

## CULTURE D'ENTAMOEBEA MURIS DE LA SOURIS A LA TEMPÉRATURE DE 22-23° C.

Par Tsch. SIMITCH et ZI. PETROVITCH

Quoiqu'*Entamoeba muris* ressemble morphologiquement beaucoup à *E. coli*, ces deux amibes se différencient nettement par certains caractères biologiques. L'un de ces caractères se rapporte à la multiplication et l'entretien de ces deux amibes *in vitro*. En effet, tandis que *E. coli* se multiplie abondamment et se conserve facilement *in vitro*, la culture de *E. muris*, à notre connaissance, n'a été signalée jusqu'à présent que par N. Kuwabara (1931) et W. W. Frye et H. E. Meleney (1932).

N. Kuwabara a cultivé *E. muris* du rat dans le milieu Tanabe-Chiba, mais il a rencontré quelques difficultés le premier mois en raison de la persistance dans les cultures de *Blastocystis*. Le maximum de croissance des amibes cultivées par cet auteur a été enregistré les 3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> jours. Avec l'acidification du milieu, les amibes disparaissent. A partir du 5<sup>e</sup> passage en culture, les enkystements des formes végétatives ont été observés de façon constante. Le diamètre des kystes obtenus en culture sur ce milieu variait de 16,3 à 27,5  $\mu$ .

W. W. Frye et H. E. Meleney, en parlant du contenu cœcal de 23 rats, ont réussi à isoler et à entretenir *in vitro* six souches d'*E. muris*. Parmi ces souches, l'une a été repiquée 9 fois, une autre 7 fois. Dans la troisième souche, entretenue *in vitro*, les formes végétatives se transformaient en kystes à huit noyaux à partir de la 7<sup>e</sup> subculture. Cependant, il est intéressant de noter que ces auteurs n'ont pas pu isoler *E. muris* de la souris, bien qu'ils aient utilisé la même technique de culture.

A. R. Neal (1950) a essayé de cultiver *E. muris* dans le milieu Dobell et Laidlaw et dans bien d'autres milieux recommandés pour les cultures d'amibes ; mais il n'a pas réussi à l'isoler *in vitro*. D'autre part, il n'a pas réussi à cultiver cette amibe en se servant des milieux de culture de Kuwabara et de Frye et Meleney.

Nos essais pour cultiver *E. muris* remontent à 1930, c'est-à-dire à l'époque de nos études sur *T. intestinalis*, parasite commun du rat, du chien, du chat et de l'homme. A cette occasion et dans le but d'isoler *T. intestinalis* du rat, de nombreux contenus cæcaux riches en *E. muris* ont été ensemencés dans différents milieux et contrôlés après conservation à 37° C. Mais bien qu'il s'agisse ici de milieux de culture sur lesquels nous isolions facilement *E. dysenteriae* et les autres amibes parasites de l'homme et des animaux domestiques, *E. muris* n'a jamais pu être ainsi isolée, ni cultivée. De ces résultats expérimentaux, nous avons conclu qu'*E. muris* ne se multiplie pas *in vitro* dans les mêmes conditions qu'*E. dysenteriae* et les autres amibes, cultivées suivant la technique de Boeck et Drbohlav.

Cependant, en suivant les cultures des contenus cæcaux de souris blanches sur gélose-sérum, conservé à 22-23° C., nous avons été surpris d'observer la présence d'*E. muris* à côté de *T. microti*. Cette découverte inattendue nous a incité à étudier un peu plus en détail les conditions de culture *in vitro* d'*E. muris*. Dans ce travail, nous avons accordé une attention spéciale au choix des milieux de culture et au degré de température de leur conservation. Dans plusieurs séries d'expériences, les milieux de culture (dont la partie inclinée était constituée de sérum ou d'œuf, ou encore de gélose avec 1 cc. de sérum de cheval, et la partie liquide par de l'eau physiologique), ont été conservés à 22-23° C., 26° C. et 37° C. après ensemencement avec le contenu cæcal de trois souches de souris blanche. Nous allons exposer brièvement ici les résultats de ces recherches :

Après examen des milieux de culture conservés à 26 et 37° C. pendant sept jours, nous n'avons trouvé que *T. microti*, quelle que soit la composition des milieux usés ; nous avons conclu de ces observations qu'*E. muris* ne se multiplie dans nos milieux de culture ni à la température de 37° C., ni à celle de 26° C. Dans les cultures maintenues à 22-23° C., les amibes ont été trouvées seulement dans le milieu à base de gélose-sérum. Dans ce dernier, les amibes ont été observées : pour une souche, le 9<sup>e</sup> jour ; pour la seconde, le 6<sup>e</sup> jour, et pour la troisième, le 7<sup>e</sup> jour de leur conservation. Par conséquent, *E. muris* peut être isolée sur gélose-sérum, pourvu que ce milieu soit conservé à 22-23° C.

Avant de communiquer les résultats obtenus en cultivant plusieurs souches d'*E. muris*, nous dirons quelques mots sur la préparation du milieu gélose-sérum, et sur la technique d'ensemencement des amibes, enfin sur le procédé de conservation des amibes isolées.

La préparation du milieu que nous employons pour la culture

d'*E. muris* est très simple : la partie inclinée de ce milieu consiste en gélose salée, à laquelle on ajoute du sérum de cheval (1 cc. par tube) avant la solidification de la gélose dans les tubes inclinés. Quant à la partie liquide, elle consiste en eau physiologique avec laquelle, au moment de l'ensemencement, nous recouvrons la partie solide sur deux travers de doigt.

Pour la culture d'*E. muris*, nous partons d'amibes fraîches, prélevées dans le contenu cæcal des souris sacrifiées. Dans chaque tube de milieu, nous mettons deux ou trois gouttes (suivant la richesse des amibes) du contenu cæcal, préalablement dilué avec de l'eau physiologique. Après adjonction de l'amidon du riz dans les tubes ensemencés, ceux-ci sont placés à l'étuve dont la température est fixée à 22-23° C.

Pour le contrôle des milieux ensemencés, on prend, au fond de la partie liquide du milieu, une goutte de culture, après grattage préalable de la partie superficielle de la gélose. Les amibes sont recherchées au petit grossissement du microscope placé dans l'étuve de Foot, chauffée à 30-35° C.

Dans le milieu gélose-sérum maintenu à 22-23° C., les premières amibes ont été trouvées (suivant les souches) entre le 6<sup>e</sup> et le 9<sup>e</sup> jour. A ce moment, les amibes sont peu nombreuses ; mais, les jours suivants, leur nombre s'accroît. Dans les cas où les premières amibes ont été vues au 6<sup>e</sup> jour, leur nombre maximum a été constaté entre le 10<sup>e</sup> et 12<sup>e</sup> jour. Cependant, à partir du 15<sup>e</sup> jour, le nombre des amibes diminue sensiblement, mais on peut les trouver dans les tubes de culture jusqu'à l'expiration du mois qui suit l'ensemencement. A partir du 12<sup>e</sup> et 15<sup>e</sup> jour, à côté des formes végétatives, on trouve également dans les cultures des kystes à huit noyaux. Les jours suivants, le nombre des kystes augmente de telle façon qu'à partir du 25<sup>e</sup> jour, on trouve plus de kystes que de formes végétatives.

Dans la première subculture (ensemencée au moment où le nombre des amibes dans le tube d'isolement atteint son maximum), la durée de multiplication d'*E. muris* n'est pas aussi longue que dans le tube d'isolement : on peut observer des amibes dès le lendemain, mais leur présence ne dure que 6-8 jours au maximum. D'autre part, les amibes sont moins nombreuses que dans le tube d'isolement. Quant aux kystes, on les trouve dès le commencement, et leur nombre augmente avec le vieillissement de la culture.

Dans la 2<sup>e</sup> subculture, la multiplication des amibes s'arrête au bout de deux à cinq jours par l'enkystement rapide de toutes les formes végétatives. Dans deux souches d'*E. muris* sur cinq, la multiplication des amibes a cessé dès la première subculture par l'enkystement des formes végétatives après deux ou trois jours.

Pour conserver le plus longtemps possible les amibes dans le tube d'isolement, nous procédons de la façon suivante : dès que nous avons découvert les premières amibes, nous renouvelons tous les trois jours une partie du milieu de culture, en remplaçant l'élément liquide du milieu par de l'eau physiologique fraîche et en ajoutant dans celle-ci une nouvelle quantité d'amidon de riz. Nous avons ainsi facilement entretenu *E. muris* en culture pendant un mois.

Les formes végétatives d'*E. muris*, isolée et cultivée à 22-23° C., se distinguent des formes végétatives trouvées dans le contenu cæcal de la souris par leur plus grande taille et par des mouvements un peu plus lents. En effet, la grandeur des formes végétatives cultivées à cette température dépasse considérablement le diamètre de 30  $\mu$ , ce qu'on ne voit pas chez les amibes trouvées directement dans le contenu cæcal de la souris. La taille des amibes de culture, bourrées d'amidon du riz, atteint souvent 45  $\mu$  en diamètre. Les mouvements des amibes de culture sont d'habitude paresseux, quelle que soit la température à laquelle on les examine. Les mouvements d'*E. muris* de culture ressemblent fort aux mouvements d'*E. coli*.

Quant aux kystes, issus dans la culture des formes végétatives, ils ne se distinguent de ceux trouvés dans les matières fécales de la souris ni par leur grandeur, ni par le nombre de leurs noyaux.

#### RÉSUMÉ

Quoiqu'*Entamoeba muris* soit un parasite de mammifère à sang chaud, cette amibe se multiplie aisément *in vitro* à la température de 22-23° C.

Nous cultivons cette amibe à 22-23° C. dans un milieu dont la partie solide (inclinée) se compose de gélose-sérum et la partie liquide d'eau physiologique.

Dans ce milieu et à cette température, on ne voit pas d'amibes avant six jours, mais elles peuvent y demeurer près d'un mois.

Dans la culture d'*E. muris*, à côté des formes végétatives, on rencontre également leurs kystes.

## BIBLIOGRAPHIE

- KUWABARA (N.). — On the cultivation of *Entamoeba muris* (Grassi, 1879) *in vitro*. *Keijo J. Med.*, II, 1931, 28.
- FRYE (W. W.) et MELENEY (H. E.). — Investigations on *Entamoeba histolytica*, and other intestinal protozoa in Tennessee. IV. A study of flies, rats, mice and some domestic animals as possible carriers of the intestinal protozoa of man in a rural community. *Am. J.H.*, XVI, 1932, 729.
- NEAL (R. A.). — An experimental study of *Entamoeba muris* (Grassi, 1879) ; its morphology, affinities and host-parasite relationship. *Parasitology*, XL, 1950, 3, 4.
- SIMITCH (Tsch.) et PETROVITCH (Z.). — Contribution à la connaissance de la biologie des *Trichomonas*. 1. Polymorphisme et division multiple de *T. microti* en culture (*sous presse*).

(Travail de l'Institut de Parasitologie de l'Académie serbe des Sciences  
Direct. : D<sup>r</sup> Tsch. Simitch)

---