NOUVEAU MODÈLE EXPÉRIMENTAL D'AMIBIASÉ CÆCALE CHEZ LE RAT

M. C. RIGOTHIER*, P. N. VUONG**, Ph. GAYRAL*

RÉSUMÉ. Le Raton a été utilisé comme modèle expérimental d'amibiase cæcale, en pratiquant l'implantation, sans effraction du cæcum, d'une suspension de trophozoïtes d'*Entamoeba histolytica*, souche gnotoxénique Rahman, de virulence élevée.

L'atteinte de la paroi est objectivée par l'aspect macroscopique du cæcum, par la densité des trophozoïtes présents et par un examen anatomopathologique. Comme il existe une corrélation entre les paramètres macroscopiques et l'histologie, un indice de gravité est défini, qui prend en compte plusieurs critères macro- et microscopiques.

Ce modèle permet donc de suivre les différentes phases de la cicatrisation et de la guérison des rats et d'apprécier ainsi l'activité de substances anti-amibiennes.

Mots-clés : *Entamoeba histolytica*. Modèle *in vivo*. Pathologie.

A new experimental model of caecal amebiasis in the rat.

SUMMARY. The young rat was used as an experimental model of caecal amebiasis by implanting, without injury of the caecum, a suspension of *E. histolytica* trophozoites gnotoxenic strain Rahman of high virulence.

The degree of pathogenicity is demonstrated by the macroscopic aspect of caecum, by the density of trophozoites and by an anatomopathologic examination. As a correlation exists between all these macroscopic parameters and histology, a degree of illness is fixed which includes several macro- and microscopic criteria. This model enables to observe the different phases of cicatrization and of recovering of young rats and so to appreciate the activity of antimicrobial agents.

Key-words : *Entamoeba histolytica*. *In vivo* model. Pathology.

Introduction

L'évaluation de l'activité anti-amibienne de substances ne peut se faire sans modèle animal expérimental. Les souches d'*Entamoeba histolytica* pathogènes *in vivo* sont accompagnées d'une flore bactérienne qui peut d'ailleurs être déterminée précisément. Parmi les hôtes utilisés (Chat, Rat, Souris, Lapin, Cobaye,

* Laboratoire de Parasitologie, Faculté de Pharmacie, Université Paris XI, F 92290 Châtenay-Malabry.

** Département d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques, Hôpital Saint-Michel, 33, rue Olivier-de-Serres, F 75015 Paris.

Accepté le 25 novembre 1988.

Hamster, Gerbille, etc.) seul le jeune Rat présente au niveau du cæcum des lésions qui ressemblent à celles observées chez l'Homme.

Le modèle « Raton » présente un certain nombre de difficultés, entraînant une grande variabilité dans les résultats.

Tout d'abord le pouvoir intrinsèque de la souche d'Amibe se modifie avec le temps et en particulier diminue au fur et à mesure de l'entretien en culture.

Plusieurs artifices, pas toujours convaincants, ont été proposés pour maintenir élevé le pouvoir pathogène ; notre choix s'est porté sur l'inoculation dans le foie du Hamster et le réisolement régulier de la souche. Par ailleurs, l'âge du Raton, l'état de réplétion de son cæcum et surtout le mode d'inoculation des Amibes dans le cæcum, influent sur le résultat, car on doit éviter de confondre une lésion iatrogène, créée à l'endroit de l'injection, avec la pathologie expérimentale recherchée. La gravité des lésions ne peut être évaluée objectivement sans une étude histologique qui permet de préciser les processus d'installation et de suivre un éventuel processus d'amélioration ou de guérison. Pour standardiser ce modèle, nous avons donc constitué et étudié différents lots de Ratons infectés par des Amibes gnotoxéniques ou par la culture bactérienne seule, pour apprécier ce qui revient au développement des Amibes, des bactéries associées, et ultérieurement ce que sera l'action de substances antiamibiennes sur la lésion.

I — DESCRIPTION DU MODÈLE

I.1 — SÉLECTION ET PRÉPARATION DES RATONS

Les Ratons (souche CDR, Sprague-Dawley, fournisseur Charles River, 76410 Cléon, France) mâles de 35 à 40 g utilisés dès le sevrage, sont maintenus dans une enceinte décontaminée pendant toute la durée de l'étude ; la boisson et la sciure sont stérilisées au préalable pour éliminer une contamination par *Entamoeba muris*, non pathogène, mais morphologiquement très proche d'*E. histolytica*.

I.2 — ENTRETIEN DE LA SOUCHE GNOTOXÉNIQUE D'*E. histolytica*

E. histolytica (souche Rahman, Rhône-Poulenc Santé, Laboratoire de Parasitologie, Centre Nicolas Grillet, Vitry, France) est cultivée en présence d'une entérobactérie sur le milieu diphasique au sérum coagulé de Dobell et Laidlaw (Institut Pasteur, réf. 56675 ; Taylor et Baker, 1968).

La virulence de la souche est maintenue par un contact tissulaire périodique : tous les 3 mois, les Amibes sont injectées dans le foie de Hamster et une nouvelle souche est réisolée à partir de l'abcès hépatique formé (Rigother, 1988).

I.3 — CULTURE DE *Citrobacter diversus*

La souche bactérienne poussant en association avec *E. histolytica* a été identifiée dans notre laboratoire. C'est un bacille gram négatif appartenant à la famille des Enterobacteriaceae, à la tribu des Salmonelleae : *Citrobacter diversus*.

Pour apprécier l'incidence de la flore bactérienne associée à la culture dans la pathologie cæcale des Ratons, nous avons réalisé des essais avec une culture pure de *Citrobacter diversus*. Les colonies obtenues en 24 heures sur gélose sont

dispersées dans l'eau distillée. La numération des germes s'effectue par ensemencement de géloses nutritives avec des dilutions croissantes de la suspension de *C. diversus* (10^{-1} à 10^{-10}) suivi de leur dénombrement au bout de 24 heures. La mesure de la densité optique pour chaque dilution permettra d'établir une courbe donnant la correspondance entre densité optique et concentration en *C. diversus*.

I.4 — CONSTITUTION DES SÉRIES EXPÉRIMENTALES

Ce travail concerne 6 groupes d'animaux répartis par tirage au sort. Les quatre premiers reçoivent la culture d'Amibes associées avec *C. diversus*, les deux derniers, seulement la culture bactérienne.

- Lot A : 12 Ratons sacrifiés 5 jours après l'injection (J6).
- Lot B : 9 Ratons sacrifiés 10 jours après l'injection (J11).
- Lot C : 9 Ratons sacrifiés 20 jours après l'injection (J21).
- Lot D : 9 Ratons sacrifiés 30 jours après l'injection (J31).
- Lot E : 7 Ratons sacrifiés 5 jours après l'injection (J6).
- Lot F : 7 Ratons sacrifiés 10 jours après l'injection (J11).

I.5 — MODE D'INOCULATION

L'infection des Ratons se fait selon un protocole inspiré de celui de Woolfe (1963), modifié par un mode particulier d'inoculation des Amibes. Les Ratons sont pris au sevrage car les lésions présentent un maximum de sévérité et d'uniformité à cet âge. Ils sont nourris avec un lait en poudre écrémé courant, des pommes et de l'eau à volonté. La veille de l'expérience, ils sont mis à la diète hydrique après avoir reçu 0,1 ml d'une solution saturée de sulfate de magnésium pour provoquer une certaine vacuité intestinale et diminuer la flore bactérienne, ce qui facilite l'implantation des Amibes.

Les trophozoïtes d'Amibes sont comptés au microscope de manière à déterminer le volume de suspension nécessaire pour l'infection. La culture d'*E. histolytica* de 48 à 72 heures est centrifugée 10 minutes à 1 000 tours/minute. Le culot est repris puis dilué au $1/10^e$ pour le comptage.

Dans le cas de la Bactérie, la numération s'effectue par mesure de la densité optique de la suspension de *C. diversus* et lecture sur la courbe de la concentration correspondante en bactéries.

A J1, les Ratons sont anesthésiés (injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique, 25 mg/kg, solution à 6 %, Laboratoire Clin Midy Vétérinaire) et laparotomisés. Le cæcum, légèrement irrité par frottement est dégagé et on injecte la suspension d'Amibes ou la culture bactérienne en évitant l'effraction de la paroi cæcale ; notre protocole consiste en effet à pratiquer l'injection au niveau du gros intestin en aval de la jonction avec le cæcum sans provoquer de lésion de la paroi cæcale, ce qui permettra d'affirmer que les abcès observés ultérieurement sont dus aux Amibes et ne sont pas des abcès de paroi iatrogènes.

Les quatre premiers lots reçoivent 500 000 trophozoïtes dans un volume voisin de 0,5 ml ; les deux derniers sont inoculés par 0,5 ml d'une suspension contenant 10^9 *C. diversus* par millilitre.

I.6 — AUTOPSIE ET EXAMEN DU CÆCUM

L'autopsie s'effectue après euthanasie à l'éther.

I.6.1 — *Examen direct.*

Après incision thoraco-abdomino-pelvienne, les deux derniers centimètres d'iléon, le bloc cæco-appendiculaire ainsi que les deux premiers centimètres du côlon ascendant ont été isolés du reste des viscères.

Le cæcum est dégagé et fendu longitudinalement. Il est examiné ainsi que son contenu. La gravité de l'atteinte amibienne est déterminée par un indice inspiré de celui de Woolfe (1963), mais prenant plus en compte l'aspect macroscopique de la paroi. Quatre paramètres sont appréciés :

- l'aspect normal, rétracté ou hypertrophié du cæcum ;
- l'épaisseur de la paroi normale (N) ou augmentée (+ à +++);

TABLEAU I. — Système d'évaluation de l'indice de gravité de l'amibiase cæcale du Raton.

Aspect du caecum	Amibes présentes à l'examen direct		Aucune Amibe après culture
	nombreuses	rarees	
Petit ou rétracté			
Paroi épaissie	5	4	0
Mucus abondant			
Petit ou rétracté			
Paroi épaissie	4	3	0
Mucus en quantité normale			
Normal			
Paroi épaissie	4	3	0
Mucus abondant			
Normal			
Paroi normale	3	2	0
Mucus abondant			
Normal			
Contenu normal	2	1	0

— la muco-sécrétion, normale (N) ou augmentée (+ à ++++);
 — enfin la présence de trophozoïtes recherchés à l'examen microscopique direct du produit de raclage de la paroi et du mucus. En outre, le cæcum est mis en culture dans un milieu pour Amibes qui sera observé après 48 heures. Cette culture augmente la probabilité de découvrir des Amibes dans les cæcums qui n'en contiendraient pas beaucoup. Elle permet aussi de distinguer plus facilement *E. histolytica* d'*E. muris* qui ne se multiplie pas en culture. L'abondance des trophozoïtes est notée de 0 à ++++ selon le nombre observé à frais.

Chaque animal se voit attribuer un indice allant de 0 à 5 (*tableau I*), qui prend en compte les aspects macroscopiques du cæcum et l'importance de la population d'*E. histolytica* présente.

I.6.2 — *Examen histologique.*

Des prélèvements sont effectués à différents niveaux et fixés par le formol à 10 % dans le tampon P. B. S. (tampon phosphate isotonique, pH 7,2). Après inclusion dans la paraffine, les coupes (épaisseur 5 μ m) sont colorées à l'hématéine-éosine-safran (H. E. S.) ou à l'acide périodique Schiff (A. P. S.).

La quantité de mucus est appréciée par le degré de vidange des cellules caliciformes bordant les glandes coliques après examen à l'objectif $\times 20$: de + à +++.

Les autres critères histologiques appréciés (colite interstitielle, hyperplasie lymphoïde, adhésion des trophozoïtes hémato-phages, colite érosive, abcès et ulcère amibiens) se rapportent au cæcum de chaque animal. Leur importance est estimée de la façon suivante :

- présence d'une colite interstitielle (+) ou non observée (—),
- hyperplasie lymphoïde absente (0) à forte (++++),
- densité en trophozoïtes adhérant à l'épithélium et hémato-phages peu importante : inférieure à 1 tous les 2 champs à l'objectif $\times 100$ (+) ou non observée (—),
- dénombrement des lésions érosives,
- présence (+) ou absence (—) d'une sclérose pariétale correspondant à la cicatrisation d'une lésion.

II — Résultats

II.1 — RATONS AUTOPSIÉS A 5 JOURS (LOT A)

Tous les Ratons autopsiés à J6 sont bien infectés et 8 présentent des indices élevés de 4 ou 5 (*tableau II*). Six animaux ont un cæcum rétracté avec une paroi épaisse : l'hypersécrétion de mucus est observée dans tous les cas. Les trophozoïtes sont présents dans le mucus parfois en véritable placard. La culture est positive mais le rendement en trophozoïtes au bout de 48 heures ne reflète pas la richesse observée à frais.

A l'histologie, les trophozoïtes sont dans tous les cas facilement identifiables

TABLEAU II. — Étude comparative des aspects macroscopiques, microscopiques et histologiques du cæcum chez des Rats amibiens autopsiés 5 jours après l'infection (lot A).

N° d'Identification des rats	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
EXAMEN DIRECT DE CAECUM												
Aspect	N	N	N	N	R	R	N	R	R	R	R	N
Épaisseur de la paroi	+	+	+	+	+	+++	+	+	+	+	+	+
Sécrétion du mucus	+++	+	+	++	+	+++	+++	++	+++	++	+++	+
Densité en trophozoïtes	++	++	+	++	++++	++	++	++	++	++	++++	++++
INDICE DE GRAVITE	3	4	3	3	5	4	3	5	4	4	5	4
HISTOLOGIE DU CAECUM												
Mucus dans les cellules caliciformes	++	+	+++	+	+	+	+++	+++	+	+	++	+++
Colite interstitielle	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-
Hyperplasie lymphoïde	0	0	0	+++	+	0	0	+	0	+	+	++
Trophozoïtes adhérent à l'épithélium et hématophages	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+
Colite érosive : aiguë	-	(1)	-	-	(4)	-	-	-	(1)	-	-	-
réparée	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Abcès en bouton de chemise : aigu	-	-	-	-	-	-	-	(1)	(1)	-	-	-
détergée	(2)	-	-	-	-	(1)	(1)	-	-	-	-	(1)
Ulcère amibien : aigu	-	-	-	-	-	(1)	-	-	-	(3)	-	-
réparé	-	-	-	(1)	-	-	-	-	-	-	-	-

— Aspect du cæcum :

- cæcum : normal (N), rétracté (R), hypertrophié (HT),
- épaisseur de la paroi : normale (N) ou augmentée (+ à +++),
- sécrétion du mucus : normale (N) ou augmentée (+ à +++),
- trophozoïtes : 0 à ++++.

— Histologie du cæcum :

- mucus dans les glandes caliciformes : + à +++,
- colite interstitielle : observée (+) ou non (-),
- hyperplasie lymphoïde : notée de 0 à +++,
- trophozoïtes hématophages adhérent : observés (+) ou non (-).

— Les chiffres des lésions (colite érosive, abcès et ulcère) indiquent leur fréquence.

dans la lumière cæcale. Un grand nombre contiennent des hématies dans leur cytoplasme ce qui permet de les différencier d'*E. muris*. Chez les animaux porteurs de lésions ulcérées, les parasites sont mêlés à de nombreux polynucléaires neutrophiles altérés. La déplétion des cellules caliciformes s'accompagne d'une hyper-sécrétion de mucus plus ou moins importante chez 8 animaux sur 12. La réaction inflammatoire importante liée à la présence des trophozoïtes se traduit par une colite interstitielle chez une majorité des animaux, accompagnée ou non d'hyperplasie lymphoïde. Les ulcérations de la muqueuse cæcale sont d'intensité variable. Les lésions érosives caractéristiques de l'ambiase sont de trois types : colite érosive, abcès en bouton de chemise et ulcère amibien.

. La première manifestation pathologique de la présence des trophozoïtes dans la lumière cæcale correspond à une adhésion des trophozoïtes à l'épithélium de la muqueuse (7 animaux sur 12). A ce stade de l'infection, on note le plus souvent dans le chorion, une vasodilatation des capillaires avec un afflux de polynucléaires et lymphocytes. Les glandes coliques présentent une hypersécrétion (*fig. 1*).

. Au stade suivant, la colite érosive, la lyse de l'épithélium permet le passage des trophozoïtes dans les couches sous-jacentes. Cette lésion observée chez trois animaux peut être unique ou multiple, de diamètre variable (parfois punctiforme, ailleurs large mesurant en moyenne 200 microns) à bords nets (*fig. 2*). Le revêtement de surface de la muqueuse cæcale est érodé. Il est remplacé par un enduit fibrineux (*fig. 3*) enserrant des Amibes mêlées à des polynucléaires neutrophiles altérés et des cellules inflammatoires mononuclées (histiocytes, lymphocytes). Certaines Amibes ont été retrouvées dans la partie superficielle du chorion qui montre une vasocongestion. Le reste de la paroi cæcale ne montre pas d'anomalie notable.

. L'extension de la colite érosive en surface et en profondeur réalise l'abcès amibien (*fig. 4*). Celui-ci provoque une rupture partielle de la musculaire muqueuse et progresse dans la sous-muqueuse. Il se forme ainsi un abcès intra-pariétal communiquant avec la lumière cæcale par la lésion érosive. L'abcès peut être unique ou multiple. Dans deux cas, il est d'allure aiguë. Il est représenté par un foyer contenant de nombreux éléments inflammatoires altérés, mêlés à des Amibes dégénérées (*fig. 5*). Dans 4 cas (*tableau II*) cet abcès présente des signes de détersion avec une raréfaction des structures parasitaires, un processus de macrophagie et l'accumulation de nombreuses cellules mononuclées à prédominance histiocyttaire.

. L'ulcère amibien est noté chez 3 animaux. Il peut être secondaire à des lésions de colite érosive, ou à l'excavation des abcès en bouton de chemise. Son diamètre est d'environ 1 000 microns. Il s'agit d'une perte de substance à contour net, intéressant la muqueuse, la sous-muqueuse ainsi que la partie interne de la musculature. Le fond de l'ulcère est tapissé par un tissu inflammatoire riche en polynucléaires altérés, en histiocytes et en lymphocytes. Quand l'ulcère est aigu, il présente au niveau des berges de nombreuses Amibes. Il est bordé par une muqueuse montrant une colite catarrhale. Dans un cas, l'ulcère présente une ré-épithélialisation avec revêtement de surface de type régénératif reposant sur un tissu scléro-inflammatoire dépourvu de structures parasitaires.

FIG. 1 à 6.

II.2 — RATONS AUTOPSIÉS A 10 JOURS (LOT B)

Cinq des 9 animaux autopsiés 10 jours après l'infection sont porteurs d'Amibes lors de l'examen microscopique du cæcum (*tableau III*). Ils sont moins gravement

TABLEAU III. — Étude comparative des aspects macroscopiques, microscopiques et histologique du cæcum chez des Ratons amibiens autopsiés 10 jours après l'infection (lot B). — Légendes : cf. tableau II.

N° d'Identification des ratons	13	14	15	16	17	18	19	20	21
EXAMEN DIRECT DE CAECUM									
Aspect	N	R	HT	HT	R	HT	HT	HT	R
Épaisseur de la paroi	+	++	N	N	+	N	N	N	N
Sécrétion du mucus	+	+++	+	+	+++	+	+	+	++
Densité en trophozoïtes	++	++	0	+	+	0	0	0	+
INDICE DE GRAVITE	3	4	0	2	4	0	0	0	3
HISTOLOGIE DU CAECUM									
Mucus dans les cellules caliciformes	+	+	++	+	++	+	+	+	+
Colite interstitielle	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hyperplasie lymphoïde	0	0	+	+	0	+	+++	+	+
Trophozoïtes adhérent à l'épithélium et hémato-phages	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Colite érosive : aiguë	-	(4)	-	-	(1)	-	-	-	-
réparée	(1)	-	-	-	-	-	-	-	(1)
Abcès en bouton de chemise : aigu	-	(2)	-	-	-	-	-	-	-
déteigé	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ulcère amibien : aigu	-	-	-	-	-	-	-	-	-
réparé	-	-	-	-	-	-	-	-	-

FIG. 1. — Premiers signes d'atteinte amibienne chez un Raton autopsié au 6^e jour de l'infection (indice de gravité : 2). Adhésion des trophozoïtes (→) à l'épithélium de la muqueuse. Dans le chorion, il apparaît une vasodilatation vasculaire avec un afflux de polynucléaires et de lymphocytes. Les glandes coliques (c) conservent leur activité hypersécrétante (H. E. S.).

FIG. 2 et 3. — Colite érosive chez un Raton autopsié au 6^e jour de l'infection (indice de gravité : 4). L'épithélium de la muqueuse est lysé (→) permettant la progression des trophozoïtes dans les couches sous-jacentes. Le revêtement de surface ulcéré est remplacé par un enduit fibrino-leucocytaire (⇔) enserrant de nombreux polynucléaires. La sous-muqueuse est infiltrée de nombreux polynucléaires et lymphocytes (H. E. S.).

FIG. 4 et 5. — Abcès amibien chez un Raton autopsié au 6^e jour de l'infection (indice de gravité : 5). La colite érosive s'étend en surface et en profondeur atteignant la sous-muqueuse et la musculuse (M.). L'abcès se caractérise par une collection purulente, renfermant des polynucléaires altérés et des Amibes (→) (H. E. S.).

FIG. 6. — Cicatrisation d'une lésion chez un Raton autopsié 20 jours après l'infection : l'épithélium régénératif de type cubocylindrique recouvre la surface lysée (→). Le début de cicatrisation se manifeste par l'apparition d'une sclérose oedémateuse (⇔) enserrant des éléments inflammatoires (H. E. S.).

atteints que les animaux du lot précédent puisque deux seulement présentent des indices élevés (4). Le cæcum est rétracté chez seulement 3 animaux sur 9 ; la paroi cæcale a le plus souvent un aspect macroscopique normal (6 animaux sur 9).

L'étude histologique montre une amorce de processus de guérison : les animaux présentant des lésions sont moins nombreux (4 animaux sur 9 contre 10/12 dans le lot A). Il existe deux types de lésions érosives :

- une colite érosive, chez 4 animaux, qui peut être unique ou multiple. Pour 2 Rats, cette lésion montre une ré-épithélialisation en surface,
- chez un seul Rat du lot, la colite érosive est associée avec un abcès en bouton de chemise.

Chez tous les animaux, la présence de mucus dans les cellules caliciformes reste inférieure à la normale. De nombreux éléments inflammatoires (polynucléaires neutrophiles altérés, cellules mononuclées) sont présents dans la lumière cæcale et tous présentent des lésions de colite interstitielle avec, chez 6 Rats, une hyperplasie lymphoïde, ce qui indique la persistance d'une réaction inflammatoire.

TABLEAU IV. — Étude comparative des aspects macroscopiques, microscopiques et histologiques du cæcum chez des Rats amibiens autopsiés 20 jours après l'infection (lot C). — Légendes : cf. tableau II.

N° d'Identification des rats	22	23	24	25	26	27	28	29	30
EXAMEN DIRECT DE CAECUM									
Aspect	HT	HT	HT	HT	HT	R	HT	HT	HT
Epaisseur de la paroi	N	N	N	N	N	+	N	N	N
Sécrétion du mucus	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Densité en trophozoïtes	0	0	0	0	0	0	0	0	0
INDICE DE GRAVITE	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HISTOLOGIE DU CAECUM									
Mucus dans les cellules caliciformes	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Colite interstitielle	-	-	+	+	-	+	-	-	-
Hyperplasie lymphoïde	+	+	+	+	+	+	+++	+++	+
Trophozoïtes adhérent à l'épithélium et hématophages	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Colite érosive : aiguë	-	-	-	-	-	-	-	-	-
réparée	-	-	-	-	-	-	(1)	-	-
Abcès en bouton de chemise : aigu	-	-	-	-	-	-	-	-	-
déteigé	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ulcère amibien : aigu	-	-	-	-	-	-	-	-	-
réparé	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sclérose pariétale localisée	-	-	-	-	-	-	(+)	(+)	-

II.3 — RATONS AUTOPSIÉS A 20 JOURS (LOT C) OU A 30 JOURS (LOT D)

Dans les autopsies effectuées 20 et 30 jours après l'infection, les indices de gravité sont de zéro (*tableaux IV et V*). Le cæcum apparaît généralement hypertrophié, la lumière cæcale est occupée par des débris stercoraux sans trophozoïtes ni cellules inflammatoires identifiables.

Les animaux autopsiés 20 jours après l'infection présentent encore une réduction du volume du mucus des cellules caliciformes. La réaction inflammatoire est persistante : 3 animaux présentent des lésions de colite interstitielle et tous ont une hyperplasie lymphoïde. Un seul animal présente une lésion érosive avec une ré-épithélialisation en surface (*fig. 6*).

Chez les animaux autopsiés 30 jours après l'infection, la muqueuse ne présente pas de lésion inflammatoire notable, tous ont une hyperplasie lymphoïde isolée et les cellules caliciformes ont un aspect normal. Chez 4 animaux, il a été retrouvé au niveau de la paroi cæcale des lésions de sclérose localisée mutilant la musculaire muqueuse et la sous-muqueuse. Ces lésions coiffées par une muqueuse de type régénératif correspondent à des abcès en bouton de chemise détergés et cicatrisés. Ces aspects traduisent un processus de guérison.

TABLEAU V. — Étude comparative des aspects macroscopiques, microscopiques et histologiques du cæcum chez des Ratons amibiens autopsiés 30 jours après l'infection (lot D). — Légendes : cf. tableau II.

N° d'Identification des ratons	31	32	33	34	35	36	37	38	39
EXAMEN DIRECT DE CAECUM									
Aspect	HT	HT	HT	HT	HT	HT	HT	HT	HT
Épaisseur de la paroi	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Sécrétion du mucus	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Densité en trophozoïtes	0	0	0	0	0	0	0	0	0
INDICE DE GRAVITE	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HISTOLOGIE DU CAECUM									
Mucus dans les cellules caliciformes	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Colite interstitielle	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Hyperplasie lymphoïde	++	++	++	++	++	+	++	++	++
Trophozoïtes adhérent à l'épithélium et hémato-phages	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Colite érosive : aiguë	-	-	-	-	-	-	-	-	-
réparée	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Abcès en bouton de chemise : aigu	-	-	-	-	-	-	-	-	-
détergés	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ulcère amibien : aigu	-	-	-	-	-	-	-	-	-
réparé	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sclérose pariétale localisée	-	-	(+)	(+)	-	-	(+)	(+)	-

II.4 — TÉMOINS *Citrobacter diversus* AUTOPSIÉS A 5 JOURS (LOT E) OU A 10 JOURS- (LOT F)

Ces animaux ne reçoivent donc que la culture bactérienne. Les cæcums des animaux autopsiés 5 et 10 jours après l'infection présentent un aspect normal avec une paroi normale ou fine et sans mucus. Seul un animal autopsié 5 jours après l'infection a présenté une paroi épaisse accompagnée de mucus.

Aucune lésion érosive de la muqueuse cæcale n'a été notée. Les structures glandulaires montrent une muco-sécrétion normale. Seul le chorion présente une note congestive.

La sous-muqueuse ainsi que la musculature sont d'aspect normal.

L'existence d'une colite interstitielle associée ou non à une hyperplasie lymphoïde chez la plupart des Ratons appartenant aux 4 groupes étudiés (A, B, C, D) montre que cette lésion est non spécifique.

III — Discussion

Certaines convergences peuvent s'établir entre l'aspect macroscopique du cæcum qui permet la détermination de l'indice de gravité et les lésions histologiques.

L'abondance de mucus dans la lumière et sur la paroi cæcale est la conséquence de la présence des trophozoïtes et pourrait constituer le premier mode de défense de l'épithélium vis-à-vis de l'invasion par les Amibes. Il constitue une barrière mécanique et biochimique (Leight, 1985). Ces manifestations se retrouvent en début de développement de la lésion chez des Ratons autopsiés 5 et 10 jours après infection.

Le contact Amibe-cellule cible est le facteur initial indispensable pour que s'exprime l'effet cytopathogène (Chadée, 1985). Le lot A regroupe une forte proportion de Ratons qui présentent des trophozoïtes hématophages adhérant à l'épithélium cæcal en même temps qu'un nombre élevé de lésions érosives.

La faible proportion de trophozoïtes adhérant à l'épithélium peut s'expliquer par la date de l'autopsie : l'adhésion doit être maximum dans les heures qui suivent l'infection et seule une autopsie précoce des Ratons permettrait d'observer l'ampleur de cette étape initiale du mécanisme pathogène.

Les lésions observées microscopiquement : colite érosive, abcès et ulcère amibiens, correspondent à une diffusion de la pathologie dans la paroi cæcale et se traduisent macroscopiquement par un épaissement de la paroi cæcale et une rétraction du cæcum. L'absence de débris stercoraux dans la lumière cæcale est liée aux troubles du péristaltisme intestinal, en particulier la diarrhée. Les animaux présentant ce type de lésions ont des indices de gravité élevés : 4 et 5.

Chez les animaux autopsiés 5 jours après l'infection, tous ceux qui ont un indice de gravité élevé présentent des lésions de la paroi cæcale le plus souvent aiguës (6 animaux sur 8, *tableau II*). L'histologie confirme le bien fondé des indices de gravité pour apprécier le degré de l'atteinte amibienne. Les animaux autopsiés

10 jours après l'infection sont moins gravement atteints (*tableau III*). Le nombre d'animaux présentant un cæcum normal à l'examen macroscopique (indice 0) avec une paroi dépourvue de lésion à l'examen histologie augmente (4 animaux sur 9). L'étude anatomopathologique des prélèvements cæcaux provenant des 4 groupes de Rats amibiens montre que les lésions surviennent essentiellement lors des 10 premiers jours de l'infection. La période la plus favorable pour étudier la pathologie cæcale chez le Raton se situe vers le 6^e jour de l'infection puisqu'à cette date le pourcentage d'animaux atteints est le plus élevé, avec en plus un maximum de sévérité au niveau des lésions. En effet 20 et 30 jours après l'infection (lot C et D) les lésions érosives sont ré-épithélialisées (*fig. 6*). La réparation des lésions est quasi complète au 30^e jour de l'infection (lot D).

Les lésions que nous avons observées présentent une grande similitude avec celles décrites chez le Cobaye (Gill *et al.*, 1987) et la Gerbille (Chadée et Meerovitch, 1985) : l'abondance en trophozoïtes est associée à une abondance du mucus sécrété par les cellules caliciformes. Ceci confirme l'hypothèse de Leitch *et al.*, (1985) sur le rôle protecteur du mucus qui constitue une barrière naturelle contre la pénétration du parasite dans la paroi cæcale. La muqueuse intestinale, par suite de l'adhésion des trophozoïtes est d'abord le siège d'une réaction inflammatoire avec un afflux de polynucléaires et de lymphocytes puis les cytotoxines amibiennes aidées par les enzymes des cellules inflammatoires lysent l'épithélium de la muqueuse et créent des petites ulcérations qui vont ensuite confluer pour former une colite érosive. Les lésions observées chez le Raton : colite érosive, abcès ulcéré correspondent à une extension des lésions érosives en surface et en profondeur. Ce sont des lésions actives provoquées par la présence des trophozoïtes qui lysent et phagocytent les cellules de la paroi cæcale, mais ils ne pénètrent dans les tissus qu'après rupture de l'épithélium intestinal (*fig. 4, 5*). Ces différentes étapes, colites, abcès ulcérés, représentent le mode le plus courant de formation des lésions chez l'animal et l'Homme. Elles sont superposables à celles décrites chez l'Homme et présentent les mêmes variations dans la réponse de l'hôte à l'infection par les Amibes : elles sont d'intensité variable, allant d'une colite banale à un abcès en bouton de chemise.

Plusieurs modèles d'amibiase cæcale utilisant une souche gnotoxénique d'Amibes ont été décrits chez le Rat (Neal et Harris, 1977 ; Singh *et al.*, 1971), le Hamster (Ray *et al.*, 1979, 1981), le Cobaye (Anand *et al.*, 1985). Avec les Cobayes et les Hamsters, la pathologie est moins sévère, plus inconstante et les Cobayes supportent moins bien l'infection que les Rats.

Deux modèles d'amibiase cæcale sont décrits utilisant une souche axénique d'*E. histolytica* : la Gerbille (Chadée et Meerovitch, 1985) et le Cobaye (Diamond *et al.*, 1978 ; Gill *et al.*, 1987). La Gerbille est extrêmement sensible à l'infection intracæcale mais son élevage est délicat. Les Cobayes nouveau-nés (1 à 5 jours), très sensibles à l'infection, meurent en grand nombre parce que beaucoup sont rejetés par leur mère après avoir été manipulés. La technique de l'infection des Cobayes par l'isolement d'une anse cæcale (Anaya-Velasquez *et al.*, 1985) est longue, délicate mais elle permet d'obtenir des ulcérations cæcales précoces (au bout

de 48 h) chez de nombreux animaux (75 %). Ces modèles, Gerbille et Cobaye, plus délicats à mettre en œuvre que le modèle Raton, semblent plus utiles dans l'étude de l'adhésion et des phénomènes cytotoxiques, en particulier, et des facteurs déclenchant l'immunité.

Conclusion

Le modèle d'amibiase cœcale chez le Raton a été modifié et amélioré sur deux points : le maintien de la virulence de la souche d'Amibes à un niveau élevé dans le but d'obtenir des lésions régulièrement sévères et un mode particulier d'inoculation des Amibes sans effraction du cœcum.

L'examen histologique des cæcums a permis de confirmer l'intérêt et la validité de l'indice de gravité pour déterminer rapidement le niveau de l'atteinte cœcale. Il présente en outre plusieurs avantages par rapport aux autres modèles proposés : l'infection des animaux avec une souche gnotoxénique a prouvé d'une part que le Raton est plus sensible à l'infection que le Cobaye ou le Hamster et qu'il supporte mieux l'infection que les Cobayes, d'autre part que le pourcentage d'animaux infectés est élevé. Ce modèle doit être retenu pour la recherche de substances à activité antiamibienne.

RÉFÉRENCES

- ANAND B. S., VINAYAK V. K., BUSHNURMATH S. R., BHAGWAT A. G., JAIN S. K. : Experimental amoebiasis in the guinea-pig: sequential histological abnormalities following intracaecal injection of *Entamoeba histolytica*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1985, 79, 626-630.
- ANAYA-VELAZQUEZ F., MARTINEZ-PALOMO A., TSUTSUMI V., GONZALEZ-ROBLES A. : Intestinal invasive amoebiasis: an experimental model in rodents using axenic or monoxenic strains of *Entamoeba histolytica*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1985, 34, 723-730.
- CHADÉE K., MEEROVITCH E. : *Entamoeba histolytica*: early progressive pathology in the caecum of the gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1985, 34, 283-291.
- DESCHIENS R., PROVOST A. : Exposé d'une technique d'inoculation de l'amibe dysentérique au chat, par laparotomie. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1937, 30, 648-656.
- DIAMOND L. S., TANIMOTO W. M., MARTINEZ-PALOMO A. : Production of cecal lesions in newborn guinea pigs with axenically cultivated *Entamoeba histolytica*. *Arch. Invest. Med. (Mex.)*, 1978, 9, 223-228.
- GILL N. J., GARG U. C., GANGULY N. K., NAHAJAN R. C., BHATNAGAR R. : Alteration of brush border membrane enzymes in intestinal amoebiasis. *Med. Sci. Res.*, 1987, 15, 101-102.
- GOLD D., NORMAN L. : Studies on the preservation and enhancement of the virulence of some strains of *Entamoeba histolytica* in axenic and monoxenic cultures. *J. Parasitol.*, 1979, 65, 970-972.
- HUNNINEN A. V., BOONE H. A. : Studies in the pathogenicity of various strains of *Entamoeba histolytica* in the rabbit. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1957, 6, 32-49.
- LEITCH G. J., DICKEY A. V., UDEZULU I. A., GORDON B. B. : *Entamoeba histolytica* trophozoites in the lumen and mucus blanket of rat colons studied *in vivo*. *Infect. Immun.*, 1985, 47, 68-73.
- LUSHBAUGH W. B., KAIRALLA A. B., LOADHOLT C. B., PITTMAN F. E. : Effect of hamster liver passage on the virulence of axenically cultivated *Entamoeba histolytica*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1978, 27, 248-254.
- MORA-GALINDO J., MARTINEZ-PALOMO A., CHAVEZ B. : Interaccion entre *Entamoeba histolytica* y el epitelio cecal del cobayo. *Arch. Invest. Med. (Mex.)*, 1978, 9, 261-273.
- MORA-GALINDO J., MARTINEZ-PALOMO A., GONZALEZ-ROBLES A. : Interacción entre *Entamoeba histolytica* y el epitelio cecal del cobayo. Estudio cuantitativo. *Arch. Invest. Med. (Mex.)*, 1982, 13, 233-243.

- NEAL R. A. : Some observations on the variation of virulence and response to chemotherapy of strains of *Entamoeba histolytica* in rats. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1951, **44**, 439-452.
- NEAL R. A., HARRIS W. G. : Attempts to inject inbred strains of rats and mice with *Entamoeba histolytica*. *J. Protozool.*, 1977, **3**, 197-199.
- RAY D. K., CHATTERJEE D. K. : Caecal amoebiasis in albinos mice an experimental model. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 1980, **75**, 255-256.
- RAY D. K., CHATTERJEE D. K., BHOPALE K. K., SHRIVASTAVA V. : Simultaneous hepatic and intestinal infection of golden hamster by *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Indian J. Parasitol.*, 1979, **3**, 203-204.
- RAY D. K., SHRIVASTAVA V., TENDULKAR J. S., DUTTA A. K., BHOPALE K. K., CHATTERJEE D. K., NAGARAJAN K. : Comparative studies on the amoebicidal activity of known 5-nitro imidazole derivatives and CG-10213-60 in golden hamster, *Mesocricetus auratus*, infected in the liver or caecum or both with trophozoites of *Entamoeba histolytica*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 1981, **77**, 287-291.
- RIGOTHIER M. C. : Étude de modulateurs du pouvoir pathogène expérimental de l'amibe *Entamoeba histolytica*, Schaudinn, 1983. Thèse Doct. ès Sciences Pharmaceutiques, Paris XI, 1988, 186 p.
- SINGH B. N., SRIVASTAVA R., DUTTA G. P. : Virulence of strains of *Entamoeba histolytica* to rats and the effect of cholesterol, rats caecal and hamster liver passage on the virulence of non-invasive strains. *Indian J. Exp. Biol.*, 1971, **9**, 21-27.
- TAKEUCHI A., JERVIS H. R., PHILLIPS B. P. : Electron microscopic studies of experimental *Entamoeba histolytica* infection in the guinea pig. III. Histolysis of the caecum. *Virchows Arch. Cell. Path.*, 1977, **24**, 263-277.
- TAYLOR A. E., BAKER J. R. : Amoebae. In: The cultivation of parasites *in vitro*, Adlard (Ed.). Blackwell. Scientific Publications, Oxford., 1968, 120-153.
- THOMPSON P. E., MC CARTHY D., REINERTSON J. N. : Observations on the virulence of *Entamoeba histolytica* during prolonged subcultivation. *Am. J. Hyg.*, 1954, **59**, 249-261.
- TREVINO-GARCIA MANZO N., CRUZ DE LAVIN E., TANIMOTO W. M. : Estudio ultra microscopico de la invasion de la mucosa del colon por *Entamoeba histolytica* en cultivo axenico. *Arch. Invest. Med. (Mex.)*, 1978, **9**, 275-284.
- WOOLFE G. : Chemotherapy of amebiasis. In: Experimental chemotherapy, Schnitzer R. L., Hawking F. (Eds). Academic Press, New York, 1963, Vol. 1, 355-443.
-