ANNALES DE PARASITOLOGIE

HUMAINE ET COMPARÉE

Tome XXXIX

1964

N° 6

Annales de Parasitologie (Paris), t. **39**, 1964, n° 6, pp. 655 à 663

MÉMOIRES ORIGINAUX

Sur le mode d'enkystement et de dékystement d'*Entamoeba histolytica* "in vitro"

par F. PICK

Etant donné que le mode proprement dit de l'enkystement et du dékystement d'*Entamoeba histolytica* n'est connu ni dans des conditions naturelles, ni dans des conditions expérimentales, nous nous sommes proposé d'étudier ce problème au moins *in vitro*.

A cette fin, nous avons procédé à diverses expériences, en faisant varier la composition et la température de l'élevage afin d'aboutir à une méthode apparemment satisfaisante.

Matériel.

La première souche que nous avons étudiée provenait d'un indigène d'Indonésie hospitalisé à Leiden.

Cette souche d'*E. histolytica*, mise initialement en culture sur le milieu classique de Boeck et Drbohlav additionné de grains d'amidon de riz, a été en régression constante dans les cultures ultérieures, ne révélant que la présence de formes végétatives disparaissant par la suite complètement, tandis que les cultures-témoins, établies dans des conditions différentes, ont rapidement montré une reprise vigoureuse de la souche en perdition.

Technique.

Dans les conditions de stérilité habituelles, nous avons alorsensemencé des prélèvements des sub-cultures du milieu classique sur un milieu di-phasique insuliné de la composition suivante :

La phase solide inclinée, dans des tubes à hémolyse, était composée de gélose additionnée de foie de bœuf, de protéose-peptone et de chlorure de sodium (Bacto-Liver-Infusion-Agar).

La partie liquide était du Ringer-sérum de Cheval, en quantité suffisante pour recouvrir la partie solide inclinée dans le tube à hémolyse, maintenu verticalement.

Au fond de la phase liquide de ce milieu di-phasique, nous avons déposé, à l'aide d'une pipette Pasteur, un mélange consistant en deux anses de grains d'amidon de riz, une anse de craie et trois unités internationales d'une Insuline commerciale, pour 1 ml de solution de Ringer.

L'insuline commerciale utilisée, a contenu par 1 U.I. d'insuline 1 mg de glucose et de traces d'un stabilisateur antiseptique.

Le matériel à examiner a été incubé à la température de 33° C, des températures plus basses ou plus élevées, entre 30 et 37° C, s'étant révélées sensiblement moins favorables.

Pour l'observation continue, des échantillons de culture ont été inclus entre lame et lamelle et placés sur une platine chauffante de température constante de 33° C.

En présence des sub-cultures toujours luxuriantes, nous avons jugé utile de tenir compte de certains aspects de la phase végétative, en partie déjà connus, qui pourraient être en rapport avec la préparation éventuelle de l'enkystement.

Mécanisme de déplacement et polarisation des trophozoïtes.

On a jusqu'alors admis que l'Amibe se déplace par protrusion d'un pseudopode qui, par son propre raccourcissement, entraîne le corps amibien pouvant montrer à sa base l'adhésion stable d'une petite masse de bactéries conglomerées.

Mais, en créant des conditions expérimentales déterminées, pour ralentir sensiblement le déplacement des Amibes, nous avons constaté d'une part que le mode proprement dit de progression est plus compliqué, et d'autre part que les trophozoïtes montrent une véritable polarisation de leurs corps.

Peu après avoir ajouté au milieu d'observation des hématies provenant du sang défibriné de mouton, on assiste à l'établissement d'un rapport curieux entre les hématies devenues épineuses et les formes végétatives toujours en progression.

C'est d'abord une, puis plusieurs hématies qui sont fixées par une de leurs épines en un seul point de la surface de l'Amibe, distal par rapport à la direction de la progression.

La fixation de cette apophyse épineuse de l'hématie entraîne sa déformation en ellipse, donnant l'impression que l'hématie résiste à son entraînement.

Si plusieurs hématies subissent le même sort, on les trouve groupées les unes auprès des autres, les épines fixées réunies en une tige s'insérant en un seul point distal du corps amibien en progression.

Au fur et à mesure que l'Amibe progresse parmi les hématies mélangées au milieu d'observation, une deuxième couche d'hématies se fixe derrière la première.

La déformation de la deuxième couche d'hématies est moins elliptique.

Finalement, il se forme une troisième couche adhérent étroitement à la deuxième. Les hématies de la troisième couche sont à peine déformées.

L'ensemble de cet arrangement donne l'impression d'un bouquet fixé avec sa tige au pôle distal de l'Amibe en progression.

Le nombre d'hématies pouvant participer à la formation d'un bouquet paraît être limité.

La fixation du bouquet est très solide, car elle se maintient pendant la migration des Amibes et même après coloration par le *May-Grünwald-Giemsa*.

Mais il y a d'autres cas où les Amibes en progression agglomèrent les hématies sous forme d'une petite calotte adaptée à leur partie distale. Par la suite, un nombre plus considérable d'hématies que dans le cas de formation d'un bouquet se fixent à la calotte basale et viennent former un amas à peu près cylindrique dont les diamètres transversal et longitudinal peuvent dépasser ceux du corps amibien en progression.

Ce phénomène de polarisation du trophozoïte d'E. *histolytica*, que nous avons décrit (4) en 1941, a été redécouvert en partie en 1958 par F. Kradolfer et F. Gros (3).

Ces auteurs, mettant en expérience des formes végétatives d'E. *histolytica* dans des préparations additionnées de sang complet de rat et placées sur une platine chauffante de 37° C, n'ont observé que le deuxième mode d'agglomération des hématies ; ils ont signalé que « l'action de rassemblement, et la formation des conglomerats terminaux d'hématies, est le processus le plus saillant dans les préparations d'Amibes additionnées d'érythrocytes. Ces observations ont été confirmées par la voie cinématographique ». (« Die Sammeltätigkeit und die Bildung der endständigen Konglomerate ist der auffallendste Vorgang in diesen mit Erythrozyten versetzten Amöbenpräparaten. Die Beobachtungen werden kinematographisch dokumentiert. »).

Dans tous les cas de polarisation des trophozoïtes par la fixation d'amas d'hématies plus ou moins figurés, on pourrait s'attendre à ce que le poids de ces hématies entraîne un allongement du corps amibien en voie de progression.

Or, c'est précisément le contraire qui arrive.

Pour entraîner la masse des hématies, le pseudopode évaginé reste dans sa position tandis que le corps amibien se raccourcit dans le sens longitudinal et s'élargit dans le sens transversal. C'est le raccourcissement du corps amibien qui entraîne la masse d'hématies.

Par la suite, il y a de nouveau arrondissement du corps amibien ne laissant persister que la partie terminale du pseudopode évaginé qui s'allonge à nouveau, et ainsi de suite.

La locomotion de ces trophozoïtes consiste donc dans le jeu alternatif de l'évagination d'un pseudopode, puis de la contraction du corps amibien ; elle n'est pas réalisée par les seules forces de traction du pseudopode.

Mode de nutrition des trophozoïtes.

Il nous a été donné d'assister à plusieurs reprises au mode d'ingestion des hématies et des grains d'amidon par les trophozoïtes.

Dans un premier temps, la partie apicale bombée du pseudopode procède à la fixation d'un de ces éléments sans que nous ayons pu observer de quelle manière le contact s'établit.

Peu après, l'Amibe procède à l'invagination progressive de la partie apicale du pseudopode entraînant l'élément à ingérer dans cette dépression.

Quand l'invagination ectoplasmatique est suffisamment profonde, elle se ferme par contraction circulaire, emprisonnant ainsi complètement le corps étranger.

La dernière phase se déroule avec une trop grande rapidité pour être suivie, car l'élément à ingérer se trouve subitement à l'intérieur de l'endoplasme, tandis que le relief bombé d'un nouveau pseudopode se produit avec la même vitesse.

L'ingestion des hématies ou des grains d'amidon de riz est souvent suivie d'une accélération de la motilité des Amibes.

F. Kraldorfer et F. Gros (3) sont d'abord arrivés à des conclusions diamétralement opposées à nos observations : « L'ingestion des érythrocytes par des trophozoïtes d'*E. histolytica*, disent-ils, se distingue de l'érythrophagocytose des leucocytes par le fait que les érythrocytes ne sont pas englobés par les pseudopodes, mais agglomérés à une partie distale des trophozoïtes, d'où ils pénètrent dans l'intérieur de l'Amibe. » (« Die Ingestion von Erythrozyten durch Trophozoiten der *E. histolytica* unterscheidet sich von der Erythrophygozytose bei Leukozyten dadurch, dass die Erythrozyten nicht von Pseudopodien umfasst werden, sondern an einer distalen Stelle des Trophozoiten angelagert werden und von da ins Amöben Innere gelangen. »).

Mais, après avoir communiqué en 1962 nos observations à F. Kradolfer, il nous a remis un tiré à part avec une annotation manuscrite mentionnant qu'il avait observé lui aussi l'ingestion des hématies par les pseudopodes des formes végétatives d'*E. histolytica*, grâce à une technique mise au point postérieurement à la note transmise et datant de 1958.

En ce qui concerne les éléments de la flore bactérienne associée, nous n'avons jamais observé le mécanisme de leur ingestion, mais nous ne pouvons pas exclure l'éventualité de leur ingestion simultanément avec les gros éléments figurés.

Enfin, il faut encore envisager la possibilité de l'ingestion des substances en solution par endosmose ce qui préjugerait la présence d'une membrane électivement semi-perméable.

En faveur de cette conception pourraient militer éventuellement les observations que nous avons faites avec la pyocyanine.

Après addition de ce pigment bactérien en solution, nous avons pu observer (4) une véritable coloration vitale et simultanément une accélération appréciable de la rapidité de locomotion des trophozoïtes, montrant même le phénomène de polarisation par des hématies agglomérées.

Forme sphérique biologique des trophozoïtes.

L'adoption de la forme sphérique par les trophozoïtes d'*E. histolytica* est un phénomène bien connu qu'on peut observer constamment dans les cultures anciennes et qu'on peut provoquer facilement par des moyens mécaniques, chimiques ou thermiques.

Or, il existe aussi une forme sphérique qu'on pourrait qualifier de « biologique ».

Cette forme est précédée obligatoirement par une phase d'élimination des inclusions alimentaires, ne comprenant que des hématies, des grains d'amidon, de riz et des gros débris cellulaires, et laissant persister la plus grande partie des éléments de la flore bactérienne ingérée. Comme nous n'avons jamais assisté à l'expulsion des gros éléments ingérés, nous pensons que cette « élimination » correspond en réalité à leur résorption.

Nous sommes alors en présence d'une *clearance* portant sur les *gros éléments ingérés* des trophozoïtes.

Après cette *clearance*, l'Amibe s'arrondit et présente des *mouvements ondulatoires périphériques*, à la suite desquels elle adopte sa forme biologique irréversible.

Rappelons que déjà F. Fajardo (2), en 1896, avait constaté que les Amibes hémaphages d'une souche brésilienne d'E. *histolytica* présentaient des mouvements ondulatoires de l'ectoplasme avant de devenir sphériques, forme qu'il avait prise pour la « forme ronde de repos ».

Comportement des éléments de la flore bactérienne ingérés à l'intérieur de la forme sphérique biologique des Amibes.

Dans l'endoplasme du corps amibien maintenant définitivement arrondi, on observe les éléments bactériens ingérés agités de mouvements browniens et répartis irrégulièrement.

Tout en continuant de montrer ces mouvements browniens, les éléments figurés se déplacent très lentement dans un sens centripète formant des couches concentriques de plus en plus éloignées du centre du corps amibien.

Finalement, ils se trouvent étroitement liés à la face interne du corps sphérique de l'Amibe. C'est le phénomène de *clearance bactérienne* de la *forme sphérique biologique* des trophozoïtes.

Formation de la membrane kystique.

Les éléments bactériens répartis à l'extrême périphérie du corps amibien sont apparemment utilisés pour la construction d'une véritable coque de protection.

Phase kystique.

Protégée par sa coque, l'Amibe parcourt les phases bien connues de sa vie endokystique portant sur l'apparition des inclusions iodo- et sidérophiles, la division du noyau, la disparition progressive de ces inclusions parallèlement à la multiplication parfois non synchrone des noyaux, et ce, jusqu'à la formation de kystes quadrinucléés privés de toutes inclusions.

Nous retenons de cette vie endokystique de l'Amibe la présence d'un nouveau processus de *clearance*, portant cette fois sur les *inclusions iodo- et sidérophiles* et qui s'achève lorsque l'Amibe endokystique est arrivé à maturité.

Nous avons en outre constaté que toutes les étapes de la phase kystique donnaient la réaction de « l'encerclement à distance » (4) qui se présente de la manière suivante :

Les hématies du sang défibriné de mouton en particulier, ajoutées au milieu

d'observation, sont stoppées devant une zone circulaire de protection entourant les kystes.

Les kystes morts sont touchés directement par les hématies environnantes.

S. L. Brug (1) a observé ces zones libres entourant les kystes vivants d'*Entamoeba histolytica*, *Endolimax nana*, *E. williamsi* et de *Blastocystis hominis* pour lesquelles il a proposé l'expression de « zones abactériennes ».

Mode d'éclosion de l'Amibe endo-kystique.

Peu après l'accomplissement de la clearance portant sur les inclusions iodo- et sidérophiles, la coque du kyste quadrinucléé laisse brusquement apparaître une ligne brisée à grandes dentelures et toujours en position équatoriale.

C'est au niveau de cette fente que la libération du corps amibien va commencer.

En règle générale, dans la nature, la naissance d'un corps commence toujours par sa partie la plus résistante ; ce mécanisme joue également pour l'éclosion du corps endokystique d'*E. histolytica* : l'un des noyaux, entouré d'une mince couche endoplasmique, traverse le premier la fente équatoriale de la coque kystique.

Par la suite, passent assez rapidement les 2°, 3° et 4° noyaux entraînant toujours de petites quantités d'endoplasme, tandis que la grande masse endoplasmique de l'Amibe glisse la dernière à travers la fente préformée.

Entièrement sortie de sa coque kystique, l'Amibe reprend sa forme plus ou moins globulaire et, en évaginant des pseudopodes, elle s'éloigne du lieu de sa naissance.

Exceptionnellement, il y a aussi des cas d'éclosion avortée, lorsque la masse endoplasmique passe la première à travers la fente équatoriale.

Dans ce cas, les quatre noyaux étroitement liés ne sont plus entourés que par une mince couche protoplasmique et restent étranglés derrière la fente équatoriale à l'intérieur de la coque kystique tandis que la masse plasmatique déjetée à l'extérieur de la coque ne peut se séparer des noyaux.

Après la naissance des Amibes quadrinucléées, les coques kystiques conservent leur fente équatoriale de déhiscence ou se séparent en deux moitiés isolées à bords dentelés.

Essais comparatifs.

Les trois souches d'*Entamoeba histolytica*, provenant de la collection de L. Lamy, que nous avons pu mettre en expérience à l'Institut Pasteur de Paris pendant les années 1945 et 1946, ont bien montré une croissance et une longévité considérables sur le milieu di-phasique insuliné.

Mais les trophozoïtes de ces trois souches n'ont jamais révélé l'apparition du phénomène de polarisation par addition d'hématies au milieu de culture, ni celui de l'hématophagie ou de l'enkystement.

Par contre, la souche d'*Entamoeba histolytica* que nous avons pu isoler dans notre laboratoire du Ministère de la Santé publique de la R.O. de l'Uruguay en 1955, à partir de selles d'un malade provenant de la frontière brésilienne, a montré le même comportement que la souche indonésienne que nous venons de décrire.

Résumé.

Après avoir repiqué une souche indonésienne d'*Entamoeba histolytica*, ensemencée initialement sur le milieu classique de Boeck et Drbohlav à 37°C, sur un milieu diphasique insuliné à 33°C, nous avons observé une reprise vigoureuse de la vitalité de cette souche, en voie de disparition sur le précédent milieu.

Dans ces conditions, il nous a été possible :

- a) d'observer le phénomène de la *polarisation des trophozoïtes*,
- b) d'analyser de près la progression de ces formes effectuée par un *mouvement triphasique*,
- c) d'assister au processus de l'érythrophagie et de l'ingestion des grains d'amidon de riz par les pseudopodes.

Dans ces conditions apparemment favorables, nous avons pu préciser le *mode d'enkystement* des trophozoïtes qui se déroule de la manière suivante :

1) Dans les trophozoïtes en mouvement, les grosses inclusions alimentaires (hématies, grains d'amidon de riz, débris cellulaires) sont dissoutes, processus pour lequel nous proposons l'expression de *clearance alimentaire* des trophozoïtes.

2) Puis l'Amibe s'arrondit.

3) L'Amibe arrondie montre des *ondulations périphériques*.

4) Après la cessation des ondulations périphériques, l'Amibe s'arrondit définitivement et prend une forme pour laquelle nous proposons l'expression de *forme sphérique biologique*.

5) A l'intérieur de la forme sphérique biologique, les éléments ingérés de la flore bactérienne associée, agités de mouvements browniens, se déplacent dans un sens centripète, forment des couches concentriques de plus en plus éloignées du centre du corps amibien et constituent finalement une couche bactérienne périphérique, étroitement liée à la face interne de la capsule sphérique biologique de l'Amibe.

Pour ce processus, nous proposons l'expression de *clearance bactérienne de la forme sphérique biologique*.

6) Ces éléments bactériens liés à la face interne de la forme biologique sphérique sont apparemment utilisés à l'élaboration d'une véritable coque de protection en vue de la future vie endokystique de l'Amibe.

De la phase kystique, nous avons retenu le processus de *clearance* portant sur les *inclusions iodo- et sidérophiles* qui doit être terminé avant l'éclosion de l'Amibe.

Nous avons observé, en outre, que tous les stades kystiques pouvaient donner la réaction de l'*encerclement à distance* lorsque des hématies sont ajoutées aux échantillons de culture, phénomène qui rappelle les *zones abactériennes* entourant les kystes d'*E. histolytica* décrites par S.-L. Brug.

Finalement, nous avons pu assister au *mode de dékystement* d'*E. histolytica* qui se déroule de la manière suivante.

- 1) Apparition d'une ligne équatoriale brisée à grandes dentelures.

Réaction de "polarisation"

Clearance bactérienne de la forme sphérique biologique

Clearance endokystique portant sur des inclusions iodo- et sidérophiles

Mécanisme de l'éclosion de l'amibe endokystique quadrinucléée
(Mode de dékystement)

Dessins schématiques portant sur *E. histolytica* interprétés dans le texte

2) Libération d'un noyau entouré d'une mince couche endoplasmique suivie de celle du deuxième, troisième et quatrième noyaux.

3) Les quatre noyaux se trouvent alors réunis étroitement dans un petit sac endoplasmique étranglé au niveau de leur éclosion sur la fente équatoriale, tandis que la grande masse protoplasmique se trouve encore à l'intérieur de la coque kystique.

4) Cette masse glisse ensuite facilement à travers l'ouverture de la fente équatoriale où sont préalablement passés les noyaux.

5) Sortie de sa coque kystique, l'Amibe reprend une forme plus ou moins globulaire et, évaginant des pseudopodes, elle s'éloigne du lieu de sa naissance.

6) Après la naissance et l'éloignement des Amibes quadrinucléées, les coques kystiques vides conservent leur fente équatoriale plus ou moins béante ; parfois les deux moitiés peuvent aussi se séparer entièrement.

Bibliographie

1. BRUG (S. L.). — in : Pick (F.) : S. L. Brug, *Bull. Soc. Path. exot.*, XLI, 1948, 107-109.
2. FAJARDO (F.). — Ueber amoebische Hepatitis einer Enterritis in den Tropen (Brasilien). *Cb. Bakt.*, (O.), XIX, 1896, 753-768.
3. KRADOLFER (F.) et GROSS (F.). — Die Ingestion von Erythrozyten durch *E. histolytica*. *Schweiz. Ztschr. Allg. Pathologie u. Bakteriologie*, XXI, 1958, 1014-1017.
4. PICK (F.). — Beobachtungen an einer Kultur von *Entamoeba histolytica* (Schaudinn). *Jl. Microbiology and Serology*, Anthonie van Leeuwenhoek. VII, 1941, 13-24.

(Prof. François Pick, Box 51, Vienne 71, Autriche)