

## CULTURE DE L'ENTAMOEBA DYSENTERIÆ SUR MILIEUX A L'INTESTIN DE CHAT

Par R. DHAYAGUDE (1)

Depuis l'époque (1925) à laquelle Boeck et Drbohlav ont annoncé avoir cultivé avec succès l'*Entamoeba dysenteriae*, un grand nombre de travaux ont été consacrés à la technique de cette culture. Parmi toutes les modifications qui ont été proposées, celle de Dobell, avec l'addition d'amidon, suggérée d'abord par E. Brumpt, a donné uniformément de bons résultats et de riches cultures ; mais le milieu de Dobell nécessite une couche inclinée de sérum coagulé de cheval, recouvert de liquide de Ringer, auquel on a ajouté de l'albumine et de l'amidon. Nous avons cultivé avec succès, sur ce milieu, *Entamoeba dysenteriae*, provenant d'une fillette de quatre ans souffrant d'un accès dysentérique aigu, et nous avons pu obtenir une culture abondante après une incubation de 48 à 72 heures. Pour poursuivre la culture au laboratoire, il était nécessaire d'avoir une grande quantité de sérum de cheval pour la préparation des tubes inclinés. Ceux que nous avons préparés avec du blanc d'œuf ou de la gélose au sang n'ont pas donné de résultats satisfaisants.

Nous avons donc cherché à préparer un milieu qui nous permettrait d'éviter la difficulté qu'il y a à se procurer du sérum de cheval et qui, en même temps, nous donnerait des cultures encore plus riches que celles qu'on obtient sur le milieu de Dobell. Nous indiquons ci-dessous les résultats de nos essais.

L'amibe de la dysenterie est pathogène pour le chat, chez lequel elle produit un type mortel de dysenterie aiguë. Aucun autre animal n'est aussi sensible à l'infection. Nous avons donc pensé qu'il y avait peut-être, dans le gros intestin du chat, quelque substance favorable à la vie et à la multiplication de l'amibe dysentérique. Puisque celle-ci prolifère si bien *in vivo*, il n'est pas illogique de penser qu'en se rapprochant des mêmes conditions *in vitro*, on pourrait obtenir de meilleures cultures.

Partant de cette idée, nous avons entrepris des expériences en vue de simplifier la préparation du milieu, de telle sorte que la

(1) Traduit de l'anglais par le D<sup>r</sup> Maurice Langeron.

culture puisse être faite avec des produits à la portée de tout laboratoire modestement doté et qui ne peut se procurer du sérum de cheval. Nous avons employé le gros intestin du chat sous plusieurs formes :

- a, fragments frais.
- b, fragments chauffés.
- c, infusion fraîche.
- d, extrait chauffé.

En outre, nous avons essayé quelques autres modifications, en vue de rechercher si un ou plusieurs des constituants employés dans le milieu de Dobell peuvent être supprimés sans nuire à la qualité du milieu. Nous avons établi aussi des moyens de contrôle pour nous assurer que l'amibe avec laquelle nous avons expérimenté n'était pas un coprozoaire.

**Technique.** — Dans toutes nos expériences, nous avons employé, à la place du sérum coagulé, de la gélose nutritive ordinaire (pH 7,6). Cette gélose inclinée était couverte de liquide de Ringer. Ces deux constituants sont restés les mêmes au cours de tous nos essais.

Les résultats que nous avons obtenus avec les milieux suivants sont consignés dans le tableau ci-joint.

O. — Ce milieu a été préparé en ajoutant à la gélose-Ringer un morceau frais de gros intestin, mesurant environ  $2 \times 2$  cent., avec de l'albumine et de l'amidon, comme pour le milieu de Dobell. Il faut prendre des chats de 5 à 6 mois ; on les tue par le chloroforme, on ouvre l'abdomen et on enlève le gros intestin jusqu'à 3-4 cent. de l'anus. On lave dans le liquide de Ringer et on coupe en petits morceaux.

OO. — Comme pour O, mais en supprimant l'albumine.

OOO. — Comme pour O, mais sans amidon.

I. — A la gélose-Ringer, on ajoute 2 à 3 cm<sup>3</sup> d'infusion de gros intestin et de l'amidon. L'infusion est préparée avec 20 gr. de gros intestin coupé en très petits morceaux et 200 gr. environ de liquide de Ringer. On laisse infuser à la glacière pendant 24 heures.

II. — Comme pour I, mais sans amidon.

III. — Gélose-Ringer avec extrait chauffé de gros intestin et amidon. On prépare l'extrait chauffé comme l'infusion, mais on chauffe à 110° pendant 20 minutes, sans laisser infuser plus longtemps. On prend 2 à 3 cm<sup>3</sup> de cet extrait.

IV. — Comme pour III, mais sans amidon.

V. — Gélose-Ringer avec un morceau d'intestin chauffé (on prend un morceau qui a servi à faire l'extrait à chaud) et de l'albumine.



VI. — Comme pour V, mais sans albumine.

VII. — Comme pour V, mais avec amidon.

VIII. — Gélose-Ringer avec un morceau d'intestin chauffé et de l'amidon, mais sans albumine.

IX. — Gélose-Ringer avec un morceau d'intestin non chauffé (ayant servi à l'infusion à froid) et avec albumine et amidon.

X. — Comme pour IX, mais sans albumine.

Les numéros suivants ont été établis pour le contrôle :

XI. — Gélose-Ringer seule.

XII. — Gélose-Ringer et albumine.

XIII. — Gélose-Ringer avec albumine et amidon.

**Remarques.** — Parmi les trois premiers milieux, le 0 donne toujours de bons résultats. Ensemencé avec une quantité variable de matériel (de quelques gouttes à 1 cm<sup>3</sup>) provenant d'une culture de trois jours sur milieu de Dobell, il donne une riche culture en moins de 48 heures.

Sur ce milieu, toutes les formes qu'on observe sont d'abord végétatives ou prékystiques immobiles, montrant un seul noyau par la coloration au Lugol. Les kystes commencent à apparaître le 3<sup>e</sup> jour. Ce sont des corps sphériques, à contour réfringent bien défini ; ils paraissent clairs parce qu'ils ne renferment aucune inclusion ou seulement des corpuscules iodophiles. Ils possèdent quatre noyaux dont la structure est très visible avec l'objectif à immersion. Le nombre de ces kystes augmente jusqu'à un maximum variable, puis reste stationnaire.

Dans les expériences entreprises par Boeck et Drbohlav et confirmées par J.-G. Thomson et Robertson, les kystes n'ont été observés qu'une fois. Plus récemment, Simić a essayé de les obtenir par divers moyens, tels que la chaleur, le froid, les rayons solaires, etc., mais il n'a pu arriver à amener les formes végétatives à s'enkyster dans les tubes de culture.

Nous croyons que notre milieu peut produire, à un certain moment, des kystes aux dépens des formes prékystiques. Ces dernières sont des corps arrondis, sans paroi définie et renfermant une grande vacuole iodophile. Le Lugol n'y fait apparaître qu'un seul noyau. On les trouve en grand nombre dans les vieilles cultures sur milieu de Dobell, mais nous n'avons jamais pu trouver de kystes dans les cultures faites sur ce milieu.

Lorsqu'après le 3<sup>e</sup> ou le 4<sup>e</sup> jour, nous avons trouvé quelques kystes bien définis, nous pensions qu'avec le vieillissement de la culture, les kystes deviendraient de plus en plus nombreux. Comme nous l'avons dit plus haut, cet espoir ne s'est pas réa-

lisé. Le nombre des kystes augmente jusqu'à un moment où il reste stationnaire. Nous avons pensé ensuite qu'en conservant les cultures suffisamment longtemps pour permettre aux formes végétatives et prékystiques de dégénérer, on obtiendrait seulement des kystes dans les tubes.

Nous avons essayé d'obtenir l'éclosion de ces kystes au moyen de la méthode de Yorke et Adams, destinée à réaliser ce phénomène avec les kystes formés dans les conditions naturelles. Nous pensions arriver ainsi à étudier le cycle complet dans les cultures en tubes. En faisant ces essais, nous avons constaté un phénomène remarquable ; nous avons trouvé qu'une culture, âgée de 4 à 5 jours, qui, le jour précédent, présentait un riche développement avec de nombreuses formes végétatives, quelques prékystes et quelques kystes bien définis, pouvait, en moins de 24 heures, voir disparaître toutes ces formes : végétatives, prékystiques et kystiques. Les repiquages faits à ce moment sur milieu de Dobell donnent un résultat négatif.

Nous avons observé chaque fois ce phénomène et nous pensons que c'est une démonstration *in vitro* de ce qui se passe probablement dans l'intestin des chats. S'ils ne meurent pas d'une infection aiguë, on sait qu'ils guérissent complètement, c'est-à-dire qu'ils ne deviennent jamais des porteurs de kystes comme c'est le cas pour l'homme. La détermination du ou des facteurs qui amènent cette destruction soudaine est un problème à la solution duquel nous travaillons ; les résultats en seront publiés en temps voulu.

Avec le milieu 000, les résultats n'ont été ni constants, ni satisfaisants. Les cultures sont toujours très pauvres. Cela montre que l'addition à la fois d'albumine et d'amidon enrichit le milieu de culture. L'amidon est un bon aliment pour les amibes, mais il fermente facilement sous l'action des micro-organismes, ce qui tend à acidifier fâcheusement le milieu. L'albumine joue probablement plutôt le rôle de tampon que celui d'aliment.

Pour les autres modifications qui vont suivre, on peut dire qu'en général le matériel non chauffé est plus favorable que le matériel chauffé.

I et II. — Ces deux milieux sont à base d'extrait d'intestin non chauffé, avec ou sans amidon. Le n° I avec amidon donne de meilleurs résultats que le n° II qui n'en renferme pas. De tous les milieux préparés à base d'extrait d'intestin, c'est le n° I qui donne les meilleurs résultats, probablement meilleurs qu'avec le milieu de Dobell.

III et IV. — Ces milieux renferment de l'extrait d'intestin à chaud avec ou sans amidon. Le résultat est généralement pauvre.

V, VI, VII, VIII. — Ces milieux sont additionnés d'un morceau d'intestin chauffé. Toutes les combinaisons possibles ont été essayées, dans la pensée que si l'une d'elles donnait une bonne culture, nous aurions trouvé le remède à la difficulté de nous procurer du sérum de cheval. V et VI n'ont pas donné de bons résultats. VIII, qui renferme de l'amidon, en a donné de meilleurs, mais VII, qui contient à la fois de l'albumine et de l'amidon, a donné les résultats les plus satisfaisants. A notre point de vue, ce milieu a résolu la difficulté et nous a donné de riches cultures.

IX et X. — Milieux additionnés d'un morceau d'intestin non chauffé. Le n° IX, avec albumine et amidon, donne des cultures plus riches que le n° X. Pour la préparation de ces milieux à l'intestin non chauffé, une glacière est indispensable. Cette nécessité les rend moins universellement applicables bien qu'ils soient meilleurs que les précédents.

XI, XII, XIII. — Milieux de contrôle qui ont toujours donné des résultats négatifs.

#### RÉSUMÉ

1. — Des milieux à base d'intestin de chat ont été employés avec succès pour la culture de l'*Entamoeba dysenterix*.

2. — Le milieu n° 0, qui contient un morceau frais de gros intestin de chat, a donné des cultures très riches et, plus tard, a produit des kystes.

3. — Le milieu n° VII, qui contient un morceau d'intestin chauffé, a été trouvé très utile pour cultiver les amibes dysentériques dans les endroits où on ne peut se procurer du sérum de cheval.

4. — L'albumine et l'amidon paraissent améliorer les milieux.

5. — Dans le milieu n° 0, on a toujours observé des kystes et on a noté leur disparition subite après le troisième ou le quatrième jour.