

MALADIE DE LA GLANDE DIGESTIVE DE L'HUITRE PLATE

Etude histochimique

par M. MOREL et G. TIGE

L'étude histochimique entreprise ici a pour but de révéler les différents constituants biochimiques présents dans le parasite.

Nous avons effectué une série d'analyses portant sur les principales figures connues du parasite : cellule de base « primaire » (stade 1), cellules incluses « secondaires » (stade 2), groupes de cellules « secondaires » isolées par une membrane avec ou sans « granules réfringents » (stade 4 et 3). Ce sont les résultats de ces examens histochimiques que nous exposons dans ce travail.

Mise en évidence des carbonyles primaires.

Réaction à l'acide périodique Schiff (A.P.S.).

Tout composé susceptible de subir l'oxydation périodique avec apparition de carbonyles primaires réagit positivement avec le réactif de Schiff.

La mise en pratique de cette réaction sur des coupes d'huîtres parasitées s'est révélée négative dans la plupart des cas. Seuls les stades 2 et 3 du parasite ont montré une très légère réaction positive.

Le parasite ne posséderait donc pas, ou très peu, de composés polysaccharides non substitués en 1,2 (principaux agents d'une réaction A.P.S. positive).

Mise en évidence de la basophilie.

On utilise les thiazines (bleu de méthylène, bleu de toluidine, etc.) à un pH inférieur au point isoélectrique des protides tissulaires pour mettre en évidence la basophilie. La basophilie traduit la présence de groupements anioniques. Elle est donc, principalement, caractéristique des polysaccharides à fonctions acides, des acides nucléiques, des dérivés d'oxydation des lipides, de l'acide urique.

Cette basophilie a pu être mise en évidence par les thiazines aux stades 2 et 3 du parasite mais elle disparaît dès que se manifestent les « corpuscules réfringents ». Dans tous les cas, le cytoplasme de la cellule de base « primaire » reste incolore.

L'utilisation de la safranine comme colorant de la basophilie révèle une réaction positive des « corpuscules réfringents », ce qui n'était pas le cas avec les thiazines. Il est donc impossible que ces corpuscules contiennent des acides nucléiques révélés par la safranine.

Mise en évidence de l'acidophilie.

Le jaune naphthol S, selon la technique de Deitch, permet à un pH suffisamment bas une évaluation du nombre total de groupements basiques (acidophilie) présents dans la structure étudiée.

La mise en œuvre de cette réaction sur le parasite de la glande digestive de l'huître plate se révèle très positive ; le parasite, quel que soit son stade évolutif, prend une teinte jaune vif caractéristique de l'acidophilie et, par conséquent, des groupements basiques des molécules protéiques.

Détection des protéines.

Réaction de Yasuma et Ishikawa à la Ninhydrine Schiff.

Cette réaction est basée sur la détection du groupement aminoacide terminal des protéines. Elle donne sur le parasite une réaction positive.

Les « corpuscules réfringents » ne réagissent pas, ce qui semble en contradiction avec la coloration au jaune naphthol (acidophilie des protéines), mais la désamination oxydative du groupement amine primaire terminal a pu être empêchée ou masquée par un autre constituant des granules.

Détection élective de certains amino-acides.

Mise en évidence du radical granidyle et de l'arginine.

La plupart des protéines contiennent de l'arginine. Ce sont les histones et les protamines (protéines basiques) qui en sont les plus riches. Ces deux protéines, constituants importants du noyau, sont généralement associées aux acides nucléiques. La détection de l'arginine chez le parasite, par la réaction de SAKAGUCHI, revêt donc une importance primordiale. On obtient une teinte orange, peu intense, suffisamment caractéristique de la présence d'arginine. Cette coloration se localise principalement aux « granules réfringents ».

Mise en évidence de la tyrosine.

La tyrosine est un acide aminé présent en quantité bien définie dans les histones. Comme pour l'arginine, sa détection est importante.

La réaction de Millon (variante de BAKER) donne un résultat positif qui se traduit par une teinte jaune rougeâtre principalement au niveau des « granules réfringents ».

La détection des deux acides aminés, arginine et tyrosine, peut nous amener à conclure à la présence de protéines du type histones et protamines localisées aux « granules réfringents ». Ces deux protéines étant généralement associées aux acides nucléiques, la présence d'A.D.N. est fort probable bien que donnant une réaction de Feulgen assez faible, voire négative.

Détection des A.D.N.

Réaction nucléale de Feulgen-Rossenbeck.

Cette réaction est basée sur une hydrolyse chlorhydrique des A.D.N. (les A.R.N. étant détruits par HCl) avec mise en évidence du groupement carbonyle du désoxyribose par le réactif de Schiff.

Pratiquée sur le parasite, cette réaction nucléale met en évidence la présence d'A.D.N. au sein des cellules incluses « secondaires » mais reste très faible sur les « corpuscules réfringents ».

Détection des mucopolysaccharides acides.

La réaction métachromatique au bleu de toluidine révèle généralement la présence de mucopolysaccharides acides (MPA). Lorsque le bleu de toluidine confère une coloration orthochromatique, les MPA ne sont pas sulfatés; par contre, une forte métachromasie β ou γ oriente les recherches vers les MPA sulfatés.

L'observation de coupes d'huîtres parasitées traitées par la réaction métachromatique donne, comme pour la basophilie, deux cas selon la présence ou non de « corpuscules réfringents ».

La coloration bleu-violet caractéristique des MPA sulfatés reste visible jusqu'à l'apparition des « corpuscules réfringents » (stade 4). La présence de MPA sulfatés semble confirmée par le caractère APS négatif du parasite et de la coloration au bleu de méthylène visible jusqu'à des pH voisins de 1.

Stades du parasite	Réactions histochimiques							
	PAS	Basophilie	ADN	Acidophilie	Protéines	MPA	Chromolipoides	Arg. + Tyr.
<i>Stade 1</i>								
Cellule de base « primaire » (cytoplasme)	—	—	—	+	+	—	—	—
<i>Stade 2</i>								
Cellules incluses « secondaires »	faible	+	+	+	+	+	+	faible
<i>Stade 3</i>								
Groupe cellules secondaires sans « granules réfringents »	faible	+	+	+	+	+	+	faible
<i>Stade 4</i>								
Groupe cellules secondaires avec « granules réfringents »	—	—	+	+	+	—	+	faible
Granules réfringents	—	sauf sufranine	—	+	—	—	+	+

TABL. 1. — Examens histochimiques pratiqués sur les différentes figures du parasite.

Détection des chromolipoides.

Coloration de Ziehl-Neelsen.

Les chromolipoides ne représentent pas une catégorie de composés définis par des caractères chimiques communs. Ils dérivent de l'oxydation des lipides et sont insolubles dans les solvants des lipides. Il en résulte, sur le plan pratique, que ces composés sont accessibles à l'étude sur coupes à la paraffine, ce qui n'est pas le cas pour les autres constituants lipidiques (coupes à la congélation obligatoire). Ces composés sont doués d'une basophilie acido-résistante que l'on met en évidence par la classique coloration de Ziehl-Neelsen.

Dans le cas de la maladie de l'huître plate, tous les stades du parasite, y compris les « corpuscules réfringents », prennent une coloration rouge intense caractéristique. Il y a donc présence de structures acido-résistantes et en particulier celles qui contiennent des chromolipoides.

D'autres molécules prennent également cette couleur rouge vif, les mélanines.

La réaction de fixation des ions ferreux de Sillie révèle leur faible quantité chez le parasite. On peut donc attribuer la coloration de Ziehl-Neelsen principalement aux chromolipoïdes.

Conclusion.

Les principaux résultats histochimiques obtenus sont résumés dans le tableau 1 ; il en ressort que le parasite subit, au cours de son évolution, des transformations biochimiques.

Aux stades 2 et 3 (cellules incluses isolées ou non par une membrane) on note la présence de protéines, ADN, MPA et de composés acido-résistants du type chromolipoïdes. La réaction à l'APS est faible, la basophilie et l'acidophilie fortes.

Quand apparaissent les « corpuscules réfringents » (stade 4), il y a une perte des propriétés basophiles et métachromatiques, la réaction à l'APS est franchement négative. Quand on étudie de plus près les « corpuscules réfringents », on s'aperçoit qu'ils sont fortement acidophiles et riches en acides aminés (arginine et tyrosine). On peut donc conclure à la présence de protéines basiques du type histones et protamines probablement associées à des acides nucléiques.

On note également la forte réaction positive à la coloration de mise en évidence des composés possédant une basophilie acido-résistante (chromolipoïdes). La détection de ces composés insaturés peut expliquer, dans une certaine mesure, la réfringence observée chez le granule.

Il manque encore à ce travail la partie concernant la mise en évidence histochimique des principaux constituants lipidiques qui ne peut être obtenue qu'à partir de coupes à la congélation.

Les lipides mis à part, nous avons obtenu de nombreux renseignements relatifs à la composition biochimique du parasite. Ces données devraient permettre de faire progresser nos connaissances sur la maladie de la glande digestive de l'huître plate.
