



**HAL**  
open science

# La contamination des eaux de loisirs par les amibes libres pathogènes

Marion Wendling

► **To cite this version:**

Marion Wendling. La contamination des eaux de loisirs par les amibes libres pathogènes. Sciences pharmaceutiques. 2014. hal-01732370

**HAL Id: hal-01732370**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01732370v1>**

Submitted on 14 Mar 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

**UNIVERSITE DE LORRAINE**  
**2014**

---

**FACULTE DE PHARMACIE**

**T H E S E**

Présentée et soutenue publiquement

le, **7 juillet 2014**

sur un sujet dédié à :

**LA CONTAMINATION DES  
EAUX DE LOISIRS PAR LES  
AMIBES LIBRES  
PATHOGENES**

pour obtenir

**le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie**

par

**Marion WENDLING**

Née le 25 octobre 1988

**Membres du Jury**

Président :	Mr R.DUVAL	Professeur de Microbiologie, Faculté de Pharmacie de Nancy
Directeur :	Mme S. BANAS	Maitre de Conférences, Faculté de Pharmacie de Nancy
Juges :	Mme L. MATHIEU Mlle C. HERBOURG	Maitre de Conférences, Ecole Pratique des Hautes Etudes Docteur en Pharmacie, Faculté de Pharmacie de Nancy

**UNIVERSITÉ DE LORRAINE  
FACULTÉ DE PHARMACIE  
Année universitaire 2013-2014**

**DOYEN**

Francine PAULUS

**Vice-Doyen**

Francine KEDZIEREWICZ

**Directeur des Etudes**

Virginie PICHON

**Président du Conseil de la Pédagogie**

Brigitte LEININGER-MULLER

**Président de la Commission de la Recherche**

Christophe GANTZER

**Président de la Commission Prospective Facultaire**

Chantal FINANCE

**Responsable de la Cellule de Formations Continue et Individuelle**

Béatrice FAIVRE

**Responsable ERASMUS :**

Francine KEDZIEREWICZ

**Responsable de la filière Officine :**

Francine PAULUS

**Responsables de la filière Industrie :**

Isabelle LARTAUD,

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

**Responsable du Collège d'Enseignement  
Pharmaceutique Hospitalier :**

Jean-Michel SIMON

**Responsable Pharma Plus E.N.S.I.C. :**

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

**Responsable Pharma Plus E.N.S.A.I.A. :**

Raphaël DUVAL

**DOYENS HONORAIRES**

Chantal FINANCE

Claude VIGNERON

**PROFESSEURS EMERITES**

Jeffrey ATKINSON

Max HENRY

Gérard SIEST

Claude VIGNERON

**PROFESSEURS HONORAIRES**

Roger BONALY

Pierre DIXNEUF

Marie-Madeleine GALTEAU

Thérèse GIRARD

Maurice HOFFMANN

Michel JACQUE

Lucien LALLOZ

Pierre LECTARD

Vincent LOPPINET

Marcel MIRJOLET

Maurice PIERFITTE

Janine SCHWARTZBROD

Louis SCHWARTZBROD

**MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES**

Monique ALBERT

Gérald CATAU

Jean-Claude CHEVIN

Jocelyne COLLOMB

Bernard DANGIEN

Marie-Claude FUZELLIER

Françoise HINZELIN

Marie-Hélène LIVERTOUX

Bernard MIGNOT

Jean-Louis MONAL

Blandine MOREAU

Dominique NOTTER

Christine PERDICAKIS

Marie-France POCHON

Anne ROVEL

Maria WELLMAN-ROUSSEAU

**ASSISTANTS HONORAIRES**

Marie-Catherine BERTHE

Annie PAVIS

**ENSEIGNANTS**

Section  
CNU\*

Discipline d'enseignement

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS**

Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ	82	Thérapie cellulaire
Chantal FINANCE	82	Virologie, Immunologie
Jean-Yves JOUZEAU	80	Bioanalyse du médicament
Jean-Louis MERLIN	82	Biologie cellulaire
Alain NICOLAS	80	Chimie analytique et Bromatologie
Jean-Michel SIMON	81	Economie de la santé, Législation pharmaceutique

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES**

Jean-Claude BLOCK	87	Santé publique
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	86	Pharmacologie
Raphaël DUVAL	87	Microbiologie clinique
Béatrice FAIVRE	87	Biologie cellulaire, Hématologie
Luc FERRARI ☒	86	Toxicologie
Pascale FRIANT-MICHEL	85	Mathématiques, Physique
Christophe GANTZER	87	Microbiologie
Frédéric JORAND ☒	87	Environnement et Santé
Pierre LABRUDE (retraite 01-11-13)	86	Physiologie, Orthopédie, Maintien à domicile
Isabelle LARTAUD	86	Pharmacologie
Dominique LAURAIN-MATTAR	86	Pharmacognosie
Brigitte LEININGER-MULLER	87	Biochimie
Pierre LEROY	85	Chimie physique
Philippe MAINCENT	85	Pharmacie galénique
Alain MARSURA	32	Chimie organique
Patrick MENU	86	Physiologie
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	86	Chimie thérapeutique
Bertrand RIHN	87	Biochimie, Biologie moléculaire

**MAITRES DE CONFÉRENCES - PRATICIENS HOSPITALIERS**

Béatrice DEMORE	81	Pharmacie clinique
Julien PERRIN	82	Hématologie biologique
Marie SOCHA	81	Pharmacie clinique, thérapeutique et biotechnique
Nathalie THILLY	81	Santé publique

**MAITRES DE CONFÉRENCES**

Sandrine BANAS	87	Parasitologie
Mariette BEAUD	87	Biologie cellulaire
Emmanuelle BENOIT	86	Communication et Santé
Isabelle BERTRAND	87	Microbiologie
Michel BOISBRUN	86	Chimie thérapeutique
François BONNEAUX	86	Chimie thérapeutique
Ariane BOUDIER	85	Chimie Physique
Cédric BOURA	86	Physiologie
Igor CLAROT	85	Chimie analytique
Joël COULON	87	Biochimie
Sébastien DADE	85	Bio-informatique
Dominique DECOLIN	85	Chimie analytique
Roudayna DIAB	85	Pharmacie galénique
Natacha DREUMONT	87	Biochimie générale, Biochimie clinique
Joël DUCOURNEAU	85	Biophysique, Acoustique

<b>ENSEIGNANTS (suite)</b>	<b>Section CNU*</b>	<b>Discipline d'enseignement</b>
Florence DUMARCAY	86	Chimie thérapeutique
François DUPUIS	86	Pharmacologie
Adil FAIZ	85	Biophysique, Acoustique
Caroline GAUCHER	85/86	Chimie physique, Pharmacologie
Stéphane GIBAUD	86	Pharmacie clinique
Thierry HUMBERT	86	Chimie organique
Olivier JOUBERT	86	Toxicologie
Francine KEDZIEREWICZ	85	Pharmacie galénique
Alexandrine LAMBERT	85	Informatique, Biostatistiques
Faten MERHI-SOUSSI	87	Hématologie
Christophe MERLIN	87	Microbiologie
Maxime MOURER	86	Chimie organique
Coumba NDIAYE	86	Epidémiologie et Santé publique
Francine PAULUS	85	Informatique
Christine PERDICAKIS	86	Chimie organique
Caroline PERRIN-SARRADO	86	Pharmacologie
Virginie PICHON	85	Biophysique
Anne SAPIN-MINET	85	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER	87	Mycologie, Botanique
Gabriel TROCKLE	86	Pharmacologie
Mihayl VARBANOV	87	Immuno-Virologie
Marie-Noëlle VAULTIER	87	Mycologie, Botanique
Emilie VELOT	86	Physiologie-Physiopathologie humaines
Mohamed ZAIYOU	87	Biochimie et Biologie moléculaire
Colette ZINUTTI	85	Pharmacie galénique

**PROFESSEUR ASSOCIE**

Anne MAHEUT-BOSSER	86	Sémiologie
--------------------	----	------------

**PROFESSEUR AGREGÉ**

Christophe COCHAUD	11	Anglais
--------------------	----	---------

✠ En attente de nomination

**\*Disciplines du Conseil National des Universités :**

80 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

81 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

82 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

85 ; Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

86 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

87 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

32 : Personnel enseignant-chercheur de sciences en chimie organique, minérale, industrielle

11 : Professeur agrégé de lettres et sciences humaines en langues et littératures anglaises et anglo-saxonnes

## **SERMENT DES APOTHICAIRES**



**Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :**

**D'** honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

**D'**exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

**D**e ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

**Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.**

**Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.**



« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION,  
NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES  
THESES, CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES  
COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».



# REMERCIEMENTS

*A mon président de thèse,*

**Monsieur R. DUVAL, Professeur en Microbiologie clinique**

**(Faculté de Pharmacie de Nancy)**

Qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse,

Sincères remerciements.

*A mon directeur,*

**Madame S. BANAS, Maître de conférences des Universités**

**(Faculté de Pharmacie de Nancy)**

Je vous remercie de m'avoir proposé ce sujet et de m'avoir aidée tout au long de la rédaction de cette thèse.

Pour votre aide précieuse, votre gentillesse, et votre disponibilité,

Trouvez ici le témoignage de ma réelle considération et l'expression de ma profonde reconnaissance.

*A mes juges,*

**Mme L. MATHIEU, Maître de conférences à l'École Pratique des Hautes Etudes**

**Mlle C. HERBOURG, Docteur en Pharmacie,**

Qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger ce travail,

Trouvez ici l'expression de mes sentiments les plus sincères.

*A mes parents,*

Qui m'ont permis de faire ces études.

Pour leur présence tout au long de ces années.

Pour leur soutien, leur compréhension, leur réconfort.

Je vous aime.

*A mon frère,*

Pour tous ces bons moments passés ensemble.

Je t'aime.

*A Maxime, Fanny, Solène, Florian, Pierre,*

Pour votre soutien et vos encouragements, merci.

*A Julien et à Sophie (Bibichou),*

Merci d'avoir été présents toutes ces années.

*A Laurence, Marthe, Marine, Camille, Claire, Fanny et Inès,*

Merci à vous toutes !! La liste est trop longue pour tout énumérer, en tout cas, merci d'être là et de me soutenir!

*A Hugues, Arnaud, Kevin, Jean-Ed, Marc, Doriane et à tous mes amis,*

Merci pour tous ces instants « inoubliables » et pour les futurs !

*A Carole, mon mentor et Pauline,*

Ainsi qu'à toute l'équipe du stage de 6<sup>ème</sup> année, mille mercis.

# SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	19
PREMIERE PARTIE : LES AMIBES LIBRES	
I. Présentation générale : .....	22
I.1 Cytosol .....	22
I.2 Système cytomembranaire .....	23
I.3 Enkystement .....	24
I.4 Principaux organites intra-cytoplasmiques .....	24
I.4.1 Noyau .....	24
I.4.2 Appareil de Golgi .....	25
I.4.3 Vacuoles digestives .....	25
I.4.4 Vésicules pulsatiles .....	25
I.5 Biologie .....	25
I.5.1 Respiration et circulation : .....	25
I.5.2 Nutrition .....	25
I.5.3 Osmorégulation et excrétion .....	26
II. Classification.....	26
III. Ecologie des amibes libres .....	28
III.1 Ecologie de <i>Naegleria fowleri</i> .....	28
III.2 Ecologie d' <i>Acanthamoeba spp.</i> .....	28
III.3 Ecologie de <i>Balamuthia mandrillaris</i> et d' <i>Hartmannella vermiformis</i> .....	29
IV. Morphologie des amibes libres .....	29
IV.1 Morphologie de <i>Naegleria fowleri</i> .....	31
IV.2 Morphologie d' <i>Acanthamoeba spp.</i> .....	33
IV.3 <i>Balamuthia mandrillaris</i> .....	36
IV.4 Morphologie d' <i>Hartmannella vermiformis</i> .....	37
V. Génome des amibes libres.....	38
VI. Epidémiologie .....	39
VI.1 Epidémiologie de <i>Naegleria fowleri</i> .....	39
VI.2 Epidémiologie d' <i>Acanthamoeba spp.</i> .....	39
VI.3 Epidémiologie de <i>Balamuthia mandrillaris</i> .....	40

VI.4	Epidémiologie d' <i>Hartmannella vermiformis</i> .....	40
VII.	Rôle pathogène des amibes libres .....	40
VII.1	Pathologie lié à <i>Naegleria fowleri</i> .....	40
VII.1.1	Clinique .....	41
VII.1.1.1	Phase d'invasion .....	41
VII.1.1.2	Phase d'état : .....	42
VII.1.1.3	Evolution.....	43
VII.2	Pathologie lié à <i>Acanthamoeba spp.</i> .....	43
VII.2.1	Encéphalite granulomateuse amibienne .....	43
VII.2.1.1	Clinique.....	44
VII.2.1.1.1	Période d'incubation .....	44
VII.2.1.1.2	La phase d'état .....	44
VII.2.1.1.3	Evolution.....	45
VII.2.2	Kératites liés à <i>Acanthamoeba spp.</i> .....	45
VII.2.2.1	Clinique.....	46
VII.2.2.1.1	Phase d'incubation .....	46
VII.2.2.1.2	Phase d'état .....	46
VII.2.3	Autres atteintes liés à <i>Acanthamoeba</i> .....	47
VII.2.3.1	Atteintes cutanées .....	47
VII.2.3.1.1	Clinique.....	47
VII.2.3.1.2	Evolution.....	48
VII.2.3.2	Les sinusites .....	48
VII.2.3.3	Les pneumonies.....	48
VII.3	Pathologie lié à <i>Balamuthia mandrillaris</i> .....	49
VII.4	Pathologie lié à <i>Hartmannella vermiformis</i> .....	50
VIII.	Diagnostic biologique des amibes libres .....	52
VIII.1	Diagnostic de <i>Naegleria fowleri</i> .....	52
VIII.1.1.1	Examen microscopique.....	52
VIII.1.1.2	Culture .....	53
VIII.1.1.3	Diagnostic moléculaire .....	53
VIII.1.1.4	Sérologie .....	54
VIII.1.1.5	Autres examens biologiques du liquide céphalo-rachidien .....	54
VIII.2	Diagnostic d' <i>Acanthamoeba spp.</i> .....	54

VIII.2.1	Encéphalite granulomateuse lié à <i>Acanthamoeba</i> .....	54
VIII.2.1.1.1	Examen microscopique.....	54
VIII.2.1.1.2	Sérologie .....	55
VIII.2.1.1.3	Autres examens biologiques du liquide céphalo-rachidien .....	55
VIII.2.1.1.4	Examen post-mortem.....	56
VIII.2.2	Kératites liés à <i>Acanthamoeba</i> .....	56
VIII.2.2.1.1	Examen microscopique.....	56
VIII.2.2.1.2	Culture .....	56
VIII.2.2.1.3	Diagnostic moléculaire .....	57
VIII.3	Diagnostic de <i>Balamuthia mandrillaris</i> .....	57
VIII.3.1.1	Examen microscopique.....	57
VIII.3.1.2	Culture .....	58
VIII.3.1.3	Diagnostic moléculaire .....	58
VIII.3.1.4	Sérologie .....	58
VIII.3.1.5	Autres examens du liquide céphalo-rachidien.....	59
VIII.4	Diagnostic d' <i>Hartmannella vermiformis</i> .....	59
VIII.4.1	Culture .....	59
VIII.4.2	Diagnostic moléculaire .....	60
IX.	Traitement .....	60
IX.1	Traitement de <i>Naegleria fowleri</i> .....	60
IX.1.1.1	Traitement spécifique.....	60
IX.1.1.2	Traitement symptomatique .....	61
IX.2	Traitement d' <i>Acanthamoeba spp.</i> .....	61
IX.2.1	Encéphalite granulomateuse.....	61
IX.2.2	Kératite amibienne .....	61
IX.2.3	Atteintes cutanées.....	62
IX.3	Traitement de <i>Balamuthia mandrillaris</i> .....	62
IX.4	Traitement d' <i>Hartmannella vermiformis</i> .....	62
IX.4.1	Traitement de la kératite amibienne.....	62
IX.4.2	Traitement de la légionellose .....	63

## DEUXIEME PARTIE : PRESENCE DES AMIBES DANS LES EAUX DE LOISIRS ET RESISTANCE AUX DESINFECTIONS

I.	Présence des amibes dans les eaux.....	65
I.1	Les eaux environnementales .....	65
I.2	Les eaux de réseaux et de piscines .....	65
I.3	Les eaux usées.....	66
I.4	Les eaux industrielles .....	66
II.	Désinfection des eaux.....	67
II.1	L'eau potable.....	67
II.1.1	L'eau potable : les normes .....	67
II.1.2	Le cycle de l'eau de consommation .....	67
II.1.3	Les procédés classiques de traitement des eaux.....	68
II.1.3.1	L'oxydation.....	68
II.1.3.2	La clarification .....	68
II.1.3.3	La désinfection.....	69
II.1.3.4	Traitements supplémentaires .....	69
II.1.3.5	La filtration .....	69
II.2	Les eaux de baignades.....	71
II.2.1	Contrôle de la qualité des eaux de baignades.....	71
II.2.1.1	Organisation du contrôle.....	71
II.2.1.2	Critères d'évaluation de la qualité de l'eau.....	71
II.2.2	Les différentes eaux de baignades.....	71
II.2.2.1	Baignades naturelles .....	71
II.2.2.2	Baignades artificielles .....	72
II.2.2.3	Eaux de piscines.....	73
II.2.2.3.1	Evaluation des produits et procédés de traitement des eaux de piscines	73
II.2.2.3.2	Evaluation des risques sanitaires liés aux piscines .....	73
II.2.2.4	Les eaux thermales.....	74
III.	Procédés de désinfection des eaux .....	75
III.1	Chlore.....	75
III.2	Brome.....	75
III.3	Baquacil® .....	76
III.4	Ozone .....	76

III.5	Rayonnements ultraviolets .....	77
III.6	Comparaison des cinétique d'action des différents traitements .....	78
III.7	Autres procédés de désinfections .....	79
III.7.1	Température .....	79
III.7.2	Calcium .....	79
III.7.3	Présence de bactéries.....	79
IV.	Résistance des amibes face aux différents procédés de désinfection des eaux .....	79
IV.1	Facteurs influençant la croissance et la prédation des amibes libres .....	80
IV.1.1	Influence de la température .....	80
IV.1.2	Influence de la présence de proie et de nutriments .....	81
IV.1.3	Relation entre les différents facteurs .....	82
IV.1.4	Influence des métaux lourds : effet inhibiteur du cuivre.....	82
IV.2	Interaction des amibes libres avec des micro-organismes .....	82
V.	Indicateurs de qualité des eaux et technique de détection des amibes en rivière.....	83
V.1	Les indicateurs de contamination des eaux de loisirs .....	83
V.1.1	Indicateurs de contamination des baignades en eaux libres.....	83
V.1.2	Indicateurs de contamination des baignades en eaux superficielles .....	84
V.1.3	Indicateurs de contamination des piscines .....	85
V.1.4	Indicateurs de contamination des eaux thermales .....	86
V.2	Les techniques de détection des amibes libres .....	86
V.2.1	Isolement de l'amibe de l'environnement .....	87
V.2.1.1	Choix des points de prélèvement .....	87
V.2.1.2	Fréquence d'échantillonnage .....	87
V.2.1.3	Volume des échantillons .....	87
V.2.1.4	Filtration et centrifugation .....	88
V.2.1.5	Mise en culture – Incubation.....	89
V.2.2	Dénombrement des amibes libres .....	89
V.2.3	Identification des amibes libres.....	89
V.2.3.1	Identification morphologique des amibes libres .....	90
V.2.3.2	Identification par méthodes immunologiques.....	90
V.2.3.2.1	Méthode immuno-enzymatique ELISA (« Enzyme-linked Immunosorbent Assay ») .....	90
V.2.3.2.1.1	Principe .....	90
V.2.3.2.1.2	Application .....	91

V.2.3.2.2	Méthode d'immunofluorescence couplé à la cytométrie en phase solide .	91
V.2.3.3	Identification par méthodes biochimiques .....	91
V.2.3.4	Identification par analyse moléculaire des amibes libres.....	92
V.2.3.4.1	Extraction de l'ADN des amibes libres .....	92
V.2.3.4.2	Choix des amorces et méthode PCR.....	92
V.2.3.4.3	La PCR multiplex .....	94
CONCLUSION	.....	96
WEBOGRAPHIE	.....	99
BIBLIOGRAPHIE	.....	102
ANNEXES	.....	113



# LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Les différents génotypes d' <i>Acanthamoeba</i> et leurs pathologies associées (KHAN, 2006).....	35
Tableau 2 : Pouvoir amoebicide du dioxyde de chlore (ClO <sub>2</sub> ), de l'ozone et du Deciquam 222 <sup>®</sup> (CURSON, et al., 1980). ....	78
Tableau 3: Valeurs seuils et classes de qualité pour l'eau douce dans la directive 2006/7/CE. ....	84
Tableau 4 : Valeurs seuils et classes de qualité pour l'eau de mer dans la directive 2006/7/CE. ....	84
Tableau 5 : Paramètres microbiologiques indicateurs de la contamination fécale des eaux de baignade et seuils de gestion (décret n°2008-990 du 18 septembre 2008). ....	85
Tableau 6 : Normes de qualité microbiologique de l'eau minérale naturelle (Arrêté du 19 juin 2000, 2000).....	86
Tableau 7 : Amorces utilisées dans l'étude de Le Clavez <i>et al</i> (2012).....	94
Tableau 8: Amorces utilisées par QVARNSTROM <i>et al</i> (2006).....	95

# LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure de l'amibe (COULON, 2011).	22
Figure 2 : Filament d'actine des amibes (CHEVRIER).	23
Figure 3 : Lobopodes du genre <i>Entamoeba</i> (BIODEUG).	29
Figure 4 : Image par microscopie électronique à balayage des acanthopodes d' <i>Acanthamoeba polyphaga</i> (OMANA-MOLINA, et al., 2004).	30
Figure 5 : Cycle biologique complet de <i>Naegleria fowleri</i> (JOHN, et al., 2013).	31
Figure 6 : Trophozoïte amiboïde de <i>Naegleria fowleri</i> (CDC).	32
Figure 7 : Trophozoïte flagellé de <i>Naegleria fowleri</i> (CDC).	32
Figure 8 : Kyste de <i>Naegleria fowleri</i> (CDC).	33
Figure 9 : Trophozoïte d' <i>Acanthamoeba</i> (CDC).	34
Figure 10 : Kyste d' <i>Acanthamoeba</i> (CDC).	34
Figure 11 : Trophozoïte de <i>Balamuthia mandrillaris</i> (CDC).	36
Figure 12 : Kystes de <i>Balamuthia mandrillaris</i> (CDC).	37
Figure 13 : <i>Hartmannella vermiformis</i> . 1 et 2. : Forme trophozoïte. 3, 4 et 5. : Forme kystique (SMIRNOV, et al., 1999).	38
Figure 14 : Cycle de vie de <i>Naegleria fowleri</i> (CDC).	41
Figure 15 : Méningo-encéphalite causée par <i>Naegleria fowleri</i> . (A) Les leptoméninges entre le cervelet et les cortex occipital sont épaissies, jaunes et d'apparence granuleuse. (B) Une zone brune de malacie est observée dans le lobe paramédian du cortex cérébelleux (PIMENTEL, et al., 2012).	42
Figure 16 : Cycle de vie d' <i>Acanthamoeba spp.</i> (CDC).	44
Figure 17 : Coupe frontale des hémisphères cérébraux avec des nécroses corticales et sous-corticales d'un cas mortel d'encéphalite amibienne granulomateuse (MARCIANO-CABRAL, et al., 2003).	45
Figure 18 : Infection de l'œil par <i>Acanthamoeba</i> . L'épithélium est ulcéré et l'infiltration stromale montre une opacité de la cornée lors d'une kératite aigüe à <i>Acanthamoeba</i> (KHAN, 2006).	47
Figure 19 : Cycle de vie de <i>Balamuthia mandrillaris</i> (CDC).	49
Figure 20 : IRM du cerveau d'un patient atteint d'une méningo-encéphalite liée à <i>Balamuthia mandrillaris</i> . L'image montre une large région atteinte dans le lobe pariéto-occipital gauche et plusieurs petites lésions rondes dispersées à travers le lobe occipital droit et les ganglions basaux bilatérales (DENNEY, et al., 1997).	50
Figure 21 : Cellule d' <i>Hartmannella vermiformis</i> infectée par <i>Legionella pneumophila</i> , 12 h après l'infection (grossissement×3400) (ABU KWAİK, et al., 1998).	51
Figure 22 : Zone de nécrose contenant de nombreux trophozoïtes de <i>Naegleria fowleri</i> (flèches), des macrophages spumeux périphériques (encadré) et des neutrophiles. Coloration à l'HES (hématoxyline et éosine-safran) (PIMENTEL, et al., 2012).	52

Figure 23 : Coloration à l'HES de tissus cérébraux provenant d'un patient atteint d'encéphalite amibienne granulomateuse. De nombreux trophozoïtes (flèches) peuvent être identifiés à l'intérieur des parois vasculaires (MARCIANO-CABRAL, et al., 2003).....	55
Figure 24 : Coloration à l'HES mettant en évidence un regroupement péri-vasculaire de trophozoïte de <i>Balamuthia mandrillaris</i> (flèche) chez un patient de 32 ans atteint d'encéphalite amibienne granulomateuse (HEALY, 2002). .....	58
Figure 25 : Image au microscope optique de kystes d' <i>Hartmannella vermiformis</i> provenant d'une culture, sur milieu agar non nutritif, d'un prélèvement des lentilles de contact d'une patiente de 22 ans atteinte de kératite amibienne (×400) (ABEDKHOJASTEH, et al., 2013). .....	59
Figure 26 : Cycle de l'eau potable (BEHETS, <i>et al.</i> , 2007). .....	68
Figure 27 : Ultrafiltration de l'eau brute (AQUASOURCE, 2011).....	70
Figure 28 : Exemple d'équipement de désinfection par rayonnements ultraviolets (USEPA, 2006).....	77
Figure 29 : Pot pour Neti Nasaflo <sup>®</sup> (NEILMED , 2000).....	114
Figure 30 : Sens et ligne de stimulation du réflexe cutané plantaire (IZEOS, 2013).....	116
Figure 31 : Babinski négatif (Réponse normale en flexion) (IZEOS, 2013). .....	117
Figure 32 : Babinski positif (Réponse anormale en extension) (IZEOS, 2013). .....	117

# LISTE DES ABREVIATIONS

<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ANSES</b>	Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail
<b>ARS</b>	Agence Régionale de la Santé
<b>CSHPF</b>	Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France
<b>CSP</b>	Code de la Santé Publique
<b>DGS</b>	Direction Général de la Santé
<b>EMN</b>	Eau Minérale Naturelle
<b>HES</b>	Hématoxyline et Eosine-Safran
<b>IF</b>	Immunofluorescence
<b>IRM</b>	Imagerie par Résonance Magnétique
<b>LCR</b>	Liquide Céphalo-Rachidien
<b>MGG</b>	May-Grünwald-Giemsa
<b>PAS</b>	Periodic Acid Schiff
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>ppm</b>	partie par million

# INTRODUCTION

L'environnement renferme une multitude de protozoaires parmi lesquels se trouvent les amibes libres, ainsi nommées parce qu'elles sont capables de vivre de manière autonome dans l'environnement, contrairement aux amibes parasitaires qui nécessite la présence d'un hôte.

La prise de conscience de la nocivité de certaines amibes libres tient à la survenue de pathologie très rares mais aux conséquences souvent dramatiques. A ce jour, parmi la multitude d'espèces existantes, seules quatre espèces amibiennes sont responsables de pathologies humaines : *Naegleria fowleri*, responsable de méningo-encéphalites amibiennes primitives ; *Acanthamoeba*, responsable d'encéphalites amibiennes granulomateuses et de kératites amibiennes ; *Balamuthia mandrillaris* et *Hartmannella vermiformis*, également responsables d'encéphalites et de kératites mais aussi de transmissions de pathologies bactériennes. Un seuil réglementaire est actuellement fixé par le Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France (avis du 4 mai 2004) et limite à 100 *Naegleria fowleri* par litre d'eau de rejet en aval des centrales thermiques le nombre d'amibes. Cependant, aucune norme n'est actuellement donnée pour les trois autres espèces pathogènes ni pour la présence d'amibes dans d'autres zones de baignades.

Quel est l'ampleur du risque sanitaire lié aux amibes libres dans les eaux de baignades, comment l'évaluer et quelles mesures sont prises pour limiter ce risque ?

La première partie de cette thèse correspond à une description des amibes libres pathogènes et de leurs pathologies associées puis, l'évaluation des risques pour la santé publique sera décrite dans la seconde partie au travers des risques de présence des amibes dans l'eau, des procédés de désinfection des eaux de loisirs et des techniques de détection des amibes dans l'eau environnementale.

# LES AMIBES LIBRES

## I. Présentation générale :

Les amibes libres sont des protozoaires, des êtres vivants unicellulaires, eucaryotes, hétérotrophes qui se multiplient de manière asexuée, par fission binaire (ou bipartition) : la division du noyau est immédiatement suivie par la division de la cellule.

Ces protozoaires sont très mobiles et se déplacent par l'émission de pseudopodes, constitués par une déformation de la membrane cytoplasmique. Le mouvement caractéristique produit par les pseudopodes est appelé mouvement amiboïde. Il est rendu possible par la présence de deux types de cytoplasme: l'ectoplasme qui a la texture d'un gel, et l'endoplasme granulaire qui lui est plus fluide. L'ectoplasme, retrouvé en périphérie, agit un peu à la manière d'un boyau d'où jaillit l'endoplasme vers l'extrémité du pseudopode naissant. Rendu à la périphérie, l'endoplasme change d'état et se transforme en gel. L'ectoplasme dans la partie arrière de l'amibe reprend l'état fluide et se transforme en endoplasme pour alimenter le mouvement (Figure 1).

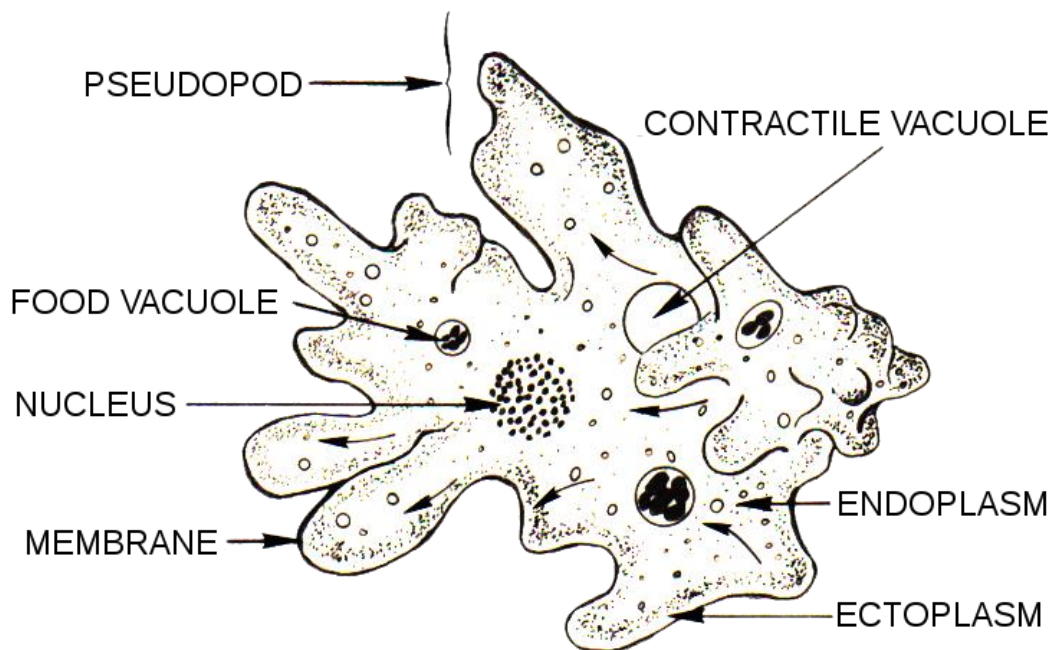


Figure 1 : Structure de l'amibe (COULON, 2011).

### I.1 Cytosol

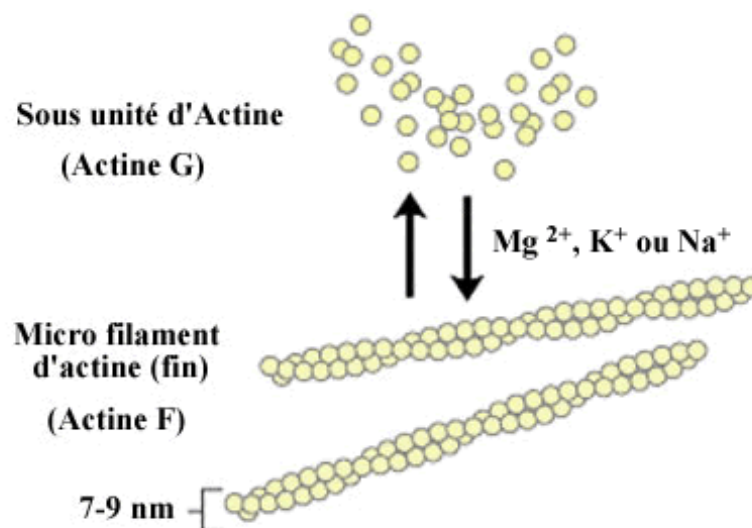
Le cytosol est un élément amorphe (sans structure) mais très concentré (20% de protéines et 70% d'eau) dans lequel baignent des inclusions cytoplasmiques diverses. Il occupe tout l'espace entre le noyau et la membrane externe. Il contient des systèmes enzymatiques importants pour la vie de la cellule, entre autres les enzymes de la chaîne glycolytique et ses systèmes biosynthétiques (GENTILINI, 1995).



## I.2 Système cytomembranaire

Le système cytomembranaire est un ensemble constitué par la membrane plasmique (paroi externe de la cellule) et ses invaginations endocytaires qui forment un réseau de membranes à l'intérieur de la cellule et la divisent en compartiments spécialisés. La structure adoptée permet aux membranes les deux actions opposées de fusion et de fission qui sont à la base de leur fonctionnalité : une membrane peut à tout moment s'ouvrir (vacuole alimentaire, lysosome : vacuoles contenant des enzymes permettant la digestion de particules ingérées) ou au contraire fusionner avec une autre partie et se fermer (division cellulaire, formation de vésicule d'endocytose) (GENTILINI, 1995).

Les membranes doivent remplir de multiples fonctions et les différences résident dans l'abondance de telle ou telle protéine. La membrane plasmique est un organe frontière ; elle est équipée de transporteurs, de pompes, de canaux, de vannes ; elle est souvent renforcée, sous-tendue par un cytosquelette composé de trois types de fibres : les microfilaments composés d'actine (Figure 2) et permettant les mouvements de la cellule, les microtubules et les filaments intermédiaires.



**Figure 2 : Filament d'actine des amibes (CHEVRIER).**

Les membranes internes sont des organites frontières spécialisés. Elles sont chargées, par exemple, de la fonction de triage entre la capture endocytaire (pinocytose) et la digestion lysosomiale (fusion avec un lysosome).

La membrane plasmique, semi-perméable, permet le passage passif de petites molécules par les mécanismes osmotiques et activement par un système de « pompe », d'endocytose, de phagocytose ou de pinocytose.

Les antigènes de surface recouvrent la membrane externe et sont constitués de protéines complexes telles que les glycoprotéines qui ont une importance particulière chez les protozoaires parasites car ce sont elles qui vont induire la réponse immunitaire chez l'hôte. Les premiers anticorps fabriqués par l'organisme envahi sont en effet dirigés spécifiquement contre ces protéines garnissant la membrane. L'action de ces anticorps a pour résultat la lyse des parasites par destruction de leur paroi.

Les protozoaires résistent très mal à la présence d'oxygène, à un excès d'ions  $\text{Ca}^{++}$  ou  $\text{Mg}^{++}$ , aux changements de tonicité, à la dessiccation ou encore aux agents détergents. Certains sont donc capables de modifier leur membrane externe, de l'épaissir, au cours d'un processus d'enkystement.

### **I.3 Enkystement**

L'enkystement est un processus permettant la mise au repos de la forme mobile, la protection de l'amibe devant des conditions défavorables ainsi que l'accomplissement d'un cycle biologique après une série de divisions successives (scissiparité) et constitue donc une nécessité pour les amibes.

Lors du processus d'enkystement, trois phases se succèdent :

- Immobilisation de la forme mobile (trophozoïte) et épuration par expulsion de divers organites (mitochondries) de particules phagocytées et non digérées et de divers produits métaboliques.
- Déshydratation
- Sécrétion d'une enveloppe kystique à 3 strates (l'externe étant la plus épaisse) celluloso-phosphoprotéique.

La paroi kystique, rigide, a une constitution très variable. En général, elle est formée de différentes couches, l'interne étant cellulosique ou composée de chitine et l'externe phosphoprotéique, dure et chargée sur sa surface externe de mucopolysaccharides. Cette paroi contient chez les amibes 33% de protéines et permet au parasite qui l'a sécrétée, de survivre dans un milieu hostile (antiseptiques, dessiccation) pendant des périodes plus longues.

Les échanges entre la cellule et l'extérieur sont interrompus pendant la durée du stade kystique et le métabolisme est arrêté (GENTILINI, 1995). Le kyste ainsi formé est une forme de résistance dans le milieu extérieur et représente alors l'élément majeur de contamination.

### **I.4 Principaux organites intra-cytoplasmiques**

#### **I.4.1 Noyau**

Unique le plus souvent, il est parfois multiple lorsque l'amibe est sous forme kystique. L'ADN est condensé sous forme de granulations de chromatine (en général en périphérie) et d'un ou de plusieurs caryosomes centraux. La disposition et la morphologie de ces éléments sont utilisées comme critères taxonomiques en particulier pour les amibes (MOULINIER, 2003).

#### **I.4.2 Appareil de Golgi**

L'appareil de Golgi est constitué de sacs aplatis et empilés les uns sur les autres, les « dictyosomes ». Il participe aux régulations de l'activité biologique des protozoaires (constitution de membranes, sécrétions, synthèse protéique, mouvements cytoplasmiques, drainage d'éléments du cytosol vers l'extérieur).

#### **I.4.3 Vacuoles digestives**

Les vacuoles digestives sont formées de manières transitoires au moment où s'effectue la digestion. Les matériaux qui la composent seront recyclés ou éliminés. Les produits de catabolisme sont rejetés à l'extérieur par un mécanisme d'exocytose.

#### **I.4.4 Vésicules pulsatiles**

Les vésicules pulsatiles ont un rôle d'excréteur et d'osmo-régulateur. Elles sont dotées d'un canal excréteur relié à un pore et sont situées à proximité de la membrane cytoplasmique. Deux phases sont observées : la diastole, c'est-à-dire le remplissage de la vésicule, puis la systole au moment de l'évacuation du contenu vers l'extérieur. La systole est une phase où la vésicule va subir une série de nombreuses et rapides contractions.

### **I.5 Biologie**

#### **I.5.1 Respiration et circulation :**

Les Protozoaires sont, pour la plupart, aérobies et ne disposent d'aucun organe spécialisé pour la respiration : il y a diffusion d'O<sub>2</sub> à travers la membrane plasmique semi-perméable. Ils ne peuvent donc pas coloniser les milieux terrestres à moins que l'air soit continuellement saturé d'humidité.

Les Protozoaires, comme tous les organismes aquatiques, font face à des problèmes lorsque la température de l'eau est élevée. En effet, les besoins d'oxygène augmentent avec un accroissement de la température. Cependant, la solubilité de l'oxygène dans l'eau diminue lorsque la température augmente. Les hautes températures sont donc défavorables à leur survie. Les amibes libres, quant à elles, ont la particularité de résister à ces hautes températures.

La circulation de l'oxygène est assurée par les courants cytoplasmiques, le transport étant favorisé par les déformations de la cellule. Le déplacement permet un certain renouvellement de l'eau au contact de la pellicule externe. Ce renouvellement, couplé aux mouvements du cytoplasme à l'intérieur de la cellule, permet de maintenir un gradient de concentration en oxygène de chaque côté de la membrane, et donc de faciliter l'entrée d'oxygène par diffusion (MENTION, 2007).

#### **I.5.2 Nutrition**

Les amibes se nourrissent de deux façons :

- La phagocytose permet à l'amibe d'ingérer des particules. Pour cela, les pseudopodes vont servir à capturer la proie qui va être ensuite ingérée à n'importe quel point du corps. Une substance toxique est ensuite libérée pour immobiliser la proie et une vacuole digestive est formée.

- La pinocytose, quant à elle, permet aux amibes d'ingérer des liquides ou des éléments nutritifs dissous.

Les amibes libres peuvent vivre de manière autonome en se nourrissant de bactéries, d'algues, de champignons ou d'autres protistes. Elles hébergent des bactéries endosymbiontes, dont certaines sont pathogènes tel que *Mycobacterium avium*, *Escherichia coli* 0157 :H7, *Vibrio cholere*, *Legionella spp.* Ces bactéries peuvent survivre et se multiplier dans les amibes, qui les protègent de l'environnement et leur confèrent une résistance accrue aux antibiotiques et aux antiseptiques (YERA, et al., 2012).

### **I.5.3 Osmorégulation et excrétion**

L'osmorégulation est une fonction vitale pour les organismes dépourvus de paroi cellulaire rigide. La plupart des Protozoaires des eaux douces sont hyper osmotiques (c'est-à-dire que la concentration en ions et en solutés est plus grande par rapport à l'environnement) et donc ils accumulent de l'eau par osmose dans leur cytoplasme.

Cette eau doit être expulsée pour éviter la lyse de la cellule, c'est le rôle de la vacuole pulsatile qui va rejeter l'eau mais également les déchets vers l'extérieur. Lorsque l'osmolarité du milieu extérieur augmente, l'eau n'entre plus dans la cellule et la fréquence des contractions vacuolaires diminue (MENTION, 2007). Les amibes éliminent leurs déchets azotés sous forme d'ammoniac par diffusion. Celle-ci est facilitée par les mouvements internes du cytoplasme.

Les amibes libres sont amphizoïdes, c'est-à-dire qu'elles peuvent vivre libres dans la nature ou chez un être humain ou un animal. Par opposition aux parasites, les amibes libres peuvent vivre la totalité de leur cycle biologique dans l'environnement.

Parmi les nombreuses espèces d'amibes libres, seules quelques-unes sont responsables d'infections sévères : *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris*, plusieurs espèces d'*Acanthamoeba* et *Hartmannella vermiformis*.

## **II. Classification**

Leurs mouvements amiboïdes impliquent que les amibes ne possèdent pas de forme cellulaire stable. Par conséquent, les caractéristiques morphologiques distinctives sont très limitées et l'identification et la classification des amibes sur des critères morphologiques est hasardeuse.

Depuis les premières études des amibes, différentes classifications ont été proposées (BOLIVAR, 2001); (SMIRNOV, 2005). SCHAEFFER (1926), cités dans (BOUYER, 2008), suggère une classification basée sur la morphologie en microscopie optique. Plus tard, certains auteurs évoquent une classification basée sur la division nucléaire (SINGH (1952) et CHATTON (1953), cités dans BOUYER, 2008) mais ces différentes propositions se sont révélées inadéquates. Par la suite, JAHN et BOVEE (1965), cités dans (BOUYER, 2008), créent un système basé sur les mouvements du cytoplasme, système rapidement limité dans la distinction des espèces. L'augmentation du nombre d'espèces difficiles à reconnaître a par la suite amplifié le besoin de clarifier les critères d'identification et de créer une classification

appropriée. Dans les années 80, l'évolution de la microscopie et l'apparition de la microscopie électronique en pratique courante ont permis la découverte de caractéristiques ultrastructurales spécifiques chez de nombreuses amibes. Une nouvelle description d'amibes déjà décrites ainsi qu'une description de nouvelles espèces d'amibes fut alors possible. Puis, une taxonomie combinant des caractéristiques ultrastructurales et des caractéristiques biologiques et physiologiques fut développée par PAGE (1987).

Cette classification est depuis régulièrement révisée, grâce aux données de la biologie moléculaire. En 2005, un consortium de 28 biologistes a publié un article de synthèse sur la nouvelle classification des Eucaryotes. ADL *et al* (2005) ont présenté une hiérarchie simplifiée pour chaque rang, sans titre formel, souhaitant ainsi affranchir leur classification des anciens systèmes hiérarchiques assez contraignants avec deux grands phyla dans le sous-règne des Sarcomastigota, les Amoebozoa dont *Hartmannella vermiformis*, *Acanthamoeba spp.* et *Balamuthia mandrillaris* font parties et les Excavata comprenant *Naegleria fowleri* :

Super-règne : EUKARYOTA

Règne : PROTOZOA

Sous-règne : SARCOMASTIGOTA

- Phylum : AMOEBOZOA
  - o TUBULINEA
    - TUBULINIDA
      - Genre HARTMANNELLA
        - o Espèce : *Hartmannella vermiformis*
    - o ACANTHAMOEBIDAE
      - Genre ACANTHAMOEBEA
        - o Espèces : *Acanthamoeba astronyxis*, *A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. lenticulata*, *A. mauritaniensis*, *A. polyphaga*...
      - Genre BALAMUTHIA
        - o Espèce : *Balamuthia mandrillaris*
    - o EUMYCETOZOA
      - DICTYOSTELIA
        - Genre DICTYOSTELIUM
          - o Espèce : *Dictyostelium dendriticum*
- Phylum : EXCAVATA
  - o HETEROLOBOSEA
    - VAHLKAMPFIIDAE
      - Genre NAEGLERIA
        - o Espèces : *Naegleria andersoni*, *N. australiensis*, *N. chilensis*, *N. fowleri*, *N. gruberi*, *N. indonesiensis*, *N. jadini*, *N. lovaniensis*...
      - Genre VAHLKAMPFIA
        - o Espèces : *Vahlkampfia avara*, *V. inornata*, *V. lobospinosa*.

La distinction de deux phyla séparant *Naegleria fowleri* des trois autres amibes permet de mieux comprendre les différences de caractéristiques morphologiques, épidémiologiques et pathogéniques de ces protozoaires que nous développerons par la suite.

### III. Ecologie des amibes libres

Les amibes libres sont retrouvées en milieu humide, dans le sol, les eaux (les lacs, les eaux stagnantes, les eaux de baignades, les canaux d'irrigation, les rivières, les eaux de refroidissement de réacteurs, l'eau des réseaux d'adduction, les eaux de table embouteillées, etc...) ainsi que l'air et sur n'importe quelle muqueuse humide de sécrétions.

#### III.1 Ecologie de *Naegleria fowleri*

*Naegleria fowleri* est présente sur toute la planète, dans les eaux douces des pays tropicaux à tempérés. Une température relativement élevée (supérieure à 20°C minimum) accompagnée d'une source de nourriture suffisante (matières organiques ou bactéries) et de faibles populations de prédateurs ou compétiteurs favorise la multiplication de *Naegleria fowleri*.

La forme trophozoïte de *Naegleria fowleri* a la particularité d'être thermo-tolérante, supportant des températures allant jusqu'à 50°C. La température optimale est de 37°C, ce qui explique qu'elle se développe dans les eaux chaudes et riches en bactéries du type *Escherichia coli* tel que les lacs et les rivières, surtout en été, les canaux d'irrigation, les eaux de refroidissement industrielles ainsi que les piscines dont l'eau est insuffisamment voire non traitée. *Naegleria fowleri* a également été retrouvé dans les narines ou la gorge de sujets asymptomatiques (YERA, *et al.*, 2012).

*Naegleria fowleri* ne tolèrent pas une salinité supérieure à 5g/l, ni une dessiccation de plus de cinq minutes. Cependant, les kystes peuvent survivre 24 heures dans l'eau de mer soit à une salinité de 40 g/l. Il a été montré que *Naegleria fowleri* est capable de supporter une large gamme de pH (2-12).

Les kystes peuvent survivre en environnement anaérobie, ce qui pourrait expliquer la réapparition estivale de *Naegleria fowleri* dans des lacs où l'échantillonnage est négatif en hiver : les kystes hiberneraient dans les sédiments du fond. Par ailleurs, il semble établi que les kystes peuvent être transportés par voie aérienne.

En France, le niveau maximum autorisé est de 100 amibes *Naegleria fowleri* par litre d'eau de rejet en aval des centrales thermiques lorsque le risque d'exposition humaine existe. Le contact avec l'Homme est donc inévitable et le contrôle ainsi que la prévention de ce contact est problématique.

#### III.2 Ecologie d'*Acanthamoeba spp.*

Les *Acanthamoeba* sont moins influencés par la température et leur température optimale est de 21°C. Elles sont ubiquitaires, présentent dans une grande variété d'habitat : les eaux de mer (salinité de 40 g/l), les eaux douces de rivières, les eaux stagnantes, les eaux de baignades, l'eau des réseaux d'adduction, les eaux de table embouteillées, les systèmes de climatisation, les végétaux, le sol et l'air. Elles ont également été retrouvées dans les narines,

la gorge et les selles de sujets asymptomatiques. Il ne semble pas exister de cycle saisonnier pour l'abondance d'*Acanthamoeba* (ETIENNE, *et al.*, 1995). Cependant, DERR-HARF *et al* (1978) observent que la concentration d'*Acanthamoeba* est plus importante à l'entrée qu'à la sortie du bassin, ce qu'ils attribuent à une prolifération au niveau des filtres des piscines (BARD, *et al.*, 1995).

### III.3 Ecologie de *Balamuthia mandrillaris* et d'*Hartmannella vermiformis*

*Balamuthia mandrillaris* et *Hartmannella vermiformis* sont retrouvés à travers le monde au niveau des eaux douces, de la terre (jardins, plantes en pot), des poussières, ce qui représente une source potentielle d'infection pour les êtres humains et les animaux. *Hartmannella vermiformis* est également présente dans de nombreux systèmes d'évacuation d'eau, avec un pic en fin d'été et en automne, dans des eaux à des températures comprises entre 11 et 12,5°C. Elle se trouve le plus fréquemment dans les rivières (36,4%), les lacs (16,7%), les lacs artificiels (20%) et dans les piscines (6,3%). De plus, *Hartmannella vermiformis* est l'amibe qui prédomine dans l'eau du robinet (KUIPER, *et al.*, 2006).

## IV. Morphologie des amibes libres

Les amibes libres sont caractérisées par l'existence de deux états : la forme trophozoïte, forme végétative mobile grâce à des pseudopodes filiformes qui se divise de façon asexuée et qui se nourrit, et l'état de kyste amibien, uninucléé à double paroi qui survient quand le milieu devient défavorable pour l'amibe.

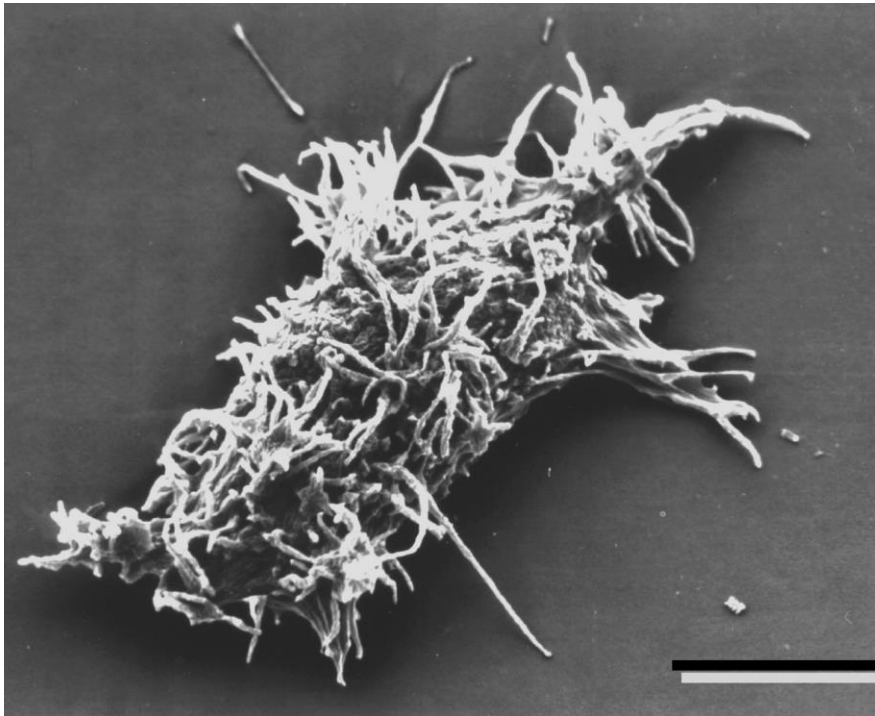
Les amibes, sous la forme trophozoïte, se déplacent par émission de pseudopodes. Ces derniers sont de deux types : les lobopodes ou les filopodes.

- Les lobopodes (Figure 3) sont des pseudopodes volumineux, arrondis, à base large et constitués d'ectoplasme et d'endoplasme. Ils peuvent être formés à partir d'un point quelconque de la membrane cytoplasmique (type polypodial) ou à la partie antérieure de l'amibe, ce qui constitue un seul gros pseudopode ne s'étalant pas latéralement (type monopodial).



Figure 3 : Lobopodes du genre *Entamoeba* (BIODEUG).

- Les filopodes sont des pseudopodes minces en doigt de gant, parfois pointus, constitués d'ectoplasme (Figure 4). C'est le cas d'*Acanthamoeba*.



**Figure 4 : Image par microscopie électronique à balayage des acanthopodes d'*Acanthamoeba polyphaga* (OMANA-MOLINA, et al., 2004).**

Le kyste amibien est une forme quiescente qui ne se nourrit pas, qui est immobile et que l'on retrouve habituellement dans l'eau du robinet. Elle résiste au chlore et aux désinfectants. Ce n'est que lorsque les conditions deviennent à nouveau favorables pour l'amibe (présence de bactéries et d'humidité) que les kystes se transforment en trophozoïtes.

*Naegleria fowleri* est l'amibe libre la plus virulente en étant responsable de la méningo-encéphalite amibienne primitive. *Acanthamoeba* est responsable de kératite de très mauvais pronostic et difficile à traiter en cas de lésions profondes ou de diagnostic tardif. Elle est également la cause, ainsi que *Balamuthia mandrillaris* et *Hartmannella vermiformis*, d'encéphalites granulomateuses d'évolution chronique et d'infections disséminées chez les patients immunodéprimés. (YERA, et al., 2012)



#### IV.1 Morphologie de *Naegleria fowleri*

*Naegleria fowleri* peut être retrouvée sous trois formes au cours de son cycle biologique (Figure 5) :

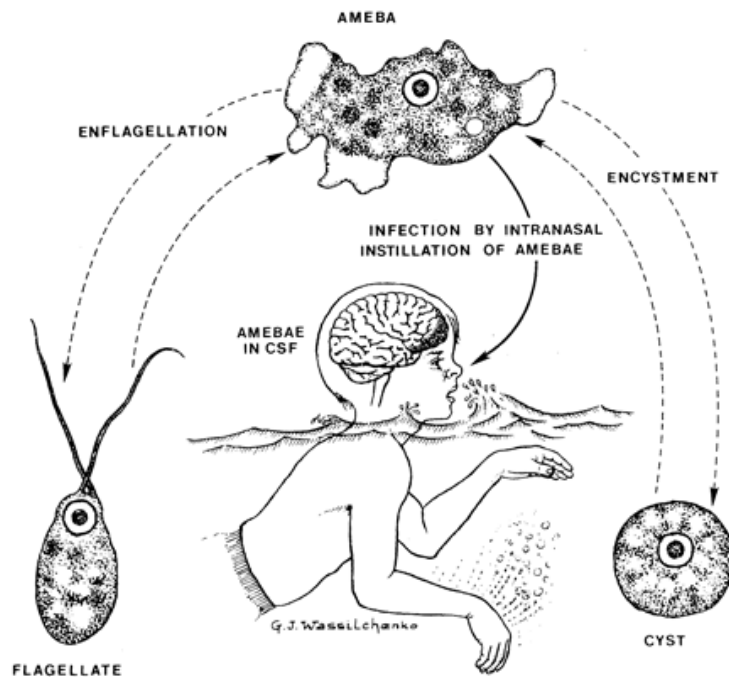
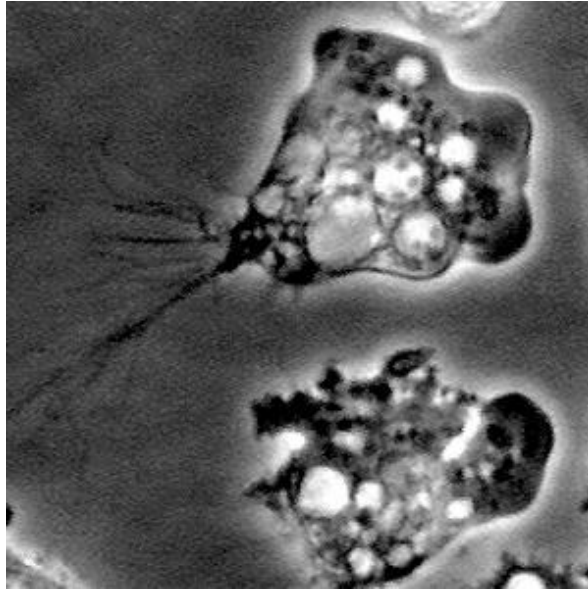


Figure 5 : Cycle biologique complet de *Naegleria fowleri* (JOHN, *et al.*, 2013).

- Le trophoïte amiboïde, de 8 à 30  $\mu\text{m}$  de diamètre, est allongé et plus large en avant qu'en arrière (Figure 6). Cette forme parasitaire a un mouvement directionnel rapide en zigzag qui est dû à la présence de lobopodes formés, alternativement d'un côté puis de l'autre, par son ectoplasme. Sous cette forme, les amibes adhèrent à leur support et participent ainsi à la constitution des biofilms dont ils se nourrissent. On retrouve, au niveau 2/3 antérieur et 1/3 postérieur un noyau unique et arrondi de 5  $\mu\text{m}$  de diamètre. En microscopie optique, avec un condensateur à contraste de phase, on observe un gros caryosome central, entouré d'un halo clair et limité par la membrane nucléaire.



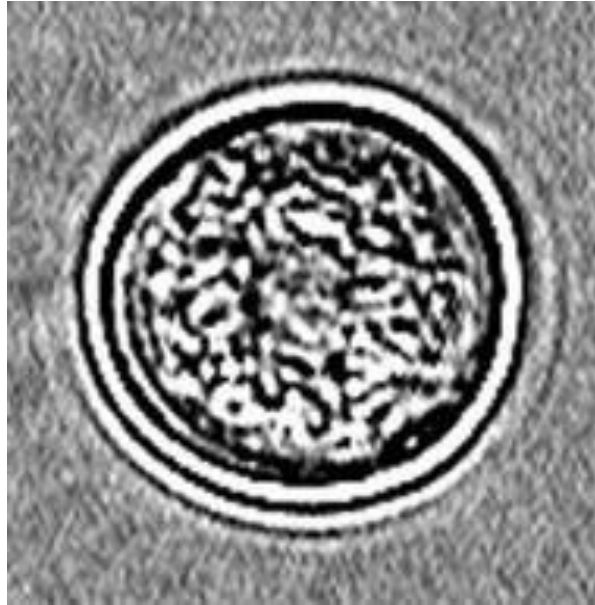
**Figure 6 : Trophozoïte amiboïde de *Naegleria fowleri* (CDC).**

- Le trophozoïte flagellé est la forme libre (transitoire et de dissémination) de *Naegleria fowleri*. L'amibe est ovale, de 7 à 18  $\mu\text{m}$ , présente un noyau unique dans le tiers antérieur et deux à quatre flagelles antérieurs longs et toujours mobiles (Figure 7). La forme flagellée de *Naegleria fowleri* est résistante au milieu extérieur, lorsque celui-ci présente des matières organiques dont les bactéries, et on y observe la multiplication de l'amibe. Le passage à cette forme flagellée, à partir de la forme trophozoïte, se fait très rapidement par un processus complexe impliquant l'apparition *ex novo* du corps basal et des flagelles. Sa disparition, par le même processus, se fait tout aussi rapidement. L'apparition de flagelles lors de la transformation de *Naegleria fowleri* présente une importance primordiale au diagnostic. En laboratoire, l'ajout d'eau distillée dans le milieu permet le passage de la forme trophozoïte amiboïde en trophozoïte flagellé de *Naegleria fowleri* ce qui est propre à cette amibe et en permet le diagnostic.



**Figure 7 : Trophozoïte flagellé de *Naegleria fowleri* (CDC).**

- Le kyste, que l'on observe quand les conditions du milieu extérieur sont défavorables à l'amibe, est la forme de résistance et de dissémination de l'amibe. Uninucléé, de 8 à 20  $\mu\text{m}$ , le kyste est arrondi et présente une double paroi régulière dont l'accolement de l'exine et de l'intine détermine la présence de pores qu'aucun opercule ne vient obturer (Figure 8). Le dékystement s'effectuera donc directement à travers le pore par étirement et striction du trophozoïte quand les conditions du milieu seront à nouveau favorables (température, pH, flore bactérienne) et la forme végétative, trophozoïte, apparaîtra bouclant ainsi le cycle.



**Figure 8 : Kyste de *Naegleria fowleri* (CDC).**

Ces trois formes sont retrouvés dans la nature, les kystes sont résistants à la chaleur (jusqu'à 65°C), au froid (jusqu'à 0°C) et ils sont sensibles à la dessiccation et à une chloration suffisante (concentration en chlore libre résiduel supérieure ou égale à 1mg/L).

#### **IV.2 Morphologie d'*Acanthamoeba* spp.**

Différentes espèces d'*Acanthamoeba* ont été isolées de prélèvements humains. Les plus fréquemment observées sont *A. culbertsoni* et *A. castellani*. Sur une vingtaine d'espèces connues, seules deux formes se présentent chez ces amibes :

- La forme trophozoïte végétatif mesure entre 15 et 25  $\mu\text{m}$ , ses déplacements sont assez lents et se font par la présence de filopodes ou encore acanthopodes (Figure 9).

Le noyau comporte un caryosome central très volumineux. On observe une vacuole pulsatile (qui donne l'impression de « clignotement »). Les trophozoïtes se multiplient par scissiparité et sont retrouvés dans le milieu extérieur, les lésions et en culture.



**Figure 9 : Trophozoïte d'*Acanthamoeba* (CDC).**

- Le forme kystique, polygonale, mesure entre 8 et 12  $\mu\text{m}$ , a un seul noyau et présente une double paroi (Figure 10) :

- une paroi externe de forme plissée, épineuse et épaisse.

- une paroi interne, étoilée, mince adhérente à la paroi externe au niveau « d'ostioles » dont le nombre varie avec l'espèce (7 chez *A. castellani*)



**Figure 10 : Kyste d'*Acanthamoeba* (CDC).**

Le genre *Acanthamoeba* comprend 25 espèces. PUSSARD et PONS (1977) ont proposé une clé de détermination des espèces d'*Acanthamoeba* basée sur le nombre et la répartition des ostioles (point où les deux enveloppes de la membrane plasmotique se raccordent et où démarre le processus d'enkystement) ainsi que l'aspect de l'exine de la paroi kystique :

- **Groupe I** (*A. astronyxis*, *A. comandoni*, *A. echinulata*, et *A. tubiashi*) : les kystes sont de taille supérieure ou égale à 18 µm ; l'endokyste est étoilé et l'ectokyste présente une surface sphérique et lisse.

- **Groupe II** (*A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. rhyodes*, *A. mauritaniensis*, *A. divionensis*, *A. griffini*, *A. lugdunensis*, *A. quina*, *A. hatchetti* et *A. triangularis*) : Les kystes sont de taille inférieure à 18 µm ; l'endokyste est de forme polygonale ou étoilée et l'ectokyste est irrégulier ou ridé.

- **Groupe III** (*A. culbertsoni*, *A. lenticulata*, *A. palestinensis*, *A. pustulosa* et *A. royreba*) : Les kystes, de taille inférieure à 18 µm, présente un endokyste arrondi ou légèrement angulaire et un ectokyste fin et lisse, voire légèrement ridé.

La classification de PUSSARD et PONS (1977) a maintenant été remplacée par les techniques de biologie moléculaire (ARN ribosomal 18S, SSUrRNA) (GAST, 1996) ; (LEDEE, 2003). Ces études moléculaires ont permis d'identifier au moins 15 génotypes d'*Acanthamoeba*, désignés T1, T2,... (Tableau 1) (BOOTON, et al., 2005). Certains de ces génotypes sont depuis connus pour être associés à une pathogénicité plus importante (le génotype T4, *Acanthamoeba castellanii*, en particulier).

**Tableau 1 : Les différents génotypes d'*Acanthamoeba* et leurs pathologies associées (KHAN, 2006)**

Génotypes d' <i>Acanthamoeba</i>	Pathologies associées
T1	Encéphalite granulomateuse
T2a	Kératite
T2b	Aucunes pathologies associées décrites
T3	Kératite
T4	Encéphalite granulomateuse, Kératite
T5	Aucunes pathologies associées décrites
T6	Kératite
T7	Aucunes pathologies associées décrites
T8	Aucunes pathologies associées décrites
T9	Aucunes pathologies associées décrites
T10	Encéphalite granulomateuse
T11	Kératite
T12	Encéphalite granulomateuse
T13	Aucunes pathologies associées décrites
T14	Aucunes pathologies associées décrites
T15	Aucunes pathologies associées décrites

Le kyste est observé dans la nature, si les conditions sont défavorables (températures, pH, salinité, flore bactérienne, particules alimentaires) dans les lésions et en culture.

L'enkystement est réversible, et selon les conditions de milieu, les kystes, après lyse des deux parois, redonnent des formes végétatives (MOULINIER, 2003).

### IV.3 Morphologie de *Balamuthia mandrillaris*

Les *Balamuthia* présente un cycle à deux stades :

- Le trophozoïte : qui se caractérise par une forme très irrégulière de 15 à 60  $\mu\text{m}$ , rarement par une forme allongée, de 60 à 12  $\mu\text{m}$  de long sur 15 à 20  $\mu\text{m}$  de large (Figure 11). Le noyau est rond et présente un large nucléole dense et coloré. Ce noyau est le plus souvent simple, parfois double et dans certains cas, il peut contenir plusieurs nucléoles, une caractéristique qui permet de distinguer *Balamuthia* d'*Acanthamoeba* dans les tissus. Le cytoplasme est abondant et les vacuoles contractiles sont nombreuses.

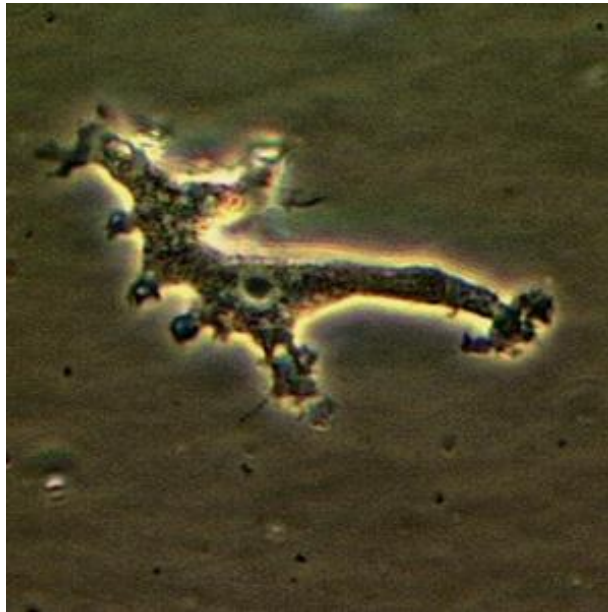
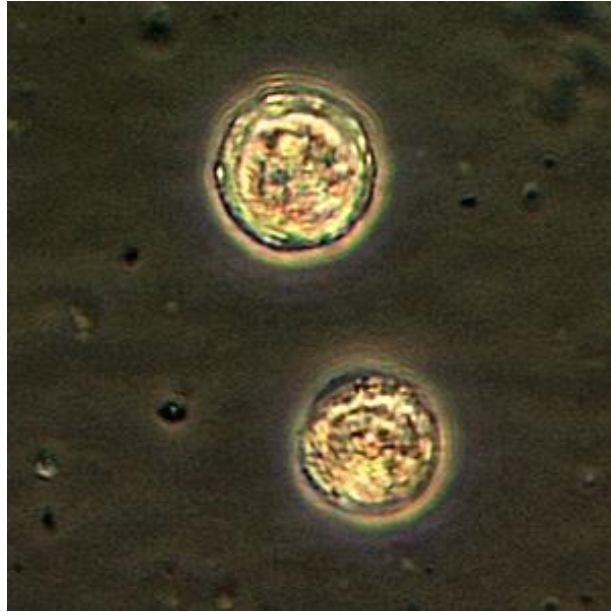


Figure 11 : Trophozoïte de *Balamuthia mandrillaris* (CDC).

- Le kyste, de 6 à 30  $\mu\text{m}$  de diamètre (Figure 12), est grossièrement arrondi et présente une triple paroi, dont l'externe (ectocyste) est mince et irrégulière, celle du milieu appelée également mésocyste est fibrillaire, et la paroi interne, l'endocyste, est quant à elle épaisse (MATIN, et al., 2008).

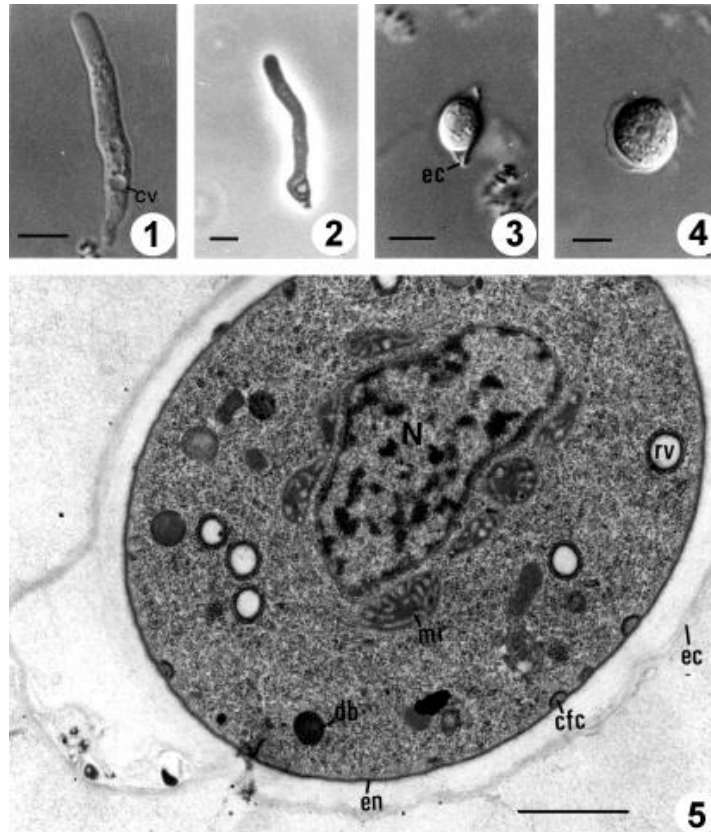


**Figure 12 : Kystes de *Balamuthia mandrillaris* (CDC).**

A l'inverse des espèces précédentes, les *Balamuthia* sont incapables de croître à des températures modérées (30 à 37°C), à pH neutre et sur gélose monoxénique à 2% à 37°C (en présence d'une proie) ; elles poussent sur cultures cellulaires en quelques semaines (MATIN, et al., 2008).

#### ***IV.4 Morphologie d'Hartmannella vermiformis***

*Hartmannella vermiformis* présente un cycle à deux stades : le trophozoïte et le kyste, la forme de résistance. La forme trophozoïte d'*Hartmannella vermiformis* est très caractéristique et l'identification de l'espèce ne semble pas poser de problème. Cependant, la forme kystique de cette espèce varie d'une souche à l'autre (Figure 13). En effet, le kyste présente une double paroi mais l'ectokyste et l'endokyste peuvent fusionner chez certaines souches (SMIRNOV, et al., 1999). La forme kystique peut survivre aux différents traitements de l'eau, pénétrer les systèmes de distribution et se multiplier dans le biofilm à la surface des tuyaux (HUERRE et PIENS, 1996).



**Figure 13 : *Hartmannella vermiformis*. 1 et 2. : Forme trophozoïte. 3, 4 et 5. : Forme kystique (SMIRNOV, et al., 1999).**

A la différence du genre *Acanthamoeba*, qui présente des filopodes et dont la forme kystique est polygonale, hérissée d'épines ; le genre *Hartmannella* est reconnaissable par des lobopodes et une forme kystique lisse et sphérique (MOULINIER, 2003).

## V. Génome des amibes libres

Le génome des amibes libres, comme tout eucaryote comporte de l'ADN nucléaire linéaire porté par des chromosomes, un ADN circulaire extrachromosomique (l'ADN plasmidique) et un ADN mitochondrial circulaire. L'ADN plasmidique est capable d'autoréplication et porte les gènes ribosomiques, la petite sous-unité (ADNr18S) et la grande (ADNr28S) ainsi que l'ADN 5,8S (DELPECH, *et al.*, 2007).

Cependant, la taille des génomes diffère d'une amibe à l'autre. Pour *Naegleria fowleri*, l'ADN mitochondrial à une longueur de 50 kb et celle de l'ADN plasmidique est de 14 kb. Ces ADN représentent respectivement 15% et 17% de l'ADN totale (ANSES, 2013).



## VI. Epidémiologie

### VI.1 Epidémiologie de *Naegleria fowleri*

Les cas de méningo-encéphalite amibienne primitive ont été décrits partout dans le monde après un passage dans des piscines chauffées, des lacs d'eau douce, des sources d'eau chaude. La baignade dans ces eaux expose les muqueuses respiratoires supérieures directement au contact de l'eau contaminée.

Le nombre de cas reportés augmente chaque année. Cependant, la confirmation de contamination se fait souvent par un examen post-mortem, qui n'est pas effectué de manière systématique (HEGGIE, 2010).

Le premier cas d'infection par *Naegleria fowleri* a été évoqué en 1965 par FOWLER et CARTER, cités dans HEGGIE, 2010, en Australie. Une année plus tard, trois cas mortels ont été reportés en Floride. Dans chaque cas, la contamination par *Naegleria fowleri* s'est faite après une baignade en eau chaude. Depuis ce temps, des recherches ont été faites et *Naegleria fowleri* a été retrouvé dans les piscines, les étangs, les lacs, les ruisseaux, les bains chauds, les eaux thermales polluées et les eaux usées. En Thaïlande et au Japon, l'amibe a été retrouvée dans des zones aquatiques fréquentées par les touristes ; en Italie, dans des zones de baignades le long de certaines rivières ; dans des piscines et des ruisseaux en Belgique et en ancienne Tchécoslovaquie, ainsi qu'en Angleterre et en Nouvelle Zélande ; et dans le sud des Etats-Unis, dans des lacs chauds d'eau douce (HEGGIE, 2010).

Les cas reportés par YODER en 2012, font effet de cas d'infections à *Naegleria fowleri* à la suite d'une utilisation prolongée de pot pour neti (Annexe 1). Il utilisait ces pots pour neti non pas avec de l'eau stérile comme il est dit dans la notice mais en utilisant de l'eau du robinet et un paquet de sel acheté dans un hypermarché.

Certains cas de contamination d'animaux (chevaux, ruminants, carnivores, animaux sauvages) ont été rapportés au Brésil. La porte d'entrée la plus probable serait une contamination par éclaboussures d'eau au niveau de la fosse nasale au moment où les animaux venaient boire dans une source propice à la prolifération de *Naegleria fowleri* (stagnante, chaude) (PIMENTEL, et al., 2012).

L'âge des sujets atteints est entre 8 et 27 ans, ce sont des sujets en parfaite santé et il semblerait que les hommes soient plus touchés que les femmes.

### VI.2 Epidémiologie d'*Acanthamoeba spp.*

Les *Acanthamoeba* sont assez peu thermo-tolérantes et seule *Acanthamoeba culbertsoni* survit à une température de 35°C à 37°C. Pour cette raison, elles sont exceptionnellement responsables d'une pathologie viscérale profonde comme des méningo-encéphalites ou des abcès cérébraux.

La température de la cornée étant située entre 2°C et 24°C, les *Acanthamoeba* provoquent essentiellement des kératites, en particulier chez les porteurs de lentilles de contact, qui

gènèrent des micro-excoriations. La contamination intervient après des bains en eau tiède, chauffée ou en piscine. (MOULINIER, 2003).

Le faible nombre de cas connus de ces affections contraste avec la large distribution des agents étiologiques dans la nature. Le portage rhino-pharyngé a été mis en évidence chez 7 à 50% des petits mammifères. Dans les mares d'eau superficielle, on a compté jusqu'à 46 000 *Acanthamoeba* par millilitre (GENTILINI, 1995).

### **VI.3 Épidémiologie de *Balamuthia mandrillaris***

Cette amibe a été isolée pour la première fois dans le cerveau d'un babouin mandrill enceinte qui est décédé dans un zoo en 1985. *Balamuthia mandrillaris* est actuellement la seule espèce décrite dans le genre. Très rapidement, elle fut reconnue, comme *Acanthamoeba spp.* responsable de l'apparition d'encéphalite granulomateuse amibienne chez l'Homme et l'animal ainsi que d'infections cutanées ou naso-pharyngées.

L'encéphalite amibienne granulomateuse provoquée par *Balamuthia mandrillaris* peut être subaiguë ou chronique, dans les deux cas, l'issue est toujours fatale.

*Balamuthia mandrillaris* atteint préférentiellement des patient immunodéprimés (SIDA, affections chroniques, traitement par immunosuppresseurs, personnes très âgées). Cependant, contrairement à *Acanthamoeba spp.*, elle est également capable de toucher des patients en bonne santé avec un statut immunitaire normal dont les enfants. La virulence de *Balamuthia* paraît donc supérieure à celle d'*Acanthamoeba*.

### **VI.4 Épidémiologie d'*Hartmannella vermiformis***

*Hartmannella vermiformis* présente une importance directe et indirecte pour la santé publique. L'organisme a été isolé à partir du liquide céphalo-rachidien de patients atteints de méningo-encéphalite et de broncho-pneumopathie. Son importance indirecte pour la santé publique est liée à son rôle d'hôte pour *Legionella pneumophila*, l'agent causal de la maladie du légionnaire.

Cette amibe est très répandue dans la nature et a été isolée dans le sol, l'eau douce, l'air et dans les réseaux d'eau potable et d'ingénierie (KUIPER, et al., 2006).

## **VII. Rôle pathogène des amibes libres**

### **VII.1 Pathologie liée à *Naegleria fowleri***

La méningo-encéphalite amibienne primitive est la seule pathologie imputable à *Naegleria fowleri* décrite chez l'Homme. *Naegleria fowleri* est capable de traverser la muqueuse tapissant les fosses nasales et passant de l'autre côté de la lame criblée de l'os ethmoïde, elle se trouve dans la boîte crânienne, au contact du lobe frontal du cerveau. Dans la substance cérébrale, elle se multiplie de manière foudroyante et provoque une fonte nécrotique qui aboutit à un coma et à la mort du patient dans un délai de trente heures à cinq jours après la pénétration des parasites (SIMITZIS LE FLOHIC, 1996).

## VII.1.1 Clinique

### VII.1.1.1 Phase d'invasion

La méningo-encéphalite amibienne primitive atteint préférentiellement des enfants ou des jeunes adultes immunocompétents ayant été exposés à de l'eau contaminée. Le délai d'apparition des premiers symptômes est généralement de cinq à sept jours mais il existe des cas ayant eu temps d'incubation plus rapide, en 24h.

L'inoculation s'effectue à partir du neuroépithélium olfactif et le stade infectant est vraisemblablement le trophozoïte, à défaut le stade flagellé (Figure 14). L'amibe s'avère capable, soit spontanément, soit à la suite de sa phagocytose par certaines cellules de ce neuroépithélium, de cheminer le long des terminaisons nerveuses olfactives, de traverser la lame criblée de l'éthmoïde, et de diffuser largement à l'encéphale à partir des lobes olfactifs (SIMITZIS LE FLOHIC, 1996). La période d'incubation est muette variant de deux à quinze jours selon la taille de l'inoculum et la virulence de l'amibe.

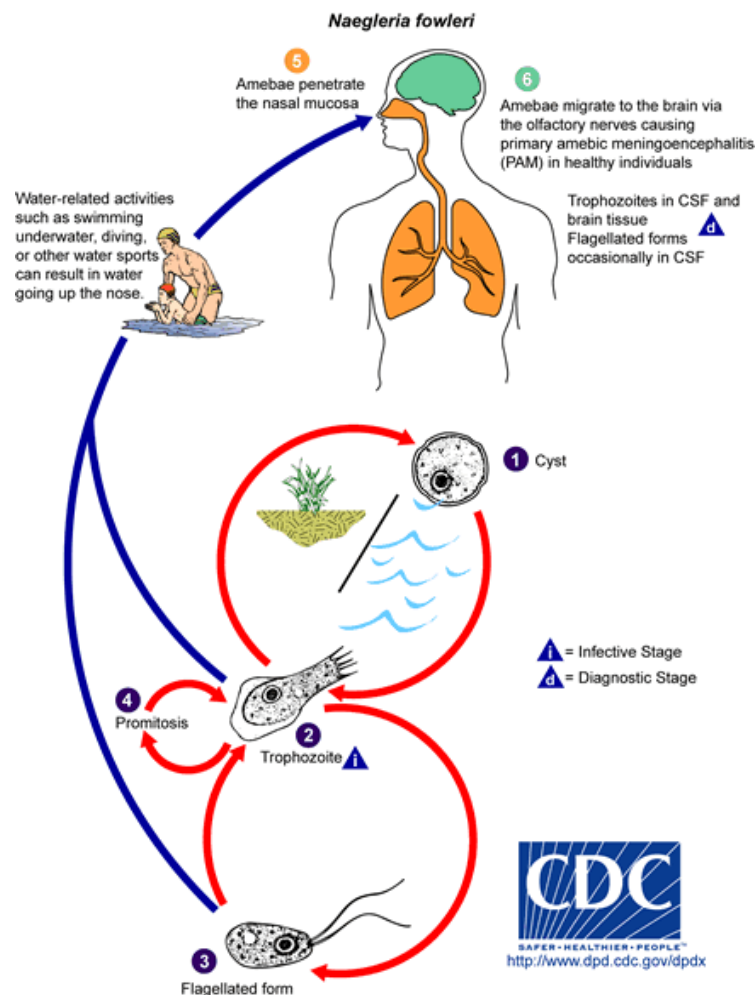


Figure 14 : Cycle de vie de *Naegleria fowleri* (CDC).

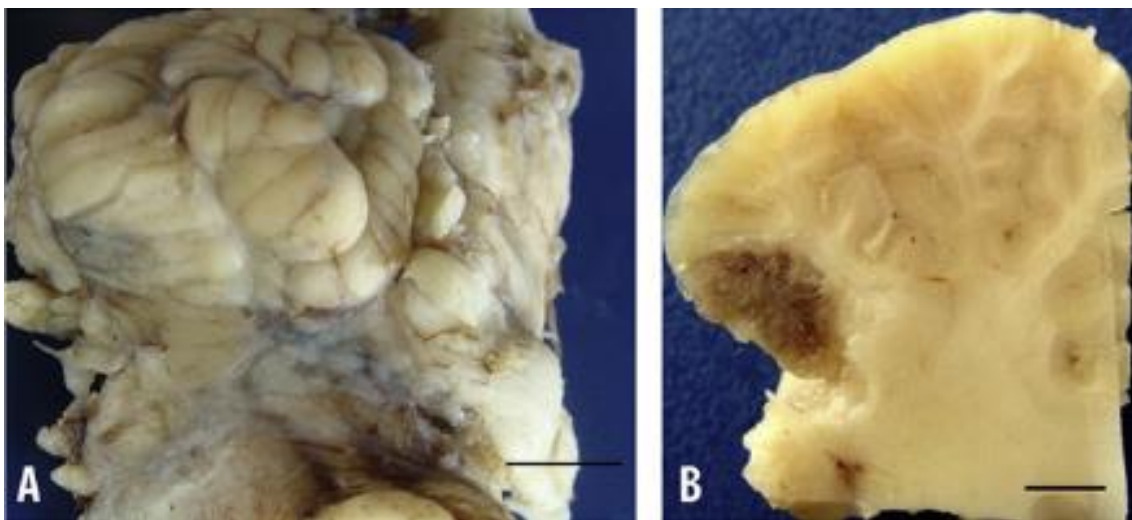
La phase d'invasion a un début brutal associé à des céphalées violentes, frontales ou bilatérales, de la fièvre (39-40°C), des nausées, des vomissements en jet et quelques signes d'irritation méningée et encéphalitique tels que la photophobie. Dans quelques cas, il s'y ajoute pharyngite, obstruction et écoulement nasal.

#### **VII.1.1.2 Phase d'état :**

La phase d'état correspond à l'invasion des espaces méningés par les amibes (Figure 15). Elle réalise un tableau de méningite purulente pseudo-bactérienne avec des céphalées permanentes, bi-frontales ou bitemporales, ne résistant pas aux analgésiques, une fièvre supérieure à 38°C, des nausées, des vomissements et une photophobie traduisant une hypertension intracrânienne. Il est également possible, durant cette phase d'observer des convulsions généralisées, une agueusie, une parosmie (hallucination olfactive) et une ataxie cérébelleuse précoce (SIMITZIS LE FLOHIC, 1996). Dans tous les cas, une rigidité de la nuque confirme le diagnostic de méningo-encéphalite. Les symptômes et les signes neurologiques correspondent à une atteinte des zones olfactives, cérébelleuses, temporales et frontales ainsi qu'une méningite patente.

La confusion, le coma sont également possibles traduisant une atteinte cérébrale diffuse ainsi qu'une atteinte des nerfs crâniens (II, IV, VI). Une rigidité de décérébration s'observe chez 10% des patients (SIMITZIS LE FLOHIC, 1996).

Selon HEGGIE (2010), la lame criblée de l'éthmoïde est plus poreuse chez les enfants et les jeunes adultes que chez le reste de la population. Ceci expliquerait le fait que ce soit la population la plus à risque de développer une méningo-encéphalite amibienne primitive.



**Figure 15 :Méningo-encéphalite causée par *Naegleria fowleri*. (A) Les leptoméniges entre le cervelet et les cortex occipitaux sont épaissies, jaunes et d'apparence granuleuse. (B) Une zone brune de malacie est observée dans le lobe paramédian du cortex cérébelleux (PIMENTEL, et al., 2012).**

### **VII.1.1.3 Evolution**

L'évolution de la grande majorité des cas de méningo-encéphalite amibienne primitive est sombre et se traduit par le décès du patient en moins de dix jours par arrêt cardiorespiratoire et œdème pulmonaire. Seule une dizaine de cas sont connus pour avoir répondu favorablement aux traitements que nous allons évoquer ultérieurement.

Les symptômes de la méningo-encéphalite sont les mêmes que ceux d'une méningo-encéphalite bactérienne, ce qui explique l'importance des informations concernant un éventuel contact de la muqueuse nasale avec de l'eau douce, de la boue ou de la poussière polluée la semaine précédant les symptômes (VISVESVARA, et al., 2007).

## **VII.2 Pathologie lié à *Acanthamoeba spp.***

Le genre *Acanthamoeba* est responsable de kératites de mauvais pronostic et difficiles à traiter si le diagnostic est tardif et les lésions profondes. Ces kératites touchent préférentiellement les porteurs de lentilles.

Il est également responsable, ainsi que l'amibe *Balamuthia mandrillaris*, d'encéphalites granulomateuses d'évolution chronique et d'infections disséminées de très mauvais pronostic, chez les patients immunodéprimés. Le diagnostic de cette pathologie se fait souvent post-mortem.

D'autres affections telles que des otites, des ulcères cutanés, des myocardites, des pneumonies... peuvent être incriminées à *Acanthamoeba* (ANOFEL, 1998).

### **VII.2.1 Encéphalite granulomateuse amibienne**

Bien plus rare que la méningo-encéphalite amibienne primitive liée à *Naegleria fowleri*, l'encéphalite granulomateuse amibienne lié à *Acanthamoeba* est également moins aigüe et plus insidieuse.

L'encéphalite granulomateuse à *Acanthamoeba* touche l'adulte d'âge moyen, déficient, atteint d'affections chroniques ou étant immunodéprimé. Cette pathologie réalise, après un début particulièrement insidieux, une affection chronique et polymorphe très différente de la précédente et dont le diagnostic et le traitement sont particulièrement ardu.

Les facteurs favorisants le plus fréquemment retrouvés sont les polytraumatismes lourds, les brûlures, les maladies métaboliques (hémophilie), la grossesse, les ulcères cutanés et enfin les toxicomanies par voie intraveineuse (SIMITZIS LE FLOHIC, 1996).

Depuis quelques années s'y surajoutent tous les processus d'immunodépression liés aux lymphocytes T, notamment par virus VIH1 et VIH2, et on doit craindre que ces pathologies liées à *Acanthamoeba* prennent une plus grande proportion en raison du nombre croissant de patients sidéens (BARD, et al., 1995) et d'un contact de plus en plus fréquent avec l'homme du fait de la multiplication d'habitats favorables à leur développement.

### VII.2.1.1 Clinique

L'encéphalite granulomateuse amibienne ne suit jamais une baignade, la durée d'incubation n'est pas connue, mais il est admis que plusieurs semaines ou mois précèdent l'apparition, insidieuse, des signes cliniques (BARD, *et al.*, 1995).

L'inoculation s'effectue à partir soit de l'appareil respiratoire (poumon, sinus) soit à partir de la peau ou de l'œil, la diffusion des amibes se faisant par voie hématogène, ou par ascension le long des voies nerveuses optiques ou olfactives (Figure 16).

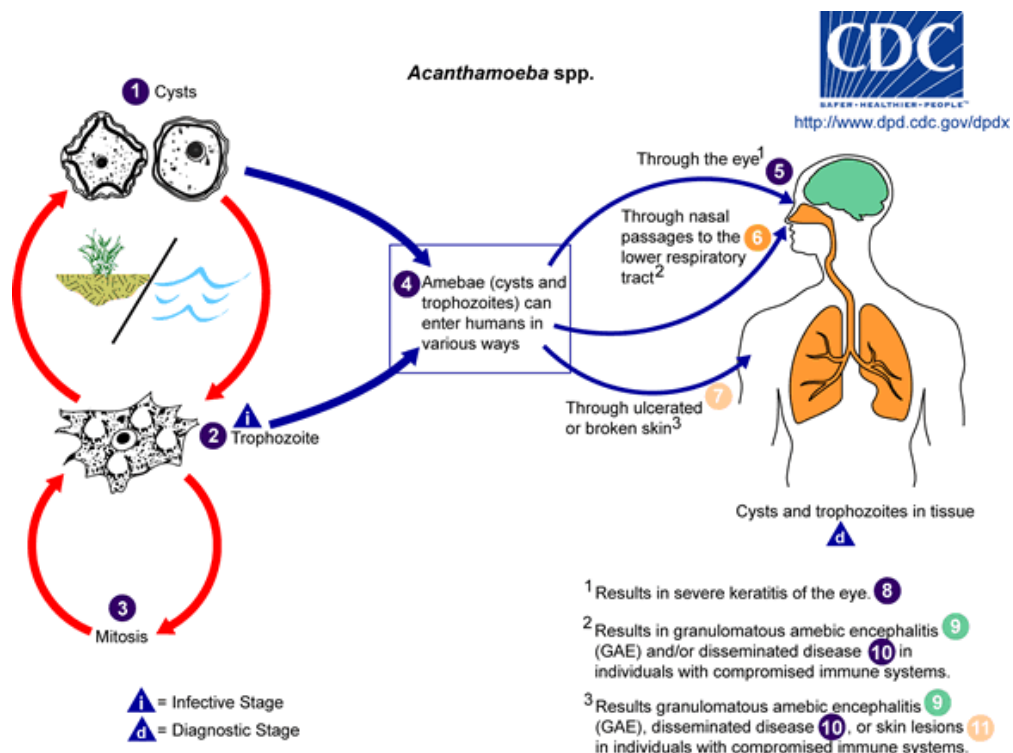


Figure 16 : Cycle de vie d'*Acanthamoeba* spp. (CDC).

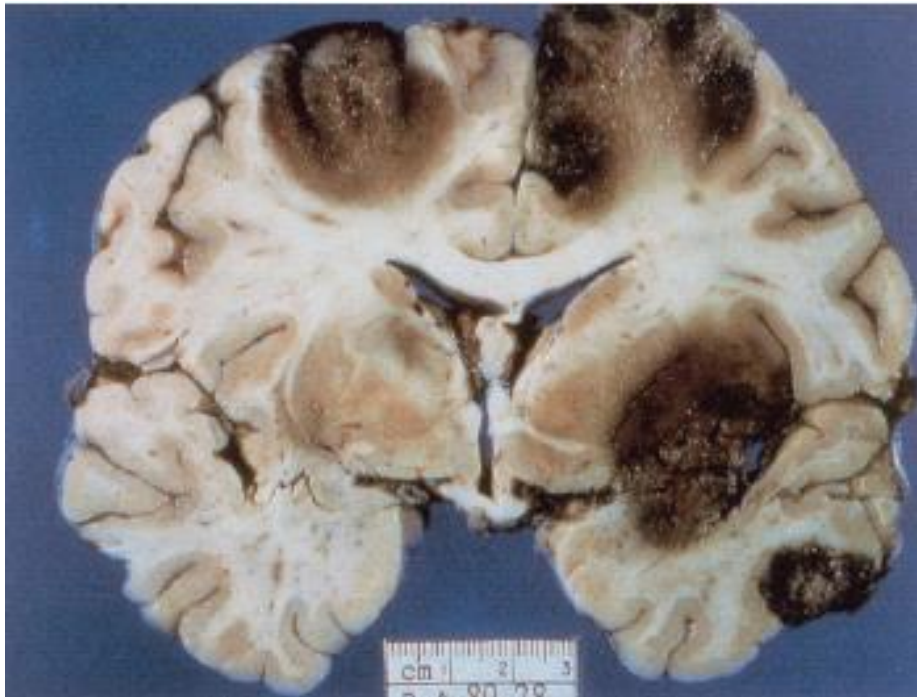
#### VII.2.1.1.1 Période d'incubation

L'incubation oscille dans les cas bien documentés entre quelques semaines à quelques mois, et peut atteindre exceptionnellement des années. Pendant toute cette période, il existe des signes discrets d'atteinte encéphalitique et/ou méningitique : vertiges, modification de la personnalité (perte d'objectivité, impudeur, mensonges répétés, imprudences professionnelles, convulsions,...) (SIMITZIS LE FLOHIC, 1996).

#### VII.2.1.1.2 La phase d'état

La phase d'état est atteinte progressivement et se caractérise par son grand polymorphisme, traduisant l'atteinte, par les amibes, de multiples régions du cerveau et du cervelet (Figure 17).

Les symptômes retrouvés sont des anomalies psychologiques tel que confusion, irritation, hallucination, somnolence ; des céphalées, de la fièvre, des convulsions, une raideur de la nuque, des nausées, des vomissements, une diplopie, un malaise général avec anorexie, photophobie, troubles du sommeil et troubles de l'audition. L'examen clinique permet de retrouver une hémiparésie, des atteintes des nerfs III et IV dans 33% des cas, une ataxie, un signe de Babinski (Annexe 2) qui traduit une lésion de la voie pyramidale, une aphasie, une anisocorie (différence de taille entre les deux pupilles), des hallucinations, voire un nystagmus (mouvement d'oscillation involontaire et saccadé du globe oculaire), et essentiellement, à la fin de l'évolution, un coma (SIMITZIS LE FLOHIC, 1996).



**Figure 17 : Coupe frontale des hémisphères cérébraux avec des nécroses corticales et sous-corticales d'un cas mortel d'encéphalite amibienne granulomateuse (MARCIANO-CABRAL, et al., 2003).**

#### VII.2.1.1.3 Evolution

En quelques semaines voire quelques mois, la phase d'état évolue vers la mort dans un état de cachexie (état de profonde diminution de l'état général d'un individu) comateuse. Dans de rares cas, la guérison est possible et aucune séquelle neurologique importante ne semble avoir été mise en évidence.

#### VII.2.2 **Kératites liés à *Acanthamoeba* spp.**

Les kératites sont actuellement les atteintes par *Acanthamoeba* les plus fréquentes. Depuis 1975, l'attention a été attirée par la fréquence des ulcères cornéens à *Acanthamoeba*. L'étiologie amibienne comme cause de rejet de greffe de cornée est bien connue mais il

apparaît que les lésions peuvent aussi survenir sur des cornées en dehors de toute agression chirurgicale :

- Dans 80% des cas chez les porteurs de lentilles de contact. En effet, ces dernières causent une irritation et délimitent une cavité où les amibes peuvent se multiplier.
- Les 20% restants concernent les régions à climat sec, où la poussière, le vent, la chaleur, l'insolation et les traumatismes par le contact avec des épis de mil fragilisent la surface cornéenne. Une carence en vitamine A et des lésions préexistantes dues au trachome peuvent fragiliser le terrain (GENTILINI, 1995).

### ***VII.2.2.1 Clinique***

L'inoculation se fait par un dépôt sur la cornée de kystes amenés au contact par le doigt sale, la lentille de contact insuffisamment nettoyée ou rincée à l'eau du robinet, l'objet contondant (eau, épi de céréales, brin d'herbe, esquille de bois,...), le vent poussiéreux, etc. Une fois dans le milieu, la température ainsi que la présence de bactéries rendent le milieu propice à la transformation du kyste en trophozoïtes qui infestera le stroma.

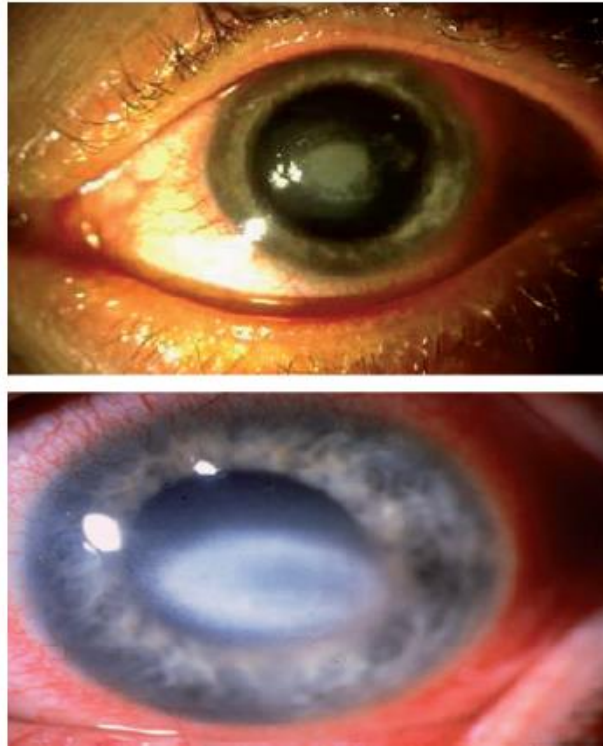
#### **VII.2.2.1.1 Phase d'incubation**

L'incubation est brève et se caractérise tout au plus par une sensation de gêne et un discret larmolement.

#### **VII.2.2.1.2 Phase d'état**

Le début se caractérise dans 60% des cas par une sensation douloureuse de corps étranger avec larmolement, et dans 30% des cas par une photophobie. La rougeur oculaire, la baisse de l'acuité visuelle et l'œdème palpébral sont fréquents. L'examen à la lampe à fente (microscope équipé d'une fente lumineuse directionnelle qui permet d'éclairer et d'étudier individuellement chaque partie de l'œil) révèle, en tout début d'évolution, l'existence d'élevures cornéennes linéaires. Elevures qui tradiraient le cheminement des trophozoïtes entre les couches cornéennes superficielles. Mais le plus souvent, l'examen met en évidence un aspect trompeur de kératites herpétique dendritiforme avec large ulcère superficiel et bourrelet immunitaire périphérique. Un écoulement séreux jaune clair et épais complète le tableau en engluant les cils (Figure 18) (SIMITZIS LE FLOHIC, 1996).





**Figure 18 : Infection de l'œil par *Acanthamoeba*. L'épithélium est ulcéré et l'infiltration stromale montre une opacité de la cornée lors d'une kératite aiguë à *Acanthamoeba* (KHAN, 2006).**

Progressivement, le tableau se complique par l'extension des lésions en surface et en profondeur, avec des périodes transitoires d'amélioration ou d'aggravation, souvent corrélées avec l'instauration d'une nouvelle thérapeutique. Lorsque le traitement n'est pas instauré à temps et/ou s'avère inefficace, la progression en profondeur des amibes se poursuit avec atteinte de la chambre antérieure, puis de la chambre postérieure, de la rétine et enfin on observe des métastases cérébrales soit par voie hémotogène, soit par voie nerveuse, le long du nerf optique (SIMITZIS LE FLOHIC, 1996).

### **VII.2.3        Autres atteintes liés à *Acanthamoeba***

#### ***VII.2.3.1        Atteintes cutanées***

Les atteintes cutanées par *Acanthamoeba spp.* sont des éventualités heureusement rares. Elles surviennent à la suite d'une blessure, même minime, avec pénétration dans la peau de débris souillés.

##### **VII.2.3.1.1    Clinique**

Après une incubation silencieuse de quelques semaines à quelques mois, elles peuvent réaliser deux tableaux différents :

- soit un tableau d'ulcère cutané caractérisé par l'apparition d'une papule lie de vin, indurée, peu ou pas douloureuse, extensive en surface et en profondeur, et dont la zone centrale finit par ulcérer, laissant sourdre un pus citrin, épais ;

- soit un tableau pseudo-tumoral, marqué par l'apparition également progressive d'une tumeur sous-épithéliale, le plus souvent sessile, peu ou pas douloureuse, recouverte par une peau chagrinée, lie de vin (SIMITZIS LE FLOHIC, 1996).

#### VII.2.3.1.2 Evolution

L'évolution peut se poursuivre pendant de longs mois, marquée par l'apparition de lésions satellites (diffusion lymphatique) ou de lésions à distance (diffusion hémotogène).

L'évolution ultime se fait par l'atteinte métastatique du cerveau avec apparition d'une encéphalite amibienne granulomateuse mortelle (SIMITZIS LE FLOHIC, 1996).

#### **VII.2.3.2 *Les sinusites***

Les sinusites peuvent être retrouvées rétrospectivement à l'interrogatoire lors d'une encéphalite granulomateuse amibienne mortelle. Elles constituent rarement un motif de consultation et se caractérisent par une évolution particulièrement longue, entrecoupée de rémissions et d'aggravations successives ; les biopsies devraient permettre d'affirmer le diagnostic en montrant dans un magma nécrotique fortement hémorragique des kystes reconnaissables à leur double paroi (SIMITZIS LE FLOHIC, 1996).

#### **VII.2.3.3 *Les pneumonies***

Les pneumonies, tout comme les sinusites, passent le plus souvent inaperçues. Elles peuvent être retrouvées après l'apparition d'une encéphalite granulomateuse amibienne mortelle pour lesquelles elles constituent une porte d'entrée (SIMITZIS LE FLOHIC, 1996).

Le diagnostic des autres atteintes d'*Acanthamoeba* repose sur l'examen anatomopathologique d'une biopsie qui permettra de retrouver les kystes et les trophozoïtes.

### VII.3 Pathologie lié à *Balamuthia mandrillaris*

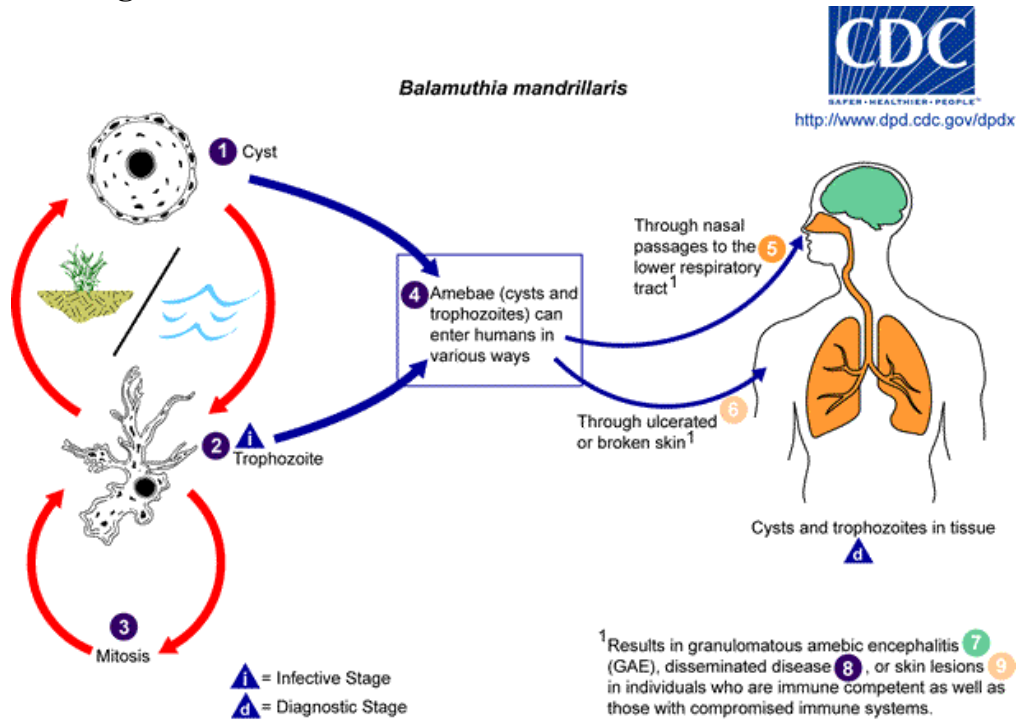
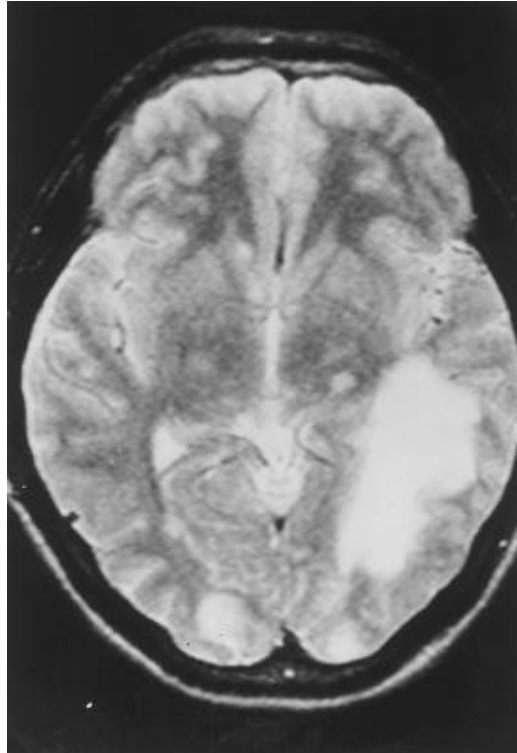


Figure 19 : Cycle de vie de *Balamuthia mandrillaris* (CDC).

Les amibes pénètrent dans l'organisme par inhalation ou par la peau lésée et gagneraient le système nerveux central par la voie hématogène (Figure 19), en provoquant des lésions cérébrales (nécroses hémorragiques, thrombi, inflammations) (Figure 20). L'observation des amibes regroupées autour des vaisseaux sanguins suggère une dissémination par voie hématogène à partir du foyer primaire de l'infection. Dans de nombreux cas, les patients présentent des lésions au niveau de la région du nez, mais on a également constaté la présence de lésions au niveau de la cavité buccale et de la gorge. La période prodromale est mal connue et pourrait durer des semaines ou des mois, mais une fois les symptômes déclarés, l'évolution est plus rapide. L'encéphalite granulomateuse amibienne à *Balamuthia mandrillaris* présente un large éventail de symptômes, elle se manifeste par des vomissements, une raideur de la nuque, des déficits sensitivomoteurs (hémiparésie), des modifications de la personnalité, des troubles visuels tels que la photophobie, la diplopie, des difficultés d'élocution, des troubles de la conscience ou encore le coma. On observe également une paralysie du troisième et du sixième nerf crânien. Ces symptômes, non spécifiques, apparaissent progressivement et évoluent pendant plusieurs semaines, voire des mois, jusqu'au décès du patient en l'absence de traitement efficace (YERA, *et al.*, 2012).



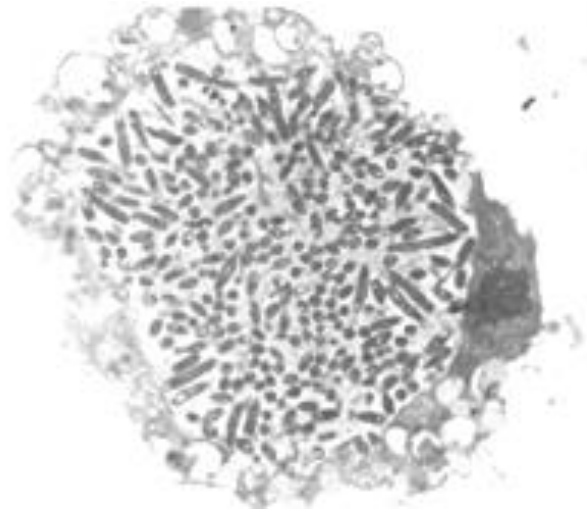
**Figure 20 : IRM du cerveau d'un patient atteint d'une méningo-encéphalite liée à *Balamuthia mandrillaris*. L'image montre une large région atteinte dans le lobe pariéto-occipital gauche et plusieurs petites lésions rondes dispersées à travers le lobe occipital droit et les ganglions basaux bilatérales (DENNEY, et al., 1997).**

Le décès est dû à l'apparition d'un œdème cérébral, une bronchopneumonie, une insuffisance hépatique, rénale, ou encore une septicémie.

#### ***VII.4 Pathologie lié à *Hartmannella vermiformis****

Contrairement à *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba spp.* ou encore *Balamuthia mandrillaris*, *Hartmannella vermiformis* est non pas connue pour sa pathogénicité direct, bien qu'elle ait été isolé du liquide céphalo-rachidien d'un patient présentant une méningo-encéphalite et une broncho-pneumonie (CENTENO, et al., 1996), mais plutôt pour avoir la capacité d'endosymbiose avec une bactérie au pouvoir pathogène important, *Legionella pneumophila*.

*Hartmannella vermiformis* colonise les systèmes d'eau potable et occupe donc le même habitat écologique que *Legionella pneumophila* qui va pouvoir parasiter certaines de ces amibes. Support de la multiplication intracellulaire de *Legionella pneumophila* (Figure 21), l'amibe joue un rôle important dans la transmission et l'amplification de la légionellose (Annexe 3).



**Figure 21 : Cellule d'*Hartmannella vermiformis* infectée par *Legionella pneumophila*, 12 h après l'infection (grossissement×3400) (ABU KWAIK, et al., 1998).**

*Legionella pneumophila* atteint ainsi de hautes concentrations dans certains systèmes d'eau potable tels que les tours de refroidissement ou encore les réservoirs à eau chaude. Elle est détectée à l'intérieur des kystes de *Hartmannella vermiformis* mais la bactérie est abondante dans sa forme trophozoïte. Il est donc possible que la bactérie soit transportée à travers les systèmes d'eau potable en parasitant la forme trophozoïte de l'amibe plutôt que sa forme kystique.

Des traitements de désinfection de ces eaux sont en place afin d'éliminer la présence de ces bactéries. Cependant, *Hartmannella* résiste à ces traitements et confère donc une protection à *Legionella pneumophila* qui peut donc atteindre les points de terminaison des lignes de distribution où les conditions sont favorables à leurs croissances.

*Hartmannella vermiformis* sous forme trophozoïte est légèrement plus sensible au chlore que l'est sa forme kystique, mais les deux sont facilement inactivés par le chlore résiduel libre à des concentrations supérieures à 4 ppm. Bien qu'une température élevée (50°C) et une chloration à 2 ppm soit chacun efficace pour diminuer la concentration de *Hartmannella vermiformis*, l'activité synergique des deux traitements ne se produit que sur la forme kystique de l'amibe.

Cependant, une éradication totale de l'amibe paraît illusoire compte tenu de la capacité de survie de ces dernières dans les biofilms des systèmes de distribution pouvant être engendré par la corrosion des tuyaux (DYKOVA, et al., 2005).

En septembre 2013, le premier cas de kératite amibienne lié à *Hartmannella* a été décrit. La patiente de 22 ans, porte des lentilles et présentait une kératite unilatérale à l'œil gauche et se plaignait de douleur à l'œil, de rougeur, de vision trouble, de sensibilité à la lumière et de sensation de corps étranger dans l'œil. L'observation au microscope confocal montre des zones d'opacité non spécifique dans les régions stromales sous-épithéliales et antérieures (ABEDKHOJASTEH, et al., 2013).

## VIII. Diagnostic biologique des amibes libres

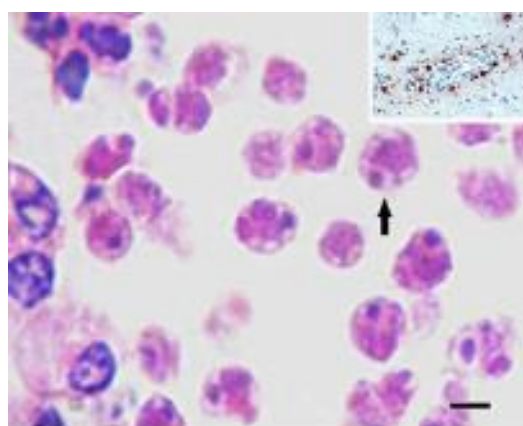
### VIII.1 Diagnostic de *Naegleria fowleri*

Le diagnostic de la méningo-encéphalite amibienne primitive au laboratoire présente un risque majeur pour le personnel : toutes manipulations de souches de *Naegleria fowleri* devraient être pratiquées sous hotte et dans un laboratoire sécurisé (P3) ce qui engendre une réelle difficulté pour le diagnostic biologique de la maladie ainsi que pour les différentes analyses faites dans l'environnement.

#### VIII.1.1.1 Examen microscopique

Le diagnostic de certitude de la méningo-encéphalite amibienne primitive repose sur la recherche, dans le liquide céphalo-rachidien, des trophozoïtes de *Naegleria fowleri*. Pour ce faire, le LCR doit être laissé au repos à température ambiante pendant quelques minutes. Les trophozoïtes sont assez souvent et facilement confondus avec des polynucléaires neutrophiles, et la mise en culture sur une gélose monoxénique (*Enterobacter sp.*) à 2% avec incubation à 37°C s'impose, levant toutes incertitudes avant la 24<sup>ème</sup> heure (SIMITZIS LE FLOHIC, 1996).

Le LCR a un aspect purulent et légèrement hémorragique. A l'examen direct entre lame et lamelles (objectif ×40), des trophozoïtes mobiles sont visibles. *Naegleria fowleri* se différencie des autres amibes car les trophozoïtes se transforment au contact de l'eau en forme flagellée (c'est le test de flagellation). Ils sont également visibles après cyto centrifugation du liquide céphalo-rachidien, fixation et coloration au May-Grünwald-Giemsa (MGG) ou à l'hématoxyline et éosine-safran (HES) (Figure 22). Des anticorps spécifiques ont été utilisés pour détecter et identifier *Naegleria fowleri* par immunofluorescence (IF) dans le liquide céphalo-rachidien après cyto centrifugation et fixation. La coloration de Gram, habituellement utilisée pour la recherche de bactéries, ne permet pas la mise en évidence des amibes libres (YERA, *et al.*, 2012).



**Figure 22 : Zone de nécrose contenant de nombreux trophozoïtes de *Naegleria fowleri* (flèches), des macrophages spumeux périphériques (encadré) et des neutrophiles. Coloration à l'HES (hématoxyline et éosine-safran) (PIMENTEL, *et al.*, 2012).**

Le bilan biologique montre une hyperleucocytose sanguine et dans le LCR, une hyperalbuminorachie (100 à 1000 mg/100 ml), une hypoglycorachie modérée et une réaction cellulaire variable avec quelques hématies et des polynucléaires neutrophiles. (SIMITZIS LE FLOHIC, 1996). La présence de globules rouges dans le LCR est à priori due à une nécrose hémorragique du cortex cérébral adjacent. On observe également la présence de trophozoïtes très mobiles d'amibes (BOUREE, 2008).

Cependant, le diagnostic se fait souvent post-mortem, les amibes peuvent donc être recherchées dans des biopsies cérébrales. Les biopsies préalablement fixées (formol tamponné) et incluses en paraffine sont coupées pour l'examen anatomocytologique et colorées à l'HES. Les images montrent une hypertrophie importante des méninges qui sont recouvertes d'un exsudat purulent et jaune en regard des lobes frontaux, temporaux, et de l'hypothalamus, un œdème congestif important de l'ensemble du cerveau, et une nécrose hémorragique des bulbes olfactifs et de tout le cortex (SIMITZIS LE FLOHIC, 1996). Tout ceci est caractérisé par la présence d'infiltrats inflammatoires constitués de polynucléaires neutrophiles, de polynucléaires éosinophiles et de macrophages (objectif ×10). Seules des formes trophozoïtes y sont retrouvées (objectif ×40). Une certaine expertise est nécessaire pour détecter et différencier les trophozoïtes d'amibes des cellules inflammatoires. Le noyau de *Naegleria fowleri* présente un nucléole rond, large et central caractéristique. Des anticorps spécifiques peuvent être utilisés pour identifier *Naegleria fowleri* dans les tissus par immunomarquage (immunoperoxidase directe).

#### **VIII.1.1.2 Culture**

Le LCR et les biopsies peuvent être mis en culture pour l'isolement de *Naegleria fowleri* (ainsi que celui d'*Acanthamoeba*), après transport à température ambiante. La culture, à partir des échantillons provenant d'infections invasives, requiert des milieux riches comportant du sérum de veau fœtal, de l'extrait globulaire ou, mieux, des cellules en culture (cellules Vero ou fibroblastes). Les isolats de *Naegleria fowleri* se multiplient plus facilement à 37°C. La lecture des cultures en petits flacons est effectuée au microscope inversé (objectif ×20 et ×40). Pour les souches isolées de l'environnement, la culture de *Naegleria fowleri* (ainsi que celle d'*Acanthamoeba*) peut être effectuée sur milieu axénique (trypticase-soja, milieux à base d'extrait de levure, de peptone) (YERA, *et al.*, 2012).

#### **VIII.1.1.3 Diagnostic moléculaire**

Des méthodes d'amplification de gènes ont été développées pour le diagnostic rapide et sensible de méningo-encéphalite amibienne primitive et d'encéphalite granulomateuse amibienne à partir du liquide cébrospinal ou de biopsies cérébrales. Il s'agit d'une PCR (polymerase chain reaction) temps réel quantitative multiplex qui permet simultanément la détection de *Naegleria fowleri*, d'*Acanthamoeba spp.* et de *Balamuthia mandrillaris*. Cette PCR utilise des amorces et des sondes spécifiques TaqMan® et cible une région de l'ADNr 18S de *Naegleria fowleri*, d'*Acanthamoeba spp.* et de *Balamuthia mandrillaris*, respectivement (YERA, *et al.*, 2012).

Une PCR en temps réel utilisant le SYBER Green<sup>®</sup>, ciblant une région de l'ADNr 18S de *Naegleria spp.* avec des amorces spécifiques, a été développée pour la détection des *Naegleria* dans des biopsies cérébrales de souris infectées, préalablement fixées par du formol tamponné, incluses en paraffines puis déparaffinées. Cette PCR pourrait être testée sur des échantillons humains d'archive (YERA, *et al.*, 2012).

#### **VIII.1.1.4 Sérologie**

La sérologie n'a pas d'intérêt dans le diagnostic de la méningo-encéphalite amibienne primitive car l'évolution de la maladie est aiguë et des anticorps anti-*Naegleria spp.* sont détectables dans le sérum de patients asymptomatiques (YERA, *et al.*, 2012).

#### **VIII.1.1.5 Autres examens biologiques du liquide céphalo-rachidien**

Dans les cas de méningo-encéphalite amibienne primitive, la formule sanguine montre généralement une augmentation des polynucléaires neutrophiles. A la ponction, le liquide cébrospinal apparaît hémorragique, xanthochromatique ou purulent. Il contient entre 300 et 26 000 éléments par millimètre cube, essentiellement des polynucléaires neutrophiles. La glyrachie est basse (inférieure à 0,1 g/l) et la protéinorachie élevée (1-10 g/l).

### **VIII.2 Diagnostic d'*Acanthamoeba spp.***

#### **VIII.2.1 Encéphalite granulomateuse lié à *Acanthamoeba***

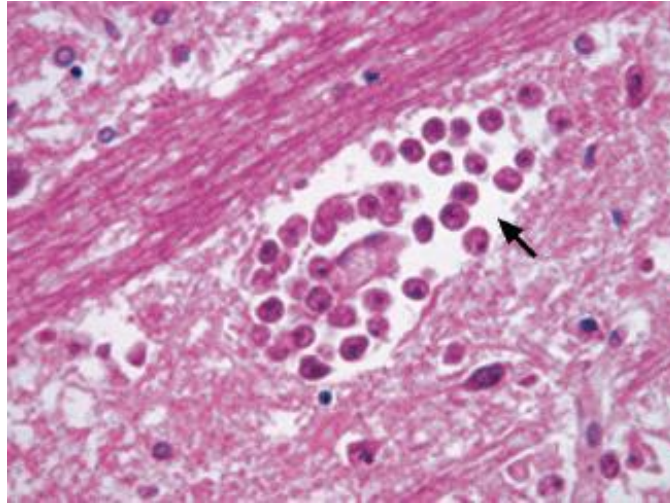
Dans l'encéphalite granulomateuse amibienne, le LCR montrera surtout des mononucléaires. La biopsie cérébrale, contenant la forme trophozoïte ainsi que la forme kystique, contrairement à *Naegleria*, confirmera le diagnostic (BOUREE, 2008).

##### **VIII.2.1.1.1 Examen microscopique**

L'isolement d'*Acanthamoeba* et de *Balamuthia mandrillaris* dans le liquide cébrospinal reste exceptionnel. Les biopsies cérébrales ou cutanées fixées, incluses et coupées, sont colorées au MCG ou à l'HES, puis observées au microscope (objectif ×40 et ×100). Dans les tissus infectés, les infiltrats inflammatoires entourant des lésions granulomateuses comportant des amibes sont observés autour des vaisseaux sanguins. La réaction inflammatoire peut être plus discrète, voire inexistante chez les sujets sévèrement immunodéprimés (YERA, *et al.*, 2012).

Colorés à l'HES, les trophozoïtes se distinguent grâce à la morphologie de leur noyau (rond avec un nucléole large et central formant un halo) (Figure 23). Il n'est cependant pas possible de différencier les trophozoïtes d'*Acanthamoeba* et de *Balamuthia mandrillaris*, car les deux amibes présentent la même morphologie nucléaire (YERA, *et al.*, 2012).





**Figure 23 : Coloration à l'HES de tissus cérébraux provenant d'un patient atteint d'encéphalite amibienne granulomateuse. De nombreux trophozoïtes (flèches) peuvent être identifiés à l'intérieur des parois vasculaires (MARCIANO-CABRAL, et al., 2003).**

Colorés à l'HES, les kystes d'*Acanthamoeba* sont clairs avec une forme étoilée, polygonale ou ovale et présentent une double paroi assez épaisse. Les kystes de *Balamuthia mandrillaris* sont plus grands, ronds avec une paroi épaisse. Les

kystes d'*Acanthamoeba* peuvent aussi être observés après coloration au Periodic Acid Schiff (PAS), au Gomori-Grocott, au trichrome. Les *Balamuthia* ont souvent été confondues avec des *Acanthamoeba*, les deux genres d'amibes libres étant responsables d'encéphalite granulomateuse amibienne et de lésions cutanées (YERA, et al., 2012).

L'utilisation d'anticorps spécifiques anti-*Acanthamoeba spp.* ou anti-*Balamuthia mandrillaris* en immunomarquage est indispensable pour différencier les deux amibes (trophozoïte et kyste) sur les coupes de tissu (YERA, et al., 2012).

#### VIII.2.1.1.2 Sérologie

Les titres sériques d'anticorps anti-*Acanthamoeba* sont mesurés par immunofluorescence indirecte en utilisant comme antigène des amibes ou des antigènes extraits d'amibes fixés sur des lames. Les sujets ayant une infection évolutive présentent des titres élevés d'anticorps (du 1/256 au 1/1024) ou une ascension significative des titres, alors que les individus exposés à *Acanthamoeba* dans l'environnement présentent des taux sériques d'anticorps habituellement faibles (inférieurs à 1/80) (YERA, et al., 2012).

#### VIII.2.1.1.3 Autres examens biologiques du liquide céphalo-rachidien

Dans les cas d'encéphalite granulomateuse amibienne lié à *Acanthamoeba*, le LCR contient une majorité de lymphocytes, la glycorachie est légèrement diminuée et la protéinorachie est modérément élevée (1-5 g/l)

#### VIII.2.1.1.4 Examen post-mortem

Les examens post-mortem montrent que les *Acanthamoeba* provoquent une encéphalite granulomateuse avec foyers de nécrose d'évolution subaigüe ou chronique localisée au cerveau moyen ainsi qu'à la base des lobes occipital et temporal correspondant à l'atteinte par voie hématogène et non par voie olfactive. Les hémisphères cérébraux peuvent présenter un état œdémateux sévère et un ramollissement associé avec les foyers de nécrose déjà cités, ainsi qu'avec de petits abcès. Les leptoméniges, surtout en regard des lésions corticales, présentent un aspect congestif et parfois un peu d'exsudat purulent (BARD, *et al.*, 1995).

### VIII.2.2 **Kératites liés à *Acanthamoeba***

#### VIII.2.2.1.1 Examen microscopique

Le diagnostic de la pathologie repose sur un examen au microscope, après coloration de Gram, des frottis cornéens ainsi que sur une culture à 21°C (température optimale pour la culture d'*Acanthamoeba*). On peut également procéder à une identification par PCR (BOUREE, 2008).

Le frottis cornéen typique présente des cellules cornéennes larges et plus ou moins altérés, un important infiltrat inflammatoire à polynucléaires neutrophiles et des kystes plus ou moins polygonaux, colorés en violet, et marqués par une taille inégale, un centre plus clair et une double paroi (SIMITZIS LE FLOHIC, 1996).

Le diagnostic de kératite amibienne est posé par la mise en évidence d'*Acanthamoeba* ou de leur ADN dans une biopsie ou un grattage de cornée, moins invasif lorsque le prélèvement est bien réalisé (YERA, *et al.*, 2012).

La quantification par PCR des cellules humaines présentes dans le prélèvement permet de valider la qualité du grattage cornéen. Les techniques de colorations, d'immunofluorescence, ou d'immunoperoxidase, ou des colorants fluorescents (calcofluor blanc et acridine orange) peuvent être utilisés mais se révèlent beaucoup moins sensibles que les techniques de biologie moléculaire (YERA, *et al.*, 2012).

#### VIII.2.2.1.2 Culture

La culture en présence de bactérie est une méthode peu onéreuse, mais peu sensible pour le diagnostic d'infection à *Acanthamoeba*, en particulier celui de la kératite amibienne. Des suspensions d'*Escherichia coli* (ou d'*Enterobacter aerogenes* ou de *Pseudomonas*), vivants ou tués sont utilisées. Les prélèvements cornéens sont déchargés sur une gélose à base d'Agar pauvre ou dans des petits flacons pour culture cellulaire contenant 5 ml de NaCl 0,9%. L'incubation a lieu pendant 15 à 21 jours à 21°C. La lecture journalière des cultures est effectuée au microscope inversé (objectifs ×20 et×40) afin d'éviter les contaminations par l'ouverture des boîtes. Les lentilles de contact et les culots de centrifugation des liquides de boîtiers de lentilles peuvent également être mis en culture. L'isolement d'*Acanthamoeba* à partir des prélèvements cornéens permet le diagnostic de la kératite amibienne, mais pas leur isolement à partir de lentilles de contact et/ou du liquide de boîtiers de lentilles. En effet, 5% à 20% des boîtiers de porteurs asymptomatiques de lentilles de contact sont contaminés (YERA, *et al.*, 2012).

La culture, comme l'examen microscopique, est une méthode peu sensible de diagnostic de la kératite amibienne (de 30% à 60% de sensibilité), en particulier lorsque les patients ont été traités au préalable par des antibiotiques ayant une activité plus ou moins amoebicide (YERA, *et al.*, 2012).

#### VIII.2.2.1.3 Diagnostic moléculaire

La plupart des souches d'*Acanthamoeba* de génotypes T1 à T17 peuvent aussi être détectées, aussi bien dans des échantillons cliniques qu'environnementaux, par une PCR conventionnelle ciblant la région ASA.S1 de l'ADNr 18S d'*Acanthamoeba spp.* avec les amorces JDP1 et JDP2. Cette PCR a pour avantage de permettre d'identifier le génotype de l'isolat détecté par séquençage et analyse de la région variable DF3 présente dans ASA.S1.

Des PCR conventionnelles ciblant différentes régions de l'ADNr 18S des *Acanthamoeba* ont été utilisées pour le diagnostic de la kératite amibienne. La PCR, effectuée directement sur les prélèvements cornéens, est une méthode sensible de diagnostic de cette pathologie. (80% à 94%). La sensibilité du diagnostic est augmentée par l'association de plusieurs couples d'amorces.

Deux PCR en temps réel TaqMan<sup>®</sup> ont été utilisées pour le diagnostic de la kératite amibienne. Une première PCR temps réel a été adaptée pour la détection d'*Acanthamoeba spp.* dans des échantillons oculaires, à partir de celle développée pour la détection de l'amibe dans une PCR multiplex, permettant également la détection de *Naegleria fowleri* et de *Balamuthia mandrillaris* dans les prélèvements cérébraux (YERA, *et al.*, 2012).

La deuxième PCR temps réel cible l'ADN mitochondrial de la petite sous-unité 16S (ADNr mt16S) d'*Acanthamoeba spp.* et permet la détection de tous les génotypes de l'American Type Culture Collection (ATCC) ; cette technique est validée pour les biopsies fixées au formol tamponné, incluses puis déparaffinées (YERA, *et al.*, 2012).

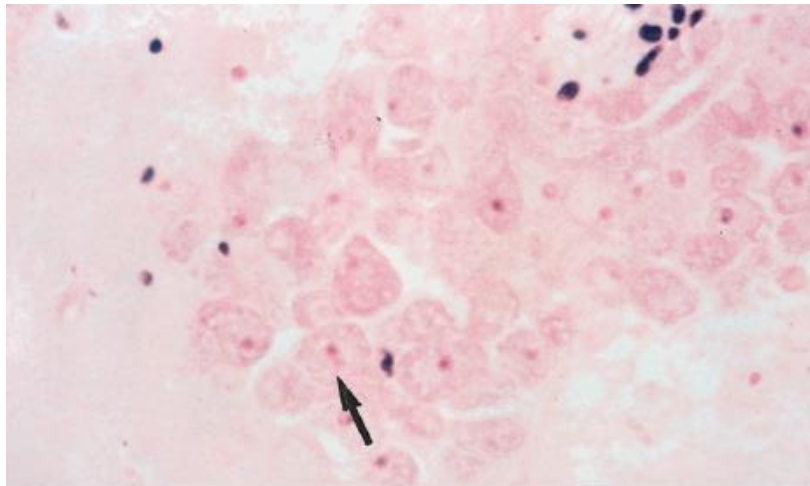
Certains collyres utilisés pour l'examen ophtalmologique sont connus pour inhiber la PCR, il faut donc rincer abondamment la cornée avec du NaCl 0,9% stérile avant d'effectuer le prélèvement et, dans la mesure du possible, avant de débiter le traitement amoebicide.

### **VIII.3 Diagnostic de *Balamuthia mandrillaris***

Dans les cas d'encéphalite granulomateuse amibienne lié à *Balamuthia mandrillaris*, l'imagerie par résonance magnétique (IRM) montre des lésions focales, des lésions d'aspect kystique, un œdème et une hydrocéphalie. L'imagerie cérébrale ne permet pas le diagnostic de cette pathologie ; elle ne peut que l'orienter, car les images observées peuvent l'être aussi en cas de gliomes, d'abcès ou d'hématomes cérébraux. Une atteinte cutanée ou une atteinte pulmonaire peuvent y être associées (YERA, *et al.*, 2012).

#### **VIII.3.1.1 Examen microscopique**

Les espèces *Acanthamoeba spp.* et *Balamuthia mandrillaris* étant très proches, l'examen microscopique pour l'encéphalite granulomateuse amibienne lié à *Acanthamoeba spp.* ou à *Balamuthia mandrillaris* sera le même que celui décrit précédemment (Figure 24).



**Figure 24 : Coloration à l'HES mettant en évidence un regroupement péri-vasculaire de trophozoïte de *Balamuthia mandrillaris* (flèche) chez un patient de 32 ans atteint d'encéphalite amibienne granulomateuse (HEALY, 2002).**

#### **VIII.3.1.2 Culture**

*Balamuthia mandrillaris* est isolée à partir des tissus uniquement par culture sur tapis de cellules de mammifères (cellules de rein de singe ou cellules d'endothélium micro-vasculaire cérébral humain) ; sa croissance est lente, la culture n'est donc pas recommandée pour le diagnostic de l'infection.

#### **VIII.3.1.3 Diagnostic moléculaire**

Récemment, une PCR temps réel TaqMan<sup>®</sup> ciblant le gène de la ribonucléase P de *Balamuthia mandrillaris* a été développée et utilisée sur des échantillons cliniques.

La sensibilité de la PCR pour la détection d'*Acanthamoeba spp.* ou de *Balamuthia mandrillaris* dans des biopsies du cerveau (fixées par le formol ou non) a été montrée en utilisant une PCR conventionnelle ciblant respectivement une région du gène mitochondrial de l'ARN de la petite sous-unité ribosomique (ADNr mt 16S) de chaque amibe avec des amorces spécifiques ; le taux de détection est toutefois plus faible avec des échantillons fixés (formol tamponné) (YERA, *et al.*, 2012).

#### **VIII.3.1.4 Sérologie**

La sérologie peut permettre le dépistage des patients présentant une infection cérébrale, cutanée ou disséminée à *Acanthamoeba spp.* ou à *Balamuthia mandrillaris*.

Les taux sériques d'anticorps anti-*Balamuthia mandrillaris* sont déterminés par immunofluorescence indirecte, par techniques immunoenzymatiques ou par cytométrie de flux. Des titres élevés sont détectés chez les patients atteints d'encéphalite granulomateuse amibienne à *Balamuthia mandrillaris* (supérieurs à 1/64). Cependant, chez les patients immunodéprimés, la sérologie ne permet pas d'infirmer le diagnostic (YERA, *et al.*, 2012).

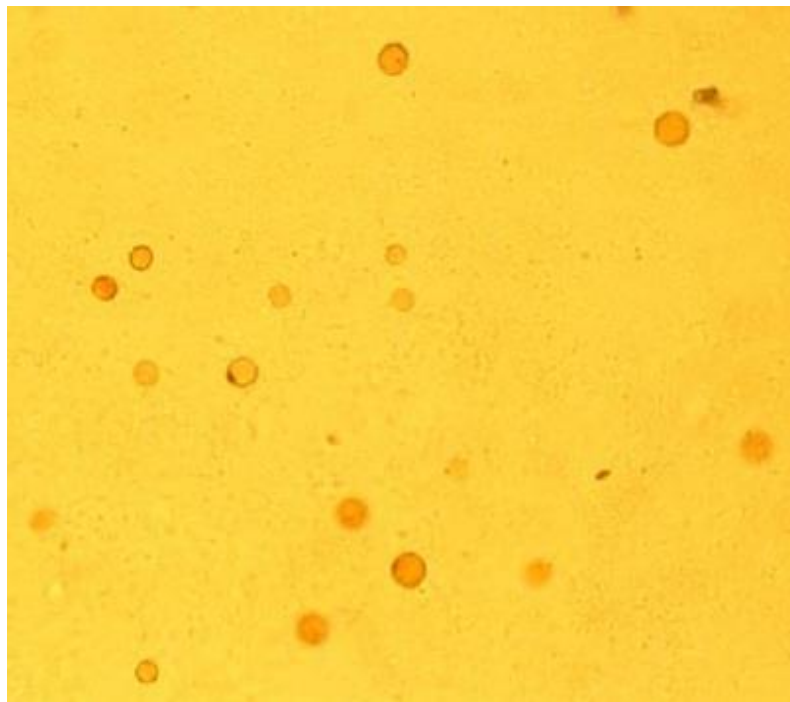
### VIII.3.1.5 *Autres examens du liquide céphalo-rachidien*

Dans les cas d'atteinte à *Balamuthia mandrillaris*, la cytologie du liquide cébrospinal est variable : acellulaire à très cellulaire avec une formule souvent lymphocytaire, mais parfois panachée ou à polynucléaires. La glycorachie est légèrement diminuée et la protéinorachie élevée (YERA, *et al.*, 2012).

### VIII.4 Diagnostic d'*Hartmannella vermiformis*

#### VIII.4.1 Culture

Le premier cas de kératite amibienne ayant été rapporté en Septembre 2013 par ABEDKHOJASTEH. Le diagnostic de la pathologie lié à *Hartmannella* n'est pas standardisé. Pour diagnostiquer *Hartmannella*, les lentilles de contact, l'étui des lentilles et la solution nettoyante ont été testés par une culture sur une gélose agar non-nutritive à 1,5% recouvert d'une couche d'*Escherichia coli* inactivé à la chaleur. Le milieu est incubé pendant 14 jours à température ambiante et est observé quotidiennement par microscopie optique. Les résultats positifs ont été découverts après un mois de culture et aucune bactérie ou champignons n'ont été isolé (Figure 25). Les caractères morphologiques des kystes et des trophozoïtes d'*Hartmannella* ont permis d'identifier le pathogène responsable de la kératite (ABEDKHOJASTEH, *et al.*, 2013).



**Figure 25 : Image au microscope optique de kystes d'*Hartmannella vermiformis* provenant d'une culture, sur milieu agar non nutritif, d'un prélèvement des lentilles de contact d'une patiente de 22 ans atteinte de kératite amibienne (×400) (ABEDKHOJASTEH, *et al.*, 2013).**

#### VIII.4.2 Diagnostic moléculaire

Après l'extraction de l'ADN des kystes, une PCR utilisant les amorces NA1 (5'-GCT CCA ATA GCG TAT ATT AA-3') et NA2 (5'-AGA AAG AGC TAT CAA TCT GT-3') a été effectué. Le déroulement de la PCR comprend une étape de dénaturation initiale d'une minute à 94°C suivi par 35 cycles de dénaturation à 94°C pendant 35 secondes, d'hybridation à 50°C pendant 45 secondes et d'extension à 72°C pendant 1 minute puis une étape d'extension finale à 72°C pendant 10 minutes. Le produit de la PCR a subi une électrophorèse sur un gel d'agarose à 1,5% et visualisé sous lampe UV. Le séquençage et l'analyse par BLAST ont révélé que l'agent pathogène responsable de la kératite appartenait à *Hartmannella vermiformis* (ABEDKHOJASTEH, et al., 2013).

### IX. Traitement

#### IX.1 Traitement de *Naegleria fowleri*

La sensibilité des amibes libres aux médicaments *in vivo* est limitée à certains médicaments, même si, *in vitro*, il semble possible d'utiliser une gamme de molécules nettement plus étendue.

Les traitements de la méningo-encéphalite amibienne primitive se révèlent généralement inefficace en raison du diagnostic tardif et donc d'une instauration de traitement tout aussi tardive. Le manque de formation de nombreux laboratoires au diagnostic étiologique de cette pathologie ainsi qu'un aspect trompeur de l'affection explique ce retard de soins spécifiques.

En effet, la thérapeutique de cette maladie repose sur un traitement spécifique, un traitement symptomatique et sur des soins de nursing

##### IX.1.1.1 Traitement spécifique

Le médicament de choix dans le traitement de la méningo-encéphalite amibienne primitive est l'amphotéricine B, un antibiotique, antifongique de la famille des macrolides polyènes. Il agit en se fixant à l'ergostérol de la membrane cellulaire et en créant donc, dans celle-ci, un pore qui provoquera la lyse de la membrane et donc de l'amibe. L'amphotéricine B doit être utilisée précocement par voie intraveineuse, intrathécale et/ou intraventriculaire. Il peut être utilisée seule ou en association avec la rifampicine par voie orale et le miconazole par voie intraveineuse.

Les doses efficaces d'amphotéricine B (FUNGIZONE<sup>®</sup>) à injecter aux patients sont de 1,5 mg/kg/jour à 3 mg/kg/jour par voie intraveineuse et de 1 g/jour à 1,5 g/jour par voie intrathécale.

L'association avec du miconazole doit se faire à une concentration pour ce dernier de 350 g/m<sup>2</sup>/jour par voie intraveineuse et 10 mg/jour par voie intrathécale.

La rifampicine (RIFADINE<sup>®</sup>) quant à elle s'utilise par voie orale à raison de 10 mg/kg/jour.

L'azithromycine (ZYTHROMAX<sup>®</sup>) a également eu des résultats positifs, in vitro et in vivo, contre *Naegleria fowleri*.

Dans le cas où un traitement par Amphotéricine B a été instauré, le décès des patients atteints de méningo-encéphalite amibienne primitive ont incriminé un début de traitement trop tardif et non une résistance de l'amibe au médicament. *Naegleria fowleri* a été isolé lors de l'autopsie de ces patients et a montré une sensibilité à l'Amphotéricine B (SCHUSTER, 2002).

#### ***IX.1.1.2 Traitement symptomatique***

La dexaméthasone a montré un intérêt particulier pour soigner la photophobie en diminuant l'hypertension intracrânienne. Cependant, elle se combine avec l'Amphotéricine B et en diminue donc la biodisponibilité.

La phénytoïne et le phénobarbital peuvent également être utilisés pour traiter les accès convulsifs de la phase d'état de la maladie.

### **IX.2 Traitement d'*Acanthamoeba spp.***

#### **IX.2.1 Encéphalite granulomateuse**

Le traitement est le plus souvent un échec compte tenu de la très grande résistance de ces agents pathogènes et de l'existence d'une pathologie associée lourde et immunodéprimante.

Les médicaments utilisés pour traiter une dissémination naso-pharyngée des amibes et les infections du système nerveux central sont le kétoconazole, le fluconazole, l'itraconazole, l'isothionate de pentamidine, le cotrimoxazole, la sulfadiazine et le 5-fluoro-cytosine (flucytosine)

Les médicaments azolés interfèrent avec la synthèse des stérols qui constituent la membrane cellulaire d'*Acanthamoeba*, ce qui augmente la perméabilité cellulaire de l'amibe et provoque une fuite d'ion de la cellule et ainsi, la lyse de celle-ci. Les imidazolés tel que le clotrimazole, le bifonazole, le kétoconazole sont plus efficaces contre les *Acanthamoeba spp.* que les triazolés comme l'itraconazole ou le fluconazole, on les préférera donc dans le traitement de l'encéphalite amibienne granulomateuse.

Bien que l'amphotéricine B soit la molécule de choix pour les affections encéphalitiques à *Naegleria fowleri*, elle ne l'est pas pour celle liée à *Acanthamoeba spp.* (SCHUSTER, *et al.*, 2004).

#### **IX.2.2 Kératite amibienne**

Le traitement comporte plusieurs possibilités médicamenteuses tel que l'iséthionate de propamide (BROLENE<sup>®</sup> en collyre), l'hexomédine, l'itraconazole (SPORANOX<sup>®</sup>...) et chirurgicales comme la kératoplastie ou encore la cryothérapie. Le pronostic est souvent bon, si le diagnostic et l'instauration du traitement se sont fait précocement, et il est mauvais si la souche amibienne présente une résistance spontanée à l'un des médicaments utilisés. (ANOFEL, 1998). La résistance de la souche amibienne est généralement synonyme d'un

enkystement de celle-ci. Dans le but d'anticiper la récurrence de l'infection due à la présence de kystes, le traitement devra être poursuivi sur une période de trois à quatre mois (SCHUSTER, *et al.*, 2004).

Les antibiotiques semblent être utiles préventivement en cas d'intervention sur la cornée (GENTILINI, 1995).

### **IX.2.3 Atteintes cutanées**

Les infections cutanées à *Acanthamoeba spp.* peuvent être traitées par l'application locale de gluconate de chlorhexidine (HIBISCRUB<sup>®</sup>) et de kétoconazole sous forme de crème (KETODERM<sup>®</sup>) (SCHUSTER, *et al.*, 2004).

Quant au traitement chirurgical, il consiste en l'exérèse large de la zone atteinte et dans les cas où les lésions sont trop larges, en un traitement par Amphotéricine B.

### **IX.3 Traitement de *Balamuthia mandrillaris***

La réussite du traitement de l'encéphalite granulomateuse à *Balamuthia mandrillaris* dépend principalement de la rapidité du diagnostic suivi d'un traitement relativement agressif.

Les molécules doivent passer la barrière hématoencéphalique. Certaines combinaisons ont prouvé leurs efficacités cliniques :

- Isétionate de pentamidine (PENTACARINAT<sup>®</sup>) : 300 mg IV une fois par jour
- Sulfadiazine (ADIAZINE<sup>®</sup>) : 1,5 g VO quatre fois par jour
- Fluconazole (TRIFLUCAN<sup>®</sup>) : 400 mg une fois par jour
- Clarithromycine (MONONAXY<sup>®</sup>, MONOZECLAR<sup>®</sup>, NAXY<sup>®</sup>, ZECLAR<sup>®</sup>) : 500mg trois fois par jour.ou Flucytosine (ANCOTIL<sup>®</sup>) : 2 g par voie orale quatre fois par jour

La durée de ces traitements est de deux semaines. Cependant, ce traitement s'avère inefficace contre les kystes de *Balamuthia mandrillaris*. Pour cette raison, les patients restent sous sulfadiazine ou clarithromycine pendant plusieurs années. La majorité des encéphalites granulomateuses à *Balamuthia mandrillaris* reste fatale car le diagnostic est trop tardif (MATIN, *et al.*, 2008).

Une exérèse chirurgicale des lésions cérébrales ou cutanées peut être pratiquée afin de limiter l'inoculum. La présence de kystes dans les tissus peut faire craindre une réactivation si le traitement n'a pas été suffisamment kysticide.

En cas d'atteintes cutanées à *Balamuthia mandrillaris*, l'association albendazole et itraconazole a été efficace ; il existe un cas de guérison spontanée.

### **IX.4 Traitement d'*Hartmannella vermiformis***

#### **IX.4.1 Traitement de la kératite amibienne**

Le seul traitement connu pour la kératite lié à *Hartmannella vermiformis* est le PolyHexaMéthylène de Biguanide (PHMB) à 0,02% (ABEDKHOJASTEH, *et al.*, 2013). La



posologie du PHMB dans le traitement de la kératite amibienne est de 1 goutte par heure y compris la nuit les deux premiers jours, puis 1 goutte toute les deux heures jusqu'au treizième jour et 1 goutte quatre fois par jour pendant 2 à 4 mois. La présentation de PHMB à 0,02% n'est pas commercialisée, il est donc nécessaire de réaliser une préparation magistrale ou hospitalière (MONTSERRAT, et al., 2009).

#### **IX.4.2 Traitement de la légionellose**

*Hartmannella vermiformis* peut transmettre la légionellose, pathologie due à *Legionella pneumophila*. Selon les recommandations de l'AFSSAPS (Agence Française de Sécurité Sanitaire de Produits de Santé), le choix thérapeutique antibiotique dépend de la gravité de la pathologie ainsi que du terrain sous-jacent :

- Pour les formes non graves, dont les patients sont en ambulatoire ou hospitalisé en médecine ou aux urgences, une monothérapie par macrolide (azithromycine préférentiellement) est prescrite ;

- Dans les formes graves, c'est-à-dire que le patient est hospitalisé en unité de soins intensifs ou en réanimation et/ou est immunodéprimé :

- une monothérapie par fluoroquinolone (lévofloxacine, ofloxacine, ciprofloxacine) ;

- ou une association de deux antibiotiques au sein des trois familles suivantes : macrolides IV (spiramycine plutôt qu'érythromycine), fluoroquinolones (par ordre de préférence : lévofloxacine, ofloxacine, ciprofloxacine), rifampicine (les associations avec la rifampicine ne sont pas à privilégier) sont prescrites.

La durée du traitement est de 8 à 14 jours pour les formes non graves (le traitement par azithromycine est de 5 jours). Elle est prolongée à 21 jours dans les formes graves et/ou chez l'immunodéprimé (avec 10 jours de traitement pour l'azithromycine) (AFSSAPS, Juin 2011).

2<sup>EME</sup> PARTIE :  
PRESENCE DES AMIBES  
DANS LES EAUX DE  
LOISIRS ET RESISTANCE  
AUX DESINFECTIONS

Dans cette partie, nous allons étudier la présence des amibes dans les eaux de loisirs ainsi que leur capacité de résistance face aux différents traitements que subit l'eau de notre environnement. Les procédés d'identification et les indicateurs de contamination des eaux de loisirs seront également abordés.

## **I. Présence des amibes dans les eaux**

L'eau est certainement l'habitat où *Naegleria fowleri* et les amibes libres ont été le plus fréquemment isolés de l'environnement (GOUDOT, 2012).

### **I.1 Les eaux environnementales**

NELSON (1971), cité dans (GOUDOT, 2012), a effectué le premier isolement de *Naegleria fowleri* à partir d'une source environnementale, dans un étang, où une victime avait nagé quelques années auparavant. Depuis, l'amibe a été retrouvée dans des mares chauffées et des sources d'eaux chaudes, des étangs, des lacs et dans des rivières (MARTINEZ, *et al.*, 1981 ; BROWN, *et al.*, 1983 ; KYLE, *et al.*, 1986 ; O'DELL, *et al.*, 1986 ; DE JONCKHEERE, 2011 ; GRIFFIN, 1983 ; KASPRZAK, 1974 ; WELLINGS, *et al.*, 1977 ; LAWANDE, *et al.*, 1979 ; GRIFFIN, 1983). Une variation saisonnière a été mise en évidence par plusieurs auteurs (GOUDOT, 2012).

Le génotype de plusieurs espèces d'*Acanthamoeba* a été retrouvé en février 2006 dans des échantillons provenant de lacs, rivières et canaux en Arizona (USA) (DE JONCKHERRE, 2007)

*Hartmannella vermiformis* est fréquemment retrouvée dans les rivières ou les lacs ainsi que dans les lacs superficiels (KUIPER, *et al.*, 2006).

### **I.2 Les eaux de réseaux et de piscines**

Les eaux de réseaux de distribution ont systématiquement subi une désinfection. Cependant, certaines conditions particulières peuvent mettre à mal ce processus (défauts de la filière de traitement, fuites,...). Ainsi, la détection d'amibes libres dans les réseaux d'eau potable a pu être diagnostiquée et pose de gros problèmes. La résistance des kystes aux procédés de désinfection pourrait expliquer leurs présences.

Récemment, en 2011, deux personnes sont mortes en Louisiane aux Etats-Unis après avoir utilisé l'eau de robinet pour se nettoyer les sinus. La contamination des eaux de réseaux n'est pas nouvelle. Le pathogène a été isolé dans l'eau potable en Europe, en Australie du Sud, en Amérique, en Asie, et en Afrique (JAMIESON, *et al.*, 1973 ; SCAGLIA, *et al.*, 1983 ; JADIN, 1974 ; WILLAERT, *et al.*, 1974 ; KADLEC, *et al.*, 1978 ; GOGATE, *et al.*, 1985).

A l'identique, la contamination des piscines a été relevée à plusieurs reprises à la suite de cas de méningo-encéphalite amibienne primitive (FOWLER, *et al.*, 1965 ; CERVA, *et al.* ; SYMMERS, 1969 ; JADIN, *et al.*, 1971 ; JAMIESON, *et al.*, 1973 ; GOUDOT, 2012).

Une étude, faite sur 136 échantillons d'eau du robinet à Rio Grande do Sul au Brésil, a identifié la présence d'*Acanthamoeba* dans 13 de ces échantillons. Les résultats de recherche

révèlent l'importance de ces amibes et le besoin de plus d'études épidémiologiques afin de déterminer leurs distribution dans l'environnement et leurs pathogénicités associés (WINCK, et al., 2011). Au Japon également, la présence d'*Acanthamoeba* a été détectée dans les réseaux de distribution de l'eau provenant de rivières ou d'eau de refroidissement des centrales nucléaires (EDAGAWA, et al., 2009).

MICHEL *et al* (1995) ont montré la présence d'*Hartmannella vermiformis* dans certaines piscines de Bulgarie. Elle est également l'amibe qui prédomine dans l'eau du robinet.

### **I.3 Les eaux usées**

Bien que cette contamination soit bien moins décrite, *Naegleria fowleri* a été retrouvée dans des échantillons de boues de station d'épuration en Inde, en Corée et au Nigeria (SINGH, *et al.*, 1972 ; LAWANDE, *et al.*, 1983). Par ailleurs, sa présence a également été rapportée dans des égouts en France, en Russie et en Inde (SINGH, *et al.*, 1972 ; GOORDEVA, 1973 ; BEURTIN, *et al.*, 1986 ; GOUDOT, 2012).

*Hartmannella vermiformis*, quant à elle, a été identifiées à différentes étapes du traitement des eaux usées en Allemagne (MICHEL, et al., 1995).

### **I.4 Les eaux industrielles**

Suite à leurs observations, FLIERMANS *et al* (1979), ont énoncé que les systèmes aquatiques thermiquement modifiés étaient propices au développement de *Naegleria fowleri*. Depuis, des études ont été engagées sur l'occurrence de *Naegleria fowleri* dans les eaux issues de systèmes de refroidissement industriels souvent associés à des centrales électriques aux Etats-Unis (Caroline du Sud, Illinois, Virginie, Floride, Texas, Pennsylvanie), en Belgique et en France (STEVENS, *et al.*, 1977 ; DIVE, *et al.*, 1981 ; DUMA, 1981 ; SYKORA, *et al.*, 1983 ; HUIZINGA, *et al.*, 1990 ; BEHETS, *et al.*, 2007 ; JAMERSON, *et al.*, 2009) (GOUDOT, 2012).

Dans leur étude, TYNDALL *et al* (1989) ont montré que durant les périodes de rejets d'effluents échauffés, les concentrations de l'agent pathogène *Naegleria fowleri* avaient augmenté de deux ordres de grandeur. De même, BEHETS *et al* (2007) ont montré que *Naegleria fowleri* a été l'espèce la plus fréquemment rencontrée parmi les espèces d'amibes libres thermotolérantes. Enfin, JAMERSON *et al* (2009) ont trouvé que sur les 16 sites échantillonnés sur la lac Anna en Virginie au cours de l'été 2007, neuf ont été trouvés positifs pour *Naegleria fowleri*. En France, DIVE *et al* (1981) a montré que les deux centrales électriques (La Maxe et les Ansereuilles) avaient des résultats positifs à la recherche de *Naegleria fowleri*. La fréquence d'isolement était 10 fois supérieure an aval qu'en amont des centrales (GOUDOT, 2012).

## **II. Désinfection des eaux**

En charge du Ministère de Santé, la sécurité sanitaire liée à l'eau est un enjeu quotidien. Qu'il s'agisse de l'eau potable ou de l'eau de baignade, la qualité doit être surveillée en permanence pour assurer la santé humaine (DAVEZAC, *et al.*, 2008).

### **II.1 L'eau potable**

Le Ministère chargé de la Santé a pour mission d'organiser le contrôle sanitaire des eaux d'alimentation. Il inspecte les installations de production, de traitement et de distribution d'eau et vérifie la qualité de l'eau utilisée puis distribuée.

Les résultats de ces contrôles sont mis à la disposition des usagers dans les mairies, sur les factures d'eau et un rapport annuel est présenté par le maire sur le prix et la qualité du service public d'eau potable (DAVEZAC, *et al.*, 2008).

#### **II.1.1 L'eau potable : les normes**

L'eau potable est définie comme étant une eau que l'on peut boire sans risque. Des normes ont été établies dans ce but et fixent notamment les teneurs limites à ne pas dépasser pour un certain nombre de substances nocives et susceptibles d'être présentes dans l'eau. Une eau potable n'est donc pas exempte de matières polluantes, mais leur concentration a été jugée suffisamment faible pour ne pas mettre en danger la santé du consommateur.

L'eau potable, selon les normes fixées, ne doit donc pas contenir de bactéries, de virus ou encore de parasites. La concentration de certaines substances telles que les nitrates, les phosphates, les métaux lourds, les hydrocarbures ou les pesticides ne doivent pas dépasser la « concentration maximale admissible ». Et à l'inverse, la présence de certaines substances comme les oligo-éléments est nécessaire.

Une eau potable est une eau qui doit être agréable à boire : elle doit être claire, avoir une bonne odeur et un bon goût. Pour cela, les sels minéraux (indispensables à l'organisme) dissous doivent avoir une concentration de 0,1 à 0,5 gramme par litre. Enfin, elle ne doit pas corroder les canalisations afin d'arriver dans les mêmes conditions que celles de départ à la sortie des robinets (BEHETS, *et al.*, 2007).

#### **II.1.2 Le cycle de l'eau de consommation**

L'eau brute, non traitée, est captée dans un cours d'eau (eau de surface) ou une nappe phréatique (eau souterraine) puis elle est acheminée vers une usine de production d'eau potable où elle y subit différents traitements physiques, chimiques et biologiques selon son origine avant d'être distribuée aux différents consommateurs. Une fois consommée et donc souillée, elle est recueillie pour être conduite vers les usines de dépollution des eaux usées, avant d'être enfin rendue à la nature dans des conditions saines pour la faune et la flore.

Le cycle de l'eau potable se décompose donc en cinq étapes : le captage, le transport, la production d'eau potable, la distribution, et la collecte et dépollution des eaux usées (Figure 26).

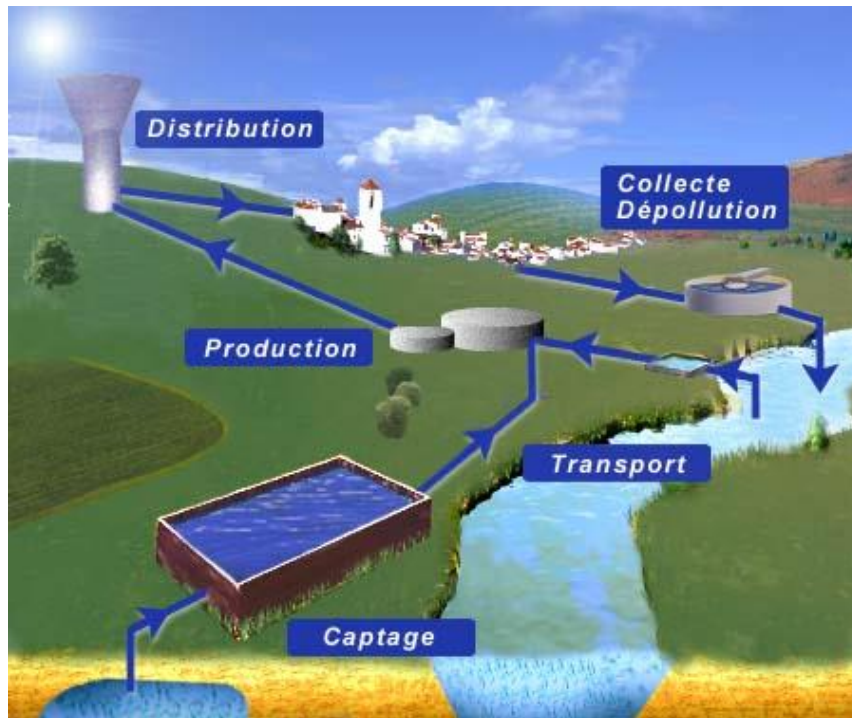


Figure 26 : Cycle de l'eau potable (BEHETS, *et al.*, 2007).

Ce cycle de l'eau de consommation nécessite d'énormes infrastructures et à l'évidence, seuls les pays riches peuvent se doter de tels équipements. La qualité de l'eau est contrôlée à chaque étape de ce cycle et doit répondre, à n'importe quel point de prélèvement, aux normes en vigueur. En France, le nombre de contrôle est proportionnel aux volumes d'eau distribuée. Dans les agglomérations importantes, plusieurs contrôles sont quotidiennement effectués et certains paramètres constamment suivis tandis que les petits villages ne peuvent offrir le même suivi pour des raisons évidentes de coût. La qualité de l'eau dans les grandes villes se voit alors plus fiable que dans les campagnes (BEHETS, *et al.*, 2007).

### II.1.3 Les procédés classiques de traitement des eaux

Le traitement classique et complet d'une eau s'effectue en plusieurs étapes dont certaines ne sont pas nécessaires aux eaux les plus propres.

#### II.1.3.1 L'oxydation

Le chlore, ou encore l'ozone, sont utilisés dans cette étape. L'oxydation permet d'éliminer les matières organiques, l'ammoniac, le fer ou le manganèse de l'eau afin de faciliter l'étape suivante, la clarification.

#### II.1.3.2 La clarification

La clarification permet d'éliminer les particules en suspension. Un passage de l'eau à travers des grilles permet de retenir les matières les plus grosses. Puis l'eau est acheminée dans des bassins de décantation où, sous l'effet de leur poids, les particules gravitent vers le fond où elles se déposent. S'en suit une étape de filtration à travers une ou plusieurs couches d'un substrat granulaire, tels que le sable, qui retient les particules résiduelles.

### ***II.1.3.3 La désinfection***

Cette étape permet l'élimination des micro-organismes pathogènes. On utilise pour cela, soit un désinfectant chimique comme le chlore ou l'azote soit des rayonnements ultraviolets. Ce traitement doit persister tout au long du réseau afin qu'aucun germe ne puisse se développer dans les canalisations.

### ***II.1.3.4 Traitements supplémentaires***

Dans le but de protéger les canalisations de la corrosion ou de l'entartrage, la dureté et l'acidité de l'eau peuvent être corrigés. Certains traitements spécifiques sont appliqués lorsque la qualité de l'eau n'est pas respectée après la chaîne traditionnelle.

Le procédé d'adsorption sur charbon actif notamment permet d'éliminer, après un éventuel traitement d'oxydation, des polluants organiques dissous comme certains pesticides ou hydrocarbures.

Des résines échangeuses d'ions sont également utilisées pour diminuer la concentration en ion nitrates de l'eau et la remplacer par un ion sans danger comme l'ion chlorure ou l'ion carbonate. La dénitrification biologique, utilisant des bactéries, permet, en transformant l'ion nitrate en azote gazeux, de diminuer la concentration de nitrate.

Ces procédés, bien qu'améliorant significativement la qualité de l'eau, sont néanmoins non dépourvus de danger. Le chlore, en réagissant avec certaines molécules organiques, voit sa concentration diminuer rapidement dans le réseau de distribution, ce qui peut favoriser le développement des micro-organismes. De plus, ces réactions conduisent à la formation de produits dont certains sont suspectés de toxicité pour l'Homme.

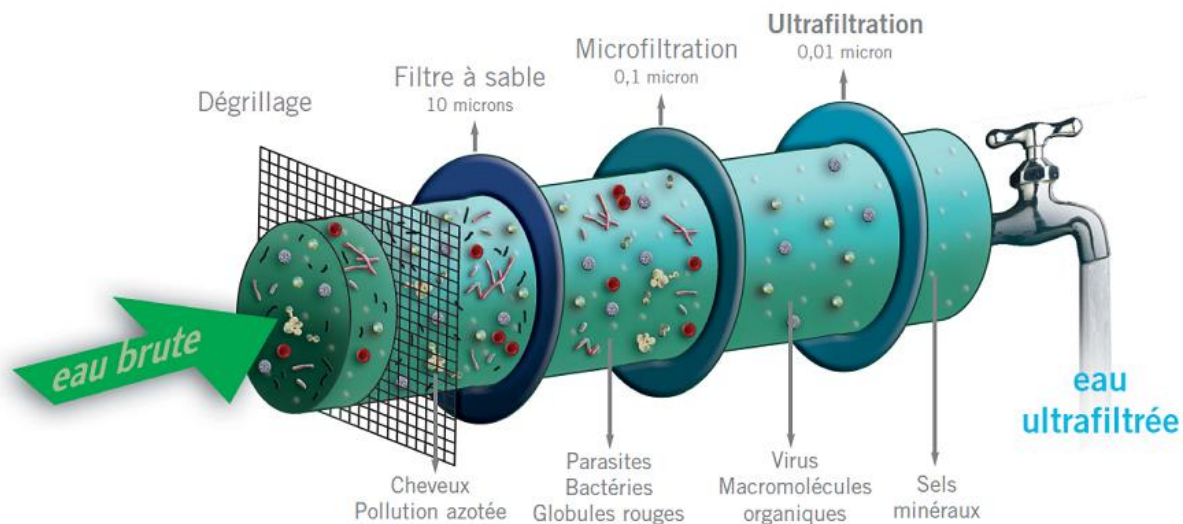
L'idéal serait donc de pouvoir traiter l'eau sans avoir recours à des réactifs chimiques. C'est ce que permettent en partie les procédés de filtration sur membranes (BEHETS, *et al.*, 2007).

### ***II.1.3.5 La filtration***

De nouvelles techniques, très performantes consistent non plus à éliminer chimiquement les micropolluants mais à les extraire physiquement. Le plus gros avantage de ces techniques est de n'utiliser aucun réactif chimique, sauf pour leur entretien. Cependant, bien qu'elles commencent peu à peu à être utilisées à grande échelle, ces nouveaux traitements présentent un coût très élevé, ce qui explique la rareté de leur utilisation.

#### **L'ULTRAFILTRATION**

L'ultrafiltration est dite à « basse pression », elle permet la clarification et la désinfection de l'eau en une seule étape (Figure 27). La paroi des membranes agit comme un filtre pour toutes les particules supérieures à 10-20 µm, c'est-à-dire, pollens, algues, parasites, bactéries, virus, germes et molécules organiques (AQUASOURCE, 2011).



**Figure 27 : Ultrafiltration de l'eau brute (AQUASOURCE, 2011).**

Un lavage régulier avec de l'eau propre circulant en sens inverse permet d'éviter aux pores de se colmater et un nettoyage chimique des membranes doit être effectué de temps en temps.

Cependant, du charbon actif en poudre est ajouté à l'eau traité car certains pesticides et molécules responsables du goût et de l'odeur de l'eau ne sont pas retenus. Ces substances s'adsorbent sur les grains de charbon lesquels sont trop gros pour traverser les pores (BEHETS, *et al.*, 2007).

### LA NANOFILTRATION

Cette technique est semblable à celle de l'ultrafiltration sauf que la membrane a une porosité de l'ordre de 0,001 $\mu$ m. Elle est constituée de trois couches de matériaux différents et est enroulée autour d'un tube central. Injectée sous pression, l'eau à traiter traverse la membrane et ressort filtrée par le tube central.

La nanofiltration permet de retenir tous les polluants dissous, qu'ils soient biologiques, organiques ou minéraux et quelle que soit leur concentration, sans avoir besoin d'utiliser l'adsorption sur charbon actif. Elle permet, elle aussi, de diminuer notablement l'usage du chlore. Son seul inconvénient technique est que l'eau produite est tellement pure qu'il est nécessaire de la reminéraliser (BEHETS, *et al.*, 2007).



## **II.2 Les eaux de baignade**

### **II.2.1 Contrôle de la qualité des eaux de baignade**

#### ***II.2.1.1 Organisation du contrôle***

Connaitre la qualité de l'eau de baignade en eau de mer ou en eau douce est un moyen de prévenir tout risque pour la santé des baigneurs.

Le contrôle sanitaire des eaux de baignade est sous la responsabilité des Agences Régionales de la Santé (ARS) et reste une préoccupation importante du Ministère de la Santé. La réglementation faite par ce dernier est basée sur les directives européennes.

Les ARS assurent le contrôle sanitaire en procédant à un état des lieux des zones de baignade et en organisant des prélèvements d'eau sur des points de contrôle déterminés.

Les analyses sont réalisées par des laboratoires agréés au titre du contrôle sanitaire des eaux par le ministère chargé de la Santé. Les résultats du contrôle sanitaire des eaux de baignade, par souci de transparence, doivent être obligatoirement affichés sur le site et en mairie (Ministère des Affaires Sociales et de la Santé, 2011).

#### ***II.2.1.2 Critères d'évaluation de la qualité de l'eau***

La qualité de l'eau est évaluée grâce à des indicateurs microbiologiques : *Escherichia coli* et les entérocoques intestinaux qui sont des témoins de la contamination fécale des eaux de baignades. Ils constituent donc un indicateur du niveau de pollution par des eaux usées et traduisent la probabilité de présence de germes pathogènes. Plus ces germes (*Escherichia coli* et les entérocoques intestinaux) sont présents en quantité importante, plus le risque sanitaire augmente (Ministère des Affaires Sociales et de la Santé, 2011).

Pour déclarer une eau de baignade en bon état, la quantité d'*Escherichia coli* et d'Entérocoques intestinaux est mesurée et doit être inférieure à certaines normes que nous développerons par la suite.

### **II.2.2 Les différentes eaux de baignade**

La baignade est, en France, la plus répandue des activités récréatives en rapport avec l'eau. Les sites où se pratiquent les activités associées incluent principalement : les piscines ouvertes au public, dans lesquelles l'eau est traitée et notamment désinfectée et désinfectante afin d'assurer sa qualité microbiologique ; les sites naturels, qui font parfois l'objet d'aménagements particuliers pour l'accueil du public, mais dans lesquels l'eau n'est pas traitée, et les baignades artificielles. L'ANSES a évalué les risques sanitaires pouvant être associés à ces trois types de baignades (ANSES - Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, 2012).

#### ***II.2.2.1 Baignades naturelles***

Les sites naturels de baignade peuvent être contaminés par des eaux usées, issues de l'assainissement collectif ou individuel, par des eaux de ruissellement ou par des sources

ponctuelles ou temporaires de pollution comme la contamination par des animaux domestiques ou de la faune sauvage. L'épuration naturelle du site, qui consiste en un filtrage par les plantes et la terre notamment, est d'une efficacité variable d'un site à l'autre.

Le risque lié à ces pollutions est principalement microbiologique, c'est-à-dire lié à la présence dans l'eau de micro-organismes pathogènes.

En cours de saison, des prélèvements d'eau sont effectués sur chaque site de baignade avec une fréquence au minimum bimensuelle. Les résultats des mesures microbiologiques réalisées sur ces prélèvements sont comparés aux limites de qualité fixées par la directive 2006/7/CE. (PARLEMENT EUROPEEN, 15 février 2006) Des indicateurs de qualité physico-chimique sont également relevés. Dès la fin de la saison, des bilans départementaux sont réalisés, une synthèse nationale est effectuée par la Direction générale de la santé (ministère de la santé) et transmise à la Commission européenne (ANSES - Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, 2012).

### ***II.2.2.2 Baignades artificielles***

Les baignades artificielles sont définies comme étant des baignades en eau captée et captive, traitée ou non, mais de nature non désinfectée et désinfectante contrairement aux piscines collectives. Elles sont de types et de caractéristiques variées. Elles peuvent tout de même être regroupées en trois catégories :

- les bassins artificiels alimentés par l'eau d'un puits ou d'une source subissant un traitement de désinfection par chloration, mais dont les caractéristiques, notamment de recirculation des eaux ne répondent pas aux dispositions préconisées pour une piscine ;
- les bassins artificiels alimentés soit par une eau superficielle (par dérivation ou pompage), soit par une eau souterraine non traitée ;
- sur le littoral, les bassins artificiels alimentés en eau de mer par la marée (bassins à marée) ou par pompage (bassins d'eau de mer), comme en mer méditerranée.

L'ANSES (2009), a produit un rapport d'expertise collective relatif à l'évaluation des risques sanitaires liés aux baignades artificielles non encadrées par la réglementation en vigueur. Une attention particulière a été portée dans l'expertise sur les installations commercialisées sous l'appellation « piscines biologiques ou écologiques » dont le développement est très important depuis une dizaine d'années.

L'expertise a permis d'identifier un certain nombre de dangers sanitaires, notamment :

- les micro-organismes pathogènes apportés par les baigneurs pouvant être à l'origine de contaminations inter-baigneurs et responsables de la plupart des épidémies déclarées en eaux récréatives ;
- les toxines de micro-algues et de cyanobactéries, dont la prolifération est amplifiée dans ce type de baignade par des conditions particulièrement propices ;

- les micro-organismes et les pollutions chimiques apportés par l'environnement, via l'eau de remplissage de la baignade, les ruissellements d'eau souillée, l'intrusion d'animaux, etc.

Si le niveau de risque varie en fonction de l'efficacité du système hydraulique et du traitement de l'eau de l'installation, le risque de contamination microbiologique apparaît cependant prédominant, quel que soit le type de baignade artificielle. Le niveau de risque est d'autant plus élevé lorsque la fréquentation est importante et le niveau d'hygiène faible.

### ***II.2.2.3 Eaux de piscines***

#### **II.2.2.3.1 Evaluation des produits et procédés de traitement des eaux de piscines**

Conformément aux dispositions du code de la Santé Publique (article D.1332-3), l'ANSES est chargée d'évaluer les demandes d'autorisation de mise sur le marché des nouveaux produits et des procédés de désinfection et de déchloration des eaux de piscines.

Les éléments constitutifs du dossier doivent permettre à l'agence d'évaluer l'efficacité et l'innocuité des produits et/ou procédés de traitement revendiqués. Les lignes directrices s'appliquent uniquement aux demandes d'autorisation de produits et procédés de traitement utilisés dans les piscines recevant du public et alimentées par de l'eau d'un réseau public ou privé autorisé pour l'alimentation humaine.

La notification finale est formulée par la DGS (Direction Générale de la Santé), sur la base de l'avis de l'Agence, puis envoyée au pétitionnaire.

#### **II.2.2.3.2 Evaluation des risques sanitaires liés aux piscines**

Les travaux d'expertise de l'ANSES (2012) ont permis d'identifier les principaux dangers chimiques et microbiologiques présents dans l'eau, l'air et les surfaces des piscines réglementées et des bains à remous. Les dangers ont été décrits notamment en fonction de l'origine de l'eau d'alimentation du bassin.

Les dangers chimiques identifiés proviennent essentiellement de substances formées à partir des produits de désinfection (chlore principalement) et les matières organiques apportées par les baigneurs.

Les dangers microbiologiques ont été analysés et les germes hydriques pathogènes potentiellement retrouvés dans les piscines réglementées ont été recensés. Bien qu'aucune épidémie n'ait été recensée à ce jour en France, il apparaît que le risque microbiologique est essentiellement lié au manque d'hygiène des baigneurs.

Ces mêmes substances et germes pathogènes peuvent également être retrouvés dans les bains à remous. Cependant ces bassins présentent certaines particularités qui peuvent modifier la hiérarchie des dangers décrits et/ou être à l'origine de dangers pertinents supplémentaires. Ces spécificités portent sur :

- la température de l'eau élevée ;

- la présence de dispositifs de bullage ;
- le faible volume d'eau rapporté au nombre de baigneurs fréquentant ces bassins ;
- un taux de renouvellement d'eau faible rapporté au taux de fréquentation de ces bains ;
- la concentration en désinfectant fluctuante ;
- l'augmentation du pH ;
- la promiscuité inter-baigneurs (ANSES - Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, 2012).

#### **II.2.2.4 Les eaux thermales**

La France comptent aujourd'hui plus de 150 établissements thermaux avec près de 500 000 personnes qui les côtoient chaque année sans compter les séjours courts effectués sans prescription médicale. Le thermalisme est basé sur l'utilisation d'eau minérale naturelle, dont la composition physico-chimique lui confère des propriétés favorables pour la santé. Ces eaux prennent leurs sources en profondeur, ce qui les protège de diverses pollutions. Afin de respecter leur caractère naturel, les eaux minérales naturelles ne peuvent recevoir aucun traitement ou ajout de désinfectant résiduel, mis à part une filtration ou un traitement aux UV, pour maîtriser la charge microbienne dans l'eau. Afin de diminuer le risque infectieux, le Ministère de la Santé impose des analyses régulières au niveau des points d'usage où sont dispensés les soins (PECASTAINGS, 2010).

La cure thermique est un traitement qui s'adresse à une grande variété de patients. Bien qu'un examen médical permet de vérifier que ces derniers ne présentent pas de contre-indication tel que l'immunodépression, les sujets traités peuvent être très âgés ou très jeunes (les cures sont autorisées à partir de 6 mois). Leur système immunitaire peut donc être affaibli ou immature. Le rapport du Conseil Supérieur de l'Hygiène Publique de France (CSHPF) émis en mai 1999 a pour objet la description et la gestion de ces risques (CSHPF, *et al.*, 1999).

Les recommandations du CSHPF obligent les établissements thermaux à faire des analyses microbiologiques en fonction des types de soins réalisés. Les analyses les plus précises sont effectués mensuellement là où le risque de contamination est le plus fort et consiste à rechercher et dénombrer la flore revivifiable à 37°C et à 22°C dans 1 ml, des coliformes dans 250 ml, des entérocoques intestinaux dans 250 ml, des spores de bactéries anaérobies sulfite-réductrices dans 100 ml, de *Pseudomonas aeruginosa* dans 250 ml et de *Legionella pneumophila* dans 1 litre d'eau minérale naturelle (PECASTAINGS, 2010). Il est à noter qu'aucun marqueur de contamination ne prend en compte la contamination amibienne bien que *Legionella pneumophila* soit connue pour avoir la capacité de se répliquer à l'intérieur des amibes dans l'environnement et peut donc constituer un marqueur indirect de contamination amibienne.

Plusieurs types de traitements ont été proposés par le Conseil Supérieur d'Hygiène pour la désinfection des eaux mais dépendent essentiellement de la nature du matériau constitutif du

réseau de l'établissement (CSHPF, *et al.*, 1999). Lors d'un traitement des eaux minérales naturelles, la quantité de désinfectant introduite doit permettre une concentration cible identique à tout point du réseau pendant toute la durée du traitement et à la fin du protocole, un rinçage efficace doit être effectué pour éliminer toutes traces de désinfectant dans les eaux minérales naturelles circulantes.

Les différents traitements pouvant être utilisés dans les établissements thermaux sont le choc thermique (70°C dans l'ensemble du réseau), les composés chlorés (dioxyde de chlore, hypochlorite de calcium, de lithium, de potassium et de sodium (eau de Javel), le chlore et ses dérivés, les chloramines, le peroxyde d'hydrogène, la soude, le Sanosil<sup>®</sup> (peroxyde d'hydrogène associé à des ions argent) et plus récemment le PolyHexaméthylène Biguanide (PHMB ou Baquacil<sup>®</sup>) (PECASTAINGS, 2010).

### III. Procédés de désinfection des eaux

Nous l'avons vu, l'élimination des amibes libres dans les eaux repose en pratique sur le traitement chimique. Les dérivés chlorés demeurent les plus utilisés, mais d'autres procédés ont été expérimentés.

#### III.1 Chlore

Deux traitements existent, soit par l'eau de Javel ou par les monochloramines. L'eau de Javel est rapidement consommée par les substances organiques dissoutes dans l'eau et par les températures élevées (40°C l'été) tandis que les monochloramines ont un temps de décroissance beaucoup plus long mais un pouvoir désinfectant plus faible.

Une teneur en chlore libre résiduel de 0,5mg/l, sous sa forme active d'acide hypochloreux (HOCl<sub>2</sub>), est suffisante pour tuer à la fois les kystes et les trophozoïtes de *Naegleria fowleri*. Malheureusement, une teneur en HOCl<sub>2</sub> atteignant 10mg/l n'a pas suffi à éradiquer complètement les *Naegleria* d'une piscine. Ces résultats contradictoires pourraient être liés à d'autres facteurs tels que le pH, la température, la présence de débris organiques, de soleil,... En outre, les kystes d'*Acanthamoeba* semblent pouvoir résister à des teneurs en chlore de 40mg/l.

Des essais de désinfections ont été menés dans des installations industrielles, ainsi, la chloration des eaux de refroidissement d'une centrale électrique aux Etats-Unis a permis d'atteindre des concentrations de chlore libre résiduel et de chlore total résiduel situées entre 0,8 et 20mg/l avec pour résultat une diminution importante (facteur 50 à 100) de l'abondance de *Naegleria fowleri* (BARD, *et al.*, 1995).

La traitement des eaux par chloration présente l'avantage d'avoir un coût de fonctionnement faible mais présente de grands risques pour l'environnement.

#### III.2 Brome

La bromation de l'eau en milieu expérimental (absence de bactéries, de particules organiques,...) à hauteur de 40 mg/l de brome total pendant 1h ou à 20 mg/l pendant 2h

conduit à une inhibition de 100% d'*Acanthamoeba polyphaga*. Ces teneurs semblent rendre cet halogène inutilisable pour les eaux de baignades (BARD, *et al.*, 1995).

En effet, le brome peut provoquer, à ces concentrations, un dysfonctionnement du système nerveux et une perturbation du matériel génétique mais également provoquer des dommages au niveau du foie, des reins, des poumons, de l'estomac et du système gastro-intestinal. Certaines formes de composés organiques bromés, comme le bromure d'éthylène, peuvent même provoquer un cancer.

### III.3 Baquacil<sup>®</sup>

Le Baquacil<sup>®</sup> est une solution à 20% de chlorure de PolyHexaMéthylène de Biguanide (PHMB) qui ne semble active qu'en milieu modérément pollué ce qui limite son utilisation. En outre, il ne détruit pas les kystes (BARD, *et al.*, 1995). Breveté en 1977 pour le traitement sans chlore des spas et des piscines, il garantit le même niveau de désinfection que le chlore ou le brome. Les biguanides sont des molécules qui peuvent avoir deux effets bactéricides sur les microorganismes en fonction de leurs concentrations :

– De 20 à 50 ppm, les biguanides entraînent des lésions et la fuite des éléments cytoplasmiques (ions, cations bivalents puis molécules organiques dont l'ADN) en adhérant aux membranes ou parois.

– Si la concentration en PHMB est supérieure à 100 ppm, on observe plutôt une coagulation du cytoplasme et la précipitation des protéines et des acides nucléiques (FLEURETTE, *et al.*, 1995).

Le PHMB a l'avantage d'être sans odeur, de donner une sensation de douceur à l'eau et permet une souplesse d'utilisation avec les variations de pH ou les hausses de température (ARCH WATER PRODUCTS EUROPE, 2013). Il est à noter que le PHMB n'est à ce jour pas agréé pour la désinfection des réseaux d'eau, ni d'EMN (PECASTAINGS, 2010).

### III.4 Ozone

Pour la désinfection de l'eau, l'ozone présente des avantages par rapport au chlore puisqu'il ne reste pas présent dans l'eau, n'altère pas son goût et ne provoque pas l'apparition de composés organochlorés qui peuvent être cancérigènes. Cependant, l'ozone ne permet pas l'éradication de tous les micro-organismes.

Un produit temps-concentration en ozone de 1,29 mg.min/l permet d'atteindre une destruction de 99,9% des kystes de *Naegleria*. Si la température du milieu est de 5°C, il faut atteindre un produit temps-concentration de 4,23 mg.min/l pour obtenir les mêmes résultats.

L'ozonation peut constituer un traitement efficace contre les trophozoïtes d'*Acanthamoeba* et de *Naegleria*. Cependant, même si l'ozone se révèle plus efficace que la chloration sur les kystes d'*Acanthamoeba*, cela n'est pas vrai pour ceux de *Naegleria*.

Le traitement ne permet tout de même pas l'élimination complète des kystes de *Naegleria fowleri* et d'*Acanthamoeba* même pour des valeurs maximales (0,4 mg/l d'ozone pendant 4 minutes) (BARD, *et al.*, 1995).

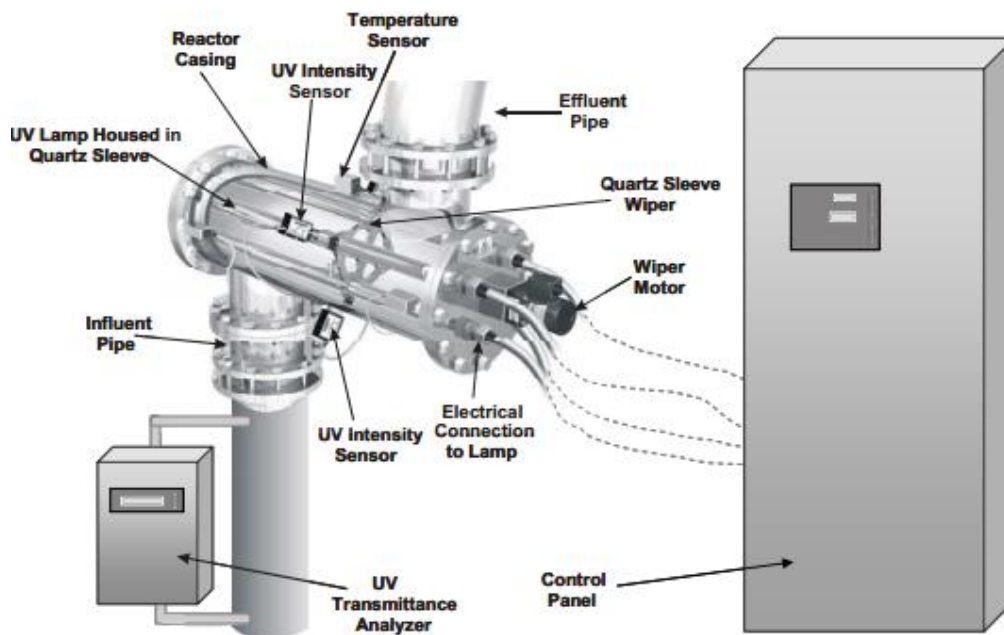
L'ozonation de l'eau présente des performances élevées pour la désinfection des eaux par rapport aux autres procédés de désinfection. Cependant, son coût élevé et la complexité de sa mise en place en limite son utilisation.

### III.5 Rayonnements ultraviolets

Le dispositif de traitement de l'eau utilise les rayonnements ultraviolets (UV), ondes lumineuses de longueur d'onde comprise entre 100 et 400 nm, au sein d'une chambre d'irradiation (Figure 28). L'eau traverse l'appareil et les cellules vivantes contenues dans le liquide sont irradiées par les rayons UV (BEN MESSAOUD, 2009).

Les rayons UV ont une action photochimique sur les corps qui se manifeste par diverses réactions : pigmentation de la peau par les UV-A (400 à 315 nm), synthèse de vitamine D par les UV-B (315 à 280 nm) et destruction des micro-organismes par les UV-C (280 à 200 nm), les UV à ondes courtes (< 200 nm) induisent la production d'ozone à partir d'oxygène et sont absorbés par la plupart des milieux (ANSES, 2010).

L'activation d'atomes de mercure est la technologie la plus répandue pour la génération de rayonnements UV utilisables en traitement d'eau. Les atomes de mercure excités à différents niveaux d'énergie supérieure vont générer un spectre de raies (c'est-à-dire émission de radiations lumineuses à différentes longueurs d'onde discrètes, d'intensité variable) lors de leur retour à l'état fondamental (ANSES, 2010).



**Figure 28 : Exemple d'équipement de désinfection par rayonnements ultraviolets (USEPA, 2006).**

L'action stérilisante est due à la perturbation apportée par le rayonnement ultraviolet dans la structure chimique des constituants de la cellule vivante et de leur fonctionnement. Le meilleur effet bactéricide est obtenu pour des longueurs d'onde comprises entre 250 et 260 nm.

Les avantages de ce système de désinfection sont l'absence de produits de réaction, l'utilisation simple et facilement réalisable sur les systèmes hydrauliques déjà en place, le coût de fonctionnement relativement bas.

### III.6 Comparaison des cinétiques d'action des différents traitements

Il apparaît que les performances de chacune de ces molécules dépendent des paramètres physiques et des contenus en ions, matières organiques,... du milieu.

Le tableau suivant présente les résultats de la comparaison dans des conditions expérimentales de l'effet désinfectant du chlore, du dioxyde de chlore, de l'ozone et d'un ammonium quaternaire (tensio-actif), le bromure de de-décyl diméthyle ammonium (Deciquam 222<sup>®</sup>)

Le pouvoir amoebicide des différents désinfectants est mesuré dans les conditions suivantes : pH 7 ; température : 25°C, concentration initiale d'amibes : 10 000/cm<sup>3</sup>, durée de la désinfection : 30 minutes (Tableau 2).

**Tableau 2 : Pouvoir amoebicide du dioxyde de chlore (ClO<sub>2</sub>), de l'ozone et du Deciquam 222<sup>®</sup> (CURSON, et al., 1980).**

Espèces	Concentration ClO <sub>2</sub> (mg/l)		Nombre d'amibes après 30 min	Concentration O <sub>3</sub> (mg/l) 30 min		Nombre d'amibes après 30 min	Concentration Deciquam 222 <sup>®</sup>	Nombre d'amibes après 30 min
	Initial	Finale		Initiale	Finale			
<i>N. gruberi</i>	1,1	0,25	40	6,75	0,08	20	0,05	
	1,1	0,25	30				0,025	4
	1,0	0,25	40					
<i>N. fowleri</i>	2,0	0,5	8	6,75	0,075	20	0,05	
	1,6	0,35	15				0,025	2
	1,3	0,25	20					
<i>A. castellanii</i>	3,4	0,75		6,75	0,078	20	0,05	
	2,9	0,65	1				0,025	6
	2,6	0,6	3					
<i>A. culbertsoni</i>	3,4	0,75		6,75	0,08	0,05		
	2,5	0,6	1				0,025	2

Si les performances sont bonnes à conditions physiques égales pour le chlore et le dioxyde de chlore dans des eaux modérément chargées en particules organiques et en bactéries, il n'en va pas de même en cas de pollution massive (BARD, *et al.*, 1995).



### **III.7 Autres procédés de désinfections**

#### **III.7.1 Température**

Une fluctuation de température entre 22°C et 4°C détruit les kystes de *Naegleria fowleri* comme d'ailleurs une température maintenue à 35°C pendant 14 jours, ce qui implique que les rejets thermiques intermittents pourraient jouer un rôle inhibiteur notamment les rejets industriels. Cependant, pour *Acanthamoeba*, une action sur les températures pour la prévention est illusoire (BARD, *et al.*, 1995).

#### **III.7.2 Calcium**

Le calcium concentré à 50mmol/l a montré une action destructrice expérimentale sur *Naegleria fowleri*.

#### **III.7.3 Présence de bactéries**

La présence de bactéries en grande quantité telles que *Pseudomonas fluorescens* ou *Serratia marcescens* inhibe le développement de *Naegleria fowleri*.

L'oxygénation, la présence de grande quantité de fer et aussi un pH très haut ou très bas dans l'environnement ont le même effet sur cette amibe libre.

Les résultats expérimentaux ne s'appliquent pas nécessairement aux conditions réelles, l'eau utilisée dans l'expérimentation est en général distillée c'est-à-dire qu'elle ne présente pas de particules en suspension ni de bactéries. Aussi, les résultats expérimentaux ne prennent pas en compte l'existence de « micro-niches » écologiques, telles que les fentes dans le carrelage de piscine, anfractuosités,... qui pourraient protéger les amibes de l'action de l'eau de Javel.

En comparaison de la plupart des amibes libres dans l'environnement, l'espèce *Naegleria fowleri* ne semble pas particulièrement résistante aux traitements chimiques usuels de désinfection de l'eau potable. Une concentration en chlore libre résiduel de 1 mg/l semble suffisante pour inactiver les trophozoïtes (forme infectante) à condition que la charge en matière organique de l'eau ne soit pas trop élevée. La résistance des kystes aux rayonnements UV nécessite une exposition à 600 J/m<sup>2</sup> pour les inactiver (ANSES, 2013).

## **IV. Résistance des amibes face aux différents procédés de désinfection des eaux**

Un des problèmes majeurs liés à l'évaluation de l'efficacité des biocides sur des microorganismes est d'évaluer les différences de résultats obtenus ainsi que leur impact. Ceci est d'autant plus vrai dans le cas des protozoaires puisqu'il n'existe à ce jour pas de méthode de référence standardisée comme pour les bactéries ou les virus. Les méthodes utilisées sont très variables. Le choix des souches testées, la composition du milieu de culture utilisé pour la croissance des trophozoïtes ou l'enkystement, le mode de préparation des kystes et leur âge ou encore la méthode utilisée pour évaluer la viabilité des kystes après traitement sont autant de variables à prendre en compte ce qui rend plus que complexe la comparaison des différentes études. De plus, l'effet d'un biocide peut varier en fonction de la formulation associée, ce qui

a été particulièrement démontré en ce qui concerne les produits de désinfection des lentilles de contact (JOHNSON, et al., 2009).

#### **IV.1 Facteurs influençant la croissance et la prédation des amibes libres**

Les amibes libres ont une double importance : écologique et de santé publique. Les implications au niveau de la santé publique sont bien connues, et un grand nombre de publications rapportent des pathologies liées aux amibes libres dans toutes les régions du globe. Cependant, trop peu d'études encore s'attachent à rechercher quelles sont les conditions favorables au développement des amibes libres pathogènes (température, proies,...), quels indicateurs pourraient signaler la présence de ces amibes et quels moyens de contrôle pourraient éventuellement être mise en place (HELUIN, 2013).

La présence quasi-ubiquitaire d'*Acanthamoeba* et de sa forme de résistance (le kyste) rend chimérique toute tentative de contrôle ou d'élimination des plans d'eau à risque, mais l'encéphalite granulomateuse amibienne étant une pathologie touchant des individus immunodéprimés uniquement, l'eau n'est en général pas le vecteur de ces infections gravissimes. Cela est d'autant plus vrai que l'amibe peut survivre dans des milieux secs. *Naegleria fowleri*, qui au contraire peut atteindre indifféremment tout individu, est un pathogène à surveiller et à éliminer si possible. Le seuil réglementaire actuellement fixé par le Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France (avis de 4 mai 2004) est de 100 *Naegleria fowleri* par litre d'eau de rejet en aval des centrales thermiques (CSHPF, 2014).

##### **IV.1.1 Influence de la température**

Le premier facteur important à avoir été identifié est la température. *Naegleria fowleri* est une amibe thermotolérante. *In vitro*, le domaine de préférence thermique pour *Naegleria fowleri* se situe entre 20 et 45°C, avec un optimum thermique à 43°C (GOUDOT, 2012). Les souches pathogènes de *Naegleria fowleri* sont capables de croître à des températures supérieures à 45°C-46°C. Cependant, elles résistent très mal à de basses températures (BIDDICK, et al., 1984).

La nature précise du rôle joué par la température de l'eau dans la croissance de *Naegleria fowleri* n'est toujours pas réellement comprise et fait l'objet de controverse. Si certains auteurs reconnaissent les sources d'eaux chaudes comme réels déterminants de leurs croissances, d'autres, tel que GRIFFIN (1983), affirme qu'une augmentation de la température de l'eau n'est pas la seule explication à la prédominance de *Naegleria* dans les sources chaudes. En effet, les compétiteurs naturels de *Naegleria fowleri* comme l'amibe libre *Acanthamoeba* sont plus résistantes à la chaleur. Selon son hypothèse, « Flagellate-Empty Habitat Hypothesis » (Hypothèse de la niche dépourvue de flagellés), GRIFFIN (1983) démontre que l'occurrence de *Naegleria fowleri* dans certaines niches serait due à un avantage sélectif de l'amibe par rapport à ses compétiteurs : la forme flagellée. L'amibe serait donc capable de coloniser plus rapidement un environnement vidé de ses occupants par les eaux des circuits de refroidissement des centrales thermiques par exemple.

Ce point de vue considère donc l'augmentation de la température non pas comme un facteur décisif de la présence de l'amibe mais seulement comme un facteur de risque de la rencontrer.

L'augmentation de température jouerait donc un rôle dans la création d'un habitat dépourvu d'autres espèces en éliminant les amibes non thermophiles ainsi que dans la vitesse de recolonisation de cet habitat par la forme flagellé de *Naegleria fowleri* (HELUIN, 2013).

GUPTA et DAS (1999) ont prouvé que la température a un effet sur la pathogénicité des souches de *Naegleria fowleri*. En effet, ils ont mis en évidence une perte croissante de la virulence entre 25 et -15°C.

Des souches d'*Acanthamoeba* ont pu être cultivées à des températures allant de 21 à 43°C, les souches pathogènes ont montré une plus grande tolérance aux fortes températures (HELUIN, 2013).

#### **IV.1.2 Influence de la présence de proies et de nutriments**

Après la température, un second facteur important pour la croissance des amibes amphizoïques a été mise en évidence : les proies. En effet, les amibes amphizoïques, si elles peuvent survivre en absorbant uniquement des nutriments en suspension, ne se multiplient de manière rapide et significative qu'en présence de proies appropriées, des bactéries pour la plupart (HELUIN, 2013).

En milieu axénique, la croissance de *Naegleria lovaniensis* (modèle non pathogène de *Naegleria fowleri*) peut se faire mais la vitesse de croissance se fera différemment suivant la température à laquelle le milieu est mis. En effet, *Naegleria* ne peut, en milieu axénique, se multiplier à 21°C, mais si des bactéries sont présentes, cela est rendu possible. Cependant, aucune forme flagellée de *Naegleria* ne sera observée en l'absence de proie. La forme flagellée apparaît si le nombre d'amibes est suffisant et si le nombre de bactéries du milieu est important (HELUIN, 2013).

*Acanthamoeba* se multiplie plus ou moins vite en fonction de la quantité et du type de bactéries inoculé dans son milieu, en particulier des bactéries Gram négatives tels que *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* ou encore *Stenotrophomonas maltophilia*. Différentes études ont montré qu'*E.coli* et *S. maltophilia* constituent une meilleure source nutritive pour *Acanthamoeba* par rapport à *S. epidermidis*, *S. marcescens* et *P.aeruginosa* et l'ingestion de bactéries vivantes (plutôt que tuées) a permis une meilleure multiplication de l'amibe (WANG, et al., 1996).

Cependant, de trop fortes concentrations de bactéries inhibent la croissance amibienne. AVERY *et al* (1995) a ainsi démontré que la diminution du pH, provoqué par le grand nombre de bactéries dans le milieu, pourrait exacerber l'enkystement et la mort du trophozoïte. La production par la bactérie de substances inhibitrices telle que la phospholipase peut également contribuer à la diminution du nombre d'amibes (WANG, et al., 1996). *Acanthamoeba* est capable de croître à 21°C et à 34°C quelle que soit la source de nutriments (xénique ou axénique) (HELUIN, 2013).

En 2008, JUNG *et al* ont montré que les souches environnementales d'*Acanthamoeba* ingèrent beaucoup plus de bactéries que les souches isolées sur les patients. La qualité et la quantité des proies disponibles pour la croissance des amibes sont donc essentielles.

*Balamuthia mandrillaris* ne semble pas se développer en présence de bactéries comme source de nourriture mais a été cultivé à partir de tissu provenant du cerveau en tant que source d'alimentation (SCHUSTER, 2002).

#### **IV.1.3 Relation entre les différents facteurs**

Les concentrations de *Naegleria fowleri*, autour de la centrale française de Cattenom, ne sont pas corrélées avec les effets saisonniers ou avec l'une des caractéristiques d'exploitation des centrales considérées séparément. Un index prédictif qui prend en compte simultanément les variations d'une série de facteurs tel que la diversité de la microfaune, le fer dissous, le pH, la salinité, la chloration ainsi que les perturbations environnementales que peuvent engendrer l'activité de la centrale, a été défini par PERNIN et PELANDAKIS. Ils ont observés une corrélation entre les concentrations de *Naegleria fowleri* et les valeurs de l'index prédictif ce qui tend à confirmer l'hypothèse faite par GRIFFIN (1983) (PERNIN, *et al.*, 2002).

#### **IV.1.4 Influence des métaux lourds : effet inhibiteur du cuivre**

Contrairement au fer qui a un effet positif sur le développement de *Naegleria*, le cuivre produit un fort effet inhibiteur sur le développement de *Naegleria* et notamment sur *Naegleria fowleri*. Ceci a été démontré par une étude sur la contamination des circuits d'eau des centrales électriques par *Naegleria* en fonction de la matière de leurs condensateurs. Plus de 3000 souches de *Naegleria* ont été isolées et identifiées ; *Naegleria fowleri* a représenté 60% des souches isolées à partir des systèmes équipés de condensateurs en acier inoxydable, alors que cette espèce pathogène ne dépasse pas 6% des souches de *Naegleria* isolés à partir des systèmes avec des condensateurs en laiton. De la même façon, les concentrations de *Naegleria fowleri* sont en moyenne près de 60 fois plus élevée dans les systèmes de refroidissement équipés d'acier inoxydable que dans les centrales avec des condensateurs de laiton. Ces différences très significatives sont le résultat d'une forte inhibition dû à l'effet toxique du cuivre qui est présent dans le laiton et qui est libéré dans l'eau par la corrosion (PERNIN, *et al.*, 2002).

#### **IV.2 Interaction des amibes libres avec des micro-organismes**

Les amibes libres se nourrissent principalement de bactéries, de champignons et d'algues par phagocytose. Au fil de l'évolution, certaines espèces bactériennes y sont devenues résistantes. Ces bactéries, non digérées par des amibes, peuvent être lytiques pour leurs hôtes ou au contraire se comporter comme de véritables endosymbiontes qui ne peuvent se répliquer qu'à l'intérieur des amibes libres. Ces dernières servent alors de réservoir pour les bactéries internalisées (GREUB, *et al.*, 2004).

Les amibes jouent un rôle dans la transmission cellulaire en produisant des vésicules remplies de bactéries. Elles représentent également un berceau évolutif pour les bactéries internalisées. En effet, des adaptations génétiques réciproques ont lieu depuis des années, amenant les amibes à améliorer leur potentiel microbicide et les bactéries à développer une résistance qui leur permet de survivre au sein des amibes.

Les amibes, sous forme kystique, résistent aux premières lignes de défense immunitaires et à certains produits désinfectants tels que le chlore. En hébergeant les bactéries, elles leur permet de résister à ces agressions.

Pour des raisons encore inconnues, *Acanthamoeba*, plus que d'autres amibes, est souvent susceptibles d'abriter des bactéries symbiotiques. Bien que leur présence ne soit pas directement liée à la culture de l'amibe, ces bactéries sont d'un intérêt considérable puisqu'elles jouent un rôle dans la promotion de la virulence des amibes.

*Acanthamoeba* a ainsi été impliquée comme hôte potentiel pour *Legionella spp.*, l'agent causal de la légionellose et de la fièvre de Pontiac. D'autres bactéries pathogènes ou potentiellement pathogènes ont été décrites en association avec *Acanthamoeba* telles que *Mycobacterium avium*, *Listeria monocytogenes*, *Burkholderia pseudomallei*, *Escherichia coli* de sérotype O157, *Chlamydia spp.* et *Chlamydia like* ainsi que *Vibrio cholerae* (SCHUSTER, 2002).

De la même façon que *Acanthamoeba spp.*, et *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris* peut devenir l'hôte de bactéries pathogènes tel que *Legionella pneumophila* et en assurer donc la survie. La capacité des amibes à héberger ces bactéries augmente le pouvoir infectieux de celle-ci en augmentant leur transmission à d'autres hôtes sensibles et peut également augmenter le pouvoir pathogène de l'amibe.

Une fois phagocyté par *Balamuthia*, *Legionella pneumophila* reste et se multiplie dans de grandes vacuoles à l'intérieur de l'amibe jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de place dans l'amibe ce qui conduit à la destruction de cette dernière et donc à la libération des bactéries dans l'environnement.

*Balamuthia mandrillaris* pouvant abriter des bactéries pathogènes et favoriser leur multiplication, elle constitue un véritable vecteur de transmission de pathologies bactériennes.

## **V. Indicateurs de qualité des eaux et technique de détection des amibes en rivière**

### **V.1 Les indicateurs de contamination des eaux de loisirs**

#### **V.1.1 Indicateurs de contamination des baignades en eaux libres**

La réglementation concernant la qualité des eaux de baignade est actuellement définie par la directive européenne 76/160/CEE de 1975 qui vise à prévenir l'exposition des baigneurs aux risques liés à la baignade comme la contamination microbiologique ou les risques de gastro-entérite et ORL. Cette réglementation a récemment évolué avec la nouvelle directive européenne 2006/7/CE du 15 février 2006 qui remplacera progressivement la directive de 1975 jusqu'à l'abrogation totale de cette dernière au 31 décembre 2014. Cette directive a été transposée en droit français dans le Code de la Santé Publique (CSP) en 2008.

Jusqu'à présent, les objectifs de qualité fixés en France ne concernaient que les cours d'eau. Dans le prolongement de la loi sur l'eau de 1992, qui avait affirmé le principe d'unicité de la ressource en eau, tous les milieux doivent répondre à des objectifs de bon état. C'est dans ce but que la nouvelle directive concerne tous les milieux tels que les cours d'eau, les lacs, les eaux souterraines, le littoral, etc.

La nouvelle directive prévoit que seuls deux paramètres microbiologiques seront à contrôler : les entérocoques intestinaux et les *Escherichia coli* et en fixe les valeurs seuils en eau douce (Tableau 3) et en eau de mer (Tableau 4) (PARLEMENT EUROPEEN, 15 février 2006).

**Tableau 3: Valeurs seuils et classes de qualité pour l'eau douce dans la directive 2006/7/CE.**

Qualité de l'eau	Excellente qualité	Bonne qualité	Qualité suffisante
Entérocoques intestinaux	200 UFC/100 ml	400 UFC/100 ml	330 UFC/100 ml
<i>Escherichia coli</i>	500 UFC/100 ml	1000 UFC/100 ml	900 UFC/100 ml

**Tableau 4 : Valeurs seuils et classes de qualité pour l'eau de mer dans la directive 2006/7/CE.**

Qualité de l'eau	Excellente qualité	Bonne qualité	Qualité suffisante
Entérocoques intestinaux	100 UFC/100 ml	200 UFC/100 ml	185 UFC/100 ml
<i>Escherichia coli</i>	250 UFC/100 ml	500 UFC/100 ml	500 UFC/100 ml

En fonction des résultats des analyses effectuées sur une période de 4 ans, à raison de quatre prélèvements et analyses par saison balnéaire minimum, et selon une méthode de calcul statistique, les eaux de baignade seront alors classées selon leur qualité : insuffisante, suffisante, bonne ou excellente. L'objectif fixé par la directive est d'atteindre une qualité d'eau au moins suffisante pour l'ensemble des eaux de baignade à la fin de la saison 2015 (MINISTERE DU DEVELOPPEMENT DURABLE, 2009).

Cependant, la directive 2006/7/CE du Parlement européen et du Conseil du 15 février 2006, en son article premier exclut les bassins de natation et de cure, les eaux captives qui sont soumises à un traitement ou sont utilisées à des fins thérapeutiques, les eaux captives artificielles séparées des eaux de surface et des eaux souterraines.

### **V.1.2 Indicateurs de contamination des baignades en eaux superficielles**

En juillet 2009, l'ANSES a produit un rapport d'expertise collective relatif à l'évaluation des risques sanitaires liés aux baignades artificielles non encadrées par la réglementation en vigueur.

Le rapport d'expertise collective de l'ANSES relatif à l'évaluation des risques sanitaires liés aux baignades artificielles de juillet 2009, souligne le besoin d'encadrer et d'accompagner le développement des baignades artificielles, par la mise en place d'un dispositif de gestion des risques sanitaires spécifique qui intégrerait notamment :

- la surveillance de paramètres microbiologiques spécifiques ;
- l'application de mesures d'hygiène strictes et la limitation du nombre de baigneurs par bassin ;

- la rédaction d'un profil de vulnérabilité de la baignade et l'application d'un délai maximum de renouvellement de l'eau ;
- le respect de prescriptions techniques minimales pour leur exploitation ;
- l'inscription sur une liste d'autorisation de mise sur le marché des systèmes ou procédés de traitement ;
- la mise en œuvre d'un dispositif de gestion des situations de non-conformité ;
- la mise en œuvre d'un dispositif de gestion d'une période transitoire dans l'attente d'une réglementation dédiée.

En l'absence de réglementation dédiée, les exigences de qualité des eaux qui leur sont appliquées correspondent généralement à celles des eaux de baignade, quel que soit l'éventuel traitement appliqué, hors traitement de chloration. Dans le cas des baignades chlorées, le contrôle sanitaire des eaux est adapté à partir des exigences préconisées pour les piscines.

Les indicateurs à examiner afin de respecter les exigences de qualité pour les paramètres microbiologiques indicateurs de la contamination fécale (germes indicateurs de la contamination fécale – GICF) sont rassemblés au tableau 5.

**Tableau 5 : Paramètres microbiologiques indicateurs de la contamination fécale des eaux de baignade et seuils de gestion (décret n°2008-990 du 18 septembre 2008).**

<b>Paramètres GICF</b>	<b>Valeur guide (UFC/100 ml)</b>	<b>Valeur impérative (UFC/100 ml)</b>
<b>Coliformes totaux</b>	500	10 000
<b>Coliformes thermotolérants (fécaux)</b>	100	2 000
<b>Streptocoques fécaux</b>	100	Pas de valeur impérative

Dans certaines circonstances, tel que le dépassement de ces valeurs limites, la recherche de pathogènes supplémentaires comme les Salmonelles ou les Entérocoques peut être réalisée (AFSSET, 2009).

### **V.1.3 Indicateurs de contamination des piscines**

Le CSP (Code de la Santé Publique) spécifie à l'article D1332-2 les exigences de qualité sanitaire des eaux des piscines désinfectées par un traitement de chloration. S'agissant de la qualité microbiologique spécifiquement, les obligations de résultats sont les suivantes :

- nombre de bactéries aérobies revivifiables à 37°C inférieur à 100 UFC pour 1 ml,
- nombre de coliformes totaux inférieur à 10 UFC dans 100 ml et absence de coliformes fécaux dans 100 ml,

- absence de germe pathogène, notamment de staphylocoque pathogène dans 100 ml pour 90% des échantillons (AFSSET, 2009).

#### V.1.4 Indicateurs de contamination des eaux thermales

Le thermalisme étant basé sur l'utilisation des eaux minérales naturelles, les indicateurs de contamination des sources d'eau minérale comprennent les coliformes à 37°C, les coliformes thermotolérants, les Streptocoques fécaux, les bactéries anaérobies sporulés sulfito-réducteurs, *Pseudomonas aeruginosa*, les légionelles dont *Legionella pneumophila*. Les normes de qualité microbiologique de l'eau minérale naturelle sont rassemblées dans le tableau 6 (Arrêté du 19 juin 2000).

**Tableau 6 : Normes de qualité microbiologique de l'eau minérale naturelle (Arrêté du 19 juin 2000, 2000)**

	SOURCE	POINTS D'USAGE		
		(1)	(2)	(3)
<b>Coliformes à 37°C dans 250 ml</b>	Absence	Absence	Absence	Absence
<b>Coliformes thermotolérants (<i>Escherichia coli</i>) à 44,5°C dans 250 ml</b>	Absence	Absence	Absence	Absence
<b>Streptocoques fécaux (entérocoques) dans 250 ml</b>	Absence	Absence	Absence	Absence
<b>Anaérobies sporulés sulfito-réducteurs dans 50 ml</b>	Absence	Absence	Absence	Absence
<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i> dans 250 ml</b>	Absence	Absence	Absence	Absence
<b>Légionnelle / <i>Legionella pneumophila</i> dans 1 litre</b>	Absence	Absence	Absence	Absence
« Absence » signifie inférieur au seuil de détection de la méthode normalisée. (1) Soins de contact direct avec les muqueuses respiratoires ou susceptibles de provoquer un contact avec les muqueuses oculaires et respiratoires. (2) Soins en contact avec les autres muqueuses internes et ingestion d'eau minérale naturelle. (3) Soins externes individuels (bains, douches) ou collectifs (couloir de marche,...)				

#### V.2 Les techniques de détection des amibes libres

Il n'existe pas de procédure standard pour le contrôle du développement d'amibes dans les circuits d'eau et pour les rechercher dans les biofilms. Trop de paramètres physiques, chimiques et biologiques entrent en lignes de compte.

Le problème global de la mise en évidence des amibes libres dans l'environnement est lié à un manque de représentativité de l'échantillonnage ainsi qu'à la variabilité du rendement des techniques d'analyse.

Le manque de représentativité est dû aux emplacements des points de prélèvements, à la périodicité des prélèvements ainsi qu'aux volumes prélevés. De même, les résultats d'analyse sont dépendants du type d'échantillons (eau ou sédiments), du volume analysé, de la technique de concentration (filtration ou centrifugation), de la méthode de culture (milieu de



culture, température d'incubation) et de la méthode d'identification (immunologique, biochimique, génétique, test de pathogénicité). Aucune approche uniforme et validée ne semble exister à l'heure actuelle, sur l'ensemble de ces points. Certaines idées directrices peuvent cependant être tirées des études concernant l'écologie des amibes libres (BARD, *et al.*, 1995).

Afin de trouver un traitement adéquat pour l'élimination des amibes dans l'environnement, il faut dans un premier temps, trouver une méthode standardisée afin de pouvoir les détecter (MENTION, 2007).

## **V.2.1 Isolement de l'amibe de l'environnement**

### ***V.2.1.1 Choix des points de prélèvement***

La distribution spatiale et temporelle des amibes est influencée par la dynamique des masses d'eaux étudiées. Dans les lacs, les courants d'eau faibles ou inexistant favorisent le dépôt des matières en suspension, dont les amibes, sur le fond. Des études faites en Moselle par EDF (Électricité De France) en 1986 ont montrées que les amibes libres sont détectées plus fréquemment à partir de l'eau qu'à partir des sédiments, en période estivale.

Pour les stations représentatives de l'ensemble du cours d'eau (par exemple en amont et en aval d'une installation industrielle), un seul point par station suffit : le point exact de prélèvement doit se situer dans une zone de courant susceptible d'homogénéiser le milieu. En revanche, compte tenu de l'homogénéité des concentrations en *Naegleria* constatée le long des rives, il semble préférable dans les zones de baignade généralement situées le long du rivage à faible profondeur d'effectuer des prélèvements en au moins deux points de ces zones. Cette dernière recommandation s'applique aussi bien dans les lacs que dans les cours d'eau (BARD, *et al.*, 1995).

### ***V.2.1.2 Fréquence d'échantillonnage***

La période la plus représentative du risque lié à l'exposition aux amibes est celle de juin à octobre sous nos climats sans différence de résultats quant à l'heure du prélèvement. Cependant, l'hétérogénéité des résultats est importante d'un jour à l'autre de la semaine. L'intérêt serait donc d'effectuer deux prélèvements à un jour d'intervalle à deux moments différents de la période estivale (BARD, *et al.*, 1995).

### ***V.2.1.3 Volume des échantillons***

Le volume des échantillons à prélever doit être d'autant plus grand que la concentration que l'on cherche à détecter est faible. Cependant, la méthode de détection de *Naegleria fowleri*, basée sur la mise en culture en boîte de Pétri, ne permet pas de mettre en évidence cette espèce en présence d'une quantité importante d'autres organismes thermophiles tels que d'autres amibes, des champignons ou encore des bactéries. Ceci conduit à diminuer le volume des échantillons pour faciliter la lecture des boîtes de Pétri et à multiplier le nombre de répétitions de manière à respecter le seuil de détection choisi. (BARD, *et al.*, 1995)

En pratique, pour pouvoir observer facilement les amibes se développant dans les boîtes de Pétri, il ne faut pas dépasser dix plages d'amibes thermophiles par boîte. Connaissant l'ordre de grandeur de la concentration en amibes thermophiles dans le milieu étudié, ceci permet de déduire le volume maximal de l'échantillon. Le nombre de répétitions est alors fixé de manière à pouvoir mettre en évidence le seuil de détection préalablement choisi.

A titre d'exemple, dans les eaux riches en amibes thermophiles (concentration supérieure à 10 amibes par litre), il faut avoir recours à 200 répétitions de 100 ml pour respecter une limite de détection de 0,1 *Naegleria fowleri* par litre, soit 200 boîtes de culture pour un seul prélèvement. Si l'on diminue le nombre de répétitions par prélèvement, la probabilité de détection ainsi que la précision relative vont être affectées (BARD, *et al.*, 1995).

Entre l'automne 2007 et l'été 2009, EDF a effectué 21 campagnes d'échantillonnage dans divers circuits de refroidissements de centrale nucléaire et rivière avoisinante afin de quantifier les espèces *Naegleria spp.*, *Hartmannella spp.* et *Nuclearia spp.* à ces endroits. Les volumes d'échantillons choisis ont été 10 échantillons de 1 ml et de 0,1 ml.

L'eau prélevée au niveau du site à examiner est filtrée ou centrifugée pour récupérer les amibes. En filtration, on dépose la membrane sur une boîte de culture qui permet aux amibes de se développer (BARD, *et al.*, 1995).

#### ***V.2.1.4 Filtration et centrifugation***

La dépression utilisée pour filtrer les échantillons doit être la plus faible possible (2 kPa pour les volumes de 100 ml, gravitaire pour 10 ml). La dépression utilisée pour les volumes de 1 et de 10 l, de l'ordre de 60 kPa, affecte certainement les amibes, mais il est pratiquement impossible de travailler à des dépressions moindres sur des eaux de rivière contenant des matières en suspension. Des essais sur des échantillons de 100 ml filtrés à des dépressions différentes (60 kPa, soit 250 ml/min, et 2 kPa, soit 20 ml/min) ont montré que la quantité de *Naegleria* récupérée à forte dépression (1 échantillon positif sur 3) était plus faible que celle récupérée à faible dépression (3 échantillons positifs sur 3) (BARD, *et al.*, 1995).

GARCIA *et al* (2013) ont effectué une étude, entre Janvier 2010 et Août 2011, dans la Communauté Autonome d'Aragne au Nord-Est de l'Espagne, afin d'identifier et de quantifier les amibes libres pathogènes dans les réservoirs qui fournissent les usines de traitement des eaux ainsi que dans ces dernières. Afin de filtrer les 68 échantillons obtenus au niveau du réservoir et les 15 échantillons de l'usine de traitement des eaux, une membrane de nitrate de cellulose (Filtre Millipore<sup>®</sup>, pore de 0,7 µm et diamètre de la membrane de 47 mm) a été utilisée.

Cependant aucune méthode standardisée n'a été mise en place pour la filtration non plus. Alors que les Anglais préconisent la filtration, les Australiens préfèrent la centrifugation (BARD, *et al.*, 1995).

Dans la mesure du possible, il est préférable de favoriser les ensemencements directs (sans filtration ni centrifugation) afin de limiter la perte des trophozoïtes et des kystes lors de

l'étape de concentration du contenu de l'échantillon mais également les phénomènes de compétitions inter-amibiennes lors de la culture sur gélose (ANSES, 2013)

#### **V.2.1.5 Mise en culture – Incubation**

Le milieu de culture le plus employé est constitué de gélose sans nutriment (NNA) recouverte de quelques millilitres d'une suspension bactérienne tel qu'*Escherichia coli* ATCC 25922 tué par la chaleur (GARCIA, et al., 2013). Un tel milieu favorise les espèces bactériophages comme les amibes libres. Les espèces bactériennes sélectionnées en tant que source de nutrition pour les amibes varient selon les auteurs mais ne modifient pas les résultats obtenus. La faible valeur nutritive du milieu diminue la croissance des bactéries et des champignons pouvant inhiber celle des amibes (BARD, et al., 1995).

Les boîtes sont ensuite scellées puis incubées à 30°C pendant 7 jours. Durant cette période, la croissance amibienne est contrôlée quotidiennement par examen microscopique, au microscope inversé, à un grossissement de 160 à 200. Les zones de croissance apparaissent généralement au bout de 3 à 4 jours d'incubation (GARCIA, et al., 2013).

Une fois la croissance observée, une partie de la gélose, contenant des kystes et des trophozoïtes, est coupée et placée dans un milieu de culture frais. Chaque culture est repiquée au moins deux fois afin d'isoler l'amibe (GARCIA, et al., 2013).

La mise en culture est une technique longue mais peu coûteuse. Cependant, la culture de l'espèce *Naegleria fowleri* nécessite un laboratoire certifié P3 c'est-à-dire que le laboratoire maintient une dépression par rapport à l'extérieur, l'air ambiant est aspiré et filtré avant la sortie, tous les réactifs sortant sont inactivés et tous les déchets sont décontaminés avant leur élimination. Le personnel d'un laboratoire certifié P3 dispose d'habits spécifiques et doit prendre une douche à la sortie du laboratoire. Afin de systématiser les techniques de détection des amibes libres et de permettre à tous les laboratoires d'effectuer l'identification des *Naegleria fowleri*, une technique de détection sans culture préalable est souhaitée.

#### **V.2.2 Dénombrement des amibes libres**

La méthode de dénombrement par détermination du Nombre le Plus Probable (NPP) permet d'estimer la concentration amibienne cultivable dans un échantillon. Cette méthode est une estimation statistique (loi de Poisson) du nombre de micro-organismes distribués aléatoirement dans un échantillon (ANSES, 2013). En pratique, on dépose dix fois le volume de 1ml et dix fois le volume de 0,1ml puis on dénombre les boîtes présentant au moins un front d'amibe. On compare les résultats à une table statistique qui donne le nombre le plus probable sur la dilution considérée.

#### **V.2.3 Identification des amibes libres**

Les premières méthodes développées afin d'identifier les amibes libres ont été des méthodes morphologiques par observations microscopiques. Cependant, bien que ces méthodes permettent l'identification du genre de l'amibe, elles ne permettent pas d'identifier l'espèce présente. Il est donc nécessaire de disposer de techniques d'identification spécifiques aux espèces pathogènes. Ces méthodes ont été développées ces dernières années pour l'espèce

*Naegleria fowleri*. En effet, au regard de la législation, le nombre maximal de *Naegleria fowleri* autorisé lorsque le risque d'exposition humaine existe est de 100 amibes par litre en France selon les recommandations du CSHPF (Conseil supérieur d'hygiène publique de France). Des méthodes biochimiques, immunologiques et moléculaires ont été mises au point, appliquées à des échantillons enrichis par ensemencement sur boîtes de culture. De nouvelles techniques plus rapides, sans mise en culture préalable ont été récemment développées : test d'immunofluorescence couplée à la cytométrie en phase solide, la PCR en temps réel ou encore la PCR quantitative. Les méthodes utilisées pour identifier les autres espèces mise en cause dans la pathogénicité humaine que sont *Acanthamoeba spp.*, *Balamuthia mandrillaris* et *Hartmannella vermiformis* se limitent aux méthodes morphologiques et moléculaires.

### ***V.2.3.1 Identification morphologique des amibes libres***

Les cultures amibiennes sont identifiées au microscope à l'aide de leurs caractéristiques morphologiques de leurs kystes et trophozoïtes en utilisant la taxonomie de Page (GARCIA, et al., 2013). Cependant, seul un œil avisé permet d'identifier précisément l'espèce observée. D'autres techniques d'identification doivent confirmer le diagnostic.

Le test de flagellation est effectué uniquement sur les amibes se développant à 44°C et présentant une morphologie caractéristique du genre *Naegleria*. Il permet uniquement la reconnaissance du genre. Il s'agit de la mise en suspension des trophozoïtes dans de l'eau distillée stérile. Le temps d'incubation de 4 à 5h puis l'observation microscopique permet de visualiser les formes flagellées nageant dans l'eau distillée.

Afin d'identifier l'espèce de *Naegleria fowleri*, le test le plus utilisé, jusqu'au milieu des années 80, était celui de la pathogénicité sur souris avec une déclaration de la méningo-encéphalite amibienne primitive. Aujourd'hui, plusieurs méthodes biochimiques (isoélectrofocalisation enzymatique, électrophorèse de fragments d'ADN obtenus avec des enzymes de restriction), immunologiques (anticorps monoclonaux), et génétiques (Polymorphisme de Longueur de Fragment de Restriction) se sont révélées comme des méthodes fiables pour l'identification de cette espèce. (BARD, et al., 1995)

Les sondes nucléiques associées aux techniques d'amplification des gènes (PCR) permettent de détecter directement les amibes sans nécessiter de phase de culture. C'est également le cas lors de l'usage de la cytométrie en flux.

### ***V.2.3.2 Identification par méthodes immunologiques***

#### **V.2.3.2.1 Méthode immuno-enzymatique ELISA (« Enzyme-linked Immunosorbent Assay »)**

##### ***V.2.3.2.1.1 Principe***

Le test ELISA permet la détection et la quantification d'antigènes variés et/ou d'anticorps dans différents types d'échantillons (sérum, plasma, salive, milieux environnementaux,...). Ils sont basés sur une reconnaissance antigène-anticorps, l'antigène étant la ou les molécules à détecter (GOUDOT, 2012).

#### *V.2.3.2.1.2 Application*

Afin d'identifier l'espèce *Naegleria fowleri*, l'anticorps monoclonal 5D12 est utilisé. Il réagit de manière spécifique avec les antigènes de la membrane de *Naegleria fowleri*. Cette méthode permet de détecter les trois formes de l'amibe (REVEILLER, *et al.*, 2000).

#### *V.2.3.2.2 Méthode d'immunofluorescence couplé à la cytométrie en phase solide*

La méthode d'immunofluorescence couplée à la cytométrie en phase solide repose sur la détection de *Naegleria fowleri* grâce à l'anticorps monoclonal spécifique 5D12, sans mise en culture de l'amibe. L'anticorps est couplé à la biotine, une enzyme qui va se fixer à la streptavidine marquée avec deux fluorochromes RPE-Cy5 (R-phycoerythrine-cyanine) afin de révéler *Naegleria fowleri*.

Dans un premier temps, l'échantillon d'eau est filtré sur une membrane de polycarbonate de porosité de 2 µm. Après marquage avec l'anticorps biotinylé et le complexe streptavidine-RPE-Cy5, la membrane est placée dans un cytomètre en phase solide afin de détecter une fluorescence. La quantification de *Naegleria fowleri* est réalisée après un examen microscopique nécessaire à l'élimination des évènements non spécifiques.

Cette méthode immunologique, bien que directe et rapide, ne fournit pas d'informations sur la viabilité des cellules et manque de sensibilité pour permettre la détection de faibles concentrations de pathogènes dans les eaux environnementales (POUGNARD, *et al.*, 2002).

#### *V.2.3.3 Identification par méthodes biochimiques*

L'identification des amibes par les méthodes biochimiques nécessite une culture des échantillons ainsi qu'une purification de ces derniers.

La méthode biochimique la plus utilisée repose sur le polymorphisme des locus enzymatiques. Afin de séparer les souches pathogènes des souches non pathogènes de *Naegleria*, cinq locus enzymatiques ont été examinés et ont montré que les souches d'une même espèce possèdent des profils enzymatiques identiques alors qu'une distinction a pu être faite entre *Naegleria gruberi*, *Naegleria lovaniensis* et *Naegleria fowleri* (NERAD, *et al.*, 1979). En étudiant le polymorphisme enzymatique des estérases, VISVESVARA (1980) a permis de différencier *Naegleria fowleri*, espèce pathogène, de *Naegleria gruberi*, non pathogène. Afin de faire une différence entre *Naegleria fowleri* et *Naegleria lovaniensis*, très proche phylogénétiquement, l'analyse de l'aspartate aminotransférase est possible (KILVINGTON, *et al.*, 1984). Le polymorphisme des estérases et des phosphatases acides a permis la distinction de 32 espèces d'*Acanthamoeba* (COSTAS, *et al.*, 1985).

La méthode de l'isoélectrofocalisation (IEF) est considérée comme la méthode la plus résolutive pour le typage des *Naegleria*. Cette méthode permet de séparer les protéines par électrophorèse en réalisant un gradient de pH. Les protéines sont alors séparées sur gel de polyacrylamide en fonction de leur point isoélectrique (dans ce cas, la charge nette de l'enzyme est nulle). PERNIN (1984) *et al* (1985) ont retenu l'acide malique et la thréonine afin de détecter de manière spécifique l'espèce pathogène *Naegleria fowleri* ainsi que les espèces *Naegleria lovaniensis* et *Naegleria australiensis*.

En 1995, Kilvington propose une méthode de détection de *Naegleria fowleri* et autres espèces de *Naegleria* par électrophorèse sur membrane d'acétate de cellulose (CAME) de l'isomérase phosphate glucose (GPI). Cette méthode permet de détecter spécifiquement : *N. fowleri*, *N. lovaniensis*, *N. australiensis* (spécificité des profils GPI). La préparation des échantillons, l'électrophorèse et la détection des protéines nécessitent 40 minutes sans compter la mise en culture à 45°C (KILVINGTON, 1995).

#### ***V.2.3.4 Identification par analyse moléculaire des amibes libres***

##### ***V.2.3.4.1 Extraction de l'ADN des amibes libres***

Le produit de la culture amibienne est récolté avec 1 ml de tampon physiologique, puis transféré dans un tube de 1,5 ml et enfin centrifugé pendant 10 min à 6000 rpm (rotation par minute) afin de purifier d'échantillon. Le culot de la centrifugation est à nouveau suspendu dans 100 µl de tampon physiologique. La suspension obtenue va permettre l'isolation de l'ADN en utilisant le kit IBIAN selon les conditions d'utilisation du fabricant (GARCIA, et al., 2013). D'autres kits ont été utilisés pour l'extraction de l'ADN des amibes libres tel que PowerSoil DNA kit<sup>®</sup> (MoBio), High pure PCR template preparation kit<sup>®</sup> (Roche) et Genomic DNA from soil<sup>®</sup> (Macherey Nagel) (LE CALVEZ, et al., 2012).

Toujours selon LE CALVEZ *et al* (2012), la comparaison des différents kits d'extraction a montré que le kit de Roche, High pure PCR template preparation kit<sup>®</sup> présente le meilleur rendement d'extraction.

##### ***V.2.3.4.2 Choix des amorces et méthode PCR***

Les amibes étant très polymorphes, l'utilisation d'une méthode objective est préférable pour l'identification. Plusieurs amorces et protocoles de PCR différents ont été élaborés pour identifier les amibes des genres *Naegleria*, *Acanthamoeba*, *Balamuthia* et *Hartmannella*.

- Afin d'identifier *Acanthamoeba spp.*, la région ASA.S1 de l'ARNr18S d'*Acanthamoeba* est amplifié en utilisant les amorces JDP 1 et JDP 2. Celles-ci amplifient le fragment diagnostique 3 (DF3) de l'ADNr18S qui, une fois séquencé avec les amorces 892 et 892C, peut-être comparé dans BLAST pour connaître le génotype de l'amibe (SCHROEDER, et al., 2001).

Le protocole de cette méthode PCR diffère cependant si l'accent veut être mis sur la sensibilité ou sur la spécificité de la réaction.

- Si la sensibilité est mise en avant, le mélange réactionnel est incubé pendant 7 minutes à 95°C suivi de 45 cycles d'1 minute à 95°C, d'1 minute à 60°C et de 2 minutes à 72°C.
- Si la spécificité est préférée, le mélange réactionnel est toujours incubé pendant 7 minutes à 95°C suivi de 20 cycles d'1 minute à 95°C, d'1 minute à 60°C et de 2 minutes à 72°C puis de 25 cycles d'1 minute à 95°C et de 2 minutes à 72°C.

- Pour identifier les espèces de *Naegleria*, les amorces les plus utilisées amplifient les sections ITS 1, 5,8S et ITS 2 de l'ARNr (DE JONCKHEERE, 1998). Après avoir séquencé la petite sous-unité ribosomale, il est possible de comparer la séquence dans BLAST et d'identifier l'espèce.

Afin de permettre la détection spécifique de *Naegleria fowleri*, une méthode pour PCR nichée à partir de la séquence d'ADN d'une protéine membranaire spécifique, Mp2C15 a pu être utilisée à plusieurs reprises dans des échantillons d'amibes pures ou dans des échantillons environnementaux (MARCIANO-CABRAL, et al., 2003). Ces amorces, nommées Mp2C15.for et Mp2C15.rev, amplifient un fragment de 166 pb du gène Mp2C15. Pour augmenter la sensibilité de la méthode, les amorces MpC15.for-in et Mp2C15.rev-in ont également été testées par MARCIANO-CABRAL en 2003 et amplifient un fragment de 110 pb.

La procédure de PCR utilisée tout d'abord un cycle de 5 minutes à 95°C suivi de 35 cycles d'une minute à 95°C, d'une minute à 65°C et de 2 minutes à 72°C

- Les amorces utilisables pour identifier *Balamuthia mandrillaris* sont BalaF 1451 (5'-TAA CCT GCT AAA TAG TCA TGC CAA T-3') et BalaR 1621 (5'-CAA ACT TCC CTC GGC TAA TCA-3'). Elles permettent l'amplification d'un fragment de 1075 pb de l'ARNr mitochondrial à l'aide de la sonde BalaP 1582 (5'-FAM-AGT ACT TCT ACC AAT CCA ACC GCC A-BHQ1-3'). Les initiales FAM correspondent à la 6-carboxyfluoresceïne (QVARNSTROM, et al., 2006).

Chaque cycle de PCR est constitué des trois étapes suivantes :

1. La dénaturation de l'ADN à la chaleur (95°C, 2 minutes) pour séparer les deux brins ;
2. L'hybridation de chaque brin (95°C, 15 secondes) ;
3. L'extension de ces amorces grâce à une ADN polymérase (63°C, 60 secondes)

YAGI *et al*, en 2007 ont mis en avant deux autres couples d'amorces de l'ARNr 16S pouvant être utilisés pour détecter *Balamuthia mandrillaris* :

- Le premier couple produit un amplicon de 1075 pb : 5'Balspec16S (5'-CGC ATG TAT GAA GAA GAC CA-3') et 3'Balspec16S (5'-TTA CCT ATA TAA TTG TCG ATA TAC CA-3').

- Le deuxième couple quant à lui produit un amplicon de 230 pb : 5'Balspec16S et Bal16Sr610 (5'-CCC CTT TTT AAC TCT AGT CAT A-3').

En utilisant ces amorces, les cycles d'amplification sont répétés 40 fois en utilisant le système LightCycler® (Roche). Chaque cycle est constitué d'une étape de dénaturation de l'ADN à 94°C pendant 10 secondes, de l'étape d'hybridation avec les amorces (58°C pendant 5 secondes) suivi de l'étape d'extension des amorces (72°C pendant 15 secondes) (YAGI, et al., 2008).

- Les amorces désignées pour l'identification spécifique de *Hartmannella vermiformis* sont Hv1728F (5'-TTA CGA GGT CAG GAC ACT GT-3') et Hv1728R (5'-GAC CAT CCG GAG TTC TCG-3'). Elles permettent l'amplification du fragment de l'ARNr18S. Une étape de pré-dénaturation (95°C ; 3 minutes) est effectuée avant les 40 cycles comprenant une étape de dénaturation à 95°C pendant 20 secondes, d'hybridation à 56°C pendant 30 secondes et d'extension à 7C pendant 40 secondes (KUIPER, et al., 2006).

#### V.2.3.4.3 La PCR multiplex

Une variante de la PCR a été développée afin de détecter simultanément différentes espèces d'amibes libres pathogènes, la PCR multiplex. Cette technique permet d'amplifier au cours d'une même PCR plusieurs régions différentes. Pour cela, il suffit d'ajouter une série de couples d'oligonucléotides (et non un seul couple) dans le milieu d'incubation. Chacun permettra d'amplifier une région différente de l'ADN. Il faut que les tailles de chacun des amplicons soient suffisamment différentes pour être discriminées.

La mise au point d'une PCR multiplex est particulièrement complexe car il est impératif que toute hybridation entre chacun des oligonucléotides utilisés soit impossible. Le produit de l'amplification est ensuite analysé par électrophorèse. Chaque bande observée correspond à une région spécifique de l'ADN qui est repérée par la taille de la bande. Plusieurs auteurs ont mis en place une PCR multiplex :

- LE CALVEZ *et al* (2012), ont développés une PCR multiplex quantitative afin d'évaluer simultanément le nombre d'amibes libres pathogènes dans l'environnement. Les espèces concernées par cette méthode sont *Naegleria lovaniensis*, *Acanthamoeba castellanii* et *Hartmannella vermiformis*, ainsi que *Vahlkampfia inornata* et *Echinamoeba exundans*. Le kit d'extraction utilisé est celui de chez Roche, l'High Pure PCR template preparation kit. Le gène cible de cette méthode est l'ARNr 18S. Plusieurs amorces ont été testées pour l'élaboration de la PCR (Tableau 7).

**Tableau 7 : Amorces utilisées dans l'étude de Le Clavez *et al* (2012).**

Noms des amorces	Séquences des amorces
<b>Amo_SYB_F</b>	5'GAATACDTTAGCATGGATAATR3'
<b>Amo_SYB_R</b>	5'CDRATCSCTGGTCGGCATMGT3'
<b>Vahl_SYB_F</b>	5'TAATACTGYTGTAGTTAAAACGCCC3'
<b>Vahl_SYB_R</b>	5'ATTCACCTCTMGCSYCATRGT3'
<b>Amo_1400_F</b>	5'ATGCCGACCARSGATYMGGAG3'
<b>Amo_1540_R</b>	5'CAAGSTGCYMGGGGAGTCAT3'
<b>Vahl_560_F</b>	5'AGGTAGTGACAAGMYRTAGYGA3'
<b>Vahl_730_R</b>	5'GGGCGTTTTAACTACARCAGTATTA3'



Les amorces sélectionnées pour l'amplification multiplex sont Amo\_1400\_F/Amo\_1540\_R et Vahl\_560\_F/Vahl\_730\_R. Le premier couple d'amorces permet l'amplification d'un fragment de 130 pb pour l'ADN d'*Acanthamoeba* et d'un fragment de 50 pb pour les ADN d'*Echinamoeba* et d'*Hartmannella*. Le second couple d'amorces amplifie un fragment de 150 pb de l'ADN de Vahlkampfiidae c'est-à-dire *Naegleria* et *Vahlkampfia*.

Le protocole suivi pour l'extraction consiste à effectuer la dénaturation de l'ADN à une température de 94°C pendant 10 min, puis 45 cycles de variation de température à 94°C pendant 10 secondes puis à 62°C pendant 10 secondes puis 72°C pendant 10 secondes sont effectués. L'acquisition de la fluorescence est faite à la fin de chaque phase d'élongation, pour chaque cycle afin de permettre la quantification des échantillons par mesure de celle-ci (LE CALVEZ, et al., 2012).

- Un essai de PCR multiplex en temps réel a été réalisé pour la détection simultanée des amibes *Acanthamoeba spp.*, *Balamuthia mandrillaris* et *Naegleria fowleri* dans des échantillons de LCR. Des séquences partielles ou totales du gène ARNr 18S ont été récupérées de la GenBank (QVARNSTROM, et al., 2006).

Les amorces et sondes utilisées pour cet essai sont rassemblées dans le Tableau 8.

**Tableau 8: Amorces utilisées par QVARNSTROM *et al* (2006).**

Amibes	Amorce 1	Amorce 2	Sonde	Taille des amplicons
<i>Acanthamoeba spp.</i>	Acant F900	Acant R1100	Acant P1000	180 pb
<i>Balamuthia mandrillaris</i>	Bala F1451	Bala R1621	Bala P1582	171 pb
<i>Naegleria fowleri</i>	Naegl F192	Naegl R344	Nfowl P	153 pb

Le mélange PCR contient le kit Platinum<sup>®</sup> Quantitative PCR SuperMix-UDG avec ROX (Invitrogen), 0,2 µM de chaque amorces, 0,1 µM de chaque sondes et 1 µl d'ADN dans 20 µl du volume totale de la réaction.

La PCR est effectuée dans un thermocycleur à temps réel Mx3000P avec un maintien de la température à 50°C pendant 2 minutes (incubation pour l'activité de l'uracile-ADN glycosylase afin de supprimer les éventuelles contaminations par des PCR antérieures) puis 40 cycles d'amplification sont effectués : à 95°C pendant 2 minutes (activation de l'ADN Taq polymérase Platinum<sup>®</sup>), puis à 95°C pendant 15 secondes et enfin à 63°C pendant 60 secondes.

La fluorescence est mesurée à la fin de chaque incubation à 63°C. Les résultats sont analysés en utilisant le logiciel Mx3000P version 2.0 (QVARNSTROM, et al., 2006).

# CONCLUSION

L'ensemble des pathologies à amibes libres résulte de modifications écologiques et l'exposition à ces protozoaires est mondiale. Se pose alors la question de responsabilité humaine face aux modifications de l'écologie des milieux hydriques avec leurs implications technologiques et préventives.

Les infections causées par ces protozoaires sont rares, touchent des sujets jeunes comme âgés, immunodéprimés ou immunocompétents, le diagnostic des pathologies amibiennes est encore inconnu d'un grand nombre de médecins et de biologistes et se fait donc tardivement ce qui explique l'échec des différents traitements existants. Il est important de mettre en place, particulièrement dans les régions concernées par les cas cliniques déjà rapportés, une recherche systématique du diagnostic de méningo-encéphalite amibienne primitive et d'encéphalite amibienne granulomateuse dans les méningites purulentes.

Les milieux ouverts, tels que les eaux douces réchauffées, les eaux de baignades, ou les milieux fermés (eaux potables, piscines, spas, établissements de soins ou thermalisme) sont concernés par l'exposition humaine aux amibes libres et la détection des amibes dans l'environnement ne constitue pas une priorité pour les autorités. En effet, lors des recherches de contamination des différents types d'eaux de loisirs, aucun indicateur de contamination amibienne n'est recherché et il n'existe pas de procédure standard pour le contrôle du développement des amibes.

Les traitements chimiques habituels de l'eau potable ne supprimant pas les amibes telluriques et les infections aux amibes libres pathogènes étant difficiles à traiter, à contrôler et à identifier, la prévention constitue la meilleure protection et a donc toute son importance.

Il est conseillé de s'abstenir de pratiquer les activités de baignades dans des eaux chaudes ou réchauffées notamment lorsque la température de l'air est élevée et le niveau de l'eau bas. Les mesures de prévention incombant aux gestionnaires des eaux de baignades sont de limiter l'introduction de sédiments et de faire respecter les règles élémentaires d'hygiène (installation de pédiluve, de douches,...) ; d'entretenir régulièrement la zone de baignades et d'informer le baigneur par un affichage des dispositifs de prévention pris pour limiter le risque.

Les conseils lors de baignades en eaux de loisirs sont d'éviter de plonger, sauter, ou immerger la tête dans des sources d'eau chaude non traitées afin d'éviter que les éclaboussures puissent atteindre les fosses nasales ou les yeux. Le port de lunettes ou de pince-nez est conseillé. Les sujets immunodéprimés doivent également être conscients des risques auxquels ils sont exposés lors de baignades en rivières ou lacs, en piscine mal contrôlée, en eau thermique chaude pour toutes les amibes libres pathogènes.

Les baigneurs se doivent de respecter les règles d'hygiène de base comme le respect des zones de déchaussage, le passage par un pédiluve afin de limiter l'introduction d'amibes, de pollution particulière ou organique.

Les porteurs de lentilles ne doivent jamais utiliser de l'eau du robinet pour nettoyer celles-ci mais uniquement du sérum physiologique stérile et il est impératif que les patients reçoivent une éducation adéquate sur l'entretien de leurs lentilles de contact.

Un grand nombre d'encéphalites granulomateuses amibiennes ont été associées aux personnes ayant eu des contacts avec le sol. Les individus présentant une lésion au niveau de la peau doivent porter des vêtements de protection (gants, bandage) avant d'être en contact avec le sol. Le terreau, souvent utilisé dans les plantes en pot, est un milieu très enrichi et propice au développement des amibes. Il convient donc de faire attention lors de la manipulation de celles-ci et d'empêcher les enfants de jouer avec.

L'ANSES rappelle tout de même que le respect des conditions de mise en œuvre des traitements de désinfection actuellement autorisés en France pour l'eau alimentant les piscines publiques est suffisant pour empêcher le risque de contamination de l'eau par les amibes.

# WEBOGRAPHIE

# WEBOGRAPHIE

**ANSES - Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail. 2012.** [En ligne] 2012. <http://www.anses.fr/fr/content/eaux-de-loisirs-les-baignades>.

**AQUASOURCE. 2011.** Spécialiste du traitement de l'eau par ultrafiltration. [En ligne] 2011. <http://www.aquasource-membrane.com>.

**ARCH WATER PRODUCTS EUROPE. 2013.** Baquacil. [En ligne] 2013. <http://www.baquacil.com/>.

**BIODEUG.** Biologie Animale - Licence 3. [En ligne] <http://www.biodeug.com>.

**CDC.** Centers of Disease Control and Prevention. [En ligne] [www.dpd.cdc.gov](http://www.dpd.cdc.gov).

**CHEVRIER, G.** *Cours de Monsieur Chevrier Gérard.* [En ligne] <http://bio.m2osw.com/gcartable/biomoleculaire/actine.htm>.

**CNRS.** Découvrir l'eau : eau potable. [En ligne] <http://www.cnrs.fr/cw/dossiers/doseau/decouv/potable/potableNor.html>.

**CSHPF. 2014.** Conseil supérieur d'hygiène publique de France - Section des eaux. *Retour d'expérience des traitements anti-amibiens à la monochloramine réalisés par EDF en 2003 sur les CNPE de Bugey, Chooz, Dampierre, Golfech et Nogent.* [En ligne] 4 Mai 2014. <http://www.hcsp.fr>.

**CSHPF, Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France. 2014.** Retour d'expérience des traitements anti-amibiens à la monochloramine réalisés par EDF en 2003 sur les CNPE de Bugey, Chooz, Dampierre, Golfech et Nogent. [En ligne] 4 Mai 2014.

**DAVEZAC, H., et al. 2008.** L'eau potable en France. 2005-2006. [En ligne] 2008. [Citation : ] <http://www.eaufrance.fr/ressources/informations-legales/credits>.

**ELMER-HAERRIG, V.** Les reflexes de défense cutanée. [En ligne] <http://www.infirmiers.com/etudiants-en-ifsu/cours/cours-soins-infirmiers-les-reflexes-de-defense-cutanee.html>.

**IZEOS. 2013.** Cours - Soins infirmiers - Les réflexes de défenses cutanées. *Cours IFSI.* [En ligne] 2013. <http://www.infirmiers.com/>.

**Ministère des Affaires Sociales et de la Santé. 2011.** Ministère chargé de la Santé / Eaux de baignades / Critères d'évaluation. [En ligne] 2011. <http://baignades.sante.gouv.fr>.

**MINISTERE DU DEVELOPPEMENT DURABLE. 2009.** Qualité des eaux de baignades. *La réglementation sur les eaux de baignades.* [En ligne] 23 décembre 2009. <http://www.developpement-durable.gouv.fr/Reglementation-sur-les-eaux-de.html>.

**NEILMED . 2000.** NeilMed pharmaceuticals - Neti Pot. [En ligne] 2000. <http://www.neilmed.com/>.

# BIBLIOGRAPHIE



# BIBLIOGRAPHIE

**ABEDKHOJASTEH, H.; NIYYATI, M.; RAHIMI, F.; HEIDARI, M.; FARNIA, S.; REZAEIAN, M. 2013.** First Report of *Hartmannella* keratitis in a Cosmetic Soft Contact Lens Wearer in Iran. *Iranian J Parasitol.* 2013, Vol. 8, 3, pp. 481-485.

**ABU KWAIK, Y.; GAO, L. Y.; STONE, B. J.; VENKATARAMAN, C.; HARB, O.S. 1998.** Invasion of Protozoa by *Legionella pneumophila* and its Role in Bacterial Ecology and Pathogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998, Vol. 64, 9, pp. 3127-3133.

**ADL, S. M.; SIMPSON, A. G. B.; FARMER, M. A.; ANDERSEN, R.A.; ANDERSON, O. R.; BARTA, J.R.; BOWSER, S. S.; BRUGEROLLE, G.; FENSOME, R.A.; FREDERICQ, S.; JAMES, T.Y.; KARPOV, S.; KUGRENS, P.; KRUG, J.; LANE, C.E.; LEWIS, L. A.; LODGE, J.; LYNN, D. H.; MANN, D. 2005.** The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. s.l. : The International Society of Protistologists, 2005.

**AFSSAPS. Juin 2011.** *Traitement antibiotique de la légionellose chez l'adulte.* Juin 2011.

**AFSSET, Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail. 2009.** *Saisine Afsset 2006/SA/011 - Risques sanitaires liés aux eaux de baignades artificielles.* s.l. : Edition scientifique, 2009.

**ALKHUNAIZI, A M.; DAWAMNEH, M F.; BANDA, R W.; DAABIL, R A.; AL-TAWFIQ, J A.; AKKAD, S A.; BOUKHAMSEEN, AI H. 2013.** *Acanthamoeba* encephalitis in a patient with systemic lupus treated with rituximab. s.l. : Elsevier Inc., 2013. pp. 192-194.

**ALSAM, S.; JEONG, S R.; SISSONS, J.; DUDLEY, R.; SIK KIM, K.; KHAN, N A. 2006.** *Escherichia coli* interactions with *Acanthamoeba* : a symbiosis with environmental and clinical implications. s.l. : SGM, 2006. pp. 689-694.

**ANOFEL, Association Française de Enseignants de Parasitologie. 1998.** *Parasitologie Médicale et Mycologie.* Saint-Maur : Format Utile, 1998. 2-910657-14-0.

**ANSES, Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail. 2013.** *Analyse des risques sanitaires liés à la présence d'amibes Naegleria fowleri dans les eaux de baignades.* 2013.

**Arrêté du 19 juin 2000. 2000.** Arrêté du 19 juin 2000 modifiant l'arrêté du 14 octobre 1937 modifié relatif au contrôle des sources d'eaux minérales. *Journal Officiel du 20 juillet 2000.* 2000.

**EVERY, S. 1995.** Quantification and Characterization of Phagocytosis in the Soil Amoeba *Acanthamoeba castellanii* by Flow Cytometry. s.l. : Am. Soc. Microbiol., 1995. pp. 1124-1132.

- BARD, D. et SICLET, F. 1995.** *Amibes libres et santé publique*. Paris : ENSP/EDF, 1995. 2-85952-751-6.
- BEAUMONT, S. 2006.** *Biologie Moléculaire*. Paris : EdiScience, 2006. 2100496506.
- BEHETS, J.; DECLERCK, P.; DELAEDT, Y.; VERELST, L.; OLLEVIER, F. 2007.** A duplex real-time PCR assay for the quantitative detection of *Naegleria fowleri* in water samples. 2007, Vol. 41, pp. 118-126.
- BEHETS, J.; DECLERCK, P.; DELAEDT, Y.; VERELST, L.; OLLEVIER, F. 2007.** Survey for the presence of specific free-living amoebae in cooling waters from Belgian power plants. *Parasitol Res.* 2007, Vol. 100, pp. 1249-1256.
- BEN MESSAOUD, A. 2009.** *Etude expérimentale et modélisation d'un procédé de désinfection par rayonnement UV*. Toulouse : Institut National des Sciences Appliquées (INSA), 2009.
- BEURTIN, D., FESTY, B. et GEORGES, P. 1986.** Recherche de *Naegleria thermophiles* dans les boues de la station d'épuration d'Achères. *Bull Soc Fr Parasitol.* 1986, Vol. 4, pp. 205-206.
- BIDDICK, C J., ROGERS, L H. et BROWN, T J. 1984.** Viability of pathogenic and nonpathogenic free-living amoebae in long-term storage at a range of temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* 1984, Vol. 48, 4, pp. 859-860.
- BOLIVAR. 2001.** SSU rRNA-based phylogenetic position of the genera *Amoeba* and *Chaos* (Lobosea, Gymnamoebia): the origin of gymnamoebae revisited. *Mol. Biol. Evol.* 2001, Vol. 18, 12, pp. 2306–2314.
- BOOTON, G C.; CARMICHAEL, J R.; VISVESVARA, G S.; BYERS, T J.; FUERST, P A. 2003.** Genotyping of *Balamuthia mandrillaris* based on nuclear 18S and mitochondrial 16S rRNA genes. *B. mandrillaris rRNA genititic variability.* 2003, Vol. 68, 1, pp. 65-69.
- BOOTON, G C.; VISVESVARA, G C.; BYERS, T J.; KELLY, D J.; FUERST, P A. 2005.** Identification and distribution of *Acanthamoeba* species genotypes associated with nonkeratitis infections. *J. Clin. Microbiol.* 2005, Vol. 43, 4, pp. 1689–1693.
- BOOTON, G C.; CARMICHAEL, J R.; VISVESVARA, G S.; BYERS, T J.; FUERST, P A. 2003.** Identification of *Balamuthia mandrillaris* by PCR Assay Using the Mitochondrial 16S rRNA Gene as a Target. *J. Clin. Microbiol.* 2003, Vol. 41, 1, pp. 453-455.
- BOUREE, P. 2008.** *Aide-Mémoire de Parasitologie et de Pathologie Tropicale*. s.l. : Médecine Sciences Publications, 2008. 978-2257000842.
- BOUYER, S. 2008.** Différenciation d'*Acanthamoeba castellanii* et rôle dans l'interaction avec *Legionella pneumophila*. Poitiers : Université de Poitiers, 2008.

- BROWN, T. J.; CURSONS, R. T.; KEYS, E. A.; MARKS, M.; MILES, M. 1983.** The occurrence and distribution of pathogenic free-living amoebae in thermal areas of the North Island of New Zealand. *N. Z. J. Mar. Freshwater Res.* 1983, Vol. 17, pp. 59-69.
- CABANES, P. A.; WALLET, F.; PRINGUEZ, E.; PERNIN, P. 2001.** Assessing the Risk of Primary Amoebic Meningoencephalitis from Swimming in the Presence of Environmental *Naegleria fowleri*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001, Vol. 67, 7, pp. 2927-2931.
- CENTENO, M.; RIVERA, F.; CERVA, L.; TSUTSUMI, V.; GALLEGOS, E.; CALDERON, A.; ORTIZ, R.; BONILLA, P.; RAMIREZ, E.; SUAREZ, G. 1996.** *Hartmannella vermiformis* isolated from a cerebrospinal fluid of a young male patient with meningoencephalitis and bronchopneumonia. *Arch. Med. Res.* 1996, Vol. 27, pp. 579-586.
- CERVA, L. et NOVAK, K.** Amoebic meningoencephalitis : sixteen fatalities. *Arch. Med. Sci.* Vol. 16, p. 92.
- COSTAS, M. et GRIFFITHS, A. J. 1985.** The suitability of starch-gel electrophoresis of esterases and acid-phosphatases for the study of *Acanthamoeba* taxonomy. *Ark Protistenk.* 1985, Vol. 123, pp. 272-279.
- COULON, C. 2011.** Amibes libres de l'environnement : Résistance aux traitements de désinfection et interactions avec les Chlamydiales. Paris : Université Paris-Sud XI, 2011.
- CSHPF, Conseil Supérieur de l'Hygiène Publique en France et DGS, Direction Générale de la Santé. 1999.** *Recommandations relatives à la gestion du risque microbien lié à l'eau minérale dans les établissements thermaux.* s.l. : MdlEedl Solidarité, 1999.
- CURSON, R. T. M, BROWN, T.J. et KEYS, E. A. 1980.** Effect of disinfectants on Pathogenic Free-Living Amoebae : in Axenic Conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 1980, Vol. 40, 1, pp. 62-66.
- DE JONCKHEERE, J. F. 1998.** Sequence variation in the ribosomal internal transcribed spacers, including the 5.8S rDNA, of *Naegleria spp.* *Protist.* Elsevier, 1998, Vol. 149, 3, pp. 221-228.
- DE JONCKHEERE, J. F. 2011.** The impact of man on the occurrence of the pathogenic free-living amoeboid flagellate *Naegleria fowleri*. *Fut. Microbiol.* 2011, Vol. 7, pp. 5-7.
- DE JONCKHERRE, J. F. 2007.** Molecular identification of free-living amoebae of the *Vahlkampfiidae* and *Acanthamoebidae* isolated in Arizona (USA). *Eur. J. Protistol.* 2007, Vol. 43, pp. 9-15.
- DELPECH, M. et KAPLAN, J C. 2007.** *Biologie moléculaire et médecine.* Paris : Medecine-Sciences Flammarion, 2007. 978-2-2571-3488-2.
- DENIS, F.; PLOY, M C.; MARTIN, C.; BINGEN, E.; QUENTIN, R. 2011.** *Bactériologie médicale.* Paris : Elsevier Masson, 2011.

- DENNEY, C F.; IRAGUI, V J.; UBER-ZAK, L D.; KARPINSKI, N C.; ZIEGLER, E J.; VISVESVARA, G S.; REED, S L. 1997.** Amebic Meningoencephalitis Caused by *Balamuthia mandrillaris* : Cases Report and Review. *Clin. Infect. Dis.* 1997, Vol. 25, pp. 1354-1358.
- DERR-HARF, C., MOLET, B. et SCHEIBER, J. 1978.** Epidémiologie des amibes libres dans les eaux de Strasbourg. 1978, Vol. 53, 5, pp. 467-477.
- DIVE, D. G.; LECLERC, H.; DE JONCKHEERE, J.; DELATTRE, J. M. 1981.** Isolation of *Naegleria fowleri* from the cooling pond of an electric power plant in France. *Ann. Microbiol. (Paris)*. 1981, Vol. 132A, pp. 97-105.
- DUMA, R. J. 1981.** Study of pathogenic free-living amoebas in fresh-water lakes in Virginia. *Environ.l Health Eff. Res. Ser. E. P. A.* 1981, 600, p. 145.
- DUNNEBACKE, T H.; SCHUSTER, F L.; YAGI, S; BOOTON, G C. 2004.** *Balamuthia mandrillaris* from soil samples. *Microbiol. SGM*, 2004, 150, pp. 2837-2842.
- DYKOVA, I.; PINDOVA, Z.; FIALA, I.; DVORAKOVA, H.; MACHACKOVA, B. 2005.** Fish-isolated strains of *Hartmannella vermiformis* Page, 1967 : morphology, phylogeny and molecular diagnosis of the species in tissue lésions. *Dis. Aqua. Org.* 2005, Vol. 46, pp. 115-121.
- EDAGAWA, A.; KIMURA, Y.; KAWABUCHI-KURATA, T.; KUSUHARA, Y.; KARANIS, P. 2009.** Isolation and genotyping of potentially pathogenic *Acanthamoeba* and *Naegleria* species from tap-water sources in Osaka, Japan. *Parasitol. Res.* 2009, Vol. 105, pp. 1109-1117.
- ETIENNE, J. et PERNIN, P. 1995.** *Ecologie et diversité des amibes libres et de l'écosystème des amibes libres*. s.l. : Département de Microbiologie moléculaire médicale, 1995.
- FLEURETTE, J., FRENEY, J. et REVERDY, M. 1995.** *Antisepsie et désinfection*. Paris : s.n., 1995.
- FLIERMANS, C. B.; TYNDALL, R. L.; DOMIGUE, E. L.; WILLAERT, E. J. P. 1979.** Isolation of *Naegleria fowleri* from artificially heated waters. *J. Therm. Biol.* 1979, Vol. 4, pp. 303-305.
- FOWLER, M. et CARTER, R. F. 1965.** Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba spp.*: a preliminary report. *Br Med J.* 1965, Vol. 2, pp. 740-742.
- GARCIA, A.; GONI, P.; CIELOSZYK, J.; FERNANDEZ, M.T.; CALVO-BEGUERIA, L.; RUBIO, E.; FILLAT, M.F.; PELEATO, M.L.; CLAVEL, A. 2013.** Identification of Free-Living Amoebae and Amoeba-Associated Bacteria from Reservoirs and Water Treatment Plants by Molecular Techniques. *Environ. Sci. Tech.* 2013, Vol. 47, 7, pp. 3132-3140.

- GAST, R.J. 1996.** Subgenus systematics of *Acanthamoeba*: four nuclear 18S rDNA sequence types. *J. Eukaryot. Microbiol.* 1996, Vol. 43, 6, pp. 498-504.
- GENTILINI, M. 1995.** *Protozoologie Médicale*. Bruxelles : De Boeck Université, 1995. 2-8041-2048-1.
- GOGATE, A. et DEODHAR, L. 1985.** Isolation and identification of pathogenic *Naegleria fowleri* (aerobia) from a swimming pool in Bombay. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1985, Vol. 79, p. 134.
- GOORDEVA, L. M. 1973.** Isolation and cultivation of limax amoebae capable to grow at 37°C. *Progr Protozool.* 1973, Vol. 139, p. 159.
- GOUDOT, S. 2012.** Etude des facteurs d'influence de l'écologie de *Naegleria fowleri* dans les biofilms. Nancy : Université de Lorraine, 2012.
- GREUB, G. et RAOULT, D. 2004.** Microorganisms Resistant to Free-Living Amoebae. *Clin. Microbiol. Rev.* 2004, Vol. 17, 2, pp. 413-433.
- GRIFFIN, J. L. 1983.** The pathogenic amoeboflagellate *Naegleria fowleri* : environmental isolations, competitors, ecologic interactions, and the flagellate-empty habitat hypothesis. *J. Protozool.* 1983, Vol. 30, pp. 403-409.
- GUPTA, S. et DAS, S.R. 1999.** Stock cultures of free living amebas : effect of temperature on viability and pathogenicity. *J. Parasitol.* 1999, Vol. 85, 1, pp. 137-139.
- HEALY, J F. 2002.** *Balamuthia* Amebic Encephalitis : Radiographic and Pathologic Findings. *Am. J. Neuroradiol.* 2002, Vol. 23, 3, pp. 486-489.
- HEGGIE, T.W. 2010.** Swimming with death : *Naegleria fowleri* infections in recreational waters. *Trav. Med.Inf. Dis.* 2010, Vol. 8, pp. 201-206.
- HELUIN, Y. 2013.** Suivi de la croissance des amibes *Naegleria lovaniensis* et *Acanthamoeba castellanii*. Nancy : Université de Lorraine, 2013.
- HERBELIN, P.; LOONES, N.; MOREL, S.; BINET, M.; REGOUDIS, E.; PELANDAKIS, M. 26-30 juin 2011.** A conventional PCR assay for the quantification of *Naegleria spp.*, *Hartmannella spp.* and *Nuclearia spp.* in cooling waters. *FEMS*. Université de Lyon; EDF, 26-30 juin 2011.
- HUIZINGA, H. W. et MC LAUGHLIN, G. L. 1990.** Thermal ecology of *Naegleria fowleri* from a power plant cooling reservoir. *Appl Environ Microbiol.* 1990, Vol. 56, pp. 2200-2205.
- JADIN, J. B. 1974.** Les amibes dans les eaux. *Pathol. Biol.* 1974, Vol. 22, pp. 81-87.
- JADIN, J. B.; HERMANNE, J.; ROBYN, G.; WILLAERT, E. 1971.** 3 cas de MEAP en Europe occidentale à Anvers. *Bull. Acad. Nat. Med.* 1971, Vol. 155, pp. 232-238.

- JAMERSON, M.; REMMERS, K.; CABRAL, G.; MARCIANO-CABRAL, F. 2009.** Survey for the presence of *Naegleria fowleri* amebae in lake water used to cool reactors at a nuclear power generating plant. *Parasitol Res.* 2009, Vol. 104, pp. 969-978.
- JAMIESON, A. et ANDERSON, K. 1973.** A method for the isolation of *Naegleria* species from water samples. *Pathology.* 1973, Vol. 5, pp. 55-58.
- JOHN, D.T et PETRI, W. A. 2013.** *Markell and Voges's Medical Parasitology.* 9. s.l. : Elsevier Health Sciences, 2013.
- JOHNSON, S. P.; SRIRAM, R.; QVARNSTROM, Y.; ROY, S.; VERANI, J.; YODER, J.; LORICK, S.; ROBERTS, J.; BEACH, M. J.; VISVESVARA, G. 2009.** Resistance of *Acanthamoeba* cysts to disinfection in multiple contact lens solutions. *J. Clin. Microbiol.* 2009, Vol. 47, 7, pp. 2040-2045.
- KADLEC, V., CERVA, L. et SKVAROVA, J. 1978.** Virulent *Naegleria fowleri* in an indoor swimming pool. *Science.* 1978, Vol. 201, p. 1025.
- KAO, P.M.; TUNG, M.C.; HSU, B.M.; CHOU, M.Y.; YANG, H.U; SHE, C.Y.; SHEN, S.M. 2012.** Quantitative detection and identification of *Naegleria spp.* in various environmental water samples using real-time quantitative PCR assay. *Parasitol Res.* 2012, Vol. 112, pp. 1467-1474.
- KASPRZAK, W. 1974.** Free-living potentially pathogenic amoebae in natural environments. *Wiad Parazytol.* 1974, Vol. 20, pp. 244-246.
- KHAN, N. A. 2006.** *Acanthamoeba* : biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiol. Rev.* 2006, Vol. 30, pp. 564-595.
- KILVINGTON, S. 1995.** Identification of *Naegleria fowleri* and other *Naegleria spp.* (free-living amoebae) using cellulose acetate membrane electrophoresis of glucose phosphate isomerase. *FEMS Microbiol. Letter.* 1995, Vol. 133, pp. 219-223.
- KILVINGTON, S., MANN, P. et WARHURST, D. 1984.** Differentiation between *Naegleria fowleri* and *N. lovaniensis* using isoenzyme electrophoresis of aspartate aminotransferase. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1984, Vol. 78, 4, pp. 562-563.
- KUIPER, M.W.; VALSTER, R.M.; WULLINGS, BART A.; BOONSTRA, H.; SMIDT, H.; VAN DER KOOIJ, DICK. 2006.** Quantitative Detection of the Free-Living Amoeba *Hartmannella vermiformis* in Surface Water by Using Real-Time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* Am. Soc. Microbiol., 2006, Vol. 72, 9, pp. 5750-5756.
- KYLE, D. E. et NOBLET, G. P. 1986.** Seasonal distribution of thermotolerant free-living amoebae. *J. Protozool.* 1986, Vol. 33, pp. 422-434.
- LAWANDE, R. V., OGUNKANMI, A. E. et EGLER, L.J. 1979.** Prevalence of pathogenic free-living amoebae in Zaria, Nigeria. *Ann Trop Med Parasitol.* 1979, Vol. 73, pp. 51-56.

- LE CALVEZ, T.; TROUILHE, M. C.; HUMEAU, P.; MOLETTA-DENAT, M.; FRERE, J.; HECHARD, Y. 2012.** Detection of free-living amoebae by using multiplex quantitative PCR. *Mol. Cell. Prob.* Elsevier, 2012, Vol. 26, pp. 116-120.
- LEDEE, DR. 2003.** Advantages of using mitochondrial 16S rDNA sequences to classify clinical isolates of *Acanthamoeba*. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2003, Vol. 44, 3, pp. 1142-1149.
- MARCIANO-CABRAL, F. et CABRAL, G. 2003.** *Acanthamoeba spp.* as Agents of Disease in Humans. *Clin. Microbiol. Rev. Am. Soc. Microbiol.*, 2003, Vol. 16, 2, pp. 273-307.
- MARCIANO-CABRAL, F.; MACLEAN, R.; MENSAH, A.; LAPAT-POLASKO, L. 2003.** Identification of *Naegleria fowleri* in Domestic Water Sources by Nested PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003, Vol. 69, 10, pp. 5864-5869.
- MARTINEZ, A. J. et DE JONCKHEERE, J. 1981.** Les infections par les amibes libres. *Bull. Ins. Past.* 1981, Vol. 79, pp. 171-205.
- MATIN, A.; SIDDQUI, R.; JAYASEKERA, S.; KHAN, N A. 2008.** Increasing Importance of *Balamuthia mandrillaris*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2008, Vol. 21, 3, pp. 435-448.
- MENTION, I. 2007.** Amibes libres et kératites amibienne chez le porteur de lentilles de contact. Nancy : Université Henri Poincaré - Nancy I, 2007.
- MICHEL, R.; HOFFMANN, R.; GIESE, A.; MULLER, K.D. 1995.** Untersuchung von drei Grundwasserwerken auf Vorkommen von *Acanthamoeben*, *Naeglerien* und anderen freilebenden Am ben. *Acta. Hydrochim. Hydrobiol.* 1995, Vol. 23, 5, pp. 202-211.
- MONTSERRAT, M.; BAZARD, M. C.; COMMUN, N.; LABRUDE, M. 2009.** Traitement de la kératite amibienne :  tude de cas cliniques observés au CHU de Nancy. *J. Phar. Clin.* 2009, Vol. 28, 1, pp. 27-32.
- MOULINIER, C. 2003.** Parasitologie et mycologies médicales - Eléments de morphologie et de biologie. Paris : EM INTER, 2003. 9782743004880.
- NERAD, T. A. et DAGGETT, P. M. 1979.** Starch gel electrophoresis : an effective method for separation of pathogenic and non-pathogenic *Naegleria* strains. *J. Protozool.* 1979, Vol. 26, pp. 613-615.
- O'DELL, W. D. et RAMALEY, R. F. 1986.** Incidence of *Naegleria* in thermal pools of Wyoming. *IVth Intl Conference on free-living amebas, Londres.* 1986.
- OMANA-MOLINA, M.; NAVARRO-GARCIA, F.; GONZALEZ-ROBLES, A.; SERRANO-LUNA, J J.; CAMPOS-RODRIGUEZ, R.; MARTINEZ-PALOMO, A.; TSUTSUMI, V.; SHIBAYAMA, M. 2004.** Induction of morphological and electrophysiological changes in hamster cornea after in vitro interaction with trophozoites of *Acanthamoeba spp.* *Infect. Immun.* 2004, Vol. 72, 6, pp. 3245-3251.

- PAGE, F. C. 1987.** The classification of 'naked' amoebae (Phylum Rhizopoda). *Arch. Protistenkd.* 1987, Vol. 133, 3-4, pp. 199-217.
- PARLEMENT EUROPEEN. 15 février 2006.** DIRECTIVE 2006/7/CE DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL concernant la gestion de la qualité des eaux de baignade et abrogeant la directive 76/160/CEE. *J. Off. UE.* 15 février 2006.
- PECASTAINGS, S. 2010.** Apport de modèles de biofilms à *Pseudomonas aeruginosa* et *Legionella pneumophila* à la maîtrise de la qualité microbiologique des réseaux d'eaux minérales naturelles. s.l. : Université de Toulouse, 2010.
- PERNIN, P. et PELANDAKIS, M. 2002.** About some aspects of the ecology and biodiversity of the *Naegleria* amoebae. Livre : S. BILLO-BONEF, *IXth International Meeting on the Biology and Pathogenicity of Free-Living Amoebae Proceedings*. Paris : John Libbey, 2002, pp. 81-85.
- PERNIN, P. 1984.** Isoenzyme patterns of pathogenic and nonpathogenic thermophilic *Naegleria* strains by isoelectric focusing. *Int. J. Parasitol.* 1984, Vol. 14, 5, pp. 459-465.
- PERNIN, P., CARIOU, M. L. et JACQUIER, A. 1985.** Biochemical Identification and Phylogenetic Relationships in Free-Living Amoebas of the Genus *Naegleria*. *J. Euk. Microbiol.* 1985, Vol. 32, 4, pp. 592-603.
- PETIT, J M., ARICO, S. et JULIEN, R. 2013.** Biologie cellulaire. Vottem : Snel, 2013.
- PIMENTEL, L.A.; DANTAS, A F M.; UZAL, F.; RIET-CORREA, F. 2012.** Meningoencephalitis caused by *Naegleria fowleri* in cattle of northeast Brazil. *Res. Vet. Sci.* 2012, Vol. 93, pp. 811-812.
- POUGNARD, C.; CATALA, P.; DROCOURT, J. L.; LEGASTELOIS, S.; PERNIN, P.; PRINGUEZ, E.; LEBARON, P. 2002.** Rapid Detection and Enumeration of *Naegleria fowleri* in Surface Waters by Solid-Phase Cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002, Vol. 68, 6, pp. 3102-3107.
- PUSSARD et PONS. 1977.** Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba*. 1977, Vol. 13, pp. 557-598.
- QVARNSTROM, Y.; VISVESVARA, G. S.; SRIRAM, R.; DA SILVA, A. J. 2006.** Multiplex Real-Time PCR Assay for Simultaneous Detection of *Acanthamoeba spp.*, *Balamuthia mandrillaris* et *Naegleria fowleri*. *J. Clin. Microbiol.* 2006, Vol. 44, 10, pp. 3589-3595.
- REVEILLER, F. L.; MARCIANO-CABRAL, F.; PERNIN, P.; CABANES, P. A.; LEGASTELOIS, S. 2000.** Species specificity of a monoclonal antibody produced to *Naegleria fowleri* and partial characterization of its antigenic determinant. *Parasitol Research.* 2000, Vol. 86, pp. 634-641.



- SCAGLIA, M.; STROSSELLI, M.; GRAZIOLI, V.; GATTI, S.; BERNUZZI, A. M.; DE JONCHHEERE, J. F. 1983.** Isolation and identification of pathogenic *Naegleria australiensis* (Amoebida, Vahlkampfiidae) from a spa in northern Italy. *Appl. Environ. Microbiol.* 1983, Vol. 46, pp. 1282-1285.
- SCHROEDER, J. M.; BOOTON, G. C.; HAY, J.; NISZL, I. A.; SEAL, D.V.; MARKUS, M. B.; FUERST, P. A.; BYERS, T. J. 2001.** Use of subgenetic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *Acanthamoebae* from humans with keratitis and from sewage sludge. *J. Clin. Microbiol.* 2001, Vol. 39, 5, pp. 1903-1911.
- SCHUSTER, F L. 2002.** Cultivation of Pathogenic and Opportunistic Free-Living Amebas. *Clin. Microbiol. Rev.* 2002, Vol. 15, 3, pp. 342-354.
- SCHUSTER, F L. et VISVESVERA, G S. 2004.** Opportunistic amoebae : challenges in prophylaxis and treatment. *Drug Resistance Updates* 7. Elsevier, 2004, pp. 41-51.
- SHIN, H. J.; CHO, M. S.; KIM, H; IM, K. 1999.** Isoenzyme patterns and phylogenetic relationships in *Acanthamoeba spp.* isolated from contact lens containers in Korea. *Korean J. Parasitol.* 1999, Vol. 37, 4, pp. 229-236.
- SIDDIQUI, R. et KHAN, N A. 2009.** Central Nervous System Infection due to *Balamuthia spp.* : Clinical diagnosis and management. *J. Biol. Sci.* 2009, Vol. 1, 1, pp. 126-132.
- SIMITZIS LE FLOHIC, A M. 1996.** Traité de parasitologie médicale - Amibiases d'origine tellurique. s.l. : Pradel, 1996. p. 293.
- SINGH, B. N. et DAS, S.R. 1972.** Occurrence of the pathogenic *Naegleria aerobia*, *Hartmannella culbertsoni* and *Hartmannella rhyodes* in sewage sludge samples of Lucknow. *Curr. Sci.* 1972, Vol. 41, pp. 277-281.
- SMIRNOV, A V. et ROLF, M. 1999.** New data on the cyst structure of *Hartmannella vermiformis* Page, 1967 (Lobosea, Gymnamoebia). *Protistol.* 1999, Vol. 1, 2, pp. 82-85.
- SMIRNOV, A. 2005.** Molecular Phylogeny and Classification of the Lobose Amoebae. *Protist.* 2005, Vol. 156, pp. 129-142.
- STEVENS, A. R.; TYNDALL, R. L.; COUTANT, C. C.; WILLAERT, E. 1977.** Isolation of the etiological agent of primary amoebic meningoencephalitis from artificially heated waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 1977, Vol. 34, pp. 701-705.
- SYKORA, J. L., KELETI, G. et MARTINEZ, A. J. 1983.** Occurrence and pathogenicity of *Naegleria fowleri* in artificially heated waters. *Appl Environ Microbiol.* 1983, Vol. 45, pp. 974-979.
- SYMMERS, W.C. 1969.** Primary amoebic meningoencephalitis in Britain. *Br Med J.* 1969, Vol. 4, pp. 449-454.

- THOMAS, V.; MCDONNELL, G.; DENYER, S P.; MAILLARD, J Y. 2009.** Free-living amoebae and their intracellular pathogenic microorganisms : risks for water quality. *FEMS Microbiol. Rev.* 2009, Vol. 34, pp. 231-259.
- TYNDALL, R. L.; IRONSIDE, K. S.; METLER, P. L.; TAN, E. L.; HAZEN, T. C.; FLIERMANS, C. B. 1989.** Effect of thermal additions on the density and distribution of thermophilic amoebae and pathogenic *Naegleria fowleri* in a newly created cooling lakes. *Appl Environ Microbiol.* 1989, Vol. 55, pp. 722-732.
- USEPA. 2006.** Ultraviolet disinfection guidance manual for the final long term 2 enhanced surface water treatment rule. 2006.
- VISVESVARA, G S., MOURA, H et SCHUSTER, F L. 2007.** Pathogenic and opportunistic free-living amoebae : *Acanthamoeba spp.*, *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2007, Vol. 50, pp. 1-26.
- VISVESVARA, G. S. et HEALY, G. R. 1980.** Disc electrophoretic patterns of esterase isoenzymes of *Naegleria fowleri* and *N. gruberi*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1980, Vol. 74, 3, pp. 411-412.
- WANG, X. et AHEARN, D. 1996.** Effect of Bacteria on Survival and Growth of *Acanthamoeba castellanii*. *Curr. Microbiol.* 1996, Vol. 34, pp. 212-215.
- WELLINGS, F. M.; AMUSO, P. T.; CHANG, S. L.; LEWIS, A. L. 1977.** Isolation and identification of pathogenic *Naegleria* from Florida lakes. *Appl Environ Microbiol.* 1977, Vol. 34, pp. 661-667.
- WILLAERT, E.; JAMIESON, A.; JADIN, J. B.; ANDERSON, K. 1974.** Epidemiological and immunoelectrophoretic studies on human and environmental strains of *Naegleria fowleri*. *Ann Soc Belg Med Trop.* 1974, Vol. 54, pp. 333-342.
- WINCK, M. A. T., CAUMO, K. et ROTT, M. B. 2011.** Prevalence of *Acanthamoeba* from Tap Water in Rio Grande du Sul, Brazil. *Curr Microbiol.* 2011, Vol. 63, pp. 464–469.
- WINIECKA-KRUSNELL, J. et LINDER, E. 2001.** Bacterial infections of free-living amoebae. *Res. Microbiol.* 2001, Vol. 152, pp. 613-619.
- YAGI, S., SCHUSTER, F. L. et VISVESVARA, G. S. 2008.** Demonstration of *Balamuthia* and *Acanthamoeba* mitochondrial ADN in sectioned archival brain and other tissues by the polymerase chain reaction. *Parasitol Res.* 2008, Vol. 102, pp. 491-497.
- YERA, H., GOLDSCHMITT, P. et CHAUMEILL, C. 2012.** Amibes libres : *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Balamuthia*. *Biologie Médicale*. EMC, 2012, Vol. 7, 4.

# ANNEXES

# ANNEXE 1 : Les Pots Neti

En sanskrit, « neti » veut dire nettoyage du nez. Dans la tradition ayurvédique, système de soins traditionnel et naturel qui a vu le jour en Inde il y a des milliers d'années, « jala neti » est le terme employé pour désigner le lavage du nez avec de l'eau salée.

Le pot pour neti est un dispositif pour douche nasale par application de solution saline apaisante et est utilisé dans le but d'évacuer les mucosités nasales, d'augmenter l'efficacité des médicaments, de diminuer la fréquence des infections et d'améliorer la circulation de l'air.

**Mode d'emploi des pots pour neti : Exemple de pot pour Neti Nasaflo® (Figure 29)**



**Figure 29 : Pot pour Neti Nasaflo® (NEILMED , 2000).**

## Étape 1

Lavez-vous les mains et rincez le pot pour neti avant de le remplir avec 240 ml d'eau tiède. Il peut s'agir d'eau distillée ou filtrée, ou encore d'eau préalablement bouillie. N'utilisez pas d'eau du robinet pour dissoudre le mélange, à moins qu'elle n'ait été préalablement bouillie puis refroidie. Vous pouvez la faire chauffer au four à micro-ondes, à condition de procéder par paliers de 5 à 10 secondes afin d'éviter de la porter à une température excessive, d'endommager le dispositif ou de vous ébouillanter les voies nasales.

## Étape 2

Coupez un coin du sachet de préparation et versez-en le contenu dans le pot pour neti. Mettez fermement en place le couvercle du pot, gardez un doigt sur l'orifice du capuchon et agitez doucement le récipient pour dissoudre la préparation.

## Étape 3

Debout devant le lavabo ou l'évier, penchez-vous aussi loin que possible sans que votre position devienne inconfortable, et inclinez la tête de côté. En gardant la bouche ouverte et sans retenir votre respiration, placez le bout du bec verseur dans une narine, de manière à l'obstruer complètement, et laissez la solution s'écouler doucement jusqu'à ce qu'elle commence à s'évacuer par l'autre fosse nasale. Utilisez environ la moitié de la solution

présente dans le pot pour neti. Elle ne devrait pas pénétrer dans votre bouche, sauf si vous inclinez la tête vers l'arrière. Pour ajuster le débit ou interrompre l'écoulement, placez un doigt sur l'orifice du capuchon, de façon à l'obstruer partiellement ou complètement.

#### **Étape 4**

Mouchez-vous doucement, sans vous pincer complètement le nez afin d'éviter de soumettre vos tympans à une pression.

Si vous le pouvez, reniflez une ou deux fois afin d'aspirer tout résidu de solution qui se trouverait encore dans votre fosse nasale. Vous nettoierez ainsi la région nasopharyngienne postérieure (c'est-à-dire la partie située à l'arrière de vos fosses nasales). Il peut arriver qu'une partie de la solution atteigne l'arrière de la gorge. Dans un tel cas, recrachez-la.

#### **Étape 5**

Répétez à présent les étapes 3 et 4 pour irriguer l'autre fosse nasale. S'il vous reste encore de la solution, mettez-la au rebut. Nous vous recommandons de préparer une nouvelle quantité de solution à chaque fois. Procédez à la douche une ou deux fois par jour ou selon l'avis de votre médecin.

## ANNEXE 2 : Signes de Babinski

Le signe de Babinski est la réponse en extension du gros orteil lors de la recherche du réflexe cutané plantaire (stimulation d'arrière en avant, du bord externe de la plante du pied). La réponse normale est une flexion du gros orteil. Parfois un stimulus cutané quelconque peut déclencher un signe de Babinski.

Le test du réflexe cutané plantaire consiste à passer sur le bord externe de la voûte plantaire à l'aide du pouce ou du bord émoussé du marteau à réflexe depuis le talon jusqu'à la partie antérieure du pied et en dedans (Figure 30).



**Figure 30 : Sens et ligne de stimulation du réflexe cutané plantaire (IZEOS, 2013).**

Le geste est réalisé alors que le patient est au repos, la jambe légèrement fléchie. Il peut arriver qu'un patient très réactif ait un mouvement de retrait avec élévation du genou, de la cheville et du pied en extension. Ce résultat n'est pas exploitable et l'examen doit être répété. C'est pourquoi il convient généralement de maintenir un dialogue actif avec le patient pour éviter qu'il se focalise sur un geste qu'il pourrait ressentir comme une chatouille.

La réaction normale à ce stimulus est une flexion plantaire et une flexion de l'orteil.



**Figure 31 : Babinski négatif (Réponse normale en flexion) (IZEOS, 2013).**

La réponse anormale à ce stimulus est une extension de l'orteil (typiquement lente et dite majestueuse) bien connue sous le nom de signe de Babinski.



**Figure 32 : Babinski positif (Réponse anormale en extension) (IZEOS, 2013).**

Cet examen systématique du bilan neurologique est souvent noté Babinski négatif lorsqu'il est normal (Figure 31) et Babinski positif (Figure 32) lorsqu'il est pathologique. Il peut également n'y avoir aucune réaction à la stimulation. Le Babinski peut être uni ou bilatéral. Cet examen

est généralement abrégé « BBK » de sorte que l'on retrouve sur la feuille d'examen la mention BBK - ou BBK +.

Un Babinski positif signe une atteinte du tronc cérébral et/ou une atteinte de la voie pyramidale. Cependant, chez l'enfant, le Babinski peut être positif jusqu'à l'âge d'un an. Cette réaction est physiologique et témoigne de l'immaturité relative du système nerveux encore en développement de l'enfant (ELMER-HAERRIG).



# ANNEXE 3 : La légionellose

La légionellose est une maladie relativement récente, dont la première épidémie a été décrite en 1976, lors du 58<sup>ème</sup> congrès de l'American Legion à Philadelphie, où, sur plus de 180 personnes atteintes, elle avait fait 34 morts.

Les légionelles sont des bacilles à Gram négatif non sporulées, non capsulées, de 0,3 à 0,9 µm de large sur 2 à 20 µm de long. Ils sont cocobacillaires à l'examen direct et prennent un aspect plus filamenteux en culture.

Les légionelles sont des germes hydrotelluriques qui affectionnent l'eau, surtout l'eau stagnante, de préférence tiède. Elles sont détruites lentement à 50°C (quelques heures) et plus rapidement à 60°C (quelques minutes).

Les réservoirs naturels des légionelles sont nombreux : lacs, rivières, puits, eau de pluie stagnantes, mais aussi sols et compostes humides. Les gîtes de prédilection restent les tours aéro-réfrigérantes, l'eau chaude des stations thermales ou l'eau chaude sanitaire. Sa présence est favorisée par la température (25 à 45°C), mais aussi par certains facteurs physicochimiques (dépôts organiques, nature des réseaux, stagnation de l'eau,...) et la présence d'autres micro-organismes (biofilms, cyanobactéries, amibes libres,...) dans lesquels elles survivent, sont protégées et peuvent réensemencer le réseau. En effet, ce germe, qui n'a pas de forme de résistance spécifique, est toutefois capable d'assurer sa survie en s'installant, voire en se multipliant à l'intérieur de cellules hôtes : amibes, cyanobactéries ou ciliées pour l'eau, et macrophages alvéolaires pour l'Homme. De même, la forte représentation de protéines *eukaryotic-like* pourrait être un moyen pour la bactérie de manipuler la cellule hôte à son profit, ce qui expliquerait le parasitisme de nombreuses espèces eucaryotes.

La maladie se présente sous plusieurs formes :

- La maladie des légionnaires est la forme « classique » qui se manifeste par une pneumopathie fébrile, qui débute de manière plus ou moins progressive après une phase d'incubation cliniquement « muette » dont la durée classiquement admise est de 2 à 10 jours.

Il peut y avoir aussi des manifestations extra-pulmonaires : douleurs musculaires, anorexie, troubles digestifs (diarrhées), troubles psychiques,... Le tableau clinique peut être atypique surtout dans les formes graves. Les pneumopathies à légionelles représentent entre 0,5 à 5 % des pneumopathies communautaires. Elles évoluent en cas sporadiques ou en cas groupés (au moins deux cas survenus dans un intervalle de temps inférieur à 6 mois). C'est une maladie grave et létale, en particulier chez les patients immunodéprimés (transplantés, cancers bronchiques, leucémies,...). Le tabagisme, l'éthylisme, le diabète, l'insuffisance rénale chroniques, les affections cardiopulmonaires chroniques, l'âge (>50ans) sont rapportés seuls ou associés comme facteurs favorisants. C'est une maladie de l'adulte « mûr » qui atteint de manière exceptionnelle l'enfant ou l'adulte jeune. Le taux de létalité est important (14% en 2004 en France). C'est une maladie à déclaration obligatoire. Il faut signaler que l'espèce

*Legionella pneumophila* est responsable d'environ 95% des cas de légionellose et plus de 80% des souches appartiennent au séro groupe 1 ;

- La fièvre de Pontiac est la forme bénigne de la maladie. Elle atteint les voies aériennes supérieures après une incubation courte (<36heures) et guérit spontanément. Elle passe souvent inaperçue.

- Les manifestations extra pulmonaires sont rares, mais des cas ont été documentés chez des patients immunodéprimés. La pathologie est variée : cellulites, sinusites, péricardites, pyélonéphrites, péritonites, pancréatites, endocardites, abcès rectal,... Des infections du site opératoire après chirurgie cardiothoracique ont été décrites et la source de contamination reliée à de l'eau contaminée par des légionelles (DENIS, et al., 2011) ;

Chez l'Homme, il n'y a pas de portage sain. La mise en évidence de la bactérie dans un prélèvement signe la maladie.

# ANNEXE 4 : La PCR

## La PCR

### Principe

Le terme PCR est l'acronyme de *Polymerase Chain Reaction* qui signifie donc que cette technique permet d'amplifier en un nombre très élevé de copies une séquence particulière d'ADN (ou parfois d'ARN). Cette réaction est basée sur le même principe de réplication que celui qui est naturellement utilisé par les cellules pour dupliquer l'ADN. Les brins d'ADN matrice sont obtenus par chauffage (dénaturation).

L'une des propriétés de toutes les ADN polymérases est de pouvoir synthétiser le brin complémentaire qu'à partir d'une amorce. Cette propriété est indispensable à la stabilité de l'information cellulaire et est mise à profit dans le technique PCR pour amplifier, par réplication successive, la séquence désirée. Il suffit pour cela de choisir des amorces oligonucléotidiques synthétiques capable de s'hybrider aux bornes de la séquence à amplifier et de réaliser les réplifications qui assureront la multiplication de la séquence encadrée par les amorces. Pour pouvoir réaliser cette opération, il est donc indispensable d'avoir une connaissance préalable de la séquence que l'on souhaite amplifier (DELPECH, et al., 2007).

La PCR nécessite :

- de faibles quantités d'ADN (moins de 1µg) possédant la séquence cible à amplifier ;
- les deux amorces nucléotidiques complémentaires des séquences qui encadrent la cible à amplifier ;
- l'ADN polymérase ;
- un mélange des quatre dNTP (dATP, dTTP, dCTP et dGTP)

Chaque cycle de PCR est constitué de trois étapes :

4. La dénaturation de l'ADN à la chaleur (95°C, 5min) pour séparer les deux brins ;
5. L'hybridation de chaque brin avec une amorce spécifique (50 à 60°C) ;
6. L'extension de ces amorces grâce à une ADN polymérase (70°C)

Après dénaturation thermique (94°C, 5min) du fragment d'ADN (matrice), l'hybridation des amorces sur les brins matrice est effectuée à une température bien précise. Cette étape est très importante car, selon la température choisie, la spécificité d'hybridation basée sur l'appariement A/T, G/C sera plus ou moins bonne. L'ensemble est amené à la température de 72°C, température optimale de fonctionnement de l'ADN polymérase Taq. Cette polymérase est extraite de la souche *Thermus aquaticus*, une bactérie qui vit dans des sources d'eau chaude. Elle reste stable à 94°C, température de dénaturation de l'ADN, ce qui autorise plusieurs cycles PCR sur le même échantillon.

A la fin de chaque cycle d'une durée de deux à trois minutes, la quantité d'ADN a été amplifiée par 2, donc de manière exponentielle à la fin de l'ensemble des cycles

(BEAUMONT, 2006). Cependant, il est inutile d'augmenter considérablement le nombre de cycles, car l'amplification cesse d'être exponentielle après 15 à 20 cycles, et atteint ensuite un plateau (DELPECH, et al., 2007).

### **Les limites de la PCR**

La première limite est celle de la taille de la séquence que l'on souhaite amplifier. Il est en effet très rare de pouvoir amplifier des séquences dont la longueur est supérieure à 3kb.

La seconde limite est celle du nombre de copies de la cible. Des amplifications à partir d'une seule copie peuvent être réalisées mais les problèmes de contamination rendent cela difficiles. Deux PCR de suite ou encore réaliser une première PCR avec des amorces aléatoires (ce qui aura comme effet d'augmenter artificiellement le nombre de copies du génome entier de la ou des cellules) peuvent être réalisées afin de pallier ce problème (DELPECH, et al., 2007).

### **Les problèmes rencontrés**

Lors d'une PCR, il peut apparaître des amplifications artéfactuelles résultant de la contamination par les produits des amplifications précédentes. Il est impossible de s'en affranchir complètement mais certaines précautions peuvent être prises telles que réaliser les incubations dans un laboratoire différent ; utiliser des cônes de prélèvement munis de coton protecteur ou de piston ; irradier les amorces avec des rayons ultraviolets ; fractionner en petits volumes tous les composants des incubations ; distribuer de l'ADN en dernier lors de la réalisation des incubations.

A cela, viennent s'ajouter le problème de la Taq polymérase, dont le taux d'erreur est de l'ordre de  $10^{-4}$  et celui de l'apparition d'amplifications parasites c'est-à-dire que les amorces peuvent s'hybrider ailleurs qu'au niveau de leur cible (DELPECH, et al., 2007).

## **La PCR en temps réel**

### **Principe :**

Cette méthode repose sur la possibilité de suivre la quantité d'ADN présente dans la réaction à tout instant et non à la fin de la PCR (PCR en point final).

Des sondes fluorescentes se fixent soit sur l'ADN double brin (ex : Technologie SYBR) soit sur la séquence d'ADN précise (ex : Technologie Taqman et Beacon).

Ces sondes ne fluorescent qu'une fois fixées à l'ADN. La mesure de la fluorescence permet de distinguer « en temps réel » si le fragment recherché (l'amplicon) est effectivement présent, et donc amplifié, sans avoir besoin de faire une électrophorèse par exemple.

De plus, la fluorescence émise est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction PCR.





La quantité d'amplicons est corrélée à la quantité initiale d'ADN de la matière originale, ce qui permet pour d'autres applications de « doser » la matrice originale.

La PCR quantitative en temps réel a la capacité de quantifier de manière efficace et de détecter avec une grande sensibilité et de spécificité des agents pathogènes suspects, voire des micro-organismes qui ne sont pas faciles à détecter ou identifiés après culture traditionnelle.

En outre, les courbes d'étalonnage qui caractérisent la relation entre le nombre de copies et des données de PCR quantitative en temps réel peuvent être construites, ce qui facilite la quantification des micro-organismes dans des échantillons d'eau de l'environnement en utilisant un dosage par PCR quantitative en temps réel (KAO, et al., 2012).

## DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : Lundi 7 Juillet 2014

<p align="center"><b>DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE</b></p> <p>présenté par : Marion Wendling</p> <p><u>Sujet</u> : Contamination des eaux de loisirs par des amibes libres pathogènes.</p> <p><u>Jury</u> :</p> <p>Président : M. DUVAL Raphaël, Maître de Conférences      Directeur : Mme BANAS Sandrine, Maître de Conférences      Juges : Mme MATHIEU Laurence, Maître de Conférences      à l'école pratique des hautes études.      Mlle HERBOURG Camille, Pharmacien d'officine.</p>	<p align="center">Vu,      Nancy, le 02/06/2014</p> <p>Le Président du Jury      Directeur de Thèse</p> <p>M. DUVAL Raphaël      Mme BANAS Sandrine.</p> <p>      </p>
<p align="center">Vu et approuvé,      Nancy, le 03.06.2014</p> <p align="center">Doyen de la Faculté de Pharmacie      de l'Université de Lorraine,</p> <p align="center">  <b>Francine PAULUS</b></p>	<p align="center">Vu,      Nancy, le 12 JUN 2014</p> <p align="center">Le Président de l'Université de Lorraine,</p> <p align="center">Pour le Président et par délégation      Le Vice-Président</p> <p align="center">      Martine DELIGNON  <b>Pierre MUTZENHARDT</b></p> <p align="center">N° d'enregistrement : 6566</p>

N° d'identification :

**TITRE**

**CONTAMINATION DES EAUX DE LOISIRS PAR DES  
AMIBES LIBRES PATHOGENES.**

Thèse soutenue le lundi 7 juillet 2014

Par Marion WENDLING

**RESUME :**

Les amibes libres sont des protozoaires capables de vivre de manière autonome dans l'environnement et retrouvées principalement dans les eaux chaudes riches en bactéries. A ce jour, parmi la multitude d'espèces amibiennes existantes, seules quatre sont responsables de pathologies humaines : *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris* et *Hartmannella vermiformis*. Les amibes libres sont caractérisées par l'existence de deux états : la forme trophozoïte, forme infectante, et la forme kystique, forme de résistance. Seule *Naegleria fowleri* existe sous un troisième état : la forme flagellée.

*Naegleria fowleri* est responsable de méningo-encéphalite amibienne primitive, qui en l'absence de traitement adéquat, provoque la mort du patient en moins de dix jours. *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris* et *Hartmannella vermiformis* sont responsables d'encéphalite amibienne granulomateuse, pathologie insidieuse provoquant la mort en quelques semaines ou quelques mois après inoculation en l'absence de traitement. Ces trois amibes sont également en cause dans les kératites amibiennes, certains abcès cutanées, sinusites, ou encore pneumonies. Les amibes libres étant des protozoaires très résistants, elles permettent la transmission et l'amplification de pathologies bactériennes telles que la légionellose. Le diagnostic de ces différentes pathologies n'est pas systématique, et se fait souvent post-mortem. Il est basé sur la culture cellulaire suivi d'un diagnostic moléculaire, la PCR. Les différents traitements existant sont la plupart du temps inefficaces, non pas à cause de la résistance des amibes libres mais par le fait d'une instauration tardive de ceux-ci.

Les amibes libres sont retrouvées dans différentes eaux de loisirs comme les eaux de baignades naturelles, artificielles, les eaux de piscine et les eaux thermales. Les normes à respecter en termes de quantité d'amibes dans ces eaux ne sont pas définies hormis celle pour *Naegleria fowleri* qui doit être inférieure 100 unités par litre d'eau de rejet en aval des centrales thermiques. Les différents traitements des eaux de loisirs utilisés sont le chlore, le brome, le Baquacil®, l'ozone ou encore le rayonnement ultraviolet. Cependant les indicateurs utilisés pour juger de la qualité de l'eau se limitent à des indicateurs bactériens. Afin de détecter et d'identifier les amibes présentes dans ces eaux de loisirs, plusieurs techniques ont été mises au point mais aucune n'a fait l'objet de standardisation. Les pathologies amibiennes, bien que rares, ont des conséquences dramatiques. La prévention constitue donc la meilleure protection face à elles.

**MOTS CLES :**

*Acanthamoeba* ; *Naegleria* ; *Balamuthia* ; SPA ; Sources thermales ; Piscines ; Rivières

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Mme Sandrine BANAS	Laboratoire de physico-chimie et Microbiologie pour l'Environnement Faculté de pharmacie	Expérimentale <input type="checkbox"/>
		Bibliographique <input checked="" type="checkbox"/>
		Thème <input checked="" type="checkbox"/>

**Thèmes**

1 – Sciences fondamentales

3 – Médicament

5 - Biologie

② – Hygiène/Environnement

4 – Alimentation – Nutrition

6 – Pratique professionnelle