

Etude de l'endoparasitisme expérimental de *Trichomonas vaginalis* chez la Souris

I. Conditions d'installation et obtention de lésions viscérales avec diverses souches du Flagellé

par J.-G. GOBERT, P. GEORGES, N. GOBERT et J. SAVEL

[Laboratoire de Parasitologie de la Faculté de Pharmacie de Paris (P^r CAVIER),
4, avenue de l'Observatoire, F 75 - Paris-6^e]

Résumé

Les auteurs étudient les différents facteurs expérimentaux qui président à l'infestation générale de la Souris par *Trichomonas vaginalis*.

Ils ont obtenu cette infestation en préparant au préalable les animaux par des cellules hétérologues : hématies de Poulet, adulte ou embryon, hématies humaines, trophozoïtes de *Trichomonas vaginalis* (souche homologue). Cette préparation doit faire intervenir un mécanisme de nature immunitaire comme peuvent le laisser penser les infestations possibles après traitement par l'azathioprine.

Chez la Souris ainsi infestée, *Trichomonas vaginalis* est capable de développer un pouvoir pathogène que le Flagellé conserve au cours de nombreuses générations obtenues par culture *in vitro*.

On constate des variations de ce pouvoir pathogène en fonction de la souche utilisée.

Summary

The A.A. study the different experimental factors influencing mice general infestation by *Trichomonas vaginalis*.

The animals infested are first prepared by an injection of heterologous cells : human or chicken (adult and embryo), red globules, or of an homologous strain of *T. vaginalis* trophozoites.

Such a process starts an immunitary mechanism similar to that suspected on infestations appearing after treatment with azathioprine.

In so infested mice, *T. vaginalis* may develop a pathogenic power preserved by the Flagellate through several generations obtained by *in vitro* cultures.

Some variations in this pathogenic power are sometimes observed, depending on the strain used for the infestation.

Le parasitisme sténoxène de *Trichomonas vaginalis* et la localisation très précise de ce Flagellé chez son hôte habituel a posé aux chercheurs un certain nombre de problèmes qui les ont amenés à pratiquer des infestations expérimentales de divers animaux de laboratoire.

Celles-ci ont été effectuées par différentes voies d'inoculation puisque, depuis 1950, on trouve, dans la littérature, de nombreux rapports concernant l'implantation de *Trichomonas vaginalis* dans le vagin, sous la peau, dans le péritoine ou même dans l'œil (2, 4, 10, 12, 14, 15).

Si la première de ces voies d'inoculation a permis d'étudier les conditions de séjour et de développement du parasite dans les voies génitales ainsi que les modifications qu'il était capable d'y produire [Soszka et coll (11), Ginel (3)], les autres, plus insolites, ont permis au Flagellé de révéler un pouvoir pathogène vis-à-vis de tissus ou d'organes très différents de ceux qui constituent son biotope normal.

A cet égard, nous rapportons ici quelques expériences visant à obtenir, chez la Souris, des lésions viscérales consécutives à l'injection intra-péritonéale de *Trichomonas vaginalis*.

Les travaux publiés antérieurement appartiennent à deux catégories : les uns procèdent par inoculation directe, unique et massive, de flagellés provenant de cultures amicrobiennes. La mise en œuvre d'inoculats comptant entre $1,5 \times 10^6$ et 4×10^6 flagellés a permis à Teras (12) et à Vershinskii (14) de fixer la D.L. 50 aux environs de $1,75 \times 10^6$ et de provoquer, chez les animaux inoculés, des lésions tissulaires telles qu'une péritonite avec exsudat fibrineux et foyers nécrotiques au niveau du foie, du pancréas, de la rate et d'autres organes abdominaux ; selon les auteurs, la gravité de ces accidents est fonction du pouvoir pathogène que les souches en question exerçaient chez les femmes sur lesquelles elles avaient été prélevées [Bogowsky et Teras (1), Reardon, Ashburn et Jacobs (9)].

La deuxième catégorie groupe les expériences d'Inoki et Hamada (5) dans lesquelles des souris reçoivent d'abord, par voie intraveineuse, des hématies de Poulet et, quelques jours plus tard, une injection intrapéritonéale de *Trichomonas vaginalis*. Les animaux meurent dans la proportion de 70 %, entre le 14^e et le 40^e jour suivant l'inoculation. D'autre part, les flagellés qui se sont multipliés chez l'animal semblent avoir acquis une virulence particulière ; en effet, prélevés chez des animaux infestés puis inoculés à des animaux neufs et non préparés, ils se montrent alors hautement pathogènes puisqu'ils provoquent la mort de ces souris en cinq à sept jours.

De plus, les mêmes auteurs affirment que ces flagellés, remis en culture, montrent, des points de vue cultural et cytotologique, des modifications permettant de

conclure que *Trichomonas vaginalis* dont ils étaient partis s'était transformé en *Trichomonas fetus*!

On comprend pourquoi les travaux des auteurs japonais nous ont semblé mériter certains éclaircissements et nous sommes d'abord attachés à fixer les conditions expérimentales tenant à la préparation de l'animal à infester, en l'espèce la Souris, et à la souche de *Trichomonas vaginalis* servant à l'infestation.

Nous avons travaillé sur des souris blanches, femelles, âgées de 45 jours et d'un poids moyen de 20 g.

MATERIEL ET METHODES.

Nous avons utilisé différentes souches de *Trichomonas vaginalis* répertoriées S8, S12, S13, S14, toutes quatre prélevées directement sur des femmes atteintes de vaginite et non encore traitées. Ces souches ont été ultérieurement conservées en culture aseptique sur milieu de Magara (8) et repiquées à intervalles réguliers de deux à trois jours. Ce temps de conservation en culture avant l'expérimentation varie pour chacune de ces souches. Il est de :

10 ans pour S ₈	9 mois pour S ₁₃
12 mois pour S ₁₂	8 mois pour S ₁₄

Nous avons utilisé, pour notre expérimentation, les modalités publiées par Inoki (5).

a) Injection préliminaire, par voie intraveineuse, d'hématies de Poulet.

Celles-ci ont été recueillies par ponction veineuse de la veine de l'aile d'une poule Leghorn, dans une seringue héparinée. Le prélèvement sanguin est ensuite centrifugé à 2.000 t. par min. et le culot d'hématies est lavé à deux reprises dans du soluté isotonique de chlorure de sodium. Le nombre d'hématies, dans la suspension finale, est estimé à l'hématimètre et une dilution convenable est éventuellement effectuée afin d'injecter par voie intraveineuse le nombre voulu d'hématies sous un volume de 0,2 ml.

Ultérieurement, pour des raisons de commodité, nous avons substitué aux hématies de poulet adulte des hématies d'embryon de poulet. Celles-ci sont obtenues en prélevant stérilement, dans un œuf incubé de douze jours, le liquide allantoïdien dans lequel on a fait s'écouler le sang obtenu par section de la membrane chorio-allantoïdienne.

Les hématies embryonnaires ainsi recueillies sont traitées comme il est dit plus haut à propos des hématies de poulet adulte.

b) Infestation des souris traitées par les hématies de poulet par injection intrapéritonéale de *Trichomonas vaginalis*.

Les flagellés, de la souche choisie, sont recueillis à partir de cultures entretenues sur milieu de Magara et âgées de 48 heures. Ils sont lavés à deux reprises

avec du soluté isotonique de glucose, puis comptés à l'aide d'une cellule de Malassez et dilués de façon convenable afin d'être injectés, en nombre connu, par voie intrapéritonéale.

RESULTATS.

Nous avons ainsi étudié les points expérimentaux suivants :

- 1) influence du nombre d'hématies injectées ;
- 2) influence du nombre de flagellés injectés ;
- 3) influence de l'intervalle ménagé entre l'injection d'hématies et l'injection de flagellés.

1) INFLUENCE DU NOMBRE D'HÉMATIES INJECTÉES.

En ce qui concerne ce premier point, les essais auxquels nous avons procédé ont donné les résultats suivants (Tableau n° 1),

Tableau n° 1

NOMBRE D'HÉMATIES	NOMBRE DE T.V. SOUCHE S. 12	DÉLAI ENTRE LES DEUX INJECTIONS	RÉSULTATS
6×10^6 (embryon)	250.000	3 jours	0 sur 5
5×10^6 (adulte)	—	7 jours	1 sur 3
3×10^6 (embryon)	—	3 jours	3 sur 5
$1,5 \times 10^6$ (embryon)	—	3 jours	4 sur 5

Nous avons donc retenu, en définitive, le nombre de $1,5 \times 10^6$ hématies par animal.

2) INFLUENCE DU NOMBRE DE FLAGELLÉS INJECTÉS.

a) chez des animaux non préparés,

Nous avons groupé nos résultats dans le tableau n° 2.

Tableau n° 2

NOMBRE, PAR LOT, D'ANIMAUX INFESTÉS AVEC SUCCÈS APRÈS AVOIR REÇU ENTRE :						
SOU-CHES	$0,1 \times 10^6$ et $0,2 \times 10^6$	$0,2 \times 10^6$ et $0,4 \times 10^6$	$0,4 \times 10^6$ et $0,75 \times 10^6$	$0,75 \times 10^6$ et $1,5 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$ et $2,5 \times 10^6$	
S ₈		0/10	0/16	0/12		
S ₁₂	0/12 (100.000)	0/17 (300.000)	0/20 (425.000)		1/5 (2.10 ⁶)	
S ₁₃		0/5 (200.000)	0/5 (400.000)	1/25 (1.10 ⁶)		
S ₁₄	0/6 (150.000)	0/15 (275.000)	0/10 (550.000)		1/20 (2.10 ⁶)	

A partir de ces résultats, nous pouvons dégager les conclusions suivantes :

- le pourcentage global d'infestation est très faible : 1,7 % ;
- l'inoculation d'un nombre relativement faible de flagellés n'a jamais été suivie de succès, chez des souris non préparées ;
- les résultats positifs sont groupés dans les lots d'animaux ayant reçu entre $0,75 \times 10^6$ et $2,5 \times 10^6$ flagellés : le pourcentage de réussite, encore très modeste, y est de 4,8 %.

b) chez des animaux préparés par injection d'hématies de Poulet.

Dans cette série d'expériences, nous avons tenu compte des résultats précédents obtenus sur des animaux non préparés. C'est pourquoi nous avons surtout travaillé avec des inoculats groupant entre 200.000 et 2.000.000 de flagellés.

Les résultats alors obtenus font l'objet du tableau n° 3.

Tableau n° 3

NOMBRE, PAR LOT, D'ANIMAUX INFESTÉS AVEC SUCCÈS APRÈS AVOIR REÇU ENTRE :				
SOU-CHES	$0,1 \times 10^6$ et $0,2 \times 10^6$	$0,2 \times 10^6$ et $0,4 \times 10^6$	$0,4 \times 10^6$ et $0,75 \times 10^6$	$0,75 \times 10^6$ et $1,5 \times 10^6$
S ₈		0/10	0/12	0/12
S ₁₂	1/15 (100.000)	11/25 (300.000)		
S ₁₃			3/5 (750.000)	
S ₁₄			2/5 (750.000)	

A partir de ces résultats nous pouvons faire les observations suivantes :

- la préparation des souris augmente nettement le pourcentage global d'infestation : 17 animaux infestés sur 84, soit 20 % ;
- l'importance numérique des lots d'animaux ne nous permet pas d'interprétation statistique, la mise en expérience de souris « Inoki » ne visant que l'obtention de *Trichomonas* « pathogènes » ;
- ces observations ne sont pas valables quelle que soit la souche utilisée ; c'est ainsi que l'utilisation de la souche S8 ne nous a toujours valu que des résultats négatifs. Jamais encore la littérature n'avait signalé l'existence de souche complètement dépourvue de pouvoir pathogène.

3) INFLUENCE DE L'INTERVALLE MÉNAGÉ ENTRE L'INJECTION D'HÉMATIES ET L'INJECTION DE FLAGELLÉS.

Nos essais nous ont permis d'observer les faits résumés dans le tableau n° 4.

Tableau n° 4

INTERVALLE ENTRE LES DEUX INJECTIONS	RÉUSSITE	ÉCHEC
0		
24 h		+
48 h	+	+
72 h	+	
7 jours	inconstante	

Nous avons retenu un délai de 48 à 72 heures entre l'injection préparante et l'injection infestante.

Plus tard, afin d'apprécier le caractère exact du rôle joué par les hématies de Poulet dans la préparation des souris et la réceptivité ultérieure de ces dernières à *Trichomonas vaginalis*, nous avons essayé d'autres agents de préparation :

Hématies humaines A, Rh+ : nous utilisons alors un matériel non nucléé alors que les hématies d'oiseaux sont nucléées. Il nous a permis, lui aussi, d'obtenir, avec 250.000 flagellés (souche S12), des souris parasitées (trois sur onze) ce qui tend à prouver que le phénomène décrit par Inoki ne dépend pas uniquement de l'origine zoologique des hématies ;

Trichomonas vaginalis de souche homologue : ici, nous avons remplacé, pour l'injection préparante, les hématies par des flagellés appartenant à la même souche que ceux utilisés plus tard pour l'infestation et cela dans les mêmes conditions que les hématies. Dans ce cas, nous avons obtenu des résultats assez irréguliers allant d'un animal parasité sur cinq à six animaux infestés sur neuf.

Enfin, dans l'hypothèse où l'injection de cellules étrangères aurait provoqué, chez les souris, un blocage des systèmes immunitaires, il pouvait sembler logique d'utiliser un produit immuno-dépresseur comme il est fait en chirurgie à l'occasion des tentatives de greffes d'organe.

Nous avons donc administré à des souris, par voie buccale, de l'azathioprine (Imurel *) à la dose de 2 mg par kg les deux premiers jours et 1 mg par kg le troisième jour. Vingt-quatre heures après la troisième prise, les souris reçoivent, par voie intrapéritonéale, 250.000 flagellés. Dans ces conditions, quelle que soit la souche utilisée (S12, S13, S14), des souris sont trouvées porteuses de lésions entre le 13^e et le 20^e jour.

Ainsi, de l'ensemble de ces résultats, nous pouvons conclure que le phénomène décrit par Inoki n'est pas à rapporter à un facteur spécifique, en l'espèce les hématies de Poulet ; on peut le reproduire en utilisant d'autres agents préparatoires dont le seul dénominateur commun paraît être lié à une dépression des systèmes immunitaires de la Souris, comme semble le prouver l'action de l'azathioprine, sans préjuger du mécanisme de cette dépression.

Chez les souris ainsi infestées, nous avons pu observer les phénomènes signalés par Inoki. L'évolution de l'infestation se déroule sur 15 à 40 jours au long desquels les animaux infestés meurent dans des proportions allant de 50 à 70 p. 100.

A l'autopsie, la cavité abdominale apparaît parfois plus ou moins remplie d'un liquide ascitique, fibrineux, dans lequel on peut observer des flagellés, mobiles et nombreux.

Au niveau des organes, foie, pancréas et des mésentères, il est facile de repérer à l'œil nu des lésions abcédées, de taille et de nombre variables.

L'étude cytologique détaillée de ces lésions fera l'objet de la communication suivante. Nous nous contentons de signaler qu'il est constant d'y trouver des flagellés vivants.

Nous rapporterons maintenant les résultats observés après réinoculation, à des souris neuves et non préparées, des parasites recueillis chez des animaux infestés. Les flagellés provenaient du liquide d'ascite ou de lésions viscérales homogénéisées au mortier au sein de soluté isotonique de glucose.

Le processus infectieux chez les animaux infestés se déroule alors de façon différente : les protozoaires manifestent d'emblée une virulence qui, non seulement, n'a pas besoin d'agent préparant pour se manifester, mais encore provoque, en un temps plus réduit (cinq à dix jours), des lésions viscérales sévères, rapidement mortelles. Ce passage à des souris non préparées peut être répété à plusieurs reprises en observant, dans les lots, des infestations qui peuvent atteindre les trois-quarts des animaux en expérience.

Nos résultats sont rassemblés dans le tableau n° 5. Ils concernent des animaux systématiquement sacrifiés au plus tard le quinzième jour après l'infestation.

Tableau n° 5

NOMBRE, PAR LOT, D'ANIMAUX INFESTÉS AVEC SUCCÈS APRÈS AVOIR REÇU ENTRE :				
SOU-CHES	0,1 × 10 ⁶ et 0,2 × 10 ⁶	0,2 × 10 ⁶ et 0,4 × 10 ⁶	0,4 × 10 ⁶ et 0,50 × 10 ⁶	0,50 × 10 ⁶ et 1 × 10 ⁶
S ₈				
S ₁₂	3/11 (100.000)	9/12 (225.000)	43/53 (450.000)	8/9 (875.000)
S ₁₃	0/10 (100.000)	3/20 (250.000)	4/9 (500.000)	4/10 (10 ⁶)
S ₁₄	0/5 (125.000)	2/5 (250.000)		8/10 (550.000)

Les commentaires suscités par ces résultats sont les suivants :

— 84 animaux ont été infestés sur les 154 inoculés, ce qui correspond à un pourcentage de 54,5 % ;

— en inoculant entre 100.000 et 500.000 flagellés, nous obtenons un taux de 51 % d'infestation ; au-delà de 500.000 flagellés, ce pourcentage atteint 69 % ;

— l'importance de la souche, déjà signalée par Teras et Roigas (13) et Laan (7) apparaît lorsque l'on compare les résultats globaux respectivement obtenus avec :

S₈ : aucun résultat puisque l'infestation de souris préalablement préparées s'est toujours révélée impossible ;

S₁₂ : 63 animaux sur 85, soit 74 p. 100 ;

S₁₃ : 11 animaux sur 49, soit 22,5 p. 100 ;

S₁₄ : 10 animaux sur 20, soit 50 p. 100.

On pourra lire, sur les courbes de la figure n° 1, les variations du caractère pathogène des souches S₁₂, S₁₃, S₁₄, lorsque chacune d'elles a subi un passage préalable chez l'animal.

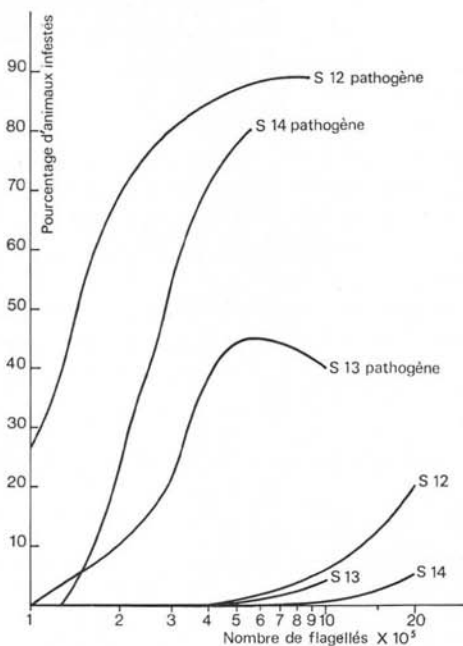


FIG. n° 1

Il faut signaler qu'au cours des passages successifs se superpose fréquemment à l'infestation par *Trichomonas vaginalis* une infection bactérienne ou mycosique qui vient rapidement perturber les résultats. Celle-ci a pu être facilement jugulée par l'administration aux animaux d'antibiotiques convenables. Nous avons cependant préféré nous débarrasser de la flore indésirable en remplaçant la transmission directe de souris à souris par un passage intermédiaire en culture sur milieu de Magara,

le tube servant au premier ensemencement étant additionné d'Amphotéricine B en plus de la pénicilline normalement présente dans la formule.

Au bout de quelques repiquages, nous disposons d'une culture « propre » qui peut être réinoculée à des souris sans risque d'une contamination associée.

Cette façon d'opérer nous a permis de faire d'autres constatations à nos yeux très importantes :

— les flagellés ont gardé, au cours de leur multiplication *in vitro*, la virulence qu'ils avaient acquise chez la Souris ;

— ce caractère pathogène semble capable de se maintenir en culture au cours des repiquages successifs, sans qu'il soit besoin d'y intercaler un passage sur l'animal. C'est ainsi que la souche S12, prélevée sur une lésion le 7 août se montrait encore virulente le 28 novembre (soit 3 mois et demi) et qu'une autre, mise en culture le 7 novembre était encore infectieuse le 24 mars (soit 4 mois et demi), pour deux tiers des animaux.

Tous ces résultats restent valables — aux variations expérimentales près n'impliquant pour l'instant aucune interprétation particulière — pour les souches S12, S13, S14. En revanche, il est important de signaler, sans pour autant en discuter ici, que la souche S8, conservée au laboratoire depuis dix ans, s'est jusqu'ici refusée à développer un pouvoir virulent dans les conditions d'expérience que nous avons décrites.

CONCLUSIONS.

Nous avons rapporté ici les éléments expérimentaux qui nous ont permis de déceler, chez *Trichomonas vaginalis*, la possibilité de provoquer chez l'animal, des lésions viscérales tout à fait différentes en nature et en gravité des phénomènes pathologiques dont il est responsable dans son biotope habituel ;

Aux effectifs que nous avons utilisés, cette possibilité est offerte chez des animaux ayant subi une préparation préalable par des cellules hétérologues dont le mécanisme d'action, sans nous apparaître encore clairement, est sans doute de nature immunitaire comme semble l'indiquer les résultats positifs obtenus après administration d'azathioprine.

Le pouvoir pathogène ou virulent acquis par les souches représente un caractère transmissible au cours de la multiplication en culture et relativement stable dans le temps.

On constate des variations de ce pouvoir pathogène en fonction de la souche utilisée.

Enfin, nous verrons, dans la publication suivante, que ce caractère virulent se manifeste préférentiellement vis-à-vis de certains organes. On peut se demander si la culture des flagellés au contact des cellules provenant des organes intéressés ne pourrait pas conférer à *Trichomonas vaginalis* le même pouvoir virulent qu'il aurait acquis après séjour chez la Souris : des travaux sont actuellement en cours qui nous

éclairerons peut-être sur les mécanismes intimes d'un phénomène dont nous avons voulu relater ici les principales manifestations.

Bibliographie

1. BOGOWSKI (P.-A.) et TERAS (J.), 1958. — Pathologico-anatomical changes in white mice in intraperitoneal infection by cultures of *Trichomonas vaginalis*, *Mediz. parasitol.*, 27, 194-199 in JOVIREC (O.) et PÉTRU (M.) (op. cit.).
2. CAVIER (R.) et MOSSION (X), 1956. — Essais d'infestation expérimentale de la ratte par *Trichomonas vaginalis*. *C.R. Acad. Sc.*, 242, 2412-2414.
3. GINEL (W.), 1962. — On changes in the vaginal mucous membrane of pregnant animals caused by *Trichomonas vaginalis*. *Wyad. Parazyt.*, 8, 217-221, in JOVIREC (O.) et PÉTRU (M.), (op. cit.).
4. HONIGBERG (B.-M.), 1961. — Comparative pathogenicity of *Trichomonas vaginalis* and *Trichomonas gallinae* for mice. I. Gross pathology, quantitative evaluation of virulence and some factors affecting pathogenicity. *J. Parasitol.*, 47, 545-571.
5. INOKI (S.) et HAMADA (J.), 1954. — Experimental transmission of *Trichomonas vaginalis* (pure culture) into mice. *J. infect. dis.*, 92, 1-3.
6. JOVIREC (O.) et PÉTRU (M.), 1968. — *Trichomonas vaginalis* and trichomoniasis. *Advances in parasitology*, 6, 117-188.
7. LAAN (I.-N.), 1965. — On the effect of passages *in vitro* and *in vivo* on the pathogenicity, agglutinative ability and fermentative activity of *Trichomonas vaginalis*. *Proc. III Pan polish Symposium on trichomoniasis. Bralyskov*, in JOVIREC (O.) et PÉTRU (M.), (op. cit.).
8. MAGARA (M.), AMINO (E.) et YOKOUTI (E.), 1953. — One method for the pure culture of *Trichomonas vaginalis*. *Amer. J. trop. med.*, 2, 267-269.
9. RÉARDON (L.-V.), ASHBURN (L.-J.) et JACOBS (L.), 1961. — Differences in strains of *Trichomonas vaginalis* as revealed by intraperitoneal infections into mice. *J. Parasit.*, 47, 527-532.
10. SCHNITZER (R.-J.), RICHARDS (K.-D.) et LEIWANT (B.), 1950. — Experimental studies on trichomoniasis. I. The pathogenicity of the trichomonad species for mice. *J. Parasitol.*, 36, 343-349.
11. SOSKZA (S.), KAZANOWSKA (W.) et KUCZYNSKA (K.), 1962. — On injury of the epithelium of the vagina caused by *Trichomonas vaginalis* in experimental animals. *Wyad. Parazyt.*, 8, 209-215. in JOVIREC (O.) et PÉTRU (M.), (op. cit.).
12. TERAS (J.), 1954. — Experimental investigation of pathogenicity of *Trichomonas vaginalis* *Dis. Tart. Gos. Univ. Tartu*.
13. -- et ROIGAS (E.), 1966. — *Wyad. Parazyt.*, 12, 161-173. in JOVIREC (O.) et PÉTRU (M.) (op. cit.).
14. VERSKINSKII (B. V.), 1957. — Experimental infection of golden hamsters with *Trichomonas vaginalis*. *Zool Zurnal.*, 36, 1774-1776.
15. WELD (J. T.) et KEAN (B. H.), 1956. — *J. Pathol.*, 32, 1135-1145.