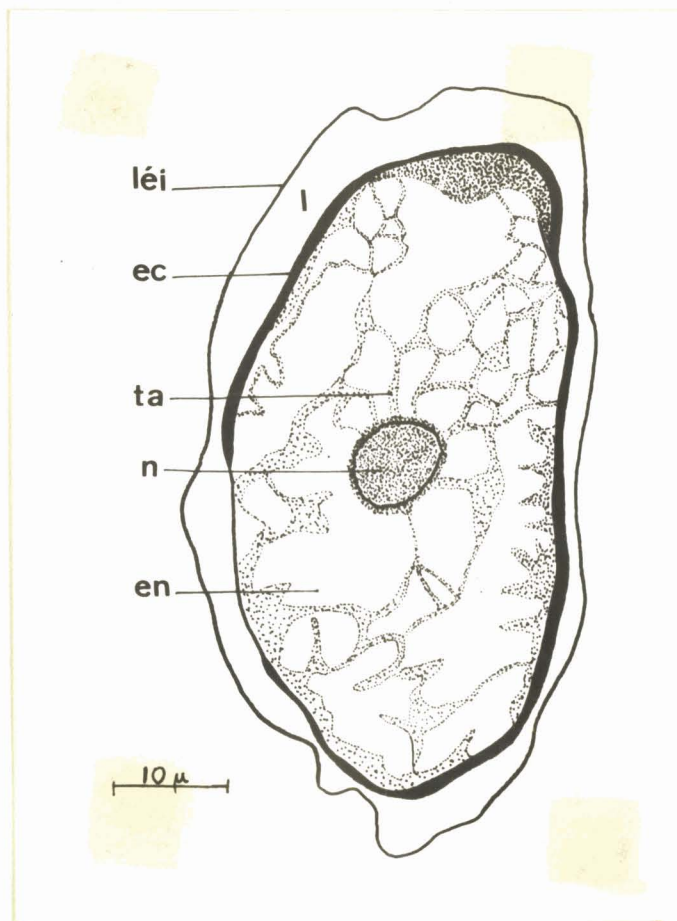


Fig. 12 - Réaction de Deitch
au jaune naphthol S

Recherche des radicaux élec-
tropositifs totaux (amino +
guanidyl + imidazol)

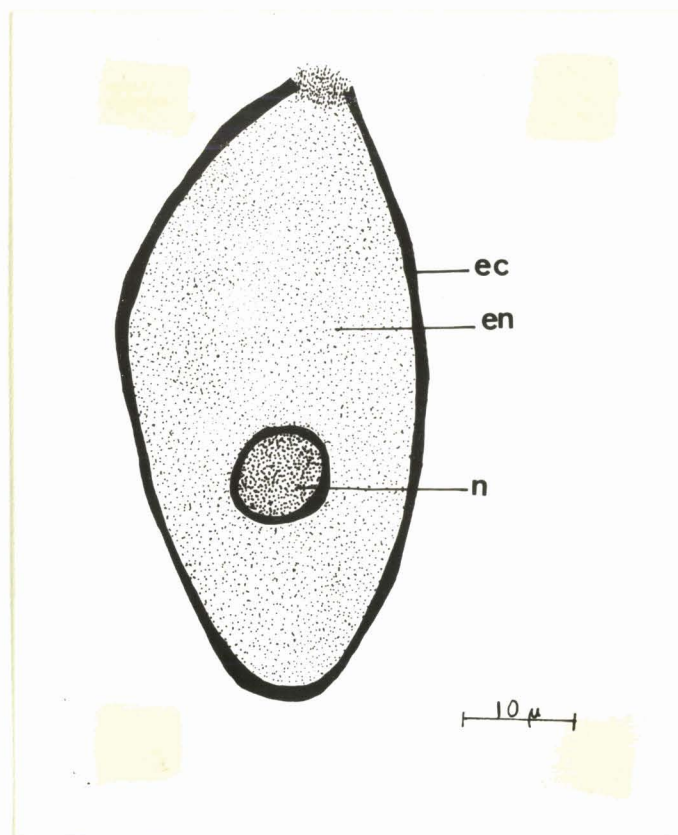
Forme intra épithéliale

ta : trame alvéolaire



Fig. 13 - Réaction au jaune
Naphthol S :

Forme libre



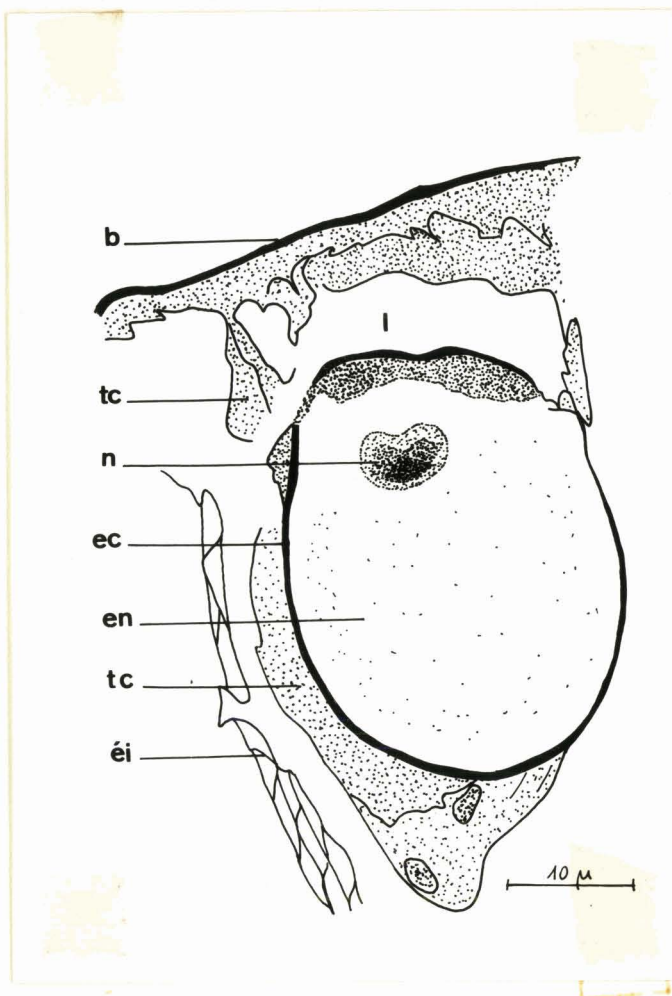


Fig. 14 - Réaction de Gomori
au calcium - cobalt

Recherche de la phosphatase
alcaline.

Forme intra épithéliale

b : basale de l'épithélium
intestinal

t.c : tissu conjonctif

é.i : épithélium intestinal

Fig. 15 - Réaction de Gomori au
plomb.

Recherche de la phosphatase
acide

Forme libre

