REVUES CRITIQUES

QUELQUES REMARQUES SUR LES CULTURES D'ENTAMÆBA DYSENTERIÆ

Par Jacques SAUTET

Depuis longtemps, de nombreux auteurs ont tenté de cultiver l'*Entamæba dysenteriae*, mais il faut arriver aux travaux de Bœck et Drbohlav, en 1924, pour avoir une méthode certaine de culture de cette amibe. Toutefois, c'est à Barret et Smith que revient l'honneur d'avoir cultivé, les premiers, une amibe pathogène pour la tortue. Mais avant de passer en revue la majeure partie des études faites depuis 1924 sur cette question, il nous paraît nécessaire de jeter un regard sur les travaux antérieurs à cette date.

I. A-t-on cultivé l'*Entamæba dysenteriae* avant 1924 ?

Si l'on en croit le titre des publications et les affirmations des auteurs, il y aurait fort longtemps que ce problème serait résolu. Malheureusement, ces affirmations ne se sont pas trouvées justifiées. Nous ne parlerons que pour mémoire de Kartulis dont les cultures d'amibes du foin, faites avec une infusion de paille stérilisée, ne donnaient au chat, par leur injection, qu'une diarrhée non caractéristique, n'ayant rien à voir avec la dysenterie. De telles cultures étaient des cultures d'amibes libres, comme celles de Mouton en 1902.

1. **Musgrave et Clegg** (1904). — Plus tard, en 1904, Musgrave et Clegg annoncent qu'ils ont pu cultiver une amibe en partant de selles dysentériques. Ils ensemencent des microbes sur de la gélose, puis des glaires. La température semble peu importante. Ces cultures inoculées au singe donnent des résultats positifs ; par contre un seul chat et un homme ont pu être infectés. D'après la description donnée, il semble bien que l'amibe cultivée ne soit pas l'amibe

dysentérique. Du reste, la possibilité de la cultiver à des températures variables, montre bien que c'est à une amibe libre que les auteurs ont eu affaire ; tout le monde connaît, en effet, l'extrême sensibilité de l'*E. dysenteriae* aux changements, même minimes, de température. Voici la formule du milieu employé par M. et C. :

Eau : 1.000 gr.

Gélose : 20 gr.

NaCl : 0 gr. 30.

Extrait de bœuf : 0 gr. 30 (1).

2. **Lesage** (1904). — Parallèlement à ces auteurs, Lesage, en décembre 1904, publie un travail sur la culture de l'amibe de la dysenterie des pays chauds ; il réussit ces cultures 7 fois sur 30 cas. Il opère à la température de 18° à 25° dans des boîtes ou dans des tubes contenant de la gélose lavée. Il garde facilement pendant deux ans ses cultures pures mixtes avec le *paracoli*. Leur inoculation au chat est positive 35 fois sur 56 ; il en résulte chez l'animal une entérite avec petites amibes dans les selles, amenant la mort en 8 à 15 jours.

La température de culture, la morphologie de l'amibe, la longévité des cultures nous prouvent que là aussi l'auteur n'a pas cultivé l'*E. dysenteriae*.

3. **Werner** (1908). — Du reste, en 1908, Werner, étudiant l'amibe dysentérique, conclut, à cette époque, à l'impossibilité de sa culture ; par contre, au cours de ses divers essais sur les milieux préconisés par les auteurs précédents, il obtient facilement la culture d'une autre amibe (*A. limax*) qu'il identifie à celle obtenue par Musgrave et Clegg. Cette opinion se confirme, car des cultures faites par Liston et Martin, en partant d'une souche isolée par Musgrave et Clegg, ne cessent de donner des résultats négatifs par leur inoculation au chat.

Cependant, cette facilité avec laquelle on isole, des selles des dysentériques, des amibes libres, ne décourage pas les chercheurs et ne les incite pas à contrôler d'une façon plus sévère leurs expériences.

4. **Noc** (1909). — En 1909, Noc cultive des amibes en partant d'abcès du foie et de selles de dysentériques. La culture se fait sur gélose alcaline à 0,5 p. 100 dans des boîtes de Pétri, en présence de bactéries, à la température de 25-28°. Les amibes vivent ainsi très longtemps. Etudiant parallèlement les amibes des eaux de Cochinchine, l'auteur dit : « Les caractères de l'amibe commune

(1) Musgrave et Clegg indiquent en outre : alcalinité, 1 p. 100.

des eaux de Cochinchine se sont toujours montrés identiques à ceux des cultures d'origine hépatique. » L'inoculation au chat est toujours négative.

Les planches contenues dans ce travail nous prouvent que ce n'est pas une *Entamoeba* que l'auteur a cultivée, mais une amibe ressemblant beaucoup à celle qui a été cultivée en 1911 par Wells. En effet les caractères morphologiques nous font croire qu'il s'agit plutôt d'une amibe de grande taille du genre *Endolimax*, par conséquent non pathogène pour l'homme.

5. **Von Wasielewski et Hirschfeld** (1911). — En 1911, Von Wasielewski et Hirschfeld obtiennent une culture pure d'une amibe libre en partant d'un seul kyste ; ils la cultivent à 22-24°, et cette température, optima pour les amibes libres, est justement celle que préconisent les auteurs précédents pour la culture de leurs amibes prétendues pathogènes.

6. **Wells** (1911). — A cette même époque, en 1911, paraît un travail très intéressant de Wells sur les contaminations aériennes des cultures d'amibes ; cet article sévère, comme le dit Chatton, incrimine la mauvaise technique des auteurs. Wells donne des faits irréfutables : il obtient très facilement des cultures d'amibes en partant d'abcès du foie et de selles dysentériques par la méthode de Musgrave et Clegg ; il fait remarquer qu'on ne peut nullement conclure à l'identité des amibes ainsi obtenues avec l'*E. dysenteriae*. De plus, en exposant à l'air, aux Indes, les milieux employés couramment, il obtient 14 fois des cultures sur 36 boîtes de Pétri exposées : les amibes obtenues appartiennent au type *limax*.

7. **Chatton et Lalung-Bonnaire** (1912). — En 1912, Chatton et Lalung-Bonnaire écrivent un article dans le même sens, mais donnent une autre interprétation des faits. « Il semble, disent-ils, que les premiers microbiologistes qui ont cultivé des amibes à partir des matériaux dysentériques, n'ont guère soupçonné qu'ils aient pu isoler d'autres espèces que celles qu'ils avaient observées. » Quant aux cultures faites en partant d'abcès du foie, renonçant à admettre la contamination aérienne, ils supposent plutôt que l'amibe commensale cultivée a suivi de l'intestin au foie la route ouverte par l'*E. dysenteriae*. A la même époque, Craig fait remarquer lui aussi que les amibes libres peuvent passer dans le tube digestif et il dit : « ...It is probable that this is the manner in which many cultures, have been obtained. » De même Vedder, pour étudier l'action de l'émétine, est dans l'impossibilité de cultiver l'*E. dysenteriae*. Malgré tous ces avertissements, d'autres travaux paraissent encore, sans présenter plus de garanties.

8. **Gauducheau** (1912). — Gauducheau, en 1912, cultive des amibes sur divers milieux : gélose nutritive avec 1 p. 100 de peptone et 2 p. 100 de gélose, pomme de terre, sérum coagulé et jaune d'œuf. Il remarque que les milieux liquides ne sont pas très favorables aux cultures. L'inoculation donne chez le chien un syndrome dysentérique une heure après l'injection intra-veineuse des cultures ; l'auteur a heureusement la prudence d'ajouter : « *Malgré la valeur pathognomonique de ce syndrome expérimental, il n'est pas encore possible pour le moment d'établir indiscutablement le rôle pathogène de ce protozoaire.* »

Ce en quoi l'auteur a parfaitement raison car, ni les conditions de culture, ni l'expérimentation, ni les figures données ne nous laissent supposer qu'il puisse s'agir de l'*E. dysenteriae*.

9. **Williams et Calkin** (1913). — En 1913, Williams et Calkin continuent à cultiver l'amibe commensale isolée par Musgrave et Clegg. Cette même année Walker et Sellard prouvent que quelques jours après leur ingestion par l'homme, les amibes libres peuvent être cultivées. Ces cultures ne sont pas pathogènes pour l'homme, car 20 volontaires les ayant absorbées ne présentent aucun trouble.

10. **Couret et Walker James** (1913). — Cependant Couret et Walker James proclament au même moment qu'il leur a été possible de cultiver l'*E. dysenteriae* en partant d'un abcès du foie non infecté : la culture est obtenue pure sur des tissus autolysés, incorporés à de la gélose (1).

11. **Pendolf, Woodcock et Drew** (1916). — En 1916, Pendolf, Woodcock et Drew font des cultures d'amibes à 37° en partant de kystes lavés et centrifugés. Ils emploient le milieu suivant :

Bouillon nutritif	5 parties.
Liq. pancréatique	2 ou 3 parties.
Sédiment avec kystes	1 partie.

Ce milieu semble assez favorable et la température de 37° paraît convenable ; mais les cultures ne sont pas pathogènes pour le chat.

12. **Ross et Thomson** (1916). — A la même époque, Ross et Thomson font remarquer que des amibes libres facilement cultivables, peuvent se rencontrer aussi dans les selles de l'homme.

13. **Cutler** (1918). — Donc, jusqu'à cette époque, il était, semble-t-il, prouvé que l'*E. dysenteriae* n'avait jamais été cultivée, aussi

(1) Pour la critique nous ne pouvons que renvoyer aux travaux de Wells et Chatton.

comprend-on toute l'importance de la publication de Cutler, qui, en 1918, annonce la découverte d'une méthode de culture de l'amibe dysentérique. Il emploie 2 milieux, l'un à l'œuf, l'autre au sang. Il est à remarquer qu'il préconise pour les cultures des amibes, l'emploi des milieux liquides. Ces milieux sont ainsi constitués :

I. *Milieu à l'œuf* (1). — Un œuf entier est secoué dans un flacon avec des billes de verre ; on ajoute 300 cm³ d'eau distillée et on agite de nouveau le mélange que l'on porte à l'ébullition au bain-marie pendant une demi-heure tout en le secouant ; il en résulte un liquide que l'on répartit dans des tubes et que l'on stérilise.

II. *Milieu au sang*. — On fait bouillir pendant une heure dans un litre d'eau 500 cm³ de caillot de sang humain ; au filtrat on ajoute 0,5 p. 100 de NaCl et 1 p. 100 de peptone ; on met dans des tubes et on stérilise.

Dans ces 2 milieux on ajoute avant l'emploi une petite goutte de sang, puis onensemence une glaïre, et on met à l'étuve à 37°. Dans la suite, Cutler trouve qu'une température de 20 à 30° est suffisante. Pour les subcultures, il faut repiquer chaque jour et il ne faut pas que le milieu soit acide. Il obtient ainsi 6 cultures qui durent 3 à 6 semaines. Inoculées au chat, ces cultures donnent une dysenterie avec lésions typiques.

Cette découverte fut contestée par beaucoup d'auteurs ; cependant, il faut reconnaître que ces milieux se rapprochent beaucoup de ceux qui devaient être employés plus tard. Bœck et Drbohlav disent, du reste, avoir pu conserver les amibes dysentériques sur ce milieu au sang, les amibes y poussant difficilement. Cutler a donc probablement cultivé le premier l'*E. dysenteriae*. Ses cultures n'étaient certes pas parfaites et sa méthode assez simple, mais c'est un précurseur.

14. **Yoshida** (1918-1919). — En 1918 et 1919, Yoshida étudie l'éclosion des kystes en 72 heures, à 22-27° dans le milieu suivant :

Liquide de Ringer	4 parties.
Sérum de cheval	1 partie.

Pour la culture des kystes d'amibes, l'auteur opère ainsi : les selles sont mélangées à de l'eau stérilisée et filtrées à travers une gaze ; on centrifuge plusieurs fois en ajoutant de l'eau ; enfin on met le culot pendant 4 minutes en contact avec une solution d'acide chlorhydrique à 2 p. 100 et on centrifuge. Onensemence le culot dans l'eau de condensation du milieu suivant : gélose à 2 p. 100,

(1) Ce milieu, dû à Dean et Monat (1916), a été modifié par Cutler qui y ajoute quelques gouttes de sang.

2 parties ; sang de cheval défibriné, 1 partie ; la culture a lieu à 30° ; 11 passages sont ainsi obtenus.

Le principe de l'enrichissement des selles et du lavage des kystes par l'acide chlorhydrique nous semble bon, puisqu'il a été repris et modifié plus tard par Dobell et Laidlaw (1926) ; mais la culture à une aussi basse température nous semble bien difficile.

Aussi, en 1919, Dobell déclare-t-il que les espèces cultivées jusqu'à ce jour sont toutes des espèces du milieu extérieur et que la découverte de la culture de l'*E. dysenteriae* est à faire. Du reste, en 1922, Gauducheau lui-même écrit : « ...Cette espèce constitue un terme de passage entre les Entamibes, parasites jusqu'à présent incultivables... »

Chose curieuse, c'est par hasard que Bœck et Drbohlav, en cultivant des flagellés, se sont aperçus que des amibes dysentériques poussaient dans leurs tubes ; aussi, se sont-ils mis aussitôt au travail pour préciser cette importante découverte et en donner une technique sûre et certaine.

15. **Barret et Smith** (1924). — Rapportons enfin les travaux de Barret et Smith qui arrivent à cultiver les premiers, en 1924, d'une façon certaine, des Entamibes des vertébrés à sang froid, en employant le milieu de Barret pour les *Blastocystis* :

Sérum humain inactivé	1 partie.
Solution de NaCl à 0,5 p. 1.000	9 parties.

Les auteurs peuvent ainsi avoir des amibes pendant plusieurs mois ; ces expériences sont confirmées et complétées par Taliaferro et Fisher.

II. Les cultures d'*Entamoeba dysenteriae* après 1924

1. **Bœck et Drbohlav** (1924). — Dans leur travail original, Bœck et Drbohlav donnent l'énumération des milieux qu'ils ont employés avec succès.

Ce sont :

- Sérum de cheval et solution salée ;
- Bouillon au sang de Cutler ;
- Gélose-sang et solution salée ;
- Gélose-sang, Locke et sérum humain ;
- Œuf incliné et solution salée ;
- Œuf incliné, solution salée et sérum de cheval ;
- Locke, œuf et sérum de cheval ;

- Locke, œuf et sérum humain (L. E. S.) ;
- L. E. S. et extrait aqueux de fèces ;
- Locke, gélose semi-solide, sérum humain et sang de cheval ;
- Locke et gélose semi-solide, sérum humain ;
- Lœffler, Locke et sérum de cheval ;
- Locke, œuf et albumine d'œuf cristallisée (1 p. 100) (L. E. A.).

Ils ne conservent que quelques-uns de ces milieux. Après plusieurs publications de Drbohlav, la méthode, définitivement mise au point, repose sur les principes suivants : l'*E. dysenteriae* doit être ensemencée, aussitôt après son émission, sur des milieux formés d'une base solide recouverte d'une couche de liquide nutritif. La culture se fait toujours à la température de 37°. Les 3 sortes de milieux employés sont les suivants : les milieux à l'œuf (*Dorset, L. E. S., L. E. A.*), les milieux au sang (*gélose au sang chauffé* ou *milieu chocolat*), et les milieux à la gélose (*Ringer-gélose-amidon*). Dans ces milieux, la base solide est constituée par de l'œuf dilué dans du liquide de Ringer ou de Locke et coagulé ; ou encore de la gélose est dissoute dans du Ringer, avec adjonction de sang ou d'amidon. Cette partie solide est recouverte soit de liquide ovomucoïde, soit de Ringer ou de Locke additionné de sérum. Ce milieu de recouvrement ne doit guère dépasser un centimètre de hauteur. Les amibes poussent alors au fond du tube, à la surface du milieu solide. Les repiquages ont lieu tous les 2 jours ou moins souvent, suivant les milieux employés. La préparation de ces milieux doit être faite stérilement. Dans les premières publications, le liquide de recouvrement devait être stérilisé par passage au Berkefeld, mais Drbohlav a simplifié la technique en supprimant cette filtration ; dans ces conditions et avec de tels milieux, les cultures d'amibes dysentériques, en présence de bactéries, sont aussi parfaites que possible et c'est encore ces milieux que l'on emploie le plus souvent aujourd'hui.

A peine ces publications ont-elles paru que de nombreuses confirmations viennent apporter une preuve éclatante du succès des deux auteurs.

En 1925, Thomson et Robertson, Gupta, Andrew, Guérin et Pons reproduisent avec facilité des cultures d'*E. dysenteriae* par la nouvelle méthode ; les modifications qu'ils y apportent sont insignifiantes.

2. **Brumpt** (1926). — Mais c'est surtout en 1926 que de nombreux travaux paraissent. Brumpt, dans une communication à l'Académie de Médecine, montre le rôle favorisant de l'amidon sur les cultures d'*E. dysenteriae* ; ces expériences devaient être reprises plus tard par Dobell.

3. **Kofoïd et Wagener** (1926). — Kofoïd et Wagener publient une simplification des milieux en remplaçant l'albumine d'œuf de la partie liquide par la solution suivante :

Locke	10 cm ³ .
Sang défibriné	0,5 p. 100.

Ce sang peut venir de l'homme, du chat, du cobaye, du lapin. Sur ce milieu les repiquages ont lieu toutes les 48 heures ; de plus, K. et W. prolongent la vie des cultures en remplaçant au bout de 24 heures le liquide de recouvrement ancien par du liquide neuf ; enfin, ils essaient l'action de l'acriflavine à 1 p. 1.000 pour empêcher la pullulation des bactéries ; Dobell (1926) devait reprendre ces expériences et les compléter.

4. **John, Yorke et Adams** (1926). — John, en avril 1926, puis Yorke et Adams, en août de la même année, devaient aussi apporter une contribution importante à la technique des cultures d'*E. dysenteriae* en partant des kystes d'amibes. John donne une brève et trop succincte note. Par contre, Yorke et Adams publient un travail très documenté sur la question. Nous retiendrons surtout la méthode d'enrichissement des selles grâce à une solution sucrée, qui nous a permis d'avoir de bonnes cultures (1926-27), les kystes n'étant nullement altérés par cette méthode.

On dilue gros comme une noix de selles dans un peu d'eau, puis on mélange avec 500 cm³ d'eau stérile et on met dans un grand cylindre en verre pendant 15 minutes.

On décante et le liquide décanté est alors centrifugé ou laissé toute la nuit dans un autre cylindre. Le dépôt est mélangé avec une solution sucrée et centrifugé à grande vitesse. Les kystes sont dans le liquide surnageant que l'on centrifuge à nouveau en diluant avec 4 fois son volume d'eau. Le culot est alors passé plusieurs fois à l'eau pour laver les kystes ; finalement, on ensemence dans les tubes de culture le culot renfermant des kystes nombreux et quelques bactéries. On a rapidement des amibes mobiles et la culture se poursuit comme si l'on était parti de formes végétatives.

Ces cultures en partant de kystes ont du reste été probablement obtenues d'abord par Bœck et Drbohlav ; mais ces auteurs n'osent pas, eux-mêmes, l'affirmer d'une façon absolue.

5. **Craig** (1926). — Cette même année, Craig publie un travail important sur une technique simplifiée, revenant un peu aux milieux liquides de Cutler, mais surtout à ceux de Yoshida et de Barret et Smith ; c'est ainsi qu'il recommande les milieux suivants :

Liquide de Locke ou de Ringer	7 parties.
Sérum humain inactivé	1 partie.

Le liquide de Ringer qu'il emploie est ainsi modifié :

NaCl (chlorure de sodium) : 8 gr.
CaCl ² (chlorure de calcium) : 0 gr. 2.
KCl (chlorure de potassium) : 0 gr. 2.
Eau distillée : 1.000 gr.

Mais l'auteur arrive à simplifier encore davantage et il annonce avoir cultivé avec succès et très facilement les amibes dysentériques sur un milieu liquide ainsi composé :

Eau physiologique (0,85 p. 100)	7 parties.
Sérum humain inactivé	1 partie.

Nous avons essayé ces milieux sans grand succès, les amibes y végétant péniblement. Mais nous n'avons peut-être pas été assez patient, car, dernièrement, Dobell, Laidlaw et Bishop, après les avoir critiqués, viennent de les employer avec de bons résultats.

6. **Dobell et Laidlaw (1926).** — Enfin, en septembre 1926, a paru un travail considérable de Dobell et Laidlaw : c'est une excellente mise au point de la question et des techniques employées par les auteurs ; on y trouve aussi des faits nouveaux ; c'est ainsi qu'après Kofoïd ils reprennent l'action de l'acriflavine sur les bactéries et les amibes en précisant les doses à employer : 1 p. 20.000 ; après Brumpt, ils signalent l'action de l'amidon sur les cultures d'amibes et ils sont les premiers à faire une étude complète de son mode d'action et de son emploi. Nous avons entièrement confirmé ces vues (1926). Après John (en avril) et Yorke et Adams (en août), ils donnent une technique de culture en partant des kystes amibiens ; pour essayer de les purifier, ils utilisent une méthode à l'acide chlorhydrique se rapprochant de celle de Yoshida (1918-19) ; mais, surtout, ces auteurs ont donné la formule d'un excellent milieu qui n'est qu'une modification heureuse d'un milieu employé primitivement par Böeck et Drbohlav.

Ce milieu se compose de sérum de cheval stérilisé et coagulé à 80° pendant une heure, recouvert de Ringer additionné de blanc d'œuf et d'amidon : sur un tel milieu, qui nous paraît parfait, les amibes se développent très bien et pendant plusieurs jours.

Enfin ces mêmes auteurs donnent plusieurs moyens pour isoler les différentes amibes ; c'est ainsi que l'on obtient seulement l'*E. dysenteriae* par l'inoculation au chat, et qu'on peut l'éliminer par l'action de l'émétine (non toxique pour les autres amibes, sur-

tout pour l'*E. coli*). Enfin les essais de culture pure ont échoué jusqu'à ce jour comme pour tous les autres auteurs.

7. Travaux postérieurs à 1926. — En 1927, les travaux sur la technique des cultures d'amibes dysentériques sont moins nombreux.

Dobell poursuit son étude sur les cultures en partant des kystes (1).

Deschiens remplace le Ringer par de l'eau physiologique à 7 p. 1.000 à laquelle il ajoute de l'albumine ; il reprend aussi avec succès la modification de Kofoïd qui renouvelle le liquide ovomucoïde dans les milieux et prolonge ainsi la vie des amibes dans le même tube.

Vogel, pour étudier l'action du yatren, emploie deux milieux : le premier est composé de Ringer auquel il ajoute 10 gr. d'amidon de riz et 30 gr. de gélose ; le deuxième se compose de parties égales de sang défibriné et de gélose à 3-4 p. 100 dissoute dans du Ringer, avec 1 p. 100 de glucose. On incline les tubes et on les chauffe à 90-100°.

Brug publie en 1928 des observations intéressantes sur la morphologie des amibes en culture et l'évolution des kystes ; de plus, il démontre l'action du sulfate de cuivre sur les kystes amibiens, qui peuvent rester vivants après son action à de fortes concentrations.

La même année, Wagner détermine certains points de technique, mais surtout il étudie l'action des médicaments sur les cultures.

Enfin Dobell, Laidlaw et Bishop reprennent l'étude de l'action de l'émétine sur les cultures d'amibes et emploient alors les anciens milieux liquides.

En dehors de ces questions de technique, dans lesquelles nous voulons ici nous cantonner, envisageons rapidement les principales études que la connaissance de la culture des amibes a permises.

1° Etude de l'action pathogène. — La plupart des auteurs admettent que les cultures d'*E. dysenteriae* sont pathogènes pour le chat. Par contre, l'adjonction d'amidon de riz empêcherait cette action (Dobell) comme le prouvent de nombreuses inoculations faites sans succès. Cependant nous avons soutenu une opinion inverse, toutes les inoculations de cultures avec amidon nous ayant toujours donné des résultats positifs jusqu'en 1926 ; mais, depuis,

(1) Dobell (1927) dit avoir publié le premier cette méthode des cultures en partant de kystes, dans *The Report of the Medical Research Council*. En tous cas la priorité appartient encore à John qui a annoncé la culture de l'*E. dysenteriae* en partant de kystes, dès avril 1926.

nous avons observé des cas où les cultures perdaient dans ces conditions leur pouvoir pathogène, sans que nous ayons pu en déterminer la cause.

2° *Etudes morphologiques et biologiques.* — Les cultures ont favorisé les travaux sur les formes végétatives, les kystes et leur développement (pour cette dernière question les opinions sont actuellement très contradictoires). Nous renvoyons aux travaux de Bœck et Drbohlav, Yorke et Adams, Dobell et Laidlaw, etc.

3° *Etude de l'action des médicaments sur les cultures d'E. dysenteriae.* — C'est surtout cette étude qui a tenté les auteurs. Signalons les travaux de Kofoed en 1925, de Yorke et Adams, de Dobell et Laidlaw en 1926, de Vogel, les nôtres, en 1927, de Chiba, de Dobell, Laidlaw et Bishop, de Wagner en 1928. Tous les résultats sont discordants ; la récente publication de Dobell, Laidlaw et Bishop nous donne du reste raison à ce sujet (1928).

4° *La culture pure des amibes* n'ayant jamais pu être obtenue, la plupart des recherches biologiques faites sur les cultures d'amibes restent contestables.

5° *Certains auteurs (John et Craig) ont voulu voir dans les cultures d'amibes un moyen de diagnostic*, comparable à une méthode d'enrichissement. Les auteurs donnent même des statistiques. Nous ne pouvons malheureusement pas nous associer à des vues aussi optimistes, car nous n'avons jamais pu cultiver les amibes dysentériques avec une aussi grande facilité.

III. Conclusions pratiques

En pratique, nous conseillons pour les cultures d'*E. dysenteriae* l'emploi des milieux suivants : *L. E. S.* ; *L. E. A.* ; *gélose au sang chauffé* ; *Ringer-gélose-amidon* de Bœck et Drbohlav et enfin le *milieu au sérum coagulé* de Dobell et Laidlaw. Tous ces milieux doivent être stériles. Les milieux liquides de Craig peuvent aussi être employés pour certaines expériences particulières, mais ils sont moins favorables au développement des amibes.

Enfin s'il s'agit seulement de conserver des amibes dans un laboratoire, et c'est souvent le cas, tous ces soins minutieux et fort longs de stérilisation peuvent être supprimés en partie ; dans ce cas, nous nous sommes toujours bien trouvé du milieu au sérum, de Dobell et Laidlaw (1) et d'un *milieu à l'œuf* ainsi composé :

(1) Pour la pratique courante, la filtration peut être supprimée.

On met dans un flacon à billes de verre non stérile, contenant 25 cm³ de Ringer, de pH 7,4, un œuf entier ; on agite, puis on répartit dans de petits tubes, à raison d'environ 1 cm³ 5, le liquide obtenu après agitation ; on incline ensuite et on chauffe progressivement jusqu'à 100° ; on laisse à cette température pendant quelques minutes ; puis on conserve à sec à la glacière ; on recouvre seulement de liquide ovomucoïde au moment de l'emploi. Le liquide ovomucoïde est fait avec aseptie et comprend : Ringer, 150 cm³, et deux-tiers de blanc d'œuf.

Nous avons gardé de tels milieux pendant plus de 5 mois et nous les avons utilisés avec succès. Nous ne sommes pas très partisan d'ajouter de l'amidon de riz en poudre à tous les tubes ; nous aimons mieux réserver son emploi au cas où les cultures semblent périlcliter, afin de leur redonner une nouvelle impulsion. Nous faisons en moyenne les repiquages tous les 2 jours sur 3 tubes, afin de ne pas perdre nos souches.

Une température de 37° et une atmosphère humide sont absolument indispensables. On doit éviter pour les repiquages d'employer une pipette trop fine et on aura soin de gratter soigneusement le fond du tube, avant le prélèvement. Onensemence en partant, soit de formes végétatives, soit de kystes : nous recommandons pour l'ensemencement l'emploi du milieu *Ringer-gélose-amidon*. Si le premier tube est trouvé négatif, il ne faut pas désespérer, on doit alors repiquer dans un autre tube, qui, la plupart du temps, sera trouvé positif le lendemain.

Enfin la culture des kystes par la méthode de Yorke et Adams nous a donné de bons résultats, mais, par la suite, nous avons employé cette même méthode simplifiée par Bidegaray. On opère ainsi :

Diluer la selle contenant des kystes avec de l'eau bouillie et la tamiser (tamis à mailles de 1 mm.) ; remplir avec cette dilution un tube à centrifuger et centrifuger (5 tours de la centrifugeuse à main) ; puis on décante la partie surnageante dans un autre tube à centrifuger et l'on centrifuge à nouveau (50 tours) ; on conserve alors le culot obtenu ; on recouvre ce culot d'une solution de saccharose à 20 p. 100 ; on mélange intimement et on centrifuge une troisième fois (50 tours) ; on décante la partie surnageante ; on la met dans un tube Borrel et on y ajoute 4 fois son volume d'eau ; on centrifuge cette dilution (50 tours) ; le culot ainsi obtenu contient les kystes et peut être ensemencé ; il est toutefois préférable de laver ces kystes plusieurs fois à l'eau en centrifugeant, afin de les débarrasser de l'excès de solution sucrée.

Disons enfin un mot de l'association des amibes et des Blastocystis : c'est là une des causes d'échec les plus importantes dans

les cultures ; divers produits ont été préconisés pour y remédier, en particulier l'adjonction d'amidon de riz aux cultures ; mais son action est incertaine. En réalité il n'y a qu'un seul moyen, inoculer au chat les selles contenant les amibes et les *Blastocystis* ; ces derniers se trouvent éliminés et l'on cultive alors en partant des amibes de la dysenterie expérimentale du chat.

RÉSUMÉ

Comme cette rapide revue nous le montre, c'est à Boeck et Drbohlav que l'on doit une méthode simple et pratique pour cultiver l'*Entamæba dysenterix* et beaucoup d'autres protozoaires intestinaux. C'est donc une grande découverte. La technique a été mise parfaitement au point par ceux qui l'ont décrite les premiers, car toutes les modifications apportées par de nombreux auteurs, sont aussi peu importantes que variées. Quant aux études sur l'*Entamæba dysenterix*, que cette méthode a permises, elles sont nombreuses, mais aucune n'apporte encore de connaissances bien nouvelles sur la morphologie et la biologie de ce parasite : nous ne sommes qu'au stade des discussions et des études contradictoires.

BIBLIOGRAPHIE

- ANDREWS (H.). — The cultivation of *E. histolytica* by Boeck's method. *Amer. Journ. Hyg.*, V, 1925, p. 556.
- BARRET (H.) et SMITH (A.). — The cultivation of *E. ranarum*. *Ann. Trop. Med. and Parasit.*, XX, 1926, p. 85.
- BIDEGARAY (H.). — *Etude statistique et critique du Parasitisme Intestinal*. Thèse, Paris, 1927.
- BOECK (W.-C.) et DRBOHLAV (J.). — The cultivation of *Entamæba histolytica*. *Amer. Jl. of Hygiene*, V, 1925, p. 371.
- The cultivation of *Entamæba histolytica*. *Proc. Nat. Acad. Sc.*, II, 1925, p. 235.
- BRUG (S.-L.). — Observations on a culture of *E. histolytica*. *Med. van den Dienst. der Volk. in Ned-Indie*, 1928.
- BRUMPT (E.). — a) L'*E. coli* peut-elle être pathogène pour l'homme ? Expérimentalement elle peut l'être pour le chat. *Bull. Acad. Med. Paris*, XCV, 1926.
- b) Infection expérimentale du chat par l'*E. coli*. *Ann. Paras.* IV, 1926, p. 272.
- CHATTON et LALUNG-BONNAIRE. — Amibe limax (*Vahlkampfia n. gen.*) dans l'intestin humain. Son importance pour l'interprétation des amibes de culture. *Bull. Soc. Path. Exot.*, V, 1912, p. 135-143.
- CHIANG (S.). — The rat as a possible carrier of dysentery amœba. *Proc. Nat. Acad. of Sc.*, XI, 1925, p. 239.

- CHIBA (E.). — On the cultivation of *E. histolytica* and Studies of certain drugs upon *E. histolytica* in culture. *Jl. of the Chosen med. Assoc.*, 1928, p. 751-753.
- CLEGG (M.-T.). — Some experiments on the cultivation of *Bacillus lepræ*. *Philip. Jl. of Science*, IV, 1909, p. 77.
- COURET (M.) et WALKER (J.). — The cultivation of *Amœbæ* in pure culture upon autolyzed tissues. *Jl. Exper. Med.*, XVIII, 1913, p. 252.
- CRAIG (C.). — a) The relation of Parasitic *Amœba* to disease. *Amer. Jl. of Med. Sc.*, XLV, 1913, p. 83.
 — b) The relation of parasitic *amœba* to disease. *War Dep. Office of the surgeon general, Bull.*, 1913, p. 95.
 — The parasitic *amœbæ* of man and their relation to disease. *New Orleans Med. and Surg. Jl.*, LXV, 1912, p. 1-17.
 — a) A simplified method for the cultivation of *E. histolytica*. *Amer. Jl. Trop. Med.*, VI, 1926, p. 333.
 — b) Observation upon the cultivation of *E. histolytica*. *Amer. Jl. Trop. Med.*, VI, 1926, p. 461.
 — Observations upon the hemolytic, cytolytic and complement binding properties of extracts of *E. histolytica*. *Amer. Jl. Trop. Med.*, VII, 1927, p. 225.
- CRAIG (C.) et JOHN (St.). — The value of cultural methods in surveys for parasitic *Amœba* of man. *Amer. Jl Trop. Med.*, VII, 1927, p. 39.
- CUTLER. — A method for the cultivation of *E. histolytica*. *Jl. Path. and Bact.*, XXII, 1918, p. 27.
 — Observation on *E. histolytica*. *Parasitology*, II, 1919, p. 127.
- DARLING (S.). — The observations on the cysts of *E. tetragena*. *Arch. of Int. Med.*, II, 1913, p. 1.
- DEAN et MONAT. — *Journ. Roy. army med. corps*, XXVI, 1916, p. 183.
- DESCHIEENS (R.). — Recherches sur les cultures d'*E. dysenteriae*. Modification du milieu et de la technique de Boeck-Drbohlav. *C. R. Soc. Biologie*, XCVI, 1927, p. 1356.
- DOBELL (C.). — *The amœba living in man*. Londres, 1919.
 — Further observations and experiments on the cultivation of *E. histolytica* from cysts. *Parasitology*, XIX, 1927, p. 288.
- DOBELL (C.) et DALE. — Experiments on the therapeutics of amœbic dysentery. *Journ. Pharmacol. and exp. Therap.*, V, 1917, p. 339.
- DOBELL (C.) et LAIDLAW. — a) On the cultivation of *E. histolytica* and some other Entozoic *Amœba*. *Parasitology*, XVIII, 1926, p. 283.
 — b) The action of Ipecacuanha alkaloid on *E. histolytica* and some other Entozoic *Amœbian* culture. *Parasitology*, XVIII, 1926, p. 266.
- DRBOHLAV (J.). — Demonstration and explanations of the method for cultivation of *Entamœba histolytica*. *Trans. of the R. Soc. of Trop. Med. and Hyg.*, XVIII, 1924, p. 238.
 — a) Présentation d'amibes dysentériques en culture. *Bull. Soc. pathol. exot.*, XVIII, 1925, p. 121.
 — b) Une nouvelle preuve de la possibilité de cultiver *Entamœba dysenteriae* type *histolytica*. *Ann. de Parasitologie*, III, 1925, p. 349.
- GAUDUCHEAU. — Sur une culture amibienne. *Bull. Soc. Path. Exot.*, II, 1909, p. 247.
 — Recherches sur la multiplication des Entamibes. *Far Eastern Assoc. Trop. Med. Trans. Second biennial Congress held at Hongkong*, 1912, p. 74.
 — Recherches sur les dysenteries. *Bull. Soc. Med. Chir. de l'Indochine*, IV, 1913, p. 167.
 — Etude comparative d'une amibe de culture et de quelques autres formes amibiennes végétatives. *Bull. Soc. Med. Chir. de l'Indochine*, V, 1914, p. 293.

- GUÉRIN (P.) et PONS. — Culture d'*E. dysenteriae*. *Bull. Soc. pathol. exot.*, XVIII, 1925, p. 517.
- Culture de *Blastocystis hominis* et des protozoaires intestinaux chez l'homme. *Ann. Inst. Pasteur Indochine*, II, 1926, p. 213.
- GUPTA (B.). — A note on the cultivation of *Entamoeba* from a monkey. *Indian med. Gaz.*, LX, 1925, p. 323.
- JOHN (St.). — a) Differential characteristics of *Amoebæ* of man in culture. *Amer. Jl. Trop. Med.*, VI, 1926, p. 319.
- b) Practical value of examination for *Endamoeba histolytica* by cultures. *Jl. Amer. Med. Assoc.*, LXXXVI, 1926, p. 1272.
- KOFOID (C.) et ALLEN. — On the culture *in vitro* of *Councilmania laffleuri* and *E. coli*. *Proc. Soc. for Exp. Biol. and Med.*, XXIII, 1924, p. 300.
- KOFOID (C.) et WAGENER. — Studies on the effect of certain drugs upon *E. dysenteriae in vitro*. *Univ. California Public Zool.*, XXVIII, 1925, p. 155.
- The behaviour of *Entamoeba dysenteriae* in mixed cultures with bacteria and studies of the effects of certain drugs upon *E. dysenteriae in vitro*. *Univ. of California Publications in Zool.*, XXVIII, 1925, p. 127.
- A simplified medium for the cultivation of *E. dysenteriae*. *Jl. Labo. and Clin. Med.*, XI, 1926, p. 683.
- LAIDLAW (P.), DOBELL (C.) et BISHOP (A.). — Further experiments on the action of emetine in culture of *E. histolytica*. *Parasitology*, XX, 1928, p. 207.
- LANGERON (M.). — *Précis de microscopie*. Paris, Masson, 4^e édition, 1925.
- LESAGE (A.). — Culture de l'amibe de la dysentérie des pays chauds. *C. R. Acad. Sciences*, CXXXIX, 1904, p. 1237.
- Culture de l'amibe dysentérique. *Ann. Inst. Pasteur*, XIX, 1905, p. 91.
- MOUTON (H.). — Recherche sur la digestion des amibes et leur diastase intracellulaire. *Ann. Inst. Past.*, XVI, 1902, p. 457.
- MUSGRAVE (W.-E.) et CLEGG (M.-T.). — Amebas : their cultivation and etiologic significance. *Bureau of govern. labo. ; Biol. labo*, Manille, 1904.
- The cultivation and pathogenesis of *Amoeba*. *Philip. Jl. of Science*, I, 1906, p. 909.
- NOC (F.). — Recherches sur la dysenterie amibienne en Cochinchine. *Ann. Inst. Past.*, XXIII, 1909, p. 177.
- PENFOLD (W.-J.), WOODCOCK (H.-M.) et DREW (A.-H.). — The excystation of *E. histolytica (tetragena)* as an indication of vitality of the cysts. *Brit. Med. Jl.*, 1916, p. 714.
- ROGERS. — The rapid Cure of Amœbic dysentery and hepatitis by hypodermic injections of soluble salts of Emetine. Further experience of the specific curative action in Amœbic disease of hypodermic injections of soluble salt of Emetine. *Brit. Med. Journ.*, 1922, p. 1424.
- ROSS (R.) et THOMSON (D.). — Studies on Egyptian sand amoeba. *Proc. R. Soc. Med.*, IX, 1916, p. 33.
- SAUTET (J.). — Action de l'amidon sur les cultures d'amibes. *Ann. de Paras.*, IV, 1926, p. 345.
- Recherches expérimentales sur quelques produits employés dans le traitement de la dysenterie amibienne. *Ann. de Paras.*, V, 1927, p. 329.
- SCHUURMANN (J.) et SCHUURMANN (A.) TEN BOHREL STUININK. — Essai de culture pure de *Trichomonas intestinalis*. *Ann. Inst. Pasteur*, XXXXI, 1927, p. 62.
- SELLARD et LEIVA. — Experimental therapy of amœbic dysentery. *Journ. Pharm. and experim. Therap.*, XXII, 1924, p. 467.
- Investigations concerning the treatment of amœbic dysentery. *Philippine Journ. Sc.*, XXII, 1923, p. 37.

- TALIAFERRO et FISHER. — The morphology of motile and encysted *E. ranarum* in culture. *Ann. Trop. med. and Paras.*, XX, 1926, p. 89.
- THOMSON et ROBERTSON. — Notes on the cultivation of certain *Amœba* and flagellates of man, using the technique of Boeck and Drbohlav. *Journ. of Trop. Med. and Hyg.*, XXVIII, 1925, p. 343.
- UJIHARA (K.). — Studien über die Amöbendysenterie. *Zeitschr. f. Hyg.*, LXXVII, 1914, p. 329.
- VEDDER. — An experimental study of the action of Ipecacuanha on *Amœba*. *Far Eastern Assoc. Trop. Med. Trans. Second Biennial Congress held at Hongkong*, 1912, p. 87.
- VOGEL. — Ueber Kulturen der Ruhramöbe und deren Beeinflussung durch Yatren. *Arch. f. Schiff's u. Trop. Hyg.*, XXXI, 1927, p. 74.
- WAGNER (O.). — Untersuchungen über die experimentelle Chemotherapie der Amöbenruhr, 1928. *Beihefte zum Archiv f. Schiff's. und Trop. Hyg.*, XXXII, 1928, p. 5.
- WALKER (F.) and SELLARD (A.). — Experimental entamœbic dysentery. *Philip. Jl. of Science*, VII, 1913, p. 253.
- WASIELEWSKI. — Ueber Amöbennachweis. *Münch. mediz. Woch.*, LVIII, 1911, p. 121.
- WASIELEWSKI et HIRSCHFELD. — Zur technik der Amöbenuntersuchung. *Hygien. Rundschau*, XIX, 1909, p. 925.
- WELLS (R.). — Aerial contamination as a fallacy in the study of amœbic infections by the cultural methods. *Parasitology*, IV, 1911, p. 204.
- WELLS (R.) et GREIG (E.). — Dysentery and liver abscess in Bombay. *Sci. mem. by Off. of the med. and san. Depart of the Gov. of India*, Calcutta, 1911.
- WENYON. — *Protozoology*. Baillière, Tindall et Co, Londres, 1926.
- WILLIAMS (A.). — Pure cultures of amœbæ... *Collected studies from the research labo. Dep. of health city of New-York*, VI, 1911, p. 298.
- WILLIAMS (A.-W.) et CALKINS (G.-N.). — Cultural Amebæ. A study in variation. *Jl. of Med. Research*, XXIX, 1913, p. 43.
- YORKE (W.) et ADAMS (A.). — I. Development of cysts. Excystation and development of encysted amœba *in vitro*. II. Longevity of the cysts *in vitro*, and their resistance to heat and to various drugs and chemicals. *Ann. Trop. Med. and Parasit.*, XX, 1926, p. 279.
- a) Observation on *E. histolytica*. Some factors governing development and excystation of the cysts *in vitro*. *Ann. Trop. Med. and Paras.*, XXI, 1927, p. 281.
- b) Amœbic dysentery. Investigations into the life history of *E. histolytica*. *Brit. Med. Jl.*, 1927, p. 486.
- YOSHIDA (K.). — The encystment of dysentery Amebæ *in vitro*. *Jl. Exp. Med.*, XXVIII, 1918, p. 387.
- Ueber die Auskeimung der Cyste von *E. tetragena* und *E. coli in vitro*. *Mitt. d. Med. Gesellsch. Tokio*, XXXIII, 1919, p. 3.
- Ueber die Encystierung der dysenterie Amöben *in vitro*. *Mit. a. d. Med. Fak. d. Kais. Univ. Kyushu*, V, 1919, p. 49.
- Reproduction in vitro of *E. tetragena* and *E. coli* from their cysts. *Jl. Exp. Med.*, XXXII, 1920, p. 357.