

tie du territoire innervé par le trijumeau et qui est connue sous le nom de « maladie de Sturge Weber », quand elle se complique de phénomènes cérébraux tels que l'épilepsie.

Le travail de M. Appelmans constitue une œuvre minutieusement étudiée, non seulement au point de vue clinique et anatomopathologique, mais aussi au point de vue critique. Il met fin aux controverses concernant la nature exacte de l'angiomatose dont il fait une maladie des capillaires et non de la glie ou des autres tissus de soutien.

Nous proposons :

1°) d'adresser des remerciements à l'auteur et de l'engager à nous présenter de nouveaux travaux;

2°) de publier son mémoire dans notre *Bulletin*.

— Ces conclusions sont adoptées.

LECTURES.

1. — **Etude histochimique et microchimique des acides nucléiques au cours de la grasserie du ver à soie**, par MM. A. GRATIA, Correspondant, J. BRACHET et R. JEENER (*).

Messieurs, avant de commencer cette lecture sur la grasserie, permettez-moi de rendre un bref, mais solennel hommage à la mémoire de celui qui a le plus grandement contribué à la connaissance de cette virose du ver à soie et de la pathologie infectieuse des insectes en général, l'éminent entomologiste français André Paillot qui vient de succomber à la fois à la tâche et aux angoisses que lui valut l'héroïque attitude de ses enfants pendant la guerre. Sa fille cadette est encore, à l'heure actuelle, en captivité dans un camp de concentration en Autriche, et ses trois fils, après avoir été de la Résistance pendant l'occupation, se trouvent maintenant sur le front des armées françaises.

J'ai tenu à rendre cet hommage ému à celui qui fut non seulement le plus original, le plus intéressant et aussi le plus modeste des collaborateurs, mais encore le plus délicat des

(*) Cette étude a été faite pendant l'été 1943, elle a fait l'objet de deux notes préliminaires (*Acta Biologica Belgica*, 28 août 1944 [1]).

amis, et chez qui l'on trouvait réunies à la fois — chose rare — la valeur de l'intelligence, la bonté du cœur et la fermeté du caractère. (*Marques unanimes d'assentiment.*)

* * *

La pathologie infectieuse du ver à soie est particulièrement riche. A côté de la muscardine due à un champignon, de la pébrine due à une microsporidie, de la flacherie due à un bacille, il existe plusieurs maladies à ultravirus, notamment la gâtine et la grasserie. Arrivé au stade ultime de cette dernière virose, le ver à soie est turgescent, il a l'aspect d'un doigt blanc, la peau tendue et mince est fortement pigmentée de jaune, d'où le nom de « jaunice » donnée à cette maladie par les Anglo-saxons. Le sang, au lieu d'être limpide, est complètement opaque et jaune comme un « lait de poule ». Ce trouble est essentiellement dû à une masse de corpuscules ayant la taille de globules rouges de mammifères; ce sont les « polyèdres » caractéristiques de cette catégorie de maladies des insectes réunies pour cette raison sous le nom de « polyédries ». Dans le cas de la grasserie, ce sont des cristaux du système cubique, de petits dodécaèdres rhombiques. Leur nature et leur signification restèrent longtemps méconnues bien que déjà en 1920, Aoki et Chigasaki (2) avaient montré que leurs propriétés antigéniques étaient distinctes de celles des tissus normaux du ver à soie. En vérité, si l'on sédimente ces polyèdres par une centrifugation modérée, le sérum surnageant ne devient pas entièrement limpide, il conserve une certaine opalescence que Paillot (3) a montré être due à une multitude de minuscules granules apparaissant sur le fond noir de l'ultramicroscope à la limite de la visibilité aux plus forts grossissements, comme d'infimes grains mats et sans éclat, animés d'un intense mouvement brownien. Filtré sur bougie suffisamment poreuse pour laisser passer ces granules, le sang « gras » conserve sa virulence; il la perd, au contraire, après filtration sur une bougie plus serrée qui les retient. Paillot en a déduit que ces granules étaient donc le support de la virulence.

En examinant à l'ultramicroscope les cellules sanguines à l'état frais quelques jours après l'inoculation. Paillot observa que le noyau de ces cellules présentait une zone périphérique fourmillant d'une masse de granules en continuelle agitation

et à laquelle il donna le nom d' « anneau scintillant ». C'est au sein de cet anneau que se forment ensuite progressivement des polyèdres d'abord petits, puis de plus en plus gros. Finalement, les cellules éclatent et répandent, dans le gang, granules et polyèdres. Le même processus se déroule dans les noyaux de deux tissus, à savoir, les corps gras et les cellules péritrichéales.

En 1938, Paillot et Gratia (4) ont isolé par ultracentrifugation du sang et des tissus de vers « gras » les granules virulents auxquels ils ont reconnu ensuite des propriétés antigéniques spécifiques entièrement distinctes de celles du sang et des tissus de vers normaux, mais, par contre, identiques à celles des « polyèdres » d'autre part isolés par centrifugation ordinaire du sang et des tissus de vers « gras ». D'autre part, les polyèdres soumis à une solution de soude diluée se redissolvaient en granules virulents et se révélaient être ainsi des agrégats, sous forme cristalline, des particules virulentes.

En 1942, Bergold et von Schramm (5) confirmaient cette dernière observation, mais utilisant des solutions plus alcalines de pH 10 à pH 11, ils constatèrent non seulement la fragmentation des polyèdres en granules, mais ensuite la dissolution complète de ceux-ci en une protéine dont ils étudièrent la virulence et les propriétés physico-chimiques et dont en 1943, Desnuelle, Chang Chi Tan et Fromageot (6) ont établi la courbe de solubilité à différents pH.

Chose curieuse, au cours de leurs recherches, Gratia et Paillot avaient également isolé par ultracentrifugation à partir des tissus de vers à soie normaux, des granules fort semblables aux granules virulents, mais qui se distinguaient toutefois de ceux-ci non seulement par leur absence de virulence, mais encore par une tendance à l'agglutination spontanée et surtout par leurs propriétés antigéniques entièrement distinctes de celles des éléments virulents.

Or, la même année, Claude (7), de son côté, isolait par ultracentrifugation du sarcome de Roux ou sarcome infectieux des poules, des granules virulents tandis qu'il séparait des tissus de poule normale des granules fort semblables mais non virulents; les deux types de granules étaient constitués de nucléoprotéides contenant de l'acide ribonucléique.

Plus récemment, J. Brachet et R. Jeener (8) ont extrait par

ultracentrifugation, du cytoplasme des cellules de Levures et de divers tissus de vertébrés, des granules semblablement porteurs d'acide ribonucléique et auxquels ils attribuent une rôle déterminant dans la synthèse des protéines. C'est aussi à l'acide ribonucléique que, selon J. Brachet (9), serait due la basophilie du cytoplasme.

Enfin, Levaditi (10) isole de la membrane choréo-allantoïdienne de l'œuf normal de poule, des corpuscules que le microscope électronique révèle morphologiquement semblables aux corpuscules élémentaires de la vaccine; il imagine qu'ils pourraient représenter le « précurseur » du virus vaccinal.

Il nous a donc paru essentiel de rechercher les relations pouvant éventuellement exister entre les granules virulents isolés des vers à soie atteints de grasserie et les granules non virulents isolés des tissus de vers à soie normaux, tout particulièrement en ce qui concerne leur teneur en acides nucléiques.

A cet effet, nous avons entrepris d'une part leur étude histo-chimique in situ dans les cellules mêmes et, d'autre part, leur étude microchimique après leur isolement par ultracentrifugation à partir des tissus préalablement broyés.

ETUDE HISTOCHIMIQUE.

On inocule par piqûres dans une fausse patte à l'aide de sang virulent, un lot de vers arrivés à l'avant-dernier stade de leur évolution. Chaque jour qui suit l'inoculation, du 1^{er} au 7^e, on prélève deux vers, qu'après extirpation du tube digestif, on fixe dans du Zenker acétique ainsi que deux vers normaux servant de témoins. Les coupes sont ensuite colorées, les unes, après hydrolyse acide préalable, par la méthode de Feulgen qui colore l'acide thymonucléique en violet, et les autres par le mélange vert de méthyle-pyronine (Unna) dont la pyronine colore l'acide ribonucléique en rouge et le vert de méthyle, la chromatine en vert (J. Brachet [6]); à titre de contrôle, certaines coupes ne sont colorées qu'après avoir subi l'action respectivement de la thymonucléase (5' à 10' à 37°) ou de la ribonucléase (30' à 50°) préparées suivant la méthode de Fischer (11). Dans ce cas, les acides thymo- et ribonucléiques étant détruits, leurs colorations caractéristiques disparaissent. Un autre contrôle consistait à soumettre des coupes à la réaction de Feulgen sans hydrolyse préalable, conditions dans lesquelles l'acide thymonucléique ne prend pas la coloration violette.

L'examen portera uniquement sur les cellules des corps gras et sur les cellules péritrachéales puisqu'elles sont le siège principal de l'infection.

RÉSULTATS.

1) *Vers normaux témoins.* — Les corps gras sont formés de grosses cellules à cytoplasme vacuolisé, modérément colorable à la pyronine n'ayant donc qu'une teneur modérée en acide ribonucléique. Dans le noyau dont la chromatine prend le vert de méthyle, on observe plusieurs nucléoles bien distincts fortement colorés en rouge par la pyronine, donc riches en acide ribonucléique.

Au Feulgen, les noyaux qui sont assez volumineux apparaissent remplis de granulations violettes assez dispersées; en somme, ils semblent plutôt pauvres en acide thymonucléique comparativement à d'autres cellules.

Les cellules péritrachéales sont aplaties; l'affinité de leur cytoplasme pour la pyronine est modérée tandis que dans le noyau les nucléoles sont bien colorés. Le noyau très allongé réagit fortement au Feulgen en présentant une concentration dense de granulations violettes.

2) *Vers infectés.* — Après un ou deux jours d'infection, on n'observe encore aucune différence avec les témoins. A partir du 3^e jour, un petit nombre de cellules accusent les premières manifestations. Leur basophilie augmente, le cytoplasme, dont la taille a augmenté, étant plus coloré par la pyronine; le noyau s'agrandit, ce qui va de pair avec une élévation du nombre et des dimensions des nucléoles. Ces cellules semblent donc révéler un enrichissement en acide ribonucléique tandis que la réaction de Feulgen, légèrement plus intense, paraît trahir un accroissement de la teneur de la chromatine en acide thymonucléique.

Au 4^e jour, le nombre des cellules atteintes augmente; la chromatine tend à se rassembler en une masse pycnotique centrale; la réaction de Feulgen montre en outre une accumulation d'acide thymonucléique dans la zone périphérique du noyau correspondant peut-être à « l'anneau scintillant » de Paillot. Dans certaines cellules, il semble bien que les polyèdres de petite taille soient en voie de formation entre cet anneau externe et la masse centrale.

Au 5^e jour, le nombre des cellules malades a fortement augmenté et les symptômes s'accroissent : le cytoplasme, dont la basophilie est devenue intense, s'est donc fortement enrichi en acide ribonucléique, il en est de même des nucléoles devenus très gros et très nombreux au sein de noyaux volumineux. Il est à noter que la teneur en acide ribonucléique du cytoplasme s'accroît de la périphérie vers le noyau.

De nombreuses cellules, à un stade plus avancé, contiennent des polyèdres bien formés dans le noyau dont les nucléoles ont alors disparu. Ces polyèdres ne prennent guère les colorants basiques mais sont par contre nettement colorés en violet par le Feulgen quoique moins intensément que la chromatine centrale; la réaction étant négative sans hydrolyse acide ou disparaissant après traitement par la thymonucléase, il s'agit certainement d'acide thymonucléique contrairement à l'opinion de Berggold (12).

Ces transformations sont particulièrement frappantes pour les cellules péritrachéales qui ont fortement augmenté de taille : d'aplaties, elles sont devenues cylindriques; leur basophilie est considérable, leur noyau énorme et pycnotique est bourré de polyèdres.

Au 6^e jour, la plupart des noyaux sont envahis par des polyèdres et leurs nucléoles disparaissent à mesure que cet envahissement est plus complet.

Au 7^e jour, on retrouve le même aspect mais en outre de nombreuses cellules en voie de nécrose se sont vidées de leurs polyèdres qu'on voit libres en abondance.

Conclusion.

Il s'avère qu'au cours de la grasserie, le cytoplasme s'enrichit en acide ribonucléique avec corrélativement hyperplasie et hyper-fonctionnement des nucléoles conformément à la théorie de Brachet (8) et de Casperson (13). Il y a également enrichissement du noyau en acide thymonucléique. Cette élévation de la teneur en acides nucléiques va de pair avec une croissance du cytoplasme et du noyau, donc avec une synthèse de protéines.

D'autre part, les polyèdres accumulés dans les noyaux contiennent de l'acide thymonucléique et pas d'acide ribonucléique.

ETUDE MICROCHIMIQUE.

Après avoir saigné et soigneusement débarrassé de leur tube digestif, on broie finement avec du sable dans une solution tampon à pH 7,4 de phosphate 0,05, un lot de vers à soie normaux et un lot de vers à soie inoculés et présentant au maximum les symptômes de la « grasserie ». On centrifuge 10' à 5.000 t/m. pour éliminer les grosses particules (y compris les polyèdres dans le cas des tissus gras); une seconde centrifugation de 10' à 9.000 t/m. sédimente de gros granules qui ne contiennent pas d'acide ribonucléique (réaction de l'orcine négative).

Après quoi, le liquide surnageant, qui ne contient plus que les fins granules, est soumis à l'ultracentrifugation 10' à 60.000 g. Le culot de granules est lavé dans la solution tampon.

D'autre part, on isole aussi les polyèdres par centrifugation fractionnée du sang et des tissus de vers gras.

Les granules extraits des vers à soie normaux ont les mêmes propriétés que ceux extraits des tissus des vertébrés : leur teneur en acide ribonucléique, qui leur confère une réaction positive à l'orcine, est du même ordre de grandeur. Cet acide nucléique s'en détache sous l'influence d'un tampon de phosphates M/6 à pH 7,4; on y constate la présence de peroxydase, de dipeptidase, de phosphatase alcaline et de plasmalogène. Ils sont solubles dans le liquide d'Edsall ($\text{CO}_3^{2-} \text{Na}^2 \text{ M}/50$) et dans le Sabényl à 2 %.

Par contre, il résulte de l'étude qualitative et quantitative ci-après que les granules extraits des vers atteints de grasserie se distinguent à la fois par une plus grande teneur en acide ribonucléique et par la présence d'acide thymonucléique.

ETUDE MICROCHIMIQUE QUALITATIVE.

Des culots de granules obtenus par ultracentrifugation à partir de tissus d'une part de vers normaux, d'autre part de vers gras, sont fixés à l'alcool puis coupés au microtome. Dans les deux cas, les coupes prennent fortement la pyronine mais de façon plus intense pour les granules de vers gras. Cette coloration disparaît après traitement par la ribonucléase. Les granules des tissus gras sont donc plus riches encore en acide ribonucléique que les granules des tissus normaux, ils contiennent de l'acide

thymonucléique car ils sont Feulgen positifs, la réaction étant négative sans hydrolyse préalable ou après action de la thymonucléase. Pour une même épaisseur de coupes, l'intensité de la coloration violette est plus élevée que celle des polyèdres. Les granules de tissus gras contiennent donc plus d'acide thymonucléique que les polyèdres.

ETUDE MICROCHIMIQUE QUANTITATIVE.

Les granules de vers normaux, les granules de vers gras et les polyèdres sont soumis au dosage par la méthode de J. Brachet (14) pour l'acide ribonucléique et par la méthode de Diesche modifiée par J. Brachet (14) pour l'acide thymonucléique.

Il en résulte que les granules de vers normaux contiennent 40 γ par mg. de poids sec d'acide ribonucléique; ils ne contiennent pas d'acide thymonucléique ou seulement des traces douteuses; inversement, les polyèdres (représentant le virus pur) ne contiennent pas ou seulement des traces douteuses d'acide ribonucléique et contiennent par contre 8,4 γ par mg. d'acide thymonucléique.

Quant aux granules extraits de vers gras et représentant un mélange de granules normaux et de granules virulents, ils renferment à la fois de l'acide ribonucléique à raison de 160 γ par mg. du poids sec, soit quatre fois plus que les granules extraits des vers normaux et de l'acide thymonucléique à raison de 19,4 γ soit au moins deux fois plus que les polyèdres.

Ces résultats entièrement concordants avec ceux de l'étude qualitative et avec ceux de l'examen histochimique montrent que le virus de la grasserie, qui se trouve dans le sang et les tissus sous forme de fins granules virulents et de leurs agrégats cristallins, les polyèdres, est un nucléoprotéide à acide thymonucléique alors que les granules de vers normaux comme ceux des vertébrés sont constitués d'un nucléoprotéide à acide ribonucléique. Ce fait est probablement de nature à expliquer les différences sérologiques.

L'introduction du virus de la « grasserie » non seulement entraîne la reproduction massive du nucléoprotéide virulent, mais encore stimule la synthèse des ribonucléoprotéides de la cellule et peut-être celle de leurs thymonucléoprotéides. Cette stimulation va de pair avec l'hypertrophie des cellules infectées

et d'autre part avec cette curieuse chomogénèse qui envahit les tissus des vers gras d'un pigment jaune caractéristique dont il importerait d'étudier la constitution chimique et la signification.

Il importerait aussi de faire dans les granules extraits des tissus de vers gras la séparation des granules virulents des granules normaux afin d'en préciser davantage les constitutions respectives. Il est encore à remarquer que les granules virulents sont vraisemblablement d'origine nucléaire puisque la grasserie est une maladie du noyau alors que les granules normaux étu-

CONSOMMATION D'OXYGÈNE EN MM³/MGR. N. ET PAR HEURE.

Témoins.	Chenilles inoculées.	Nombre de jours depuis l'inoculation.
23	25	3
24	27	3
33	35	3
31	31	3
33	28	4
27	29	4
23	29	4
40	25	4
34	25	4
42	35	4
32	28	5
36	29	5
34	36	5
	38	5
	23	6
	20	6
	26	6

diés jusqu'à présent sont d'origine cytoplasmique. Il convient donc de rechercher l'existence éventuelle de granules normaux d'origine nucléaire et de les extraire de noyaux normaux préalablement séparés du cytoplasme. C'est ce que nous avons tenté de faire sur les noyaux des hématies nucléées de poule. Mais toutes nos tentatives sont restées infructueuses : nous n'avons jamais pu obtenir autre chose qu'une substance donnant des solutions de grande rigidité et ayant la constitution de la nucléohistone. Elle a fait, depuis, l'objet des études de l'un de nous (15). Ces résultats négatifs sont de nature à confirmer le caractère spécifique et étranger des granules virulents de la

En raison de l'active synthèse de protéines à laquelle correspond la multiplication du virus, il nous a paru opportun de rechercher si l'infection s'accompagne d'une élévation des échanges respiratoires. Dans ce but, nous avons comparé la consommation d'oxygène des tissus normaux à ceux des chenilles grasses. Les mesures ont été effectuées par la méthode de Warburg; elles ont porté sur des chenilles dont on avait enlevé préalablement les glandes sericigènes et l'intestin; on séparait ensuite les tissus de la peau en grattant au moyen d'un scalpel : ces tissus consistaient presque entièrement en cellules des corps gras, trachées et cellules pérित्रachéales et c'est sur eux que les mesures étaient exécutées. En fin d'expérience, la teneur en azote du contenu des récipients était déterminée au microkjehldahl; les résultats ont été exprimés en mm³ d'oxygène consommé par heure et par mgr. de N. Ainsi que le montre le tableau ci-contre, la consommation d'oxygène des tissus de la chenille malade ne diffère pas de manière appréciable de celle des témoins; tout au plus remarque-t-on peut-être à la fin de la grasserie une tendance à la diminution des oxydations. Elle s'explique par l'abondance des polyèdres (qui ne respirent très probablement pas) et par la tendance à la cytolysé des cellules à ce moment.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) A. GRATIA, J. BRACHET et R. JEENER. *Acta biologica belgica*, 28 août 1944; — (2) AOKI et CHIGASAKI, *Centralbl. f. Bakter.*, 1921, 86, 481; — (3) A. PAILLOT. *Ann. Inst. Pasteur*, 1926, 40, 314; — (4) A. PAILLOT et A. GRATIA. *C.R. Soc. Biol.*, 1938, 126, 1178; — (5) G. BERGOLD. *Arch. ges. Virusforsch.*, 1939, 1, 120 à 140; — (6) DESNUELLE, GOLD et G. von SCHRAMM. *Biol. Zbl.*, 1942, 62, 103; — (7) CHANG CHI TAN et FROMAGEOT. *Ann. Inst. Pasteur*, 1943, 69, 75; — (8) J. BRACHET et R. JEENER. *Science*, 1940, 91, 77; — (9) J. BRACHET. *Arch. Biol.*, 1942, *Enzymologia*, 1944, 11, 196; — (10) C. LEVADITI. *Ann. Inst. Past.*, 1940, 64, 359, 456; 53, 207; — (11) C. LEVADITI. *Ann. Inst. Past.*, 1939, 130, 1175; C. LEVADITI et BONET-MAURY. *C.R. Soc. Biol.*, 1939, 130, 1175; — (12) G. BERGOLD. *Biol. Zbl.*, 1943, *Seylers Z.*, 1941, 271, 246; — (13) T. CASPERSON. *Naturwiss.*, 1941, 29, 33; — (14) J. BRACHET. (En préparation); — (15) R. JEENER. *Acta biologica belgica*, 27 mai 1944 et 28 avril 1945.

M. LE PRÉSIDENT. — Nous remercions M. Gratia de son intéressante communication.