ANNALES DE PARASITOLOGIE

HUMAINE ET COMPARÉE

TOME XXII

1947

Nos 3-4

MÉMOIRES ORIGINAUX

ENTAMÆBA KNOWLESI N. SP.

PARASITE DE DEUX TORTUES :

TERRAPINA CINOSTERNOIDES

ET *PLATYSTERNUM MEGACEPHALUM*

Par J. RODHAIN et M. Th. VAN HOOF

Dans une note présentée à la Société de Biologie Belge, en 1945, l'un de nous a mentionné qu'après une interruption de 4 ans, les cas d'amibiase relevant d'*Entamæba invadens* avaient réapparu parmi les serpents du Jardin Zoologique d'Anvers. Antérieurement nous avons prouvé que certains Chéloniens pouvaient être porteurs de l'entamibe pathogène sans en souffrir apparemment.

La réapparition des nouveaux cas mortels nous incita à rechercher, si, parmi les diverses espèces de tortues constituant la collection de la zoologie, se trouvaient des porteuses de l'entamibe pathogène.

Ces recherches, dont nous rapportons les résultats dans le présent travail, ont dû être fréquemment interrompues par suite de circonstances diverses qui les ont fait traîner en longueur.

Les tortues terrestres vivent dans de petits terrariums séparés, sans communication les uns avec les autres. En dehors de ces ter-

rariums fermés, vivent réunies une dizaine d'espèces de tortues d'eau dans un bassin ouvert dont l'eau est périodiquement renouvelée.

Nos recherches rappelées plus haut, nous avaient appris que l'on pouvait obtenir des cultures d'*Entamoeba invadens* en ensemençant le culot de centrifugation de l'eau prélevée dans des terrariums où vivaient des porteurs de kystes.

Nous avons donc commencé par faire des cultures d'après cette technique. Environ 250 cm³ d'eau recueillis en raclant le fond des dépressions, servant d'abreuvoir ou de bain pour les tortues, sont centrifugés à 3.000 tours pendant 10 minutes. Le culot est ensuite réparti en une série de tubes de culture.

Le milieu employé est celui qui nous sert pour l'entretien de nos souches d'*Entamoeba invadens* à savoir :

Partie solide : sérum de mouton coagulé.

Partie liquide : Ringer.

Immédiatement après l'ensemencement des tubes, il est ajouté un peu d'amidon de riz stérilisé à sec. Les tubes sont maintenus à la température du laboratoire.

Les amibes apparaissent dans les cultures, où pullule une flore bactérienne très variée, après un laps de temps variant de 5 à 10 jours. Elles s'accompagnent ou non de flagellés ou d'infusoires divers.

Nos premiers essais remontent au 20-6-1944.

I. Le culot de centrifugation ensemencé provient d'un terrarium où vivent deux espèces de tortues : *Terrapina cinosternoïdes* et *Chelodina longicollis*.

Toutes les cultures deviennent positives. A frais les trophozoïtes présentent la plus grande ressemblance avec *Entamoeba invadens*. Afin d'expérimenter leur pouvoir pathogène et établir ainsi leur identification, nous inoculons une première culture à un orvet (63). L'orvet, tenu en observation, ne présente aucun signe d'amibiase. Inoculé après cinq mois, au moyen d'une de nos souches d'*Entamoeba invadens*, le reptile meurt d'amibiase typique après 60 jours.

II. Le 18-VII. — Nous faisons un essai identique avec de l'eau prélevée dans le grand bassin où vivent diverses tortues d'eau. Tous les tubes nous donnent des amibes semblables à celles de l'expérience précédente.

Nous obtenons le même résultat positif avec de l'eau prélevée d'un terrarium où vivait une tortue *Malacoclemys* ; de même avec de l'eau du

terrarium d'une *Testudo tabulata* et d'un autre où vivait une tortue du Japon.

Au contraire, les ensemencements, faits avec de l'eau recueillie dans le terrarium où vivait un *Boa constrictor* et dans celui d'un *Python molurus*, restèrent négatifs. Il en fut de même aussi des cultures établies avec de l'eau du bassin où survivaient encore quelques caïmans.

L'étude histologique des amibes obtenues se borna à l'examen à l'état frais. Une culture provenant du terrarium où vivait *Terrapina ornata* fut inoculée à un orvet (64) qui resta indemne d'amibiase.

Ces premiers essais ne nous avaient pas permis d'obtenir une souche d'amibe pathogène. Ils nous firent penser que les entamibes cultivées appartenaient à une souche différente d'*Entamæba invadens*.

Trois mois après, le 23-2-1945, nous avons repris un essai. L'eau provenait d'un bassin provisoire dans lequel, à la suite des dégâts causés au Jardin zoologique par les bombardements des robots allemands, avait été rassemblée toute une série de tortues d'espèces diverses.

Les cultures furent positives, leur pathogénicité fut éprouvée vis-à-vis d'un orvet (65) qui ne contracta pas d'amibiase et vis-à-vis de cinq vipérines *Tropidonotus natrix*.

Aucune de celles-ci non plus ne contracta d'amibiase. Une d'elles fut tuée 21 jours après l'inoculation. L'intestin ne présentait pas la moindre trace d'irritation ; la culture de son contenu donna pourtant encore un résultat positif. La culture obtenue fut inoculée à un orvet (69) qui resta indemne d'amibiase. Cet essai nous confirma la nature non pathogène des *Entamæba* obtenues en culture, et nous détermina à en faire l'étude morphologique.

Jusqu'en septembre 1945 nous n'avions conservé que la souche isolée du bassin dit provisoire. Nous décidâmes d'isoler individuellement, dans des aquariums séparés, les diverses espèces de tortues vivant dans le grand bassin commun et d'établir des cultures après que les animaux y auraient été détenus pendant 7 à 10 jours.

Nous résumons dans le tableau ci-dessous les résultats de ces essais :

ESPÈCES DE TORTUES	RÉSULTAT DES CULTURES	TYPES D'AMIBES OBTENUES	PROVENANCE DES TORTUES
<i>Emys orbicularis</i>	+	<i>Endolimax</i>	Europe
<i>Terrapina cinosternoides</i>	+	<i>Entamoeba</i>	?
<i>Hydromedusa tectifera</i>	0	—	Argentine
<i>Chelodina longicollis</i>	+	<i>Endolimax</i>	Australie
<i>Damonia</i> (Sp.).....	0	—	?
<i>Platysternum megacephalum</i> .	+	<i>Entamoeba</i>	?
<i>Hydraspis nilarii</i>	0	—	Amérique du Sud
<i>Sternotherus sinuatus</i>	0	—	Afrique
<i>Clemys leprosa</i>	0	—	Europe
<i>Terrapina henriki</i>	0	—	?

Description de l'Entamibe. — L'étude des deux souches obtenues des terrariums où vivaient, dans l'un *Terrapina cinosternoides*, et dans l'autre *Platysternum megacephalum*, montra qu'il s'agissait de la même espèce morphologique.

Trophozoïtes. — Dans les cultures examinées à frais, les trophozoïtes ressemblent à ceux d'*Entamoeba invadens*, dont ils présentent les mêmes mouvements. Ils avancent rapidement, poussant un pseudopode unique qui habituellement ne permet pas de distinguer l'ectoplasme. Ce dernier ne devient nettement apparent que lorsque les mouvements de l'amibe se ralentissent.

Le noyau est difficilement visible dans l'endoplasme des parasites mobiles et nous a paru moins distinct que chez *Entamoeba invadens*.

L'endoplasme contient des bactéries diverses et est parfois bourré de grains d'amidon. L'amibe peut aussi incorporer des kystes (autophagie).

Les dimensions des trophozoïtes varient dans des limites assez considérables : à côté de grandes formes s'en rencontrent de beaucoup plus petites qui n'ont à peine que le tiers des premières : 10 μ 25.

Les dimensions les plus fréquentes que nous avons mesurées sur des formes de culture (amibes au repos arrondies) sont de 20 μ 5 à 29 μ 5. Les formes dépassant 30 μ sont rares ; la plus grande que nous avons rencontrée mesurait 28 μ 8 $\times$ 31 μ 2, elle avait phagocyté quatre kystes. En mouvement, les parasites s'allongent considérablement et peuvent s'étirer jusqu'à atteindre 61 μ .

Le noyau à caryosome petit, central, mesure, dans les formes non en division, en moyenne $4\mu 8$; il peut être central ou excentrique. Lorsque la différenciation est suffisante, les grains de la couche chromatique périphérique apparaissent nettement distincts.

Kystes. — Lors de l'enkystement apparaît une grande vacuole iodophile, en dehors de laquelle se remarquent les noyaux. Ceux-ci, au nombre de quatre, sont situés, deux par deux, à la périphérie du

Entamæba knowlesi n. sp. — Culture ex *Terrapina cinosternoïdes*.
Kystes et trophozoïtes (1)

kyste, les deux paires séparées par la vacuole iodophile. Cette dernière disparaissant, les noyaux viennent occuper une situation plus centrale.

Les corps chromatoïdes, lorsqu'ils sont visibles, sont toujours peu nombreux, un ou deux et de forme au moins deux fois plus longue que large. Les mensurations faites à frais sur des kystes de liquide de culture additionné de traces de Lugol, ont donné les résultats suivants :

(1) Les trophozoïtes sont dessinés d'après les cultures sur lamelles immergées d'après la méthode de Dobell. Coloration par hématoxyline phosphotungstique ; réactif employé aussi pour les kystes.

Sur 50 kystes, 21 mesuraient 12μ ; 20 avaient $9\mu 5$; les plus petits ne dépassaient pas $7\mu 2$ et le plus volumineux atteignait $13\mu 8$. La moyenne sur le total était de $10\mu 78$.

Les mensurations pratiquées sur des kystes colorés à l'hématoxyline ferrique, après fixation au sublimé alcoolique de Schaudinn, nous ont donné, pour 13 kystes, une moyenne de 11μ .

Le diamètre des quatre noyaux inclus dans les kystes mûrs est notablement plus petit que ceux des formes végétatives. Il ne dépasse pas en moyenne $2\mu 4$.

Discussion. — Pas moins de sept espèces d'Entamibes sont décrites chez des Chéloniens. Carini, qui a découvert les deux dernières espèces, a dressé un tableau d'ensemble, résumant les caractères distinctifs de chacune de ces Entamibes.

Nous croyons utile, pour la discussion qui va suivre, de reproduire le tableau de Carini ; nous y avons inscrit les caractères spécifiques de l'amibe que nous avons étudiée ici.

Remarquons déjà ici que pour les espèces *Entamæba testudinis* et *E. baretti*, les kystes ne sont pas connus ; cette lacune est certes regrettable et nécessitera ultérieurement une révision de la nomenclature actuelle. Elle laisse en tout cas planer un certain doute sur l'identité des entamibes observées par Alexeieff chez *Nicosia trijuga*, et par Wenyon chez *Testudo argentina* et *Testudo calcarata* et que ces auteurs rapportent à *Entamæba testudinis*. W. H. Tagliafero et Holmes font remarquer d'ailleurs que l'entamibe qu'Alexeieff considère comme *Entamæba testudinis* se rapproche d'*Entamæba barretti*.

Parmi les cinquante espèces, quatre possèdent des kystes quadri-nucléés : *Entamæba terrapinæ* Sanders et Cleveland, hôte de deux espèces de *Chrysomys* ; *Entamæba insolita*, Geiman-Wichterman parasitant *Testudo elephantina*, et *Testudo vicina* ; *Entamæba testudinea* de la tortue brésilienne *Testudo tabulata*, et enfin *Entamæba* sp. décrite par Knowles et das Gupta chez *Trionyx gangeticus*.

C'est à ces espèces qu'il importe de comparer l'entamibe que nous avons cultivée. Celle-ci se distingue d'emblée de *E. testudinea* dont les dimensions sont beaucoup plus grandes, tant celles des formes végétatives que des formes enkystées.

Entamæba insolita, outre que les trophozoïtes sont de dimensions moindres que celle de notre parasite, possède un kyste notablement plus volumineux. Quant à *E. terrapinæ*, les très petites dimensions des trophozoïtes, ainsi que celles de leurs noyaux, la font distinguer de l'espèce que nous avons étudiée. C'est de l'*Entamæba* décrite par Knowles et das Gupta que notre parasite se rapproche

Entamibes de tortues

Espèce d'Entameba	Auteur et date	Espèce de tortue	Dimensions en μ		Kystes	Cultures
			Trophozoïtes	Noyau		
<i>Entameba testudinis</i>	Hartmann 1910 Alexieff 1912	<i>Testudo graeca</i> <i>Nicotia trifuga</i>	50-70	12.5	Non vus	Non éprouvées
	Wenyon 1926	<i>Testudo argentina</i>	Dimensions celles ci-dessus	Dimensions		Non éprouvées
	Sanders-Cleveland 1930	<i>Testudo calcarata</i> <i>Chrysomys picta</i>	Dimensions non données	Dimensions non données		Non éprouvées Cultivées durant peu de temps
<i>Entameba baretti</i>	Barret-Smith 1923 Taliaferro-Holmes 1924	<i>Chelydra serpentina</i>	13-23 moyenne 18	—	Non vu	Positives
<i>Entameba</i> sp. ?	Knowles-Gupta 1937	<i>Trionyx gangeticus</i>	10-60	5-6	11,7 4 noyaux	Cultivées facilement
<i>Entameba terrapinae</i>	Sanders-Cleveland 1930	<i>Chrysomys elegans</i> <i>Chrysomys picta</i>	10-15 moyenne 10	2-4	8-14 moyenne 10 4 noyaux	Cultivées facilement à 20-22° C.
<i>Entameba insolita</i>	Geiman-Wiechertman 1937	<i>Testudo elephantina</i> <i>Testudo vicina</i>	21-16,8	5,2	15,7 4 noyaux	N'a pas été éprouvée
<i>Entameba testudinea</i>	Carini 1944	<i>Testudo tabulata</i>	50-120	10	25 2-4 noyaux	Pas éprouvée
<i>Entameba jaboti</i>	Carini 1944	<i>Testudo tabulata</i>	20-30	6	16-18 2 noyaux	Positives
<i>Entameba knowlesi</i>	Rodhain-Van Hoof 1947	<i>Chelodina longicollis</i> <i>Platysternum</i> <i>megacephalum</i>	21-33	4,8	9,6 à 12 moyenne 10-11 4 noyaux	Cultivées facilement à la température du laboratoire

le plus. Cette amibe se cultive facilement, comme la nôtre ; le noyau des trophozoïtes et les kystes quadrinucléés ont des dimensions très voisines de celles que nous relevons chez l'*Entamæba* décrite par nous. Les dimensions des formes végétatives de cette dernière sont pourtant notablement inférieures.

Seule une étude comparative plus poussée des formes de culture pourrait décider si vraiment les deux parasites sont différents l'un de l'autre. En attendant qu'elle puisse se faire, nous proposons pour l'*Entamæba* que nous avons isolée par culture des deux tortues, *Terrapina cinosternoides* et *Platysternum megacephalum*, le nom spécifique d'*Entamæba knowlesi*. Nous pensons ainsi honorer la mémoire de l'ancien directeur de l'Ecole de Médecine Tropicale de Calcutta. Nous voulons aussi retenir la possibilité de l'identité du parasite, dont la description fait l'objet de ce travail, avec l'*Entamæba* décrite par Knowles et das Gupta et qu'ils n'ont pas cru devoir nommer.

Nous entretenons depuis un an les cultures d'*Entamæba knowlesi*, en vue de faire des essais pour rechercher si cette amibe peut s'établir en parasite durable chez d'autres espèces de tortues que celles d'où nous l'avons isolée. La question, au point de vue zoologique, offre quelque importance.

Il est certain que la description d'*Entamæba testudinis* et aussi celle d'*Entamæba baretti*, n'est pas complète. L'ignorance dans laquelle nous restons concernant leurs kystes est cause de confusion dans la nomenclature des Entamibes des Chéloniens. Les recherches que nous espérons pouvoir réaliser, lorsque les conditions pour l'obtention de tortues diverses deviendront meilleures, contribueront peut-être à préciser la nomenclature des Entamides des Chéloniens.

Sous ce rapport aussi, la comparaison des cultures des espèces cultivables serait hautement utile.

BIBLIOGRAPHIE

- ALEXIEF (A.). — Sur quelques protistes parasites intestinaux d'une tortue de Ceylan, *Nicoria trijuga*. *Zool. Anz.*, XL, 1912, p. 97.
- BARRET (H.) et SMITH (N.-M.). — The cultivation of an *Entamæba* from the turtle *Chelydra serpentina*. *Amer. J. Hyg.*, IV, 1924, p. 155-159.
- CARINI (A.). — Entamæbas do intestino de Quelônios. Descrição de duas espécies novas encontradas na *Testudo tabulata*. *Arqu. de Biol.*, XXVIII, 1944.
- DOBELL (C.). — Some new methods for studying intestinal amœbæ and other protozoa. *Parasitology*, XXXIV, 1942, p. 101-112, ,

- GEIMAN (Q.) et WICHTERMAN (R.). — Intestinal protozoa from galapagos tortoises (with description of three species). *J. Paras.*, XXIII, 1937, p. 331-343.
- HARTMANN (M.). — Nova ameba intestinal, *Entamæba testudinis*. *Mem. Inst. Osw. Cruz*, II, 1910, p. 3.
- KNOWLES (R.) et DAS GUPTA (B.-M.). — On two intestinal protozoa of an indian turtle. *Ind. J. Med. Res.*, XXXI, 1930, p. 18.
- RODHAIN (J.). — Longue conservation de la virulence d'*Entamæba invadens* en culture. *C.R. Soc. Biol.*, CXXXIX, 1945, p. 67.
- RODHAIN (J.) et VAN HOOFF (M.-T.). — Les chéloniens porteurs d'*Entamæba invadens*. *C.R. Soc. Biol.*, CXXI, 1936, p. 156.
- SANDERS (E.-P.) et CLEVELAND (L.-R.). — The morphology and life-cycle of *Entamæba terrapinæ* sp. nov. from the terrapin *Chrysemys elegans*. *Arch. Protist.*, LXX, 1930, p. 267-272.
- TALIAFERRO (V.-H.) et HOLMES (F.-O.). — *Entamæba baretti* n. sp. from the turtle *Chelydra serpentina*. *Amer. J. Hyg.*, IV, 1924, p. 160-168.
- WENYON (C.-M.). — *Protozoology*, London, 1926.

Institut de médecine tropicale Prince-Léopold, Anvers.