

Amibiase expérimentale

Obtention du type pathogène de *E. histolytica*
chez la souris blanche rendue immunotolérante

par F. LANCASTRE, J.-C. BAZIN, Y. LE FICHOUX,
G. MOUGEOT et M. GARGOURI

(Avec la collaboration technique de A.-M. LOTTI et J. BOLOGNINI)

(Laboratoire de Parasitologie. C.H.U. de St-Antoine,
27, rue de Chaligny, 75 - Paris-12^e)

Résumé

Chez des Souris blanches préalablement traitées par des injections massives d'un antigène protéinique banal (blanc d'œuf), les auteurs ont obtenu un état de tolérance immunitaire compatible avec la survie et la multiplication des trophozoïtes d'*E. histolytica* et préservant leur caractère pathogène.

Summary

In white mice previously treated with massive doses of a common proteinic antigen (white of egg), a immunotolerance state compatible with survival and multiplication of trophozoites of *E. histolytica* and preserving their pathogenic condition has been achieved by the authors.

Rappel parasitologique et clinique.

Entamoeba histolytica Schaudinn 1903, est un Protozoaire Rhizopode qui présente :

1° une forme enkystée, de dissémination et de perpétuation ;

2° une forme végétative ou trophozoïte offrant deux aspects.

a) Le type *minuta*, normal, non pathogène, qui s'observe aussi bien dans les selles des malades amibiens en dehors des périodes aiguës ou subaiguës de la maladie que chez les convalescents et les porteurs sains. Il correspond donc à l'amibiase-infestation.

b) Le type *histolytica*, pathogène, hémaphophage, s'observe au moment des crises dysentériques. C'est la forme de l'invasion tissulaire, parasite de la paroi intestinale et qui peut, par voie lymphatique ou sanguine ou par propagation directe, coloniser de nombreux viscères.

Ces diverses formes sont également bien différenciées sur le plan morphologique (tableau I).

Tableau I

d'après DESCHIENS, 1965

CARACTÈRES DIFFÉRENTIELS DES TROPHOZOÏTES
d'*Entamoeba histolytica* ET *E. coli*

ESPÈCES	<i>Entamoeba histolytica</i>		<i>Entamoeba coli</i>
	forme <i>histolytica</i> hémaphophage et pathogène	forme <i>minuta</i> non pathogène	
TAILLE EN MICRONS	20-40	15-25	15-40
ECTOPLASME	Bien distinct Très réfringent	Peu distinct de l'endoplasme	Peu distinct Peu réfringent
ENDOPLASME	Contient souvent des hématies	Ne contient pas d'hématies	Ne renferme pas d'hématies
PSEUDOPODES	Très mobiles Formation rapide à 20-25° C	Peu mobiles	Peu mobiles Formation lente
MOTILITÉ	Très forte à 20-25° C	Faible à 20-25° C	Très faible à 20-25° C
NOYAU	Périphérique, petit rarement visible à frais Chromatine périphérique Caryosome unique, central ou sub-central, petit	Mêmes caractères	Subcentral. Toujours visible à frais Chromatine périphérique Caryosome unique, excentrique, petit

Expérimentation chez des animaux de laboratoire.

Les études expérimentales sur l'Amibiase nécessitent le maintien d'une ou plusieurs souches d'*E. histolytica*, ce qui est possible grâce à la culture des trophozoïtes sur divers milieux, diphasiques ou monophasiques (*in* Deschiens, 1965) ou encore grâce aux techniques d'inoculation intracœcale chez le Chat, le Cobaye et le Rat blanc. L'inoculation intrarectale du jeune Chat est moins utilisée actuellement.

Il est curieux de constater que la Souris, animal cependant facile à élever au laboratoire, n'est pas utilisée, et, à notre connaissance, seuls Kessel (1923) et E. Brumpt (1949) ont parlé de la possibilité d'infester ce rongeur par *E. histolytica*.

Brumpt indique, sans autre précision, « un faible taux » d'infestations réussies, et Kessel aurait obtenu 10 % d'infestation à partir de kystes ingérés. Le diagnostic d'*E. histolytica* a été fait dans ce cas sur la présence de kystes à quatre noyaux dans les selles et à l'autopsie et non de trophozoïtes hématophages, tels ceux obtenus expérimentalement chez le Chat, le Cobaye ou le Rat.

Nous avons nous-mêmes infesté des lots de Souris blanches des deux sexes, par voie intracœcale, avec des broyats de cœcum de rats infectés et présentant de nombreuses amibes hématophages, et, dans un nombre limité de cas (6,25 % des Souris inoculées tableau III), nous avons observé la présence de quelques amibes qui présentaient les caractéristiques de la forme *minuta* d'*E. histolytica*. Ces amibes étaient bien distinctes des *Entamoeba muris* (Grassi 1881) que l'on trouve chez beaucoup de rongeurs, et qui sont elles-mêmes morphologiquement identiques à *Entamoeba coli*, autre entamibe non pathogène du gros intestin de l'homme (Neal, 1966).

Nous n'avons jamais trouvé de formes histolytiques hématophages ou de kystes chez ces Souris.

On peut donc admettre que les Souris sont habituellement réfractaires à *E. histolytica*. Cette non-adaptation d'un parasite vis-à-vis d'un Vertébré se définit encore par les termes de « résistance innée » de l'animal hôte et de « spécificité parasitaire ». L'explication se trouve très vraisemblablement au niveau immunologique. Il y a acceptation ou rejet du parasite, de la part de l'animal-hôte, l'acceptation étant conditionnée par une absence de réaction de défense immunitaire efficace.

Le problème serait donc d'obtenir, pour le maintien et la multiplication du parasite, un état d'immunotolérance.

Depuis les travaux de Felton (1942), plusieurs immunologistes, et en particulier Dubert et Paraf (1957), Halpern et coll. (1963), Liacopoulos et coll. (1961-1962), ont précisé les bases de l'inhibition de divers types de réponses immunologiques et réussi à provoquer une « paralysie immunitaire » chez des animaux de laboratoire (Cobayes, Souris).

Leurs travaux indiquent qu'il est possible de créer une interférence compétitive entre des protéines hétérologues non spécifiques, et les γ globulines des anticorps. Dans ces expériences, une protection immunologique vis-à-vis d'antigènes sensibilisants est induite par des injections de fortes doses d'antigènes protéiniques (sérum albumine et γ globulines humaines et bovines), pendant une semaine environ. Au terme de ces

traitements, les animaux sont devenus réfractaires aux antigènes sensibilisants. Il existe une absence de réponse immunologique.

Nous nous sommes inspirés de ces travaux en les adaptant dans l'espoir d'obtenir chez la Souris blanche un état de « tolérance immunitaire » favorable au maintien et à la multiplication des trophozoïtes de *E. histolytica* dans le caecum.

Matériel et technique.

Nous avons choisi comme antigène paralysant le blanc d'œuf, injecté par voie intrapéritonéale à des Souris blanches pesant entre 25 et 30 g à raison de 2 ml, par jour pendant huit jours.

Arrêt le neuvième jour. Le dixième jour, infestation par voie intestinale haute (Deschiens, 1965) : les Souris, anesthésiées à l'éther, sont opérées et reçoivent dans le cœcum 0,25 ml d'un filtrat riche en amibes hématophages, provenant d'un broyat de cœcums de Rats infestés depuis cinq jours.

La plaie opératoire est recousue au catgut et lavée avec une solution de Pénicilline-Colimycine (1000U/ml).

Des lots témoins (Souris non traitées) sont inoculés de la même façon. Toutes les Souris sont sacrifiées le troisième jour de l'infestation. (Cette durée nous ayant paru minima pour parler d'infestation réelle). Les caecums sont prélevés, broyés isolément dans un mortier et trois prélèvements sont effectués et examinés entre lame et lamelle, à frais et après coloration au merthiolate-iode-formol (M.I.F.).

Dans tous les cas, les Souris mortes dans les 48 heures suivant l'opération n'ont pas été comprises dans les résultats.

Résultats et discussion.

Nos expériences ont porté au total sur 114 Souris, dont 60 témoins. Dans la catégorie des Souris traitées par le blanc d'œuf, nous avons eu 14 Souris sur 54 (26 %) décédées dans les 48 heures et chez les Souris témoins, 12 sur 60 (20 %).

Les chiffres donnés dans les tableaux II et III ne tiennent compte que des Souris autopsiées et examinées au troisième jour, et dont les caecums ont été vérifiés.

A l'ouverture de la cavité abdominale, le caecum des Souris traitées apparaît congestionné, luisant, souvent très augmenté de volume ; le contenu en est afécal, glaireux. De nombreux *Trichomonas* sont retrouvés, nous en avons à plusieurs reprises observés qui étaient hématophages.

A l'inverse, chez les Souris témoins, le caecum est de couleur et de taille normale et rempli de matières fécales. Il y a rarement abondance de flagellés.

Les tableaux II et III indiquent le nombre et le pourcentage des Souris, traitées et non traitées qui ont présenté des trophozoïtes d'*E. histolytica* à l'examen microscopique du contenu caecal.

Il est important de signaler que, nous n'avons vu des amibes hématophages que chez des Souris traitées et uniquement chez celles-ci.

Lorsque nous avons vu des amibes dysentériques chez les Souris témoins, elles présentaient toujours la forme *minuta*.

Nous devons ajouter que les Souris témoins infestées étaient en bonne santé apparente au troisième jour, alors que les Souris traitées bougeaient peu, ne s'alimentaient guère et étaient presque toujours cachectiques. Lors d'expériences préliminaires, aucune de ces Souris n'a survécu au-delà du cinquième jour.

Tableau II

SOURIS AYANT REÇU 8 × 2 ML DE BLANC D'ŒUF

Catégorie	Nombre	Pourcentage
Présence d' <i>E. histolytica</i> (hématophages)	36	90
Absence d' <i>E. histolytica</i>	4	10
TOTAL	40	100

Tableau III

SOURIS TÉMOINS

Catégorie	Nombre	Pourcentage
Présence d' <i>E. histolytica</i> forme <i>minuta</i>	3	6,25
Absence d' <i>E. histolytica</i>	45	93,75
TOTAL	48	100

Pour nous résumer, il apparaît donc que neuf Souris sur dix qui ont préalablement reçu des injections massives de blanc d'œuf sont devenues réceptives à *E. histolytica*, au point que les trophozoïtes hématophages inoculés ont survécu et se sont multipliés sous cette forme. La proportion des Souris témoins hébergeant *E. histolytica* forme *minuta* n'est que de une sur seize (une sur dix pour Kessel).

La différence nous semble significative. Il y a chez les Souris traitées, abolition de la « résistance naturelle » vis-à-vis de l'amibe dysentérique et cela dans une proportion considérable. Chez des Souris normales persiste toujours une très faible réceptivité (faible pourcentage d'infestations réussies, amibes demeurant ou devenant non hématophages, simples commensales).

D'autre part, chez des Souris traitées par du blanc d'œuf, mais non infestées par *E. histolytica*, nous n'avons pas constaté de modifications du comportement des *E. muris* qui sont demeurées non pathogènes.

En conclusion, nous estimons qu'il est possible, par des injections massive et répétées d'un antigène protéinique banal, de réaliser chez la Souris blanche un état de tolérance immunitaire propice à la survie et au maintien de la virulence et du caractère pathogène d'un parasite qui, autrement a très peu de chance d'évoluer.

Nous pensons que le blanc d'œuf agit en provoquant l'inhibition de la réponse immunitaire primaire, et en permettant, par conséquence la formation d'un terrain neutre pour le développement du parasite. Pour mieux étudier ces phénomènes nous envisageons d'effectuer chez la Souris de nouvelles expérimentations portant sur d'autres parasites, en particulier des métazoaires, auxquels elle est normalement réfractaire.

Bibliographie.

1. BRUMPT (E.), 1949. — *Précis de Parasitologie*, I, p. 191. Masson et C^{ie}, Paris.
2. DESCHIENS (R.), 1965. — *L'Amibiase et l'Amibe dysentérique*. (Monographies de l'Institut Pasteur), Masson et C^{ie}, Paris.
3. DUBERT (J.-M.) et PARAF (A.), 1957. — Etude quantitative des conditions nécessaires à l'apparition d'un état de tolérance immunitaire. *Comptes rendus Acad. Sci.* (Paris), 244, 686-688.
4. FELTON (L. D.) et OTTINGER (B.), 1942. — Pneumococcus Polysaccharide as a paralyzing agent on the mechanism of immunity in white mice. *J. Bacteriol.*, 43, 94-95.
5. HALPERN (B. N.), LIACOPOULOS (P.), MARTIAL-LASFARGUES (C.) et ARACTINGI (R.), 1963. — Allongement de la durée de survie des homogreffes cutanées chez le Lapin et le Cobaye au cours de la paralysie immunitaire induite par l'administration de globulines hétérologues. *Comptes rendus Soc. Biol.* (Paris), 157, 740-743.
6. KESSEL (J. F.), 1923. — Experimental infection of rats and mice with the common intestinal amoebae of man. *Univ. California Pub. Zool.*, 20, n° 19, 409-430.
7. LIACOPOULOS (P.), 1961. — Inhibition des réponses immunologiques après administration de doses élevées d'une protéine hétérologue. *Comptes rendus Acad. Sci.* (Paris), 253, 751-753.
8. LIACOPOULOS (P.), NEVEU (T.), BIOZZI (G.) et HALPERN (B.), 1962. — Inhibition de l'hypersensibilité du type retardé au cours de la tolérance immunitaire non spécifique du Cobaye adulte. *Comptes rendus Acad. Sci.* (Paris), 254, 3765-3767.
9. NEAL (R. A.), 1966. — Experimental studies on *Entamoeba* with reference to speciation. *Advances in Parasitology*, 4, 1-51. Academic Press, London and New-York.
10. STIFFEL (C.), BEN-EFRAIM (S.), PERRAMANT (M. F.) et LIACOPOULOS (P.), 1966. — Compétition des antigènes. Etudes sur son mécanisme chez le Cobaye. *Annales Inst. Pasteur* (Paris), III, Suppl. n° 5, 94.