



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

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.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE DE LORRAINE

2013

FACULTE DE PHARMACIE

Suivi de la croissance des amibes *Naegleria lovaniensis* et
Acanthamoeba castellanii en milieux xénique et axénique

THESE

Présentée et soutenue publiquement

Le 4 septembre 2013

pour obtenir

le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

par **Yannick HELUIN**

né le 03 novembre 1985 à Schiltigheim (67)

Membres du Jury

Président :	M. Frédéric JORAND,	Maître de Conférences
Directeur de thèse :	Mme Sandrine BANAS,	Maître de Conférences,
Juges :	M. Jean-François MUNOZ	Directeur de laboratoire
	Mme Laurence MATHIEU	Maître de Conférences
	M. Ilan THOUVENIN	Pharmacien

**UNIVERSITE DE LORRAINE
FACULTE DE PHARMACIE
Année universitaire 2012-2013**

DOYEN

Francine PAULUS

Vice-Doyen

Francine KEDZIEREWICZ

Directeur des Etudes

Virginie PICHON

Président du Conseil de la Pédagogie

Bertrand RIHN

Président de la Commission de la Recherche

Christophe GANTZER

Président de la Commission Prospective Facultaire

Jean-Yves JOUZEAU

Responsable de la Cellule de Formations Continue et Individuelle

Béatrice FAIVRE

Responsable ERASMUS

Responsable de la filière Officine

Responsables de la filière Industrie

Responsable du Collège d'Enseignement Pharmaceutique Hospitalier

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

Responsables Pharma Plus E.N.S.A.I.A.

Francine KEDZIEREWICZ

Francine PAULUS

Isabelle LARTAUD

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Jean-Michel SIMON

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Raphaël DUVAL

Bertrand RIHN

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

Dominique NOTTER

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
Pascale FRIANT-MICHEL	85	Mathématiques, Physique
Christophe GANTZER	87	Microbiologie
Pierre LABRUDE	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	Biologie générale, Biochimie clinique
Joël DUCOURNEAU	85	Biophysique, Acoustique
Florence DUMARCAY	86	Chimie thérapeutique
François DUPUIS	86	Pharmacologie
Adil FAIZ	85	Biophysique, Acoustique
Luc FERRARI	86	Toxicologie
Caroline GAUCHER-DI STASIO	85/86	Chimie physique, Pharmacologie
Stéphane GIBAUD	86	Pharmacie clinique

ENSEIGNANTS	Section CNU*	Discipline d'enseignement
Thierry HUMBERT	86	Chimie organique
Frédéric JORAND	87	Environnement et Santé
Olivier JOUBERT	86	Toxicologie
Francine KEDZIEREWICZ	85	Pharmacie galénique
Alexandrine LAMBERT	85	Informatique, Biostatistiques
Faten MERHI-SOUSSI	87	Hématologie
Christophe MERLIN	87	Microbiologie
Blandine MOREAU	86	Pharmacognosie
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 ZAIOU	87	Biochimie et Biologie moléculaire
Colette ZINUTTI	85	Pharmacie galénique
PROFESSEUR ASSOCIE		
Anne MAHEUT-BOSSER	86	Sémiologie
PROFESSEUR AGREGE		
Christophe Cochaud	11	Anglais

*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.

De 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 ».

Avant-propos

Les travaux présentés dans cette thèse d'exercice s'inscrivent dans le contrat de recherche intitulé « Ecologie de l'amibe pathogène *Naegleria fowleri* dans les biofilms » entre EDF-LNHE et le LCPME (UMR 7564 CNRS-Nancy-Université, Institut Jean Barriol).

Groupe de travail LNHE :

Sébastien GOUDOT	EDF LNHE, Chatou.
Pascaline HERBELIN	EDF LNHE, Chatou.
Sylvie SOREAU	EDF LNHE, Chatou.

Groupe de travail LCPME :

Sandrine BANAS	MC, LCPME UMR 7564 CNRS-UHP, Faculté de Pharmacie.
Frédéric JORAND	PR, LCPME UMR 7564 CNRS-UHP, Faculté de Pharmacie.
Laurence MATHIEU	MC, LCPME UMR 7564 CNRS-UHP, EPHE.

Remerciements

A mon Directeur de thèse,

Mme Sandrine BANAS, Maître de Conférences

Pour m'avoir permis de valoriser ces travaux effectués sous votre encadrement éclairé,
Pour votre sympathie et la confiance que vous m'avez accordée tout au long de ce travail,
Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la direction de ma thèse,
Veuillez trouver ici le témoignage de ma profonde gratitude et de mon plus grand respect.

A mon Président de jury,

M. Frédéric JORAND, Professeur

Pour m'avoir aiguillé dans mon travail lorsque cela était nécessaire,
Pour votre implication dans ce projet auquel j'ai participé,
Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de ma thèse,
Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et de toute mon estime.

A mes juges,

M. Jean-François MUNOZ, Directeur du Laboratoire d'hydrologie de Nancy

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail avec la compétence qui est la votre,
Veuillez croire en ma sincère gratitude et mon plus grand respect.

Mme Laurence MATHIEU, Maître de Conférences,

Pour vos remarques pertinentes lors des réunions,
Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail.
Soyez assurée de ma reconnaissance et de toute mon estime.

M. Ilan THOUVENIN, Docteur en Pharmacie

Pour l'intérêt que vous avez manifesté au sujet de cette thèse,
Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de la juger.
Veuillez croire en tout mon respect et mes sincères remerciements.

A M. Christophe GANTZER, Professeur

Pour m'avoir accueilli au sein de votre équipe de recherche,
Pour vos qualités humaines et professionnelles,
Veuillez trouver ici le témoignage de mon plus grand respect et de ma reconnaissance.

Aux stagiaires que j'ai encadrés à la paillasse,
Olivier Osswald dont les résultats sont inclus dans ce rapport,
Virginie Grateau pour le travail qu'elle a effectué.

A tout le personnel du LCPME,
David pour sa disponibilité et sa bonne humeur, Sandrine pour l'administratif, Sandra et Christelle pour leur gentillesse, Isabelle Bertrand, à tout le monde et ceux que j'ai oublié pour les pauses café.

A mes parents,
Pour avoir toujours cru en moi et m'avoir poussé à aller aussi loin que je l'ai souhaité,
Pour m'avoir donné les moyens de devenir ce que j'ai envie d'être,
Pour toute la joie que vous savez apporter.

A mon frère et ma sœur,
Pour votre affection et tous les moments passés ensemble,
Pour les jeux vidéos, les pizzas de papa le samedi.

A Marie,
Pour ton soutien dans toutes les épreuves et le bonheur que tu mets dans ma vie,
Pour tout le chemin déjà parcouru ensemble et celui que l'on souhaite encore parcourir,
Pour toutes les petites choses aussi, parce qu'elles font toute la différence.

A ma famille,

Pour être tous formidables,

Pour les moments de qualité que je passe avec parrain, marraine, grands-parents, oncles, tantes, cousins et cousines, et toute la belle-famille pour m'avoir si bien accepté,

A la mémoire des grands-parents et de mon oncle disparus.

A mes amis,

Gautier, Maxime, Jean-Nicolas, Quentin, Mathieu, David, et ceux que j'oublie pour ces années de Lycée inoubliables, et pour tout ce qui a suivi,

Le Grec, Peter, Marie, Julie, Bat, Le Fnox, Sid, Zabouche, et ceux que j'oublie ici également pour les meilleures soirées nancéiennes, vosgiennes, de chez mémé et tous les autres bons moments,

A tous les autres, et à ceux que j'ai perdus de vue.

Sommaire

Avant-propos	IX
Remerciements	XIII
Sommaire	XIX
Glossaire.....	XXIII
Abréviations	XXVII
Tableaux et Figures	XXXI
Introduction	1
Revue bibliographique	5
1 Caractéristiques biologiques des amibes	7
1.1 Classification.....	7
1.2 Morphologie.....	8
1.2.1 Structure	8
1.2.2 Ultrastructure.....	8
1.2.3 Mouvement et pseudopodes	8
1.3 Physiologie.....	9
1.3.1 Cycle de vie	9
1.3.2 Nutrition	10
1.4 Ecologie des amibes libres	10
1.4.1 Habitat	10
1.4.2 Conditions environnementales supportées	10
2 Les amibes pathogènes	11
2.1 Amibes parasitaires	11
2.2 Amibes amphizoïques	11
2.2.1 <i>Acanthamoeba spp</i>	12
2.2.2 <i>Naegleria fowleri</i>	14
3 Facteurs influençant la croissance et la prédation des amibes libres	16
3.1 Influence de la température	16
3.2 Influence de la présence de proies	17
3.3 Influence des compétiteurs.....	17
3.4 Relation entre les différents facteurs.....	18
3.5 Autres facteurs importants	18

4	Objectif du travail de recherche	18
	Matériel et méthodes	21
1	Culture et entretien des amibes	23
1.1	Souches microbiennes.....	23
1.1.1	Souche d' <i>Escherichia coli</i> K12.....	23
1.1.2	Souche d' <i>Acanthamoeba castellanii</i>	23
1.1.3	Souche de <i>Naegleria lovaniensis</i>	23
1.2	Préparation des milieux de culture et des tampons	23
1.2.1	Milieu PYG et tampon pour <i>Acanthamoeba castellanii</i>	23
1.2.2	Milieu Chang (ou SCGYEM) et tampon pour <i>Naegleria lovaniensis</i>	24
1.2.3	Géloses NNA pour amibes	24
1.2.4	Milieu LB pour <i>Escherichia coli</i>	24
1.3	Entretien des cultures amibiennes.....	25
1.3.1	Entretien des cultures axéniques d' <i>Acanthamoeba castellanii</i>	25
1.3.2	Entretien des cultures axéniques de <i>Naegleria lovaniensis</i>	26
1.4	Détermination de la viabilité des amibes	26
1.5	Production d' <i>Escherichia coli</i> K12.....	27
2	Méthode expérimentale d'évaluation de la croissance.....	27
2.1	Objectifs	27
2.2	Protocole expérimental	27
2.2.1	Croissance en milieu axénique	27
2.2.2	Croissance sur tapis bactérien	28
2.3	Plan expérimental.....	31
2.3.1	Croissance en milieu axénique	31
2.3.2	Croissance sur tapis bactérien	32
2.4	Exploitation des résultats	33
2.4.1	Calcul de la vitesse spécifique de croissance μ	33
2.4.2	Calcul du temps de doublement de la population.....	34
2.4.3	Linéarisation de Lineweaver et Burke.....	34
	Résultats et discussion.....	35
1	Croissance amibienne en milieu axénique	37
1.1	Croissance à 21°C en milieu axénique.....	39
1.1.1	Suivi de la croissance d' <i>Acanthamoeba castellanii</i> en milieu axénique à 21°C.....	39
1.1.2	Suivi de la croissance de <i>Naegleria lovaniensis</i> en milieu axénique à 21°C	40

1.2	Croissance à 28°C	41
1.2.1	Suivi de la croissance d' <i>Acanthamoeba castellanii</i> en milieu axénique à 28°C.....	41
1.2.2	Suivi de la croissance de <i>Naegleria lovaniensis</i> en milieu axénique à 28°C	42
1.3	Croissance à 34°C	43
1.3.1	Suivi de la croissance d' <i>Acanthamoeba castellanii</i> en milieu axénique à 34°C.....	43
1.3.2	Suivi de la croissance de <i>Naegleria lovaniensis</i> en milieu axénique à 34°C	44
1.4	Croissance à 39°C	45
1.4.1	Suivi de la croissance d' <i>Acanthamoeba castellanii</i> en milieu axénique à 39°C.....	45
1.4.2	Suivi de la croissance de <i>Naegleria lovaniensis</i> en milieu axénique à 39°C	46
1.5	Synthèse des résultats en milieu axénique	46
1.5.1	Température optimale de croissance	47
1.5.2	Rendement de la croissance	48
2	Croissance amibienne en présence d'un tapis bactérien	51
2.1	Croissance à 21°C	52
2.1.1	Suivi de la croissance d' <i>Acanthamoeba castellanii</i> sur tapis bactérien à 21°C.....	52
2.1.2	Suivi de la croissance de <i>Naegleria lovaniensis</i> sur tapis bactérien à 21°C	53
2.2	Croissance à 34°C	54
2.2.1	Suivi de la croissance d' <i>Acanthamoeba castellanii</i> sur tapis bactérien à 34°C.....	54
2.2.2	Suivi de la croissance de <i>Naegleria lovaniensis</i> sur tapis bactérien à 34°C	55
2.3	Augmentations de température de 21 à 34°C	56
2.3.1	Suivi de la croissance d' <i>Acanthamoeba castellanii</i> sur tapis bactérien à 21°C avec augmentation de la température à 34°C après 23h de culture.....	58
2.3.2	Suivi de la croissance de <i>Naegleria lovaniensis</i> sur tapis bactérien à 21°C avec augmentation de la température à 34°C après 23h de culture.....	59
2.3.3	Suivi de la croissance d' <i>Acanthamoeba castellanii</i> sur tapis bactérien à 21°C avec augmentation de la température à 34°C après 43h de culture.....	60
2.3.4	Suivi de la croissance de <i>Naegleria lovaniensis</i> sur tapis bactérien à 21°C avec augmentation de la température à 34°C après 43h de culture.....	61
2.3.5	Suivi de la croissance d' <i>Acanthamoeba castellanii</i> sur tapis bactérien à 21°C avec augmentation de la température à 34°C après 63h de culture.....	62
2.3.6	Suivi de la croissance de <i>Naegleria lovaniensis</i> sur tapis bactérien à 21°C avec augmentation de la température à 34°C après 63h de culture.....	63
2.4	Synthèse des résultats obtenus avec une croissance amibienne sur tapis bactérien.....	64
2.4.1	Température optimale de croissance	64
2.4.2	Rendement de la croissance	73
2.4.3	Flagellation de <i>Naegleria lovaniensis</i>	80

2.4.4	Comparaison des différents protocoles expérimentaux.....	82
	Conclusion.....	85
	Bibliographie	89

Glossaire

Amibe amphizoïque : amibe libre capable de vivre de manière parasitaire.

Amibe libre : amibe capable de vivre de manière autonome dans l'environnement.

Amibe nue : amibe dépourvue de coquille.

Amibe parasitaire : amibe qui nécessite un hôte pour compléter son cycle de vie.

Amibe sociale : amibe dont le cycle de vie passe par une forme pluricellulaire.

Axénique : se dit d'une culture dépourvue d'une source nutritive constituée de microorganismes ou cellules.

Bloom : prolifération incontrôlée de microorganismes.

Chang modifié : ou **SCGYEM (Serum-Casein-Glucose-Yeast Extract-Medium)**, milieu de culture de *Naegleria lovaniensis*. **Flagellate-Empty Habitat Hypothesis** : **Hypothèse de la niche dépourvue de flagellés** : hypothèse selon laquelle les amibes capables de flageller auraient un avantage sélectif pour coloniser une niche écologique donnée si celle-ci ne comporte pas de compétiteurs flagellés.

Forme flagellée : stade de développement de certaines amibes capable de se mouvoir rapidement en milieu liquide. **Intrathécale** : se dit d'une injection dans un milieu cloisonné, comme les méninges.

Kyste : forme de résistance des amibes (et d'autres protozoaires). **Mouvement dirigé** : mouvement qui permet aux amibes de se déplacer.

μ : Vitesse spécifique de croissance de l'amibe.

μ_{\max} : Vitesse spécifique de croissance maximale de l'amibe. **Trophozoïte** : forme végétative (capable de nutrition et division) des amibes.

Uroïde : extrémité postérieure de la forme locomotive (en mouvement dirigé) des amibes.

Vero : cellules de rein de singe vert.

Xénique : se dit d'un milieu contenant une source de nutriments vivante (cellules, micro-organismes).

Abréviations

SCGYEM : *Serum-casein-glucose-yeast extract-medium*, milieu de culture de *Naegleria lovaniensis*, composé de sérum, caséine, glucose et levure.

DO₆₀₀ : **Densité optique pour $\lambda = 600\text{nm}$** , mesure utilisée pour estimer la densité bactérienne.

EAG : **Encéphalite amibienne granulomateuse**, pathologie profonde provoquée par *Acanthamoeba castellanii* chez des individus immunodéprimés.

HLF : *Human lung fibroblast*, cellules de fibroblaste pulmonaire humain.

IRM : **Imagerie par résonnance magnétique**, méthode d'imagerie diagnostique non invasive et non ionisante.

KA : **Kératite amibienne**, pathologie de l'œil provoquée par *Acanthamoeba castellanii*.

K_s : **Constante de dissociation**, nombre de bactéries nécessaires pour une vitesse de croissance amibienne μ égale à la moitié de la vitesse maximale.

LB : *Lysogeny broth*, milieu utilisé pour la culture d'*Escherichia coli*.

LCR : **Liquide Céphalo-Rachidien**, liquide servant de protection au cerveau.

MEAP : **Méningo-Encéphalite Amibienne Primitive**, pathologie profonde provoquée par *Naegleria fowleri*.

NNA : *Non-Nutrient Agar*, gélose dépourvue de source nutritive.

PSM : **Poste de Sécurité Microbiologique**, hotte à flux laminaire utilisée pour manipuler des micro-organismes pathogènes.

PYG : *Pepton-yeast-glucose*, milieu composé de peptone, levure et glucose, utilisé pour la culture d'*Acanthamoeba castellanii*.

SVF : **Sérum de Veau Fœtal**, sérum servant à supplémenter certains milieux de culture.

Tableaux et Figures

Liste des Tableaux

Tableau 1. Protocole expérimental des essais réalisés pour <i>Acanthamoeba castellanii</i> en milieu axénique. Le nombre de réplicats pour chacune des concentrations en amibes en logarithme népérien, est indiqué dans chaque case.	31
Tableau 2. Synthèse des essais réalisés pour <i>Naegleria lovaniensis</i> en milieu axénique. Le nombre de réplicats pour chacune des concentrations en amibes en logarithme népérien, est indiqué dans chaque case.	32
Tableau 3. Synthèse des essais réalisés pour <i>Acanthamoeba castellanii</i> et <i>Naegleria lovaniensis</i> sur tapis bactérien. Le nombre de réplicats est indiqué dans chaque case. Il s'agit de simples réplicats pour les témoins, mais de triplicats pour les essais.	33
Tableau 4. Valeurs moyennes de μ pour <i>Naegleria lovaniensis</i> et <i>Acanthamoeba castellanii</i> en fonction de la température en milieu axénique.	47
Tableau 5. Rendements de croissance maximaux, rendements de croissance après 150 heures et quantité d'amibes produite au total pour <i>A. castellanii</i> et <i>Naegleria lovaniensis</i> en milieu axénique.	49
Tableau 6. Calcul des valeurs de K_S (bactéries/amibe) et μ_{\max} (h^{-1}) pour <i>Naegleria lovaniensis</i> à partir des paramètres extraits de la linéarisation.	71
Tableau 7. Pourcentage d'essais pour lesquels au moins une forme flagellée de <i>N. lovaniensis</i> a été observée en fonction de la température de croissance.	81

Liste des Figures

Figure 1. <i>Acanthamoeba castellanii</i> . Formes trophozoïte (a) et kyste (b). n : noyau, cv : vacuole contractile (Visvesvara <i>et al.</i> 2007).	9
Figure 2. <i>Naegleria fowleri</i> . Formes trophozoïte (a), flagellée (b) et kyste (c) (Visvesvara <i>et al.</i> 2007).	10
Figure 3. Proximité génétique de <i>Naegleria fowleri</i> et <i>Naegleria lovaniensis</i> . Neighbour-joining analysis sur ARNr. D'après Hsu <i>et al.</i> 2009.	14
Figure 4. Emplacement des cinq concentrations amibiennes testées dans des puits sur les trois plaques pour les essais en milieu axénique.	32
Figure 5. Croissance d' <i>Acanthamoeba castellanii</i> à 21°C en milieu axénique à partir de différentes concentrations initiales d'amibes en $\ln(\text{amibes}/\text{cm}^2)$.	38
Figure 6. Croissance d' <i>Acanthamoeba castellanii</i> à 21°C en milieu axénique en $\ln(\text{densité amibienne}/\text{cm}^2)$ en fonction du temps (h). Concentrations initiales d'amibes de 5,5 et 7 en \ln d'amibes par cm^2 .	39
Figure 7. Croissance de <i>Naegleria lovaniensis</i> à 21°C en milieu axénique en $\ln(\text{densité amibienne}/\text{cm}^2)$ en fonction du temps (h). Concentrations initiales d'amibes de 5,5 et 7 en \ln d'amibes par cm^2 .	40
Figure 8. Croissance d' <i>Acanthamoeba castellanii</i> à 28°C en milieu axénique en $\ln(\text{densité amibienne}/\text{cm}^2)$ en fonction du temps (h). Concentrations initiales d'amibes de 5,5 et 7 en \ln d'amibes par cm^2 .	41

Figure 9. Croissance de <i>Naegleria lovaniensis</i> à 28°C en milieu axénique en ln(densité amibienne/cm ²) en fonction du temps (h). Concentrations initiales d'amibes de 5,5 et 7 en ln d'amibes par cm ² .	42
Figure 10. Croissance d' <i>Acanthamoeba castellanii</i> à 34°C en milieu axénique en ln(densité amibienne/cm ²) en fonction du temps (h). Concentrations initiales d'amibes de 5,5 ln et 7 ln d'amibes par cm ² .	43
Figure 11. Croissance de <i>Naegleria lovaniensis</i> à 34°C en milieu axénique axénique en ln(densité amibienne/cm ²) en fonction du temps (h). Concentrations initiales d'amibes de 5,5 et 7 en ln d'amibes par cm ² .	44
Figure 12. Croissance d' <i>Acanthamoeba castellanii</i> à 39°C en milieu axénique en ln(densité amibienne/cm ²) en fonction du temps (h). Concentrations initiales d'amibes de 5,5 et 7 en ln d'amibes par cm ² .	45
Figure 13. Croissance de <i>Naegleria lovaniensis</i> à 39°C en milieu axénique en ln(densité amibienne/cm ²) en fonction du temps (h). Concentrations initiales d'amibes de 5,5 et 6,5 en ln d'amibes par cm ² .	46
Figure 14. Croissance d' <i>Acanthamoeba castellanii</i> à 21°C en ln(densité amibienne/cm ²) en fonction du temps (h) en présence de différentes concentrations d' <i>E. coli</i> K12 (2×10^6 à 2×10^8 bactéries/cm ²) et d'un témoin sans bactérie. Concentration initiale d'amibes : 4,5 ln d'amibes par cm ² .	52
Figure 15. Croissance de <i>Naegleria lovaniensis</i> à 21°C en ln(densité amibienne/cm ²) en fonction du temps (h) en présence de différentes concentrations d' <i>E. coli</i> K12 ($9,5 \times 10^5$ à $9,5 \times 10^8$ bactéries/cm ²) et d'un témoin sans bactérie. Concentration initiale d'amibes : 8 ln d'amibes par cm ² .	53
Figure 16. Croissance d' <i>Acanthamoeba castellanii</i> à 34°C en ln(densité amibienne/cm ²) en fonction du temps (h) en présence de différentes concentrations d' <i>E. coli</i> K12 ($9,5 \times 10^7$ à $6,5 \times 10^8$ bactéries/cm ²) et d'un témoin sans bactérie. Concentration initiale d'amibes : 8 ln d'amibes par cm ² .	54
Figure 17. Croissance de <i>Naegleria lovaniensis</i> à 34°C en ln(densité amibienne/cm ²) en fonction du temps (h) en présence de différentes concentrations d' <i>E. coli</i> K12 (2×10^8 à $9,5 \times 10^8$ bactéries/cm ²) et d'un témoin sans bactérie. Concentration initiale d'amibes : 7,5 ln d'amibes par cm ² .	55
Figure 18. Croissance d' <i>Acanthamoeba castellanii</i> à 21°C en ln(densité amibienne/cm ²) en fonction du temps (h) en présence de différentes concentrations d' <i>E. coli</i> K12 et d'un témoin sans bactérie. Concentration initiale d'amibes : 8 en ln d'amibes par cm ² . Les traits verticaux représentent les différentes étapes de la croissance auxquelles les augmentations de température sont testées.	57
Figure 19. Résultat du test d'augmentation de température. Les traits verticaux rouges correspondent au passage d'une enceinte à une autre.	57
Figure 20. Croissance d' <i>Acanthamoeba castellanii</i> à 21°C, avec augmentation de la température à 34°C après 23 heures en ln(densité amibienne/cm ²) en fonction du temps (h), en présence de différentes concentrations d' <i>E. coli</i> K12 et d'un témoin sans bactérie. Concentration initiale d'amibes : 4,5 en ln d'amibes par cm ² .	58
Figure 21. Croissance de <i>Naegleria lovaniensis</i> à 21°C, avec augmentation de la température à 34°C après 23 heures en ln(densité amibienne/cm ²) en fonction du temps (h), en présence de différentes concentrations d' <i>E. coli</i> K12 et d'un témoin sans bactérie. Concentration initiale d'amibes : 8 en ln d'amibes par cm ² .	59
Figure 22. Croissance d' <i>Acanthamoeba castellanii</i> à 21°C, avec augmentation de la température à 34°C après 43 heures en ln(densité amibienne/cm ²) en fonction du temps (h), en présence de différentes concentrations d' <i>E. coli</i> K12 et d'un témoin sans bactérie. Concentration initiale d'amibes : 9 en ln d'amibes par cm ² .	60

Figure 23. Croissance de <i>Naegleria lovaniensis</i> à 21°C, avec augmentation de la température à 34°C après 43 heures en ln(densité amibienne/cm ²) en fonction du temps (h), en présence de différentes concentrations d' <i>E. coli</i> K12 et d'un témoin sans bactérie. Concentration initiale d'amibes : 8 en ln d'amibes par cm ² .	61
Figure 24. Croissance d' <i>Acanthamoeba castellanii</i> à 21°C, avec augmentation de la température à 34°C après 63 heures en ln(densité amibienne/cm ²) en fonction du temps (h), en présence de différentes concentrations d' <i>E. coli</i> K12 et d'un témoin sans bactérie. Concentration initiale d'amibes : 4,5 en ln d'amibes par cm ² .	62
Figure 25. Croissance de <i>Naegleria lovaniensis</i> à 21°C, avec augmentation de la température à 34°C après 63 heures en ln(densité amibienne/cm ²) en fonction du temps (h), en présence de différentes concentrations d' <i>E. coli</i> K12 et d'un témoin sans bactérie. Concentration initiale d'amibes : 8 en ln d'amibes par cm ² .	63
Figure 26. Vitesses spécifiques de croissance (μ) d' <i>Acanthamoeba castellanii</i> en fonction du rapport initial bactéries/amibes. Chaque température testée (21°C, 34°C, et les augmentations de température de 21°C à 34°C après 23, 43 et 63 heures) est figurée par un symbole différent.	65
Figure 26bis. Vitesses spécifiques de croissance (μ) d' <i>Acanthamoeba castellanii</i> en fonction du rapport initial bactéries/amibes. Chaque température testée (21°C, 34°C, et les augmentations de température de 21°C à 34°C après 23, 43 et 63 heures) est figurée par un symbole différent. Résultats avec un rapport initial bactéries par amibe inférieur à 5×10^5 .	65
Figure 27. Vitesses spécifiques de croissance (μ) de <i>Naegleria lovaniensis</i> en fonction du rapport initial bactéries/amibes. Chaque température testée (21°C, 34°C, et les augmentations de température de 21°C à 34°C après 23, 43 et 63 heures) est figurée par un symbole différent.	67
Figure 27bis. Vitesses spécifiques de croissance (μ) de <i>Naegleria lovaniensis</i> en fonction du rapport initial bactéries/amibes. Chaque température testée (21°C, 34°C, et les augmentations de température de 21°C à 34°C après 23, 43 et 63 heures) est figurée par un symbole différent. Résultats avec un rapport initial bactéries/amibe inférieur à 3×10^5 .	68
Figure 28. Vitesses spécifiques de croissance (μ) de <i>Naegleria lovaniensis</i> en fonction du ratio initial bactéries/amibes et régressions logarithmiques. Chaque température testée (21°C, 34°C, et les augmentations de température de 21°C à 34°C après 23, 43 et 63 heures) est figurée par un symbole différent.	70
Figure 29. Linéarisation de Lineweaver et Burke (lin) de la relation entre la vitesse spécifique de croissance (μ) de <i>Naegleria lovaniensis</i> et du ratio initial bactéries/amibes. Chaque température testée (21°C, 34°C, et les augmentations de température de 21°C à 34°C après 23, 43 et 63 heures) est figurée par un symbole différent.	71
Figure 30. Nombre d'amibes <i>Acanthamoeba castellanii</i> produites après la phase de croissance en fonction du rapport initial bactéries/amibes. Chaque température testée (21°C, 34°C, et les augmentations de température de 21°C à 34°C après 23, 43 et 63 heures) est figurée par un symbole différent.	73
Figure 30bis. Nombre d'amibes <i>Acanthamoeba castellanii</i> produites après la phase de croissance en fonction du rapport initial bactéries/amibes. Chaque température testée (21°C, 34°C, et les augmentations de température de 21°C à 34°C après 23, 43 et 63 heures) est figurée par un symbole différent. Résultats avec un rapport initial bactéries/amibe inférieur à 5×10^5 .	74
Figure 31. Rendement de croissance d' <i>Acanthamoeba castellanii</i> après 150 heures de culture en fonction du rapport initial bactéries/amibes. Chaque température testée (21°C, 34°C, et les augmentations de température de 21°C à 34°C après 23, 43 et 63 heures) est figurée par un symbole différent.	75

Figure 31bis. Rendement de croissance d' <i>Acanthamoeba castellanii</i> après 150 heures de culture en fonction du rapport initial bactéries/amibes. Chaque température testée (21°C, 34°C, et les augmentations de température de 21°C à 34°C après 23, 43 et 63 heures) est figurée par un symbole différent. Résultats avec un rapport initial bactéries/amibe inférieur à 5×10^5 .	76
Figure 32. Nombre d'amibes <i>Naegleria lovaniensis</i> produites en fonction du rapport initial bactéries/amibes. Chaque température testée (21°C, 34°C, et les augmentations de température de 21°C à 34°C après 23, 43 et 63 heures) est figurée par un symbole différent.	77
Figure 32bis. Nombre d'amibes <i>Naegleria lovaniensis</i> produites en fonction du rapport initial bactéries/amibes. Chaque température testée (21°C, 34°C, et les augmentations de température de 21°C à 34°C après 23, 43 et 63 heures) est figurée par un symbole différent. Résultats avec un ratio initial bactéries/amibe inférieur à 3×10^5 .	78
Figure 33. Rendement de croissance de <i>Naegleria lovaniensis</i> après 150 heures de culture en fonction du rapport initial bactéries/amibes. Chaque température testée (21°C, 34°C, et les augmentations de température de 21°C à 34°C après 23, 43 et 63 heures) est figurée par un symbole différent.	79
Figure 33bis. Rendement de croissance de <i>Naegleria lovaniensis</i> après 150 heures de culture en fonction du rapport initial bactéries/amibes. Chaque température testée (21°C, 34°C, et les augmentations de température de 21°C à 34°C après 23, 43 et 63 heures) est figurée par un symbole différent. Résultats avec un ratio initial bactéries/amibe inférieur à 3×10^5 .	80

Introduction

Les microorganismes qui font l'objet de la présente étude sont des amibes, plus particulièrement *Naegleria lovaniensis* et *Acanthamoeba castellanii*. Il s'agit de protozoaires vivant en milieu aquatique et qui se nourrissent de particules en suspension et de proies (bactéries, champignons...). Leur distribution est ubiquitaire et elles ont été mises en évidence dans des prélèvements d'eau douce sur tous les continents. Certaines prolifèrent de manière très rapide lorsque ces eaux douces sont chauffées naturellement (soleil) ou non (circuits de refroidissement), ce qui pose de nos jours un problème de santé publique préoccupant.

En effet, ces amibes sont des amibes libres, ce qui signifie, par opposition aux amibes parasitaires, qu'elles sont capables de vivre et de se reproduire dans un milieu naturel. Cependant, durant les 50 dernières années, un nombre non négligeable de cas d'infections (dont certaines se sont révélées fatales) a été rapporté. Le terme d'amibes amphizoïques a été choisi pour désigner les amibes chez lesquelles on a découvert cette capacité à parasiter l'Homme et à provoquer chez lui une pathologie bien qu'elles semblent à la base adaptées pour une existence en milieu naturel.

A ce premier problème de santé publique s'ajoute un second qui concerne certaines amibes non pathogènes et amibes amphizoïques qui sont capables d'héberger d'autres microorganismes pathogènes comme *Legionella pneumophila* par exemple, et de leur offrir une niche favorable à leur multiplication.

Ces arguments plaident en faveur d'une étude approfondie de ces microorganismes et des conditions dans lesquelles elles prolifèrent.

Nous nous attacherons tout d'abord à décrire dans une analyse bibliographique les amibes en général (classification, morphologie, physiologie et écologie), avant de s'intéresser plus particulièrement aux amibes pathogènes. Le mode de culture des amibes utilisées dans la présente étude et les pathologies engendrées par *A. castellanii* et *Naegleria fowleri* (dont *N. lovaniensis* est un modèle non pathogène utilisé au laboratoire) seront présentés. Pour finir, les différents facteurs connus pouvant influencer la survie et la croissance de ces microorganismes seront analysés afin de servir de base au travail expérimental qui suivra.

Revue bibliographique

1 Caractéristiques biologiques des amibes

1.1 Classification

Le terme « amibe » désigne un ensemble polyphylétique d'eucaryotes qui, à un moment donné de leur cycle de vie, se déplacent à l'aide de pseudopodes. Anciennement toutes regroupées dans le taxon des *Sarcodina*, les amibes ont été dispersées dans une grande variété de taxons par la phylogénie moderne (**Cavalier-Smith 1993**). Cette classification est appelée à être révisée à nouveau dans un futur plus ou moins proche.

La grande variété génétique des amibes n'a d'égale que leur variété morphologique. Il existe des amibes testacées (recouvertes d'une coquille, à ne pas confondre avec les formes kystiques d'autres amibes), par opposition aux amibes nues (dépourvues de cette coquille) auxquelles on se réfère le plus souvent lorsque l'on utilise le mot « amibe ». Les amibes sont des organismes unicellulaires mais certaines, comme *Dictyostelium discoideum*, peuvent se trouver sous forme pluricellulaire dans certaines conditions.

Les amibes étudiées dans ce travail de recherche, à savoir *Acanthamoeba castellanii*, *Naegleria fowleri* et *Naegleria lovaniensis*, appartiennent respectivement aux phyla *Rhizopoda* pour la première et *Percolozoa* pour les deux autres (**Cavalier-Smith 1993**). Ce sont des amibes nues qui peuvent former des kystes, forme de résistance opposée à la forme végétative (ou forme trophozoïte).

Enfin, on peut également différencier les amibes en fonction de leur mode de vie. On distinguera alors :

- les amibes libres (ex : *Amoeba proteus*), qui sont capables de vivre, se reproduire et se nourrir de façon autonome dans la nature,
- éventuellement les « amibes sociales » (ex : *Dictyostelium discoideum*), qui sont les amibes libres ayant la capacité de vivre sous forme pluricellulaire,
- les amibes parasitaires (ex : *Entamoeba histolytica*), qui ne se développent pas ou peu dans un milieu naturel et ont besoin d'un hôte intermédiaire pour compléter leur cycle de vie, provoquant souvent un syndrome pathologique,
- les amibes amphizoïques (ex : *N. fowleri*, *A. castellanii*), qui sont des amibes libres ayant la capacité de vivre occasionnellement de façon parasitaire chez un hôte (**Page 1988**).

1.2 Morphologie

1.2.1 Structure

La taille des amibes est très variable. Si certaines ne mesurent que quelques micromètres, les plus grandes peuvent atteindre un diamètre de l'ordre du millimètre. Les trophozoïtes d'*A. castellanii* ont un diamètre compris entre 15 et 50µm et cette amibe forme des kystes polygonaux à double paroi mesurant de 10 à 25µm. *N. lovaniensis* est une amibe légèrement plus petite, avec des trophozoïtes d'un diamètre variant de 10 à 25µm environ et des kystes circulaires légèrement plus petits (**Visvesvara et al. 2007**).

1.2.2 Ultrastructure

Le noyau des amibes se distingue généralement par son (ou ses) nucléole. Ainsi, le noyau peut arborer un seul nucléole central comme celui des genres *Acanthamoeba* et *Naegleria* (**Visvesvara et al. 2007**) ou plusieurs nucléoles périphériques.

La paroi, quant à elle peut se présenter sous différentes formes. Par exemple, on trouve des amibes recouvertes d'un glycocalyx neutre, ou filamenteux, mais également formant une sorte de cuticule, voire des écailles (**Smirnov & Brown 2004**).

Enfin, d'autres structures comme les mitochondries et l'appareil de Golgi peuvent servir à différencier différentes classes d'amibes.

1.2.3 Mouvement et pseudopodes

Smirnov & Brown (2004) distinguent trois morphologies-types d'amibes selon la forme des pseudopodes:

- les amibes à « lobopodes » comme *Acanthamoeba* et *Naegleria* (les plus couramment observées),
- les amibes à « filipodes » qui émettent des excroissances cytoplasmiques filiformes,
- et les amibes réticulées, dont le cytoplasme ressemble à un réseau ou une toile d'araignée.

Lorsqu'une amibe adhère à un substrat suffisamment solide, elle commence à se mouvoir, tout d'abord de façon non-dirigée, puis d'un mouvement dirigé. Ce dernier type de mouvement est très important car les différences morphologiques observées alors permettent de classer les loboses (amibes à lobopodes) dans différentes catégories et de les différencier (**Smirnov & Brown 2004**) notamment grâce à leur uroïde (extrémité postérieure de la forme locomotive) ou au nombre et à la forme des pseudopodes émis.

1.3 Physiologie

1.3.1 Cycle de vie

Les amibes suivent en général un cycle de vie comportant deux formes (ex : *Acanthamoeba spp*, **Figure 1**) :

- la forme trophozoïte : forme végétative de l'amibe, capable de se mouvoir, se nourrir et se reproduire, souvent à la surface d'un substrat,
- la forme kyste : forme de résistance mobile munie d'une paroi (simple ou double) adoptée par l'amibe lorsque les conditions deviennent défavorables (température, absence de nutriments, taux d'humidité...).

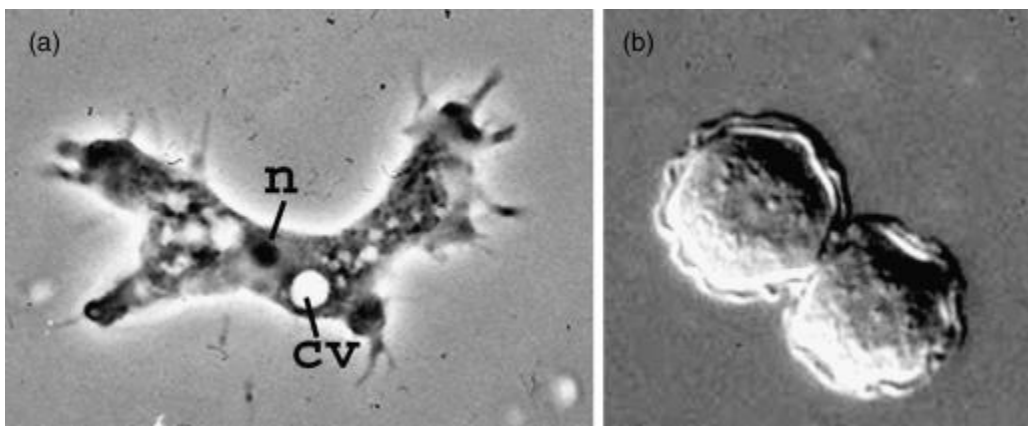


Figure 1. *Acanthamoeba castellanii*. Formes trophozoïte (a) et kyste (b). n : noyau, cv : vacuole contractile (Visvesvara *et al.* 2007).

Ce cycle simple permet aux amibes de coloniser un grand nombre d'environnements tout en assurant la survie sous forme kystique d'un nombre suffisant d'individus pour résister aux périodes défavorables. Les amibes, sauf exception, se reproduisent par fission binaire et aucune forme de reproduction sexuée n'a à ce jour été observée (Schuster & Visvesvara 2004).

Certaines amibes, comme *Naegleria*, peuvent également se trouver sous une troisième forme : la forme flagellée (**Figure 2**). Cette forme nécessite des conditions particulières pour apparaître, et permet à l'amibe de se mouvoir très rapidement en milieux aqueux, lui conférant un avantage vis-à-vis de ses compétiteurs dans la colonisation de niches écologiques (Griffin 1983).

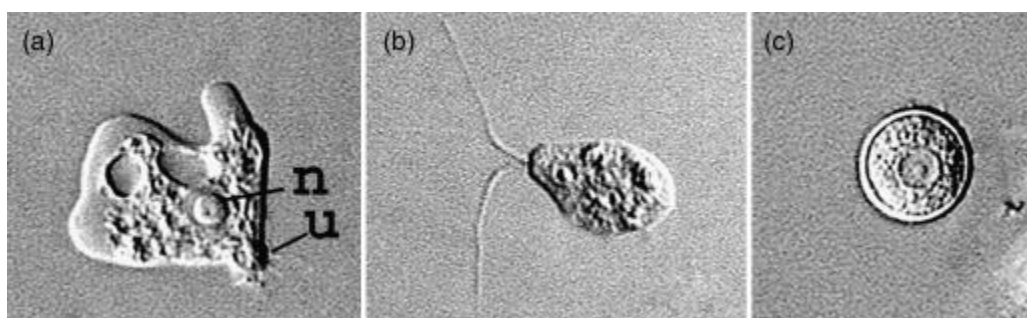


Figure 2. *Naegleria fowleri*. Formes trophozoïte (a), flagellée (b) et kyste (c) (Visvesvara *et al.* 2007).

1.3.2 Nutrition

S'il est possible de maintenir des cultures axéniques (en l'absence d'autres microorganismes) de certaines amibes, les sources nutritionnelles principales des amibes dans l'environnement sont des bactéries (Rodríguez-Zaragoza 1994).

Ainsi, en milieu naturel, les amibes sont des prédateurs. Elles se nourrissent en phagocytant des bactéries, ou d'autres microorganismes unicellulaires, voire certains petits organismes pluricellulaires (micro-algues...) à l'aide de leurs pseudopodes. Elles ont donc au même titre que les autres protozoaires un rôle de régulateur dans bon nombre d'écosystèmes microbiens (Rodríguez-Zaragoza 1994).

1.4 Ecologie des amibes libres

1.4.1 Habitat

Les amibes libres (et amphizoïques) se retrouvent de manière quasi-ubiquitaire dans le monde. Elles vivent dans les sols, les eaux et peuvent même être isolées depuis l'atmosphère comme c'est le cas pour *A. castellanii* par exemple (Rodríguez-Zaragoza *et al.* 1993).

On retrouve des amibes libres dans quasiment toutes les étendues d'eau douce, et même salée pour certaines espèces comme celles du genre *Acanthamoeba*. Les amibes y vivent ou survivent aux interfaces eau-sol (matière suspendue, kystes dans les sédiments (milieu anaérobie)) et aux interfaces eau-air (Preston *et al.* 2001). Les amibes capables de flageller peuvent vivre de manière planctonique, mais cet état est généralement transitoire (recherche de proies, d'une nouvelle niche...) (Rodríguez-Zaragoza 1994).

1.4.2 Conditions environnementales supportées

Les amibes libres vivent en conditions aérobies, cependant, les kystes peuvent survivre même en l'absence d'oxygène (Preston *et al.* 2001). Les fortes températures (jusqu'à 45°C pour *N. fowleri*

par exemple (**Detterline & Wilhelm 1991**) et la dessiccation des kystes sont des conditions extrêmes que les amibes supportent également. Certaines amibes peuvent même résister à des conditions d'osmolarité élevées (**Cordingley et al. 1996**) ou à des températures très basses (**Brown et al. 1982**).

2 Les amibes pathogènes

2.1 Amibes parasitaires

Ces amibes constituent un réel problème de santé publique dans les pays du tiers-monde. Chaque année, 40 000 à 100 000 personnes de par le monde meurent d'amibiase, la pathologie provoquée par *E. histolytica*. Ce parasite a un cycle de vie similaire à celui des amibes libres étudiées, alternant entre le kyste (capable de résister à l'acidité de notre estomac, mais ne survivant que quelques jours dans l'environnement extérieur) et le trophozoïte, est maintenant bien connu et se situe hors du champ d'étude des présents travaux (**Stanley 2003**).

2.2 Amibes amphizoïques

Considérées jusque récemment comme des amibes libres inoffensives, les amibes amphizoïques (ou opportunistes) sont devenues un sujet de préoccupation depuis le milieu du XXe siècle. En effet, de rares mais souvent fatales infections ont été reportées comme étant dues à différentes espèces d'amibes libres depuis 1960.

Il est rapidement apparu que les lieux de contaminations étaient très souvent des plans d'eau. Des campagnes de détection ont été menées et des concentrations d'amibes amphizoïques élevées, notamment des variétés thermophiles de *Naegleria* et d'*Acanthamoeba* ont été isolées d'eaux de circuits de refroidissement de centrales thermiques aux Etats-Unis (**Jamerson et al. 2009**), en Belgique (**Behets et al. 2007**) et en France (**Dive et al 1981**). Ces amibes sont très certainement présentes, en plus faible concentrations, dans la grande majorité des plans et cours d'eau de la planète comme le suggèrent les campagnes de détection effectuées.

Cette ubiquité et le caractère pathogène imprévisible de ces micro-organismes sont plus que suffisants pour justifier une surveillance rapprochée et des études poussées malgré le relativement faible nombre de cas déclarés ces 50 dernières années.

Les amibes amphizoïques identifiées comme responsables de pathologies à ce jour sont : *Acanthamoeba spp*, *Balamuthia mandrillaris*, *N. fowleri*, et *Sappinia diploidea* (**Visvesvara et al. 2007**). Le présent rapport concerne les deux genres les plus courants : *Acanthamoeba* et *Naegleria*.

2.2.1 *Acanthamoeba* spp

Le genre *Acanthamoeba*

Amoeba polyphagus (rebaptisée *Acanthamoeba polyphaga* plus tard) est la première espèce du genre à être isolée par **Puschkarew (1913)**. *A. castellanii* a quant à elle été isolée en 1930 par Castellani. Aujourd'hui, au moins 24 espèces du genre ont été identifiées, plusieurs sont pathogènes.

Culture

A. castellanii se cultive assez facilement sur gélose non nutritive (NNA pour *Non-Nutrient Agar*), recouverte de bactéries facilement assimilables par l'amibe, comme *Escherichia coli* ou *Enterobacter aerogenes* (**Visvesvara et al. 2007**). Lorsque le tapis amibien est arrivé à confluence, il ne reste plus suffisamment de bactéries et les amibes s'enkystent. Elles peuvent être conservées pendant plusieurs mois ainsi à température réduite, et indéfiniment par repiquage. L'amibe peut également être cultivée en boîtes dans un milieu *Pepton-Yeast-Glucose* (PYG) (**Schuster 2002**). La température optimale de croissance se situerait autour de 21-30°C selon **Khan, (2002)**, mais ces valeurs ne sont pas étayées par des données expérimentales et la définition de température optimale reste imprécise dans ces travaux. Il semblerait qu'il s'agisse plutôt de température usuelle de culture. Néanmoins, sur trois températures de croissance testées précédemment en laboratoire (21, 28 et 34°C) il est apparu que la quantité maximale d'amibes était obtenue après croissance à 21°C à partir de tapis bactérien d'*E. coli* K12 comme unique substrat (**Abel 2009**).

Pathologie

Les amibes pathogènes du genre *Acanthamoeba* peuvent être responsables de deux pathologies distinctes : la kératite amibienne (KA), et l'encéphalite amibienne granulomateuse (EAG). Exceptionnellement, des lésions de la peau peuvent être observées.

La kératite amibienne

Epidémiologie : Le nombre de cas de kératite amibienne (KA) est estimé à plusieurs milliers depuis les années 1980. En 2006, par exemple, on comptait déjà 5000 cas diagnostiqués aux Etats-Unis (**Visvesvara et al. 2007**). L'amibe pénètre dans la cornée lorsque celle-ci est lésée, à l'occasion d'un contact avec une eau contaminée. Les porteurs de lentilles de contact constituent la principale population à risque puisque ces dernières provoquent régulièrement une érosion de la cornée (**Marciano-Cabral & Cabral 2003**). Un mauvais entretien des lentilles est également source de contamination.

Diagnostic et clinique : Une fois la cornée pénétrée, les amibes commencent à la détruire. Un infiltrat caractéristique en cercle se forme et donne un premier indice diagnostique. La pathologie, non traitée, conduit par la suite à une ulcération particulièrement douloureuse, puis à une perforation de la cornée pour finalement aboutir à l'énucléation (**Seal 2003**). Le diagnostic définitif de la KA est donné par l'observation de trophozoïtes mais surtout de kystes dans un prélèvement cornéen (**Visvesvara et al. 2007**).

Pronostic et traitement : Sans traitement, la maladie conduit inéluctablement à l'énucléation. Les traitements les plus performants à ce jour sont à base de chlorhexidine et de polyhexaméthylène biguanide et permettent de soigner la maladie lorsque le traitement est institué à temps (**Seal 2003**). Cependant, les rechutes (dues aux kystes) sont assez fréquentes et une kératoplastie s'avère nécessaire dans certains cas (**Visvesvara et al. 2007**).

L'encéphalite amibienne granulomateuse

Epidémiologie : L'EAG est une pathologie profonde, qui touche presque exclusivement les individus immunodéprimés. Les populations les plus à risque sont donc les séropositifs et sidéens, les malades chroniques, etc. Environ 200 cas ont été reportés depuis les années 1960. L'invasion du cerveau se fait certainement par voie nasale ou hématogène (**Visvesvara et al. 2007**).

Diagnostic et clinique : Le diagnostic de l'EAG est malheureusement tardif dans la plupart des cas. En effet, la période d'incubation est longue, de quelques semaines à plusieurs mois (**Schuster & Visvesvara 2004**). Les symptômes, peu spécifiques, comprennent classiquement des nausées, maux de tête et une fièvre modérée. Ils évoluent vers des hémiparésies, des crises d'épilepsies et le coma. Le diagnostic peut être posé par Imagerie par Résonnance Magnétique (IRM). L'analyse du Liquide Céphalo-Rachidien (LCR) permet rarement de détecter *A. castellanii* (**Visvesvara et al. 2007**).

Pronostic et traitement : Le pronostic est en général assez sombre pour cette maladie, et ce pour plusieurs raisons : le diagnostic tardif, la population affectée (immunodéprimés) et l'absence de traitements véritablement efficaces. Différentes drogues ont été testées et l'association la plus efficace à ce jour est une combinaison d'isethionate de pentamidine, de sulfadiazine, de flucytosine et de fluconazole (**Visvesvara et al. 2007**).

Endosymbiose

Au problème de santé publique posé par la pathogénicité d' *A. castellanii* s'en ajoute un autre. En effet, il est connu depuis la fin des années 1970 que les amibes libres peuvent être hôtes de bactéries intracellulaires facultatives ou obligatoires, comme *Legionella pneumophila* par exemple (**Greub & Raoult 2004**). Ces bactéries sont endocytées de la même manière que les proies d' *A.*

castellanii mais résistent à la dégradation qui s'ensuit dans l'amibe. Cette endosymbiose est importante pour la survie de bactéries telles que *L. pneumophila* dans les biofilms en milieu hydrique (Murga *et al.* 2001) et permet à la bactérie de se multiplier rapidement et de résister aux conditions auxquelles les kystes amibiens résistent. *A. castellanii* peut servir ainsi de vecteur d'épidémie en permettant, par exemple, la multiplication de *L. pneumophila* dans des circuits d'eau hospitaliers.

2.2.2 *Naegleria fowleri*

Le genre *Naegleria*

Il existe plus de 30 espèces de *Naegleria* décrites à ce jour, mais une seule semble être pathogène pour l'Homme : *N. fowleri*. Cette dernière est thermophile et peut supporter des températures allant jusqu'à 45°C. *N. lovaniensis* est une espèce très proche et également thermophile utilisée comme modèle de laboratoire non pathogène. La **Figure 3** montre la proximité génétique de différentes espèces de *Naegleria*.

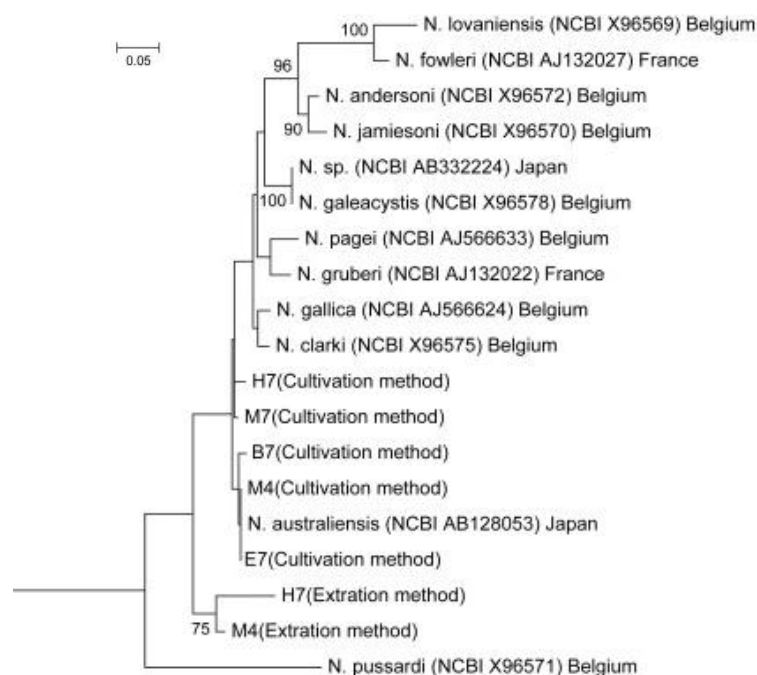


Figure 3. Proximité génétique de *Naegleria fowleri* et *Naegleria lovaniensis*. Neighbour-joining analysis sur ARNr.

D'après Hsu *et al.* 2009.

Les amibes du genre *Naegleria* peuvent, dans certaines circonstances, se trouver sous forme flagellée.

Culture

Tout comme *Acanthamoeba spp*, les amibes du genre *Naegleria* se cultivent aisément sur géloses NNA recouvertes de bactéries ou de cellules. Les plus efficaces utilisées actuellement sont les cellules *Vero E6*, un clone des cellules de rein de singe vert (Vero) et les cellules de fibroblaste pulmonaire humain (ou HLF, *Human Lung Fibroblast*). Plus classiquement, des bactéries telles que *E. coli* peuvent servir de substrat sur NNA. *N. lovaniensis* peut être également cultivée dans un milieu axénique. Le milieu Chang ou *Serum-Casein-Glucose-Yeast Extract-Medium* (SCGYEM) est le plus utilisé (**Schuster 2002**). L'amibe semble trouver un optimum de croissance à 34°C (essais menés à 21, 28 et 34°C par **Abel (2009, communication personnelle)** mais d'autres conditions doivent être testées pour affiner ces données. En effet, *N. fowleri* a par exemple déjà été isolée dans l'eau à 16°C par **Sykora et al. (1983)**.

Pathologie

N. fowleri est responsable d'une pathologie rare mais gravissime chez l'Homme. Il s'agit de la méningo-encéphalite amibienne primitive (MEAP).

Epidémiologie : Plus de 440 cas de MEAP ont été recensés depuis 1965, cependant, le nombre de cas réels est sans doute plus important car le diagnostic est en général post-mortem et difficile à poser. Contrairement à l'EAG, la MEAP touche des individus sains et en bonne santé, principalement des enfants et des jeunes adultes, les contaminations ayant lieu lors d'épisodes de baignades dans des eaux douces chaudes, comme les eaux ayant été utilisées pour le refroidissement de centrales thermiques (**Dive et al. 1981, Behets et al. 2007, Caruzo & Cardozo 2008**).

Diagnostic et clinique : Les signes cliniques de la MEAP sont similaires à ceux d'une méningo-encéphalite bactérienne aiguë, c'est pourquoi son diagnostic est difficile. La période d'incubation peut varier entre 24h et une semaine et les premiers symptômes sont en général des maux de tête, une forte fièvre et une rigidité de la nuque. Le patient souffre par la suite de nausées, vomissements et d'irritabilité avant que les premiers signes d'anomalies neurologiques s'installent (léthargie, crises d'épilepsie, coma). L'élément qui oriente le diagnostic est le contact avec une eau chaude ou tiède dans les jours précédant le début de la maladie. Un scanner peut révéler des lésions cérébrales non caractéristiques, mais c'est l'examen du LCR qui est informatif et permet de confirmer le diagnostic (**Visvesvara et al. 2007**).

Pronostic et traitement : Le pronostic est correct lorsqu'un traitement de choc est initié rapidement. Malheureusement, la maladie étant peu répandue et encore assez méconnue, le diagnostic est en général assez tardif. Ceci explique que quelques patients seulement ont survécu à la MEAP. L'un d'eux, sans séquelles 4 ans après sa guérison, a été traité par de la rifampicine et

une combinaison d'amphotéricine B et de miconazole en injection intraveineuse et intrathécale (Visvesvara *et al.* 2007).

Endosymbiose

L'endosymbiose existe également chez *Naegleria*, avec *Vibrio cholerae* par exemple (Thom *et al.* 1992). Cependant, celle-ci est moins problématique que dans le cas d' *A. castellanii* car les kystes de *Naegleria* sont beaucoup moins résistants aux conditions environnementales et aux traitements utilisés. Ils ne constituent ainsi pas un « refuge » aussi performant que ceux d' *A. castellanii* pour les bactéries intracellulaires.

3 Facteurs influençant la croissance et la prédation des amibes libres

Les amibes amphizoïques (qui, rappelons-le, sont des amibes libres pathogènes) 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 mis en place.

La présence quasi-ubiquitaire d' *A. castellanii* 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'EAG 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 vrai que l'amibe peut survivre dans des milieux secs. *N. 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 du 4 mai 2004) est de 100 *N. fowleri* par litre d'eau de baignade. Ce seuil reste toutefois très élevé si on considère que ces amibes proviennent d'une eau de rejet ayant été diluée par l'eau d'une rivière.

3.1 Influence de la température

Le premier facteur important à avoir été identifié est la température. Griffin rapporte en 1972 que les souches pathogènes de *N. fowleri* sont capables de croître à des températures supérieures à celles des plus hautes fièvres (45 à 46°C). Des souches d'*Acanthamoeba* ont quant à elles pu être cultivées jusqu'à des températures allant de 35 à 43°C, les souches pathogènes ayant montré une

tolérance plus grande aux fortes températures. Les résultats d'autres études publiées par la suite (**Delattre & Oger 1981, Detterline & Wilhelm 1991, Jamerson et al. 2009**) confirment cette tendance, qui pourrait être un facteur discriminant des amibes les plus pathogènes.

3.2 Influence de la présence de proies

Après la température, un second facteur important pour la croissance des amibes amphizoïques a été mis 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.

Wang & Ahearn ont ainsi démontré en **1997** qu' *A. castellanii* se multipliait plus ou moins vite en fonction de la quantité et du type de bactéries que l'on inoculait dans son milieu. *E. coli* est ainsi une très bonne source nutritive pour *A. castellanii* et l'ingestion de bactéries vivantes (plutôt que tuées) a permis une meilleure multiplication de l'amibe. De trop fortes concentrations bactériennes (ratios de 1 amibe pour 10^4 bactéries et plus) ont par contre inhibé la croissance de l'amibe. Une étude plus récente a démontré que les souches environnementales d' *A. castellanii* ingèrent beaucoup plus de bactéries que les souches isolées sur des patients (**Jung et al. 2008**). Ces résultats confirment l'importance de la qualité et la quantité des proies disponibles pour la croissance des amibes. Cependant, les résultats varient d'une étude à l'autre et des investigations supplémentaires doivent être menées pour les confirmer. Il serait également intéressant de répéter ces expériences sur *Naegleria*, cette amibe étant plus particulièrement visée par les normes de contrôle.

3.3 Influence des compétiteurs

Une hypothèse intéressante sur l'occurrence de *N. fowleri* dans une niche environnementale donnée est la présence de compétiteurs (**Griffin 1983**). Ces compétiteurs sont d'autres protistes, ce qui inclut les amibes comme *A. castellanii*, qui pourrait entrer en compétition avec *N. fowleri* (ou *N. lovaniensis*) même à des températures élevées, surtout pour les souches pathogènes d'*Acanthamoeba*, plus résistantes à la chaleur (**Griffin 1972**). **Griffin** a appelé son hypothèse « *Flagellate-Empty Habitat Hypothesis* » (hypothèse de la niche dépourvue de flagellés) en **1983**. En effet, l'occurrence de *N. fowleri* dans certaines niches serait due à un avantage sélectif de l'amibe par rapport à ses compétiteurs : la forme flagellée. Ainsi, l'amibe serait capable de coloniser plus rapidement un environnement vidé de ses anciens occupants par un phénomène naturel ou l'intervention de l'Homme (par exemple, les eaux des circuits de refroidissement des centrales thermiques). **Detterline & Wilhelm (1991)** abondent dans le sens des résultats de **Griffin** et citent des travaux universitaires de **Detterline (1989)** qui a testé l'influence de hautes températures et a conclu que celles-ci n'étaient pas favorables à *N. fowleri* si des compétiteurs

étaient présents. Ces études ont servi de base de réflexion sur l'écologie des amibes amphizoïques mais restent isolées et attendent encore d'être confortées par d'autres travaux.

3.4 Relation entre les différents facteurs

Les principaux facteurs responsables du développement d'amibes libres pathogènes cités ci-dessus sont très certainement liés. Par exemple, le nombre de proies est susceptible d'augmenter lorsque la température augmente (**Griffin 1972**), de part l'optimum de croissance relativement élevé de celles-ci (ex : *E. coli* à 37°C). L'influence du nombre de proies est donc corrélée à la température. C'est très certainement le cas pour les compétiteurs également, et **Detterline & Wilhelm (1991)** émettent l'assertion que l'effet majeur de la température sur la présence d'amibes thermophiles dans un environnement donné est lié à l'élimination de leurs compétiteurs. Les résultats de l'étude menée par **Delattre & Oger en 1981** semblaient déjà pointer dans cette direction, puisque la température au point d'échantillonnage ne semblait pas être un facteur déterminant. Cependant, l'étude démontre que dans un circuit contenant un « point chaud » *N. fowleri* semblait se maintenir plus longtemps.

3.5 Autres facteurs importants

D'autres facteurs sont certainement impliqués dans les proliférations amibiennes. Ainsi, **Detterline & Wilhelm (1991)** ont construit un index prédictif de la présence de *N. fowleri* en fonction de différents paramètres de l'environnement. Outre la température sont considérés la diversité de la microfaune, le fer dissous, le pH, la salinité, la chloration et, de manière importante, les conditions environnementales : stables ou ayant subi des changements importants comme ceux que peuvent engendrer les activités anthropiques.

Après avoir détaillé les caractéristiques des amibes et les facteurs influençant leur multiplication, il a été décidé d'étudier les facteurs température et proie sur la croissance amibienne.

4 Objectif du travail de recherche

Pour décrire les vitesses spécifiques de croissance des amibes libres et rechercher les facteurs influençant cette croissance il a semblé intéressant, d'après les travaux cités dans la littérature, de travailler sur deux facteurs : la température et la densité bactérienne. L'étude a porté sur deux amibes : *A. castellanii* et *N. lovaniensis*, utilisée comme modèle non pathogène de *N. fowleri*. Les deux espèces étant phylogéniquement très proches, *N. lovaniensis* possède les mêmes

caractéristiques que *N. fowleri*, mais est dépourvue du pouvoir pathogène sur l'Homme que possède cette dernière (**De Jonckheere, 2004, Hsu et al. 2009**).

Pour le facteur « proie », des essais ont été menés dans différentes conditions nutritionnelles afin de déterminer un seuil minimum de bactéries nécessaire à la prolifération des amibes et éventuellement un effet inhibiteur pour les plus fortes concentrations bactériennes. Les cinétiques de croissance seront comparées en utilisant soit un milieu nutritif axénique, soit en présence de tapis bactériens avec des concentrations bactériennes différentes variant de $9,5.10^5$ à $9,5.10^8$ bactéries cm^{-2} .

Pour le facteur « température », différentes conditions seront également testées correspondant aux températures rencontrées dans les milieux aquatiques en présence d'une pollution thermique. Les températures testées sont : 21, 28, 34 et 39°C en milieu axénique et 21 et 34°C en présence de bactéries. Les amibes seront également soumises à des augmentations rapides de la température afin de mimer l'effet d'un circuit de refroidissement de centrale thermique. En effet, les augmentations de température dans l'eau de ces circuits conduit régulièrement à une multiplication rapide et indésirable des amibes amphizoïques (**Behets et al. 2007**).

Les résultats devraient apporter des informations sur les conditions environnementales pour lesquelles ces amibes peuvent survivre ou proliférer.

Matériel et méthodes

1 Culture et entretien des amibes

1.1 Souches microbiennes

1.1.1 Souche d'*Escherichia coli* K12

La souche d'*E. coli* K12 utilisée est enregistrée sous le numéro 700078 à l'ATCC.

1.1.2 Souche d'*Acanthamoeba castellanii*

La souche d'*A. castellanii* utilisée dans cette étude est une souche environnementale fournie par EDF R&D. *A. castellanii* étant un pathogène de classe 2, toutes les opérations nécessitant la mise en contact avec l'air ambiant des cultures doivent être effectuées sous poste de sécurité microbiologique (PSM) (HeraSafe, Thermo).

1.1.3 Souche de *Naegleria lovaniensis*

La souche de *N. lovaniensis* utilisée dans cette étude est une souche environnementale fournie par EDF R&D. Le prélèvement a été effectué dans la Loire près de la centrale de Dampierre-en-Burly dans le Loiret (France).

1.2 Préparation des milieux de culture et des tampons

Les milieux de culture utilisés pour les amibes sont dérivés de milieux utilisés en bactériologie. Pour *A. castellanii*, le milieu PYG est utilisé, et pour *N. lovaniensis*, c'est le milieu Chang qui est utilisé (Schuster 2002). Le milieu utilisé pour multiplier *E. coli* K12 est le milieu *Lysogeny Broth* (LB).

1.2.1 Milieu PYG et tampon pour *Acanthamoeba castellanii*

Pour 1 litre de milieu PYG (Peptone, Yeast, Glucose), sont ajoutés à 900 mL d'eau ultrapure (qualité MilliRO/MilliQ+, Millipore) sous agitation :

- 20 g de protéose peptone (Difco, 211684),
- 1 g d'extrait de levure (Difco, 212750),
- 1 g de citrate de sodium (Sigma-Aldrich, S-4641),
- 10 mL de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ à 0,4 M (Sigma-Aldrich, M-1880),
- 10 mL de solution de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ à 0,25 M (Sigma-Aldrich, N-0876),
- 8 mL de solution de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ à 0,05 M (Merck-Darmstadt, 233-140-8),
- 10 mL de solution de KH_2PO_4 à 0,25 M (Sigma-Aldrich, P-0662).

Le pH de la solution est ajusté à 6,5 avec une solution de HCl 1 N ou NaOH 1 N. Le milieu est aliquoté et autoclavé à 121°C pendant 20 minutes. Le milieu peut être conservé 3 mois à température ambiante.

Le tampon est préparé de la même manière, mais sans protéose peptone ni extrait de levure. Il se conserve également 3 mois à température ambiante.

1.2.2 Milieu Chang (ou SCGYEM) et tampon pour *Naegleria lovaniensis*

Pour 1 litre de milieu sont ajoutés à 1 L d'eau ultra pure sous agitation :

- 12,5 g de caséine hydrolysée à l'acide (Merck-Darmstadt),
- 6,25 g d'extrait de levure (Difco, 212750),
- 1 g de KH_2PO_4 (Sigma-Aldrich, P-0662),
- 1,65 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich, N-0876),
- 3,1 g de glucose anhydre 99% (Acros organics, 170080010).

Le milieu est aliquoté et autoclavé à 121°C pendant 20 minutes. Le milieu peut être conservé 3 mois à température ambiante.

Le tampon est préparé de la manière suivante : pour 1 L, ajouter à 1 L d'eau désionisée sous agitation :

- 1 g de KH_2PO_4 (Sigma-Aldrich, P-0662),
- 1,65 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich, N-0876).

De la même manière, le tampon est aliquoté et autoclavé pendant 20 minutes à 121°C. Le tampon se conserve également pendant 3 mois à température ambiante.

1.2.3 Géloses NNA pour amibes

Les géloses NNA sont disponibles en boîtes prêtes à l'emploi (Indicia, ref : CNF), c'est-à-dire déjàensemencées avec *E. coli*.

1.2.4 Milieu LB pour *Escherichia coli*

Le milieu LB est disponible prêt à l'emploi (Roth, X968.1). 25 g sont ajoutés à 1 L d'eau désionisée sous agitation avant autoclavage 15 minutes à 121°C. Il se conserve 1 mois à 4°C une fois reconstitué.

1.3 Entretien des cultures amibiennes

1.3.1 Entretien des cultures axéniques d'*Acanthamoeba castellanii*

Les amibes sont cultivées dans des flacons plats en plastique de 25 cm² dans une étuve thermostatée à 21°C (Incu-Line, VWR, 390-0350). Les amibes sont alors sous forme de trophozoïtes adhérant au fond de la boîte. Le milieu est renouvelé toutes les semaines, et un repiquage régulier est effectué toutes les 5 semaines. En effet, après un temps trop long passé à confluence, les cultures semblent s'affaiblir et les amibes meurent. Le repiquage consiste en un prélèvement d'amibes dans un flacon pour en ensemercer un ou plusieurs autres.

Changement de milieu

Le milieu axénique d'*A. castellanii* est changé tous les 7 jours.

La solution suivante est préparée sous PSM ; les quantités sont données pour un flacon plat de 25cm²:

- 50 µL de solution de (NH₄)₂FeSO₄•26H₂O à 5 mM,
- 50 µL d'une solution à 10 mg mL⁻¹ d'un mélange pénicilline-streptomycine (Lonza, 09-757F),
- 250 µL d'une solution de glucose à 2 mM (Sigma-Aldrich, G-5400).

Le tout est filtré au travers d'une membrane de 0,22 µm de porosité (Millex-GS, SLGS025NB). Une quantité de cette solution équivalente à n+3 flacons souhaités est préparée pour prendre en compte le volume retenu dans le volume mort du filtre.

Ensuite, les flacons sont rincés avec 2 mL de tampon spécifique *Acanthamoeba* avant d'être remplis avec 4,65 mL de milieu frais et 0,35 mL de la solution préparée précédemment (fer, antibiotique et glucose).

Repiquage

Le repiquage s'effectue toutes les 5 semaines pour *A. castellanii*.

Pour effectuer un repiquage, le milieu d'un flacon est vidé. Le flacon est ensuite rincé avec 2 mL de tampon *Acanthamoeba* puis 5mL de tampon sont introduits dans le flacon. Les flacons sont déposés sur un lit de glace pendant environ 15 minutes avant d'être tapés contre la paume de la main pour décoller les trophozoïtes.

Une fois le tapis décollé, 1mL de tampon est prélevé dans le flacon et déposé dans un nouveau flacon. Ensuite, 3,65 mL de milieu PYG et 0,35 mL de la solution de fer, glucose et antibiotique

préparée comme décrit ci-dessus sont ajoutés. Cette méthode permet également de multiplier les cultures puisqu'on peut ainsi obtenir 5 nouveaux flacons à partir d'un ancien.

1.3.2 Entretien des cultures axéniques de *Naegleria lovaniensis*

Comme pour *A. castellanii*, les trophozoïtes de *N. lovaniensis* sont cultivés dans des flacons plats en polystyrène de 25 cm² (Becton Dickinson, 353047) auxquels ils adhèrent. Les flacons sont placés dans une étuve thermostatée à 34°C qui est la température usuellement utilisée pour la croissance de *N. lovaniensis*. Le milieu est changé tous les 5 jours et un repiquage régulier est effectué toutes les 3 semaines, faute de quoi les cultures s'épuisent et les amibes meurent.

Changement de milieu

L'ancien milieu est vidé et les flacons sont rincés avec 2 mL de tampon *Naegleria* environ. Les flacons sont ensuite remplis avec 4,5 mL de milieu Chang, 0,5 mL de sérum de veau fœtal (SVF), (VWR, BWSTS1810/100) et 50 µL de solution à 10 mg/mL d'un mélange pénicilline-streptomycine.

Repiquage

Le milieu est vidé et les flacons sont rincés avant ajout de 5 mL de tampon *Naegleria*. Les flacons sont déposés sur un lit de glace pendant 15 minutes environ avant de décoller les trophozoïtes du fond. Un millilitre de tampon est alors prélevé et déposé dans un nouveau flacon, puis 3,5 mL de milieu, 0,5 mL de SVF et 50 µL de solution antibiotique sont ajoutés

1.4 Détermination de la viabilité des amibes

La viabilité des amibes peut être déterminée par comptage en cellule de Malassez. Le colorant vital rouge neutre est utilisé pour ce faire.

On ajoute 1 µL de colorant rouge neutre à 10 µL de suspension à dénombrer. Un volume de 1 µL du mélange est ensuite monté entre lame et lamelle sur cellule de Malassez. Les amibes vivantes apparaissent en rose, alors que les amibes mortes, qui ne sont plus capables de rejeter le colorant, apparaissent en rouge. Un comptage complet du nombre d'amibes vivantes **n** dans les 25 rectangles (ce qui correspond à un volume de 0,25 mm³) est réalisé à l'aide d'un microscope à fond clair (Axioskop 40, Zeiss). Pour le calcul final, il convient de tenir compte du facteur de dilution. Le nombre d'amibes vivantes **N** dans 1 mL est donc de :

$$N = 4000n / 1,1$$

1.5 Production d'*Escherichia coli* K12

La souche d'*E. coli* K12 utilisée est conservée à -80°C sur de longues périodes. Les aliquotes de 1 mL sont conservés dans des tubes cryogéniques contenant un milieu LB additionné de 20% de glycérol. Avant utilisation, la souche est cultivée en milieu LB liquide.

Une aliquote de suspension bactérienne est décongelé et dilué dans 50 mL de milieu LB dans un erlenmeyer avant incubation 12 heures environ à 37°C sous agitation.

Un volume de 500 µL de la suspension obtenue est prélevé et ajouté à 50 mL de milieu LB dans un erlenmeyer. Une nouvelle incubation de 12 heures environ à 37°C sous agitation est effectuée.

Ces opérations permettent d'éliminer la plupart du glycérol utilisé pour la conservation des bactéries à -80°C.

2 Méthode expérimentale d'évaluation de la croissance

2.1 Objectifs

Les objectifs poursuivis lors de ces essais sont de déterminer les températures optimales de croissance des amibes *N. lovaniensis* et *A. castellanii* en milieu axénique et en présence d'un tapis bactérien, et ce pour optimiser les cultures en laboratoire et déterminer dans quelles conditions les deux amibes peuvent survivre et se multiplier en milieu naturel.

2.2 Protocole expérimental

2.2.1 Croissance en milieu axénique

Préparation de la suspension amibienne

Une suspension d'amibes est préparée de la manière suivante : les tapis amibiens de plusieurs flacons ayant été repiqués 48 à 72 heures auparavant sont détachés dans 5 mL de tampon ou de milieu correspondant à l'amibe utilisée. Une aliquote est prélevé pour comptage des amibes vivantes en cellule de Malassez (selon le protocole donné en 1.4). Des dilutions sont ensuite effectuées aux concentrations désirées en amibes. Les amibes mortes sont exclues du calcul. Au début de l'essai, 500 µL de suspension amibienne sont déposés dans des puits de plaques Multiwell TC 24 puits (Becton-Dickinson, 353047). Les puits sont d'un diamètre de 1,883 cm² et le volume utile est de 1 mL.

Suivi de la croissance de l'amibe

Les plaques multipuits sont placées dans des boîtes afin de minimiser l'évaporation. La quantité d'amibes dans chaque puits est évaluée de la façon suivante : un comptage est effectué au microscope inversé (Telaval 31, Zeiss) à l'aide d'un réticule dont la surface est connue : n amibes sur une surface s . Ainsi, le nombre d'amibes par cm^2 N est déterminé par la formule suivante :

$$N = n / s$$

Différentes conditions de température sont testées. A chaque observation, six comptages sont effectués dans des puits différents et pour chacun dans une zone représentative du puits pour chaque condition de température et de concentration amibienne de départ. Deux observations par jour sont effectuées, ce qui correspond, sur 5 jours, à 1600 comptages. Lorsque l'expérience dure plus de 5 jours, un temps assez long correspondant au week-end peut s'écouler entre deux comptages.

Le nombre d'amibes par puits correspond en fait au nombre de trophozoïtes. Les kystes, bien qu'ils puissent être viables, ne sont pas pris en compte dans les comptages.

2.2.2 Croissance sur tapis bactérien

Pour la suite de l'étude, nous avons choisi de ne pas travailler avec des bactéries en suspension, mais de réaliser un tapis bactérien permettant de mimer les phénomènes de prédation rencontrés dans un biofilm. Les résultats obtenus seront ainsi plus susceptibles de refléter une réalité environnementale des amibes, celles-ci se nourrissant en général sur les interfaces eau-sol où elles se trouvent. Les résultats obtenus en milieu axénique, ceux obtenus en suspension bactérienne par d'autres auteurs, et ceux obtenus en présence d'un tapis bactérien dans les présents travaux pourront également être comparés entre eux.

Les températures qui seront testées sont 21°C et 34°C. Des augmentations de température de 21 à 34°C seront également mises en œuvre.

Caractérisation de la souche bactérienne

La taille des bactéries a été évaluée grâce à un Nanosizer (Zetasizer ZS, Malvern Instruments). Trois séries de mesures ont été effectuées dans du tampon pour *A. castellanii* et trois dans du tampon pour *N. lovaniensis*. Les mesures s'effectuent en cellule à électrode à l'aide d'une aliquote de solution. Cette détermination se base sur le mouvement brownien des particules dans la solution.

Les bactéries sont prélevées et utilisées en fin de phase exponentielle de croissance. Afin d'évaluer rapidement la concentration des solutions bactériennes, une relation a été établie entre la DO_{600} de la suspension et le nombre de bactéries par mL de suspension. Cette relation a été

déterminée par comptages bactériens en épifluorescence dans des suspensions de DO_{600} connue d'après le protocole suivant :

- Une suspension bactérienne est préparée selon la méthode décrite en **1.5**,
- 10 mL de suspension sont centrifugés dans un tube à fond conique durant 20 minutes à 4600 g (Centrifugeuse J2-21, Beckman),
- Le culot est repris avec 10mL de tampon 1:1 (mélange à parts égales vol/vol de tampons pour *Acanthamoeba* et *Naegleria*) afin de constituer la suspension à marquer,
- La DO_{600} de la suspension est mesurée,
- 100 μ L d'une solution de SYBR II sont ajoutés à 1 mL de la suspension à marquer,
- Le prélèvement est mis à l'obscurité pendant 15 minutes,
- Le prélèvement est dilué au 1/100e avec de l'eau ppi avant filtration sur membrane nylon 0,22 μ m,
- La membrane est séchée sous isolateur puis montée entre lame et lamelle avec une goutte de glycérine tamponnée pour observation et comptage.
- Le comptage s'effectue sur cinq champs photographiés au microscope à épifluorescence. La surface d'un champ S_C est de $2,275 \cdot 10^{-2} \text{ mm}^2$. La surface totale de la membrane S_M filtrante est de 973 mm^2 .
- Le nombre de N bactéries pour une unité de DO_{600} est donné par la formule suivante :

$$N = n \times S_M / S_C \times 100 / DO_{600}$$

Préparation du tapis bactérien en puits

Un volume de 50 mL de suspension d'*E. coli* K12 tel que préparé en **1.5** est distribué équitablement dans 4 tubes à fond conique. La solution est ensuite centrifugée à température ambiante pendant 20 minutes à 4600 g (Centrifugeuse J2-21, Beckman). Les surnageants sont éliminés et chaque culot est repris avec 10mL de tampon amibe utilisé pour l'expérience (mélange 1:1 vol/vol de tampons pour *Naegleria* et *Acanthamoeba*). Un mélange de tampons est utilisé pour garder les mêmes conditions pour tous les essais sans favoriser une amibe par rapport à l'autre.

La concentration de la suspension bactérienne peut ensuite être déterminée par spectrophotométrie (SmartSpec 3000, Biorad). La densité optique à 600 nm (DO_{600}) est en effet directement corrélée à la quantité de bactéries présentes dans la suspension. La valeur retenue pour la souche d'*E. coli* utilisée dans cette étude est de $1,2 \times 10^9$ bactéries par unité de DO_{600} .

Afin d'obtenir un tapis bactérien, on introduit dans des plaques multipuits (Multiwell TC plates, Becton-Dickinson, 353047) un volume $V = 500 \mu\text{L}$ de suspension bactérienne de concentration C connue. Les plaques sont ensuite centrifugées pendant 20 minutes à 2000 g dans une centrifugeuse

équipée d'un rotor à nacelles (Heraeus Multifuge X3R, Thermo). Le surnageant est aspiré et conservé pour en calculer la concentration en bactéries **S**. La quantité de bactéries déposée **B** par cm^2 de puits correspond ainsi à :

$$\mathbf{B = (C - S) \times V / 1,883}$$

Pour les premiers essais, la quantité de bactéries dans chaque puits sera calculée afin de tester la validité de la méthode expérimentée pour obtenir un tapis bactérien. Par la suite, les surnageants seront recueillis dans un tube. La concentration bactérienne de cette suspension sera utilisée pour le calcul de la quantité de bactéries déposées.

Préparation de la suspension amibienne

Des tapis amibiens sont détachés 48 à 72 h après repiquage dans un mélange 1:1 des deux tampons afin d'effectuer les tests dans des conditions comparables et ne favorisant aucune amibe par rapport à l'autre. Une aliquote est prélevée pour comptage en cellule de Malassez afin de déterminer le titre de la suspension amibienne et la viabilité des amibes (selon le protocole donné en 1.4). Des dilutions sont ensuite effectuées aux concentrations désirées : de $1,5 \times 10^2$ à 8×10^3 amibes cm^{-2} , c'est-à-dire 3×10^2 à $1,5 \times 10^4$ amibes mL^{-1} de suspension. Les amibes mortes et les kystes sont exclus du calcul. Au début de l'essai, 500 μL de suspension amibienne sont déposés dans les puits contenant les bactéries.

Augmentations de température

Les variations de température de 21 à 34°C sont obtenues en modifiant la température de fonctionnement des enceintes thermostatées. La température est suivie par une sonde ACR Smartbutton (ACR Systems Inc).

Suivi de la croissance de l'amibe

Les plaques à puits sont placées dans des boîtes hermétiques afin de minimiser l'évaporation. La quantité d'amibes dans chaque puits est évaluée de la façon suivante : un comptage est effectué au microscope inversé (Telaval 31, Zeiss) à l'aide d'un réticule.

Différentes conditions de température sont testées en triplicat. Pour chaque triplicat, un comptage est effectué dans chacun des trois puits différents, dans une zone représentative du puits, pour chaque condition de température et de concentration amibienne de départ. Une observation par jour est effectuée.

Le nombre d'amibes par puits correspond en fait au nombre de trophozoïtes. Les kystes, bien qu'ils puissent être viables, ne sont pas pris en compte dans les comptages.

2.3 Plan expérimental

2.3.1 Croissance en milieu axénique

Ces tests de croissance seront effectués à 21°C, 28°C, 34°C et 39°C.

Cinq concentrations amibiennes de départ sont testées (6, 7, 8, 9 et 10 ln(densité amibienne/cm² environ). Pour chaque concentration, six puits en milieu axénique sont préparés, ainsi que deux puits témoins contenant du tampon. Ces témoins permettront de vérifier que la croissance observée est bien due aux constituants nutritifs du milieu axénique et non à une contamination bactérienne. A chaque observation, un comptage est effectué par puits. Un essai est effectué pour chaque amibe : *A. castellanii* et *N. lovaniensis*. Le **Tableau 1** résume les différentes conditions étudiées pour *A. castellanii* et le nombre de réplicats effectué pour chaque condition.

Tableau 1. Protocole expérimental des essais réalisés pour *Acanthamoeba castellanii* en milieu axénique. Le nombre de réplicats pour chacune des concentrations en amibes en logarithme népérien, est indiqué dans chaque case.

Essai 1		<i>Acanthamoeba castellanii</i>									
		Milieu PYG					Tampon (témoin)				
Concentration (ln)		6	7	8	9	10	6	7	8	9	10
Température (°C)	21	6	6	6	6	6	2	2	2	2	2
	28	6	6	6	6	6	2	2	2	2	2
	34	6	6	6	6	6	2	2	2	2	2
	39	6	6	6	6	6	2	2	2	2	2

Le même protocole expérimental, résumé dans le **Tableau 2** est appliqué pour l'essai avec *N. lovaniensis*.

Tableau 2. Synthèse des essais réalisés pour *Naegleria lovaniensis* en milieu axénique. Le nombre de réplicats pour chacune des concentrations en amibes en logarithme népérien, est indiqué dans chaque case.

Essai 1		<i>Naegleria lovaniensis</i>									
		Milieu PYG					Tampon (témoin)				
Concentration (ln)		6	7	8	9	10	6	7	8	9	10
Température (°C)	21	6	6	6	6	6	2	2	2	2	2
	28	6	6	6	6	6	2	2	2	2	2
	34	6	6	6	6	6	2	2	2	2	2
	39	6	6	6	6	6	2	2	2	2	2

Pour chaque température testée et pour chaque amibe, trois plaques à 24 puits, schématisées sur la **Figure 4** ci-dessous, ont été utilisées. Les puits situés aux coins des plaques ne sont jamais utilisés car l'évaporation y est plus importante.

	C1	C1	C2	T2	
	C1	T1	C2	C2	
	C1	C1	T2	C2	
	T1	C1	C2	C2	

	C3	C3	C4	T4	
	C3	T3	C4	C4	
	C3	C3	T4	C4	
	T3	C3	C4	C4	

		C5	C5		
		C5	T5		
		C5	C5		
		T5	C5		

Figure 4. Emplacement des cinq concentrations amibiennes testées dans des puits sur les trois plaques pour les essais en milieu axénique.

En tout, quatre conditions de température et cinq concentrations initiales d'amibes sont testées pour *A. castellanii* et pour *N. lovaniensis*, pour un total de 20 conditions différentes par amibe.

Les résultats sous forme de graphiques seront exprimés en ln de la population amibienne pour une meilleure lisibilité et afin de permettre le calcul de la vitesse spécifique de croissance μ .

2.3.2 Croissance sur tapis bactérien

Ces tests de croissance seront effectués à 21°C, 34°C, et à 21°C avec augmentation de température à 34°C après 23, 43 et 63 heures de culture.

Pour chaque condition, trois réplicats sont effectués. Un témoin pour chaque concentration amibienne de départ est également préparé, afin de vérifier que l'amibe n'effectue pas de divisions en l'absence de bactéries (consommation de déchets, réserves énergétiques).

Les concentrations amibiennes initiales lors des essais sur tapis bactérien sont de 4,5 ; 6,5 ; 7 ; 7,5 ; 8 ; 8,5 et 9 ln d'amibes par cm².

Les concentrations bactériennes initiales des tapis bactériens sont de 9,5.10⁵ ; 2.10⁶ ; 1,5.10⁷ ; 2.10⁷ ; 9,5.10⁷ ; 2.10⁸ ; 6,5.10⁸ ; 8.10⁸ et 9,5.10⁸ bactéries cm⁻²

Les différentes analyses effectuées sont résumées dans le **Tableau 3**.

Tableau 3. Synthèse des essais réalisés pour *Acanthamoeba castellanii* et *Naegleria lovaniensis* sur tapis bactérien. Le nombre de réplicats est indiqué dans chaque case. Il s'agit de simples réplicats pour les témoins, mais de triplicats pour les essais.

	<i>Acanthamoeba castellanii</i>		<i>Naegleria lovaniensis</i>	
	Témoin	Essai (triplicat)	Témoin	Essai (triplicat)
21°C	9	13	4	10
34°C	2	4	4	10
21°C puis 34°C après 23 h	5	13	4	10
21°C puis 34°C après 43 h	6	8	4	10
21°C puis 34°C après 63 h	5	13	4	10

2.4 Exploitation des résultats

2.4.1 Calcul de la vitesse spécifique de croissance μ

La vitesse spécifique de croissance μ en phase exponentielle de croissance est calculée à partir des courbes de croissance amibienne (en ln) et correspond à la pente de ces dernières. Elle est calculée sur la partie de la courbe avec la pente la plus importante, selon la formule suivante :

$$\mu = (\ln N_2 - \ln N_1) / (t_2 - t_1)$$

Lorsque cela est possible, μ est calculée sur trois points ou plus. Cependant, le suivi a parfois été effectué sur un nombre de points trop peu nombreux par rapport à la vitesse de croissance (en particulier *N. lovaniensis* à 34°C), et la phase de croissance exponentielle n'est pas clairement visible, le calcul dans ce cas a été effectué sur deux points. Le μ ainsi obtenu est un μ apparent.

2.4.2 Calcul du temps de doublement de la population

Le temps de génération G (temps de doublement de la population) correspond à l'inverse de la vitesse spécifique de croissance corrigé par $\ln 2$ ($G = \ln 2 / \mu$).

2.4.3 Linéarisation de Lineweaver et Burke

La linéarisation de Lineweaver et Burke, basée sur le modèle cinétique de Michaelis-Menten, permet d'approcher les valeurs des constantes de croissance par l'équation :

$$y = x/S + 1/\mu$$

Où S est la concentration en substrat (densité bactérienne). Dans ce cas, l'intersection entre la droite et l'axe des ordonnées correspond à la valeur $1/\mu_{\max}$, alors que l'intersection entre la droite et l'axe des abscisses correspond à la valeur $-1/K_S$. K_S est la constante d'affinité pour le substrat, en d'autres termes il correspond au nombre de bactéries initiales nécessaires par amibe pour que l'amibe puisse croître à une vitesse égale à la moitié de sa vitesse maximale de croissance, μ_{\max} étant la valeur maximale théorique de μ pouvant être atteinte.

Résultats et discussion

L'objectif de l'étude est d'évaluer la croissance et le comportement des deux amibes *Acanthamoeba castellanii* et *Naegleria lovaniensis* (modèle non pathogène de *Naegleria fowleri*) lors de modifications de deux facteurs environnementaux qui sont la température et la quantité de nutriments.

Le comportement des amibes a été évalué tout d'abord en milieu de culture axénique (dépourvu d'autres micro-organismes). Le milieu utilisé pour chaque amibe est celui utilisé en routine pour la culture au laboratoire (SCGYEM pour *N. lovaniensis* et PYG pour *A. castellanii*). Les cultures seront effectuées à 21, 28, 34 et 39°C afin de déterminer la température optimale de croissance des amibes en présence de nutriments en suspension.

Par la suite, les essais ont été menés en présence de bactéries formant un film au fond du puits, reflétant une réalité environnementale (substrat proche d'un biofilm).

Le facteur « concentration en substrat » a été évalué en faisant varier les quantités de bactéries présentes dans le film au fond des puits.

Le facteur « température » a été évalué en testant deux températures, 21 et 34°C, ainsi qu'en effectuant des augmentations de température de 21 à 34°C afin de mimer la circulation de l'eau dans un condenseur de centrale thermique.

Les résultats donnent le nombre d'amibes sous forme trophozoïte (végétative) et excluent les kystes pour deux raisons. La première est technique. Il est en effet très difficile d'effectuer un comptage précis des kystes, ceux-ci se détachant du fond du puits. La seconde raison est que ce sont des formes de résistance. Dans la nature, il est fort probable qu'ils soient déplacés (par le courant d'une rivière par exemple) dans une autre niche écologique avant de revenir à l'état végétatif. Ainsi, pour faciliter l'interprétation des travaux, il est plus judicieux de les écarter du comptage. Enfin, les kystes n'apparaissent en quantités significatives que dans les cultures dont la croissance est nulle et dans les cultures « âgées » dont le milieu de culture est épuisé et/ou dont il ne reste plus d'espace disponible au fond du puits.

1 Croissance amibienne en milieu axénique

La croissance des deux amibes *N. lovaniensis* et *A. castellanii* a été évaluée dans 20 conditions différentes, soit 40 au total pour les 2 amibes. Les essais ont été menés à quatre températures différentes : 21, 28, 34 et 39°C. Les températures de croissance couramment utilisées en recherche pour ces amibes sont respectivement 34°C et 21°C. Certaines études suggèrent néanmoins que leur

température optimale de croissance peut être supérieure (Visvesvara *et al.* 2007 ; Schuster 2002), notamment pour des amibes provenant d'isolats pathogènes (ce qui n'est pas le cas ici) c'est pourquoi la température de 39°C a été choisie. La température de 28°C est une température intermédiaire à laquelle les interactions entre les deux amibes pourraient être importantes, leur capacité à croître à cette température a donc été évaluée. Pour chaque condition de température, cinq concentrations de départ d'amibes ont été utilisées : 5,5, 7, 8,5, 9 et 10 (en ln(amibes/cm²)). La **Figure 5** montre la variation du logarithme népérien de la densité amibienne en fonction du temps pour les résultats obtenus lors de la croissance d' *A. castellanii* à 21°C. A chacune des courbes de croissance correspond une courbe témoin correspondant à des amibes en solution tampon qui permet de confirmer la non-croissance de l'amibe en l'absence de source nutritionnelle. Les dénombrements ont été effectués pendant 7 jours, deux fois par jour sur six puits pour chaque concentration et sur deux puits pour les témoins, avec une observation par puits.

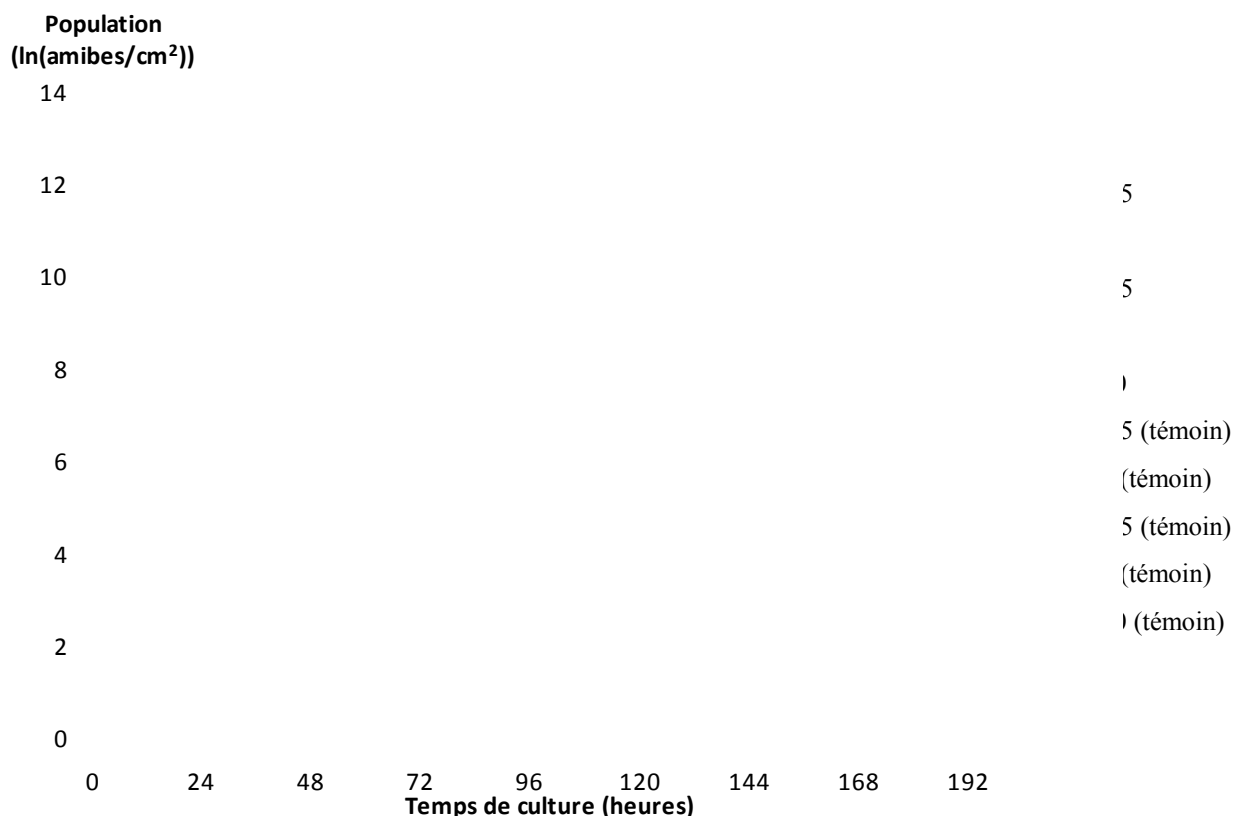


Figure 5. Croissance d'*Acanthamoeba castellanii* à 21°C en milieu axénique à partir de différentes concentrations initiales d'amibes en ln(amibes/cm²).

La courbe témoin montre une croissance qui se stabilise au-dessus de 4 en ln d'amibes par cm². La valeur de la densité amibienne n'a jamais été de 0 au cours des expériences.

Les résultats obtenus avec des ln de concentrations initiales d'amibes par cm² de 5,5 et 7 montrent une croissance régulière des amibes jusqu'à 190 heures avec une pente constante.

Pour les résultats obtenus avec des concentrations de départ amibiennes supérieures à 7 en ln d'amibes par cm^2 , la phase de croissance est ralentie faute de place disponible dans le puits pour une division rapide des amibes. Ces valeurs de départ étant trop importantes pour pouvoir analyser correctement la phase de croissance de l'amibe, elles ne seront pas représentées dans le reste du document. Seules deux concentrations initiales seront retenues pour les résultats suivants : 5,5 et 7 en ln d'amibes par cm^2 , soit environ 250 et 1000 amibes par cm^2 .

1.1 Croissance à 21°C en milieu axénique

1.1.1 Suivi de la croissance d'*Acanthamoeba castellanii* en milieu axénique à 21°C

La **Figure 6** regroupe les résultats obtenus lors de la croissance d' *A. castellanii* à 21°C en milieu axénique.

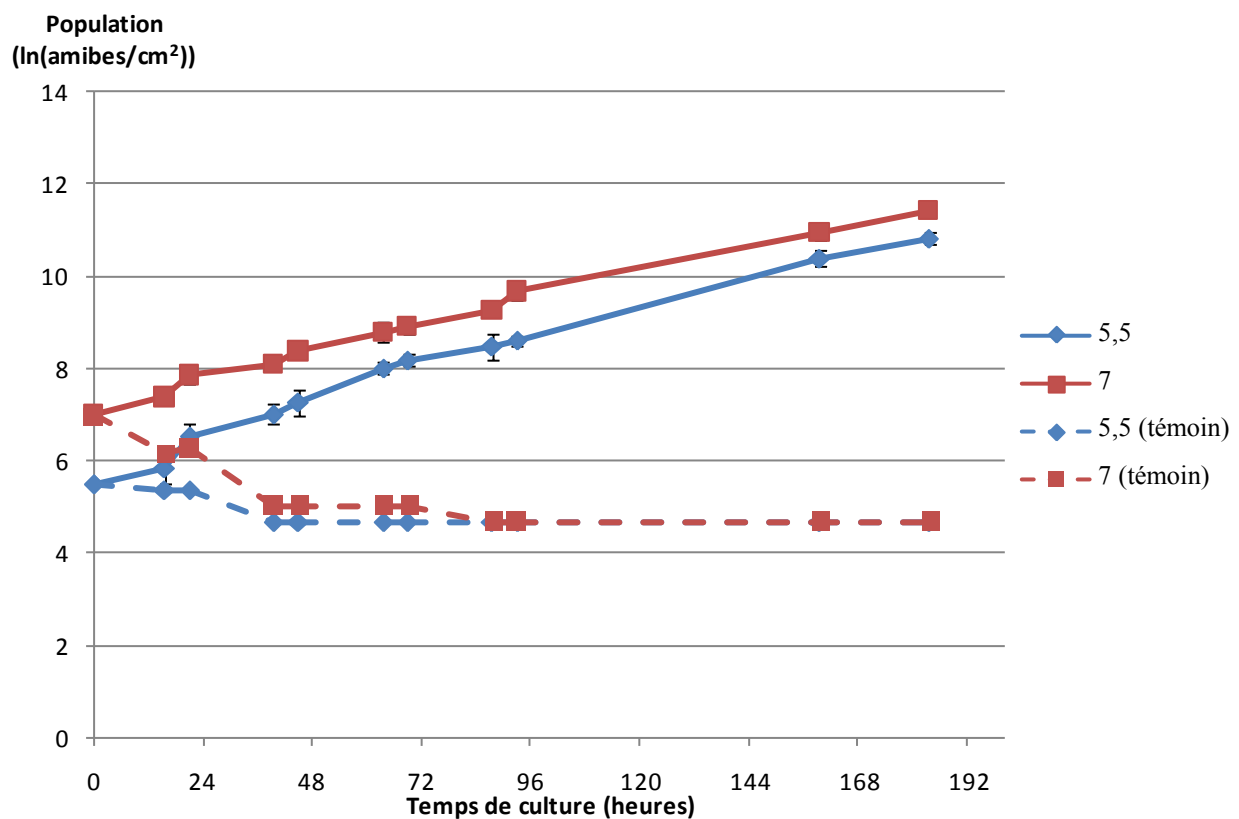


Figure 6. Croissance d'*Acanthamoeba castellanii* à 21°C en milieu axénique en ln(densité amibienne/ cm^2) en fonction du temps (h). Concentrations initiales d'amibes de 5,5 et 7 en ln d'amibes par cm^2 .

A 21°C, la croissance d' *A. castellanii* est lente et régulière dans un substrat axénique. Les temps de doublement de la population (G) sont respectivement de 17 et 29 heures pour les concentrations amibiennes initiales de 5,5 et 7 ln par cm^2 (250 et 1100 amibes par cm^2 environ), pour des valeurs respectives de μ de 0,040 et de 0,024 h^{-1} . La croissance se poursuit encore au bout de 180 heures.

1.1.2 Suivi de la croissance de *Naegleria lovaniensis* en milieu axénique à 21°C

La **Figure 7** montre la croissance de *N. lovaniensis* à 21°C en milieu axénique.

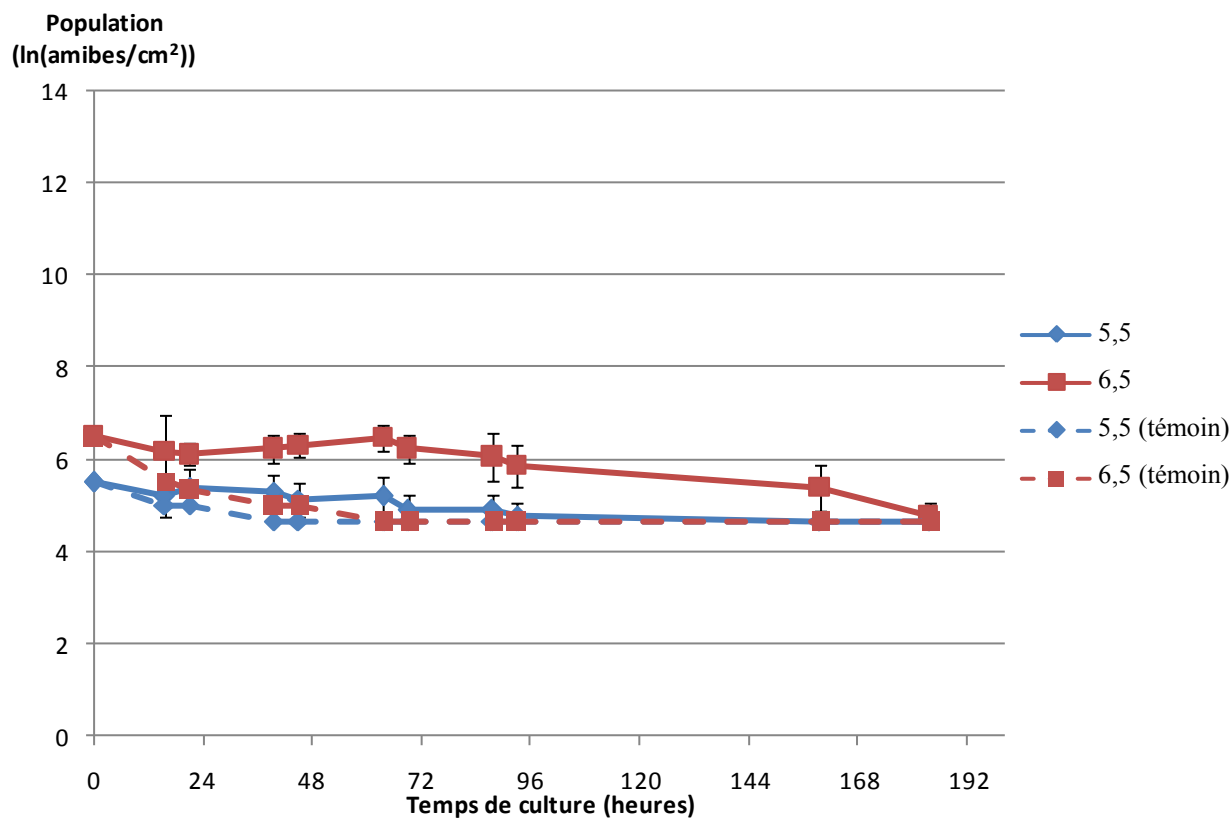


Figure 7. Croissance de *Naegleria lovaniensis* à 21°C en milieu axénique en ln(densité amibienne/cm²) en fonction du temps (h). Concentrations initiales d'amibes de 5,5 et 7 en ln d'amibes par cm².

Les courbes de la **Figure 7** montrent l'absence de croissance de *N. lovaniensis* en milieu axénique. Elle semble incapable de se multiplier à 21°C. La population amibienne se maintient brièvement avant de rejoindre le niveau des courbes des suspensions témoins. La croissance de *N. lovaniensis* semble impossible à cette température en milieu axénique. Ce résultat semble logique au vu du caractère thermophile de l'amibe.

1.2 Croissance à 28°C

1.2.1 Suivi de la croissance d'*Acanthamoeba castellanii* en milieu axénique à 28°C

La **Figure 8** montre les résultats obtenus pour la croissance d' *A. castellanii* à 28°C en milieu axénique.

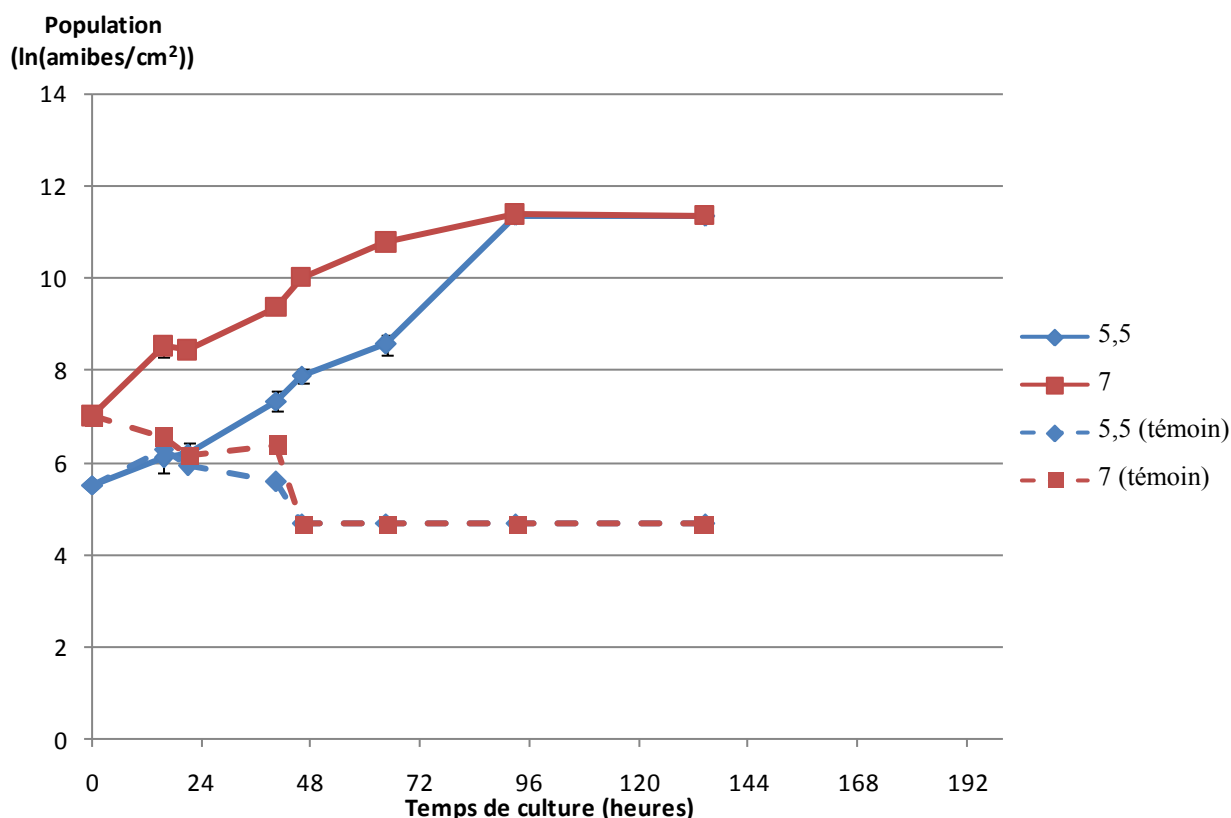


Figure 8. Croissance d'*Acanthamoeba castellanii* à 28°C en milieu axénique axénique en ln(densité amibienne/cm²) en fonction du temps (h). Concentrations initiales d'amibes de 5,5 et 7 en ln d'amibes par cm².

A une température de 28°C, l'amibe *A. castellanii* croît à une vitesse relativement importante. En effet, une croissance stationnaire est atteinte après 90 heures environ. Les temps de doublement de la population sont respectivement de 11 heures et 12 heures pour les concentrations initiales de 5,5 et 7 ln par cm² (pour des valeurs respectives de μ de 0,065 et 0,059 h⁻¹). Ainsi, la croissance est environ 1,5 à 3 fois plus rapide à 28°C qu'à 21°C (temps de doublement de 17 et 29 heures). Il est à noter que la croissance semble moins régulière qu'à 21°C.

1.2.2 Suivi de la croissance de *Naegleria lovaniensis* en milieu axénique à 28°C

La **Figure 9** donne les résultats obtenus pour la croissance de *N. lovaniensis* à 28°C en milieu axénique.

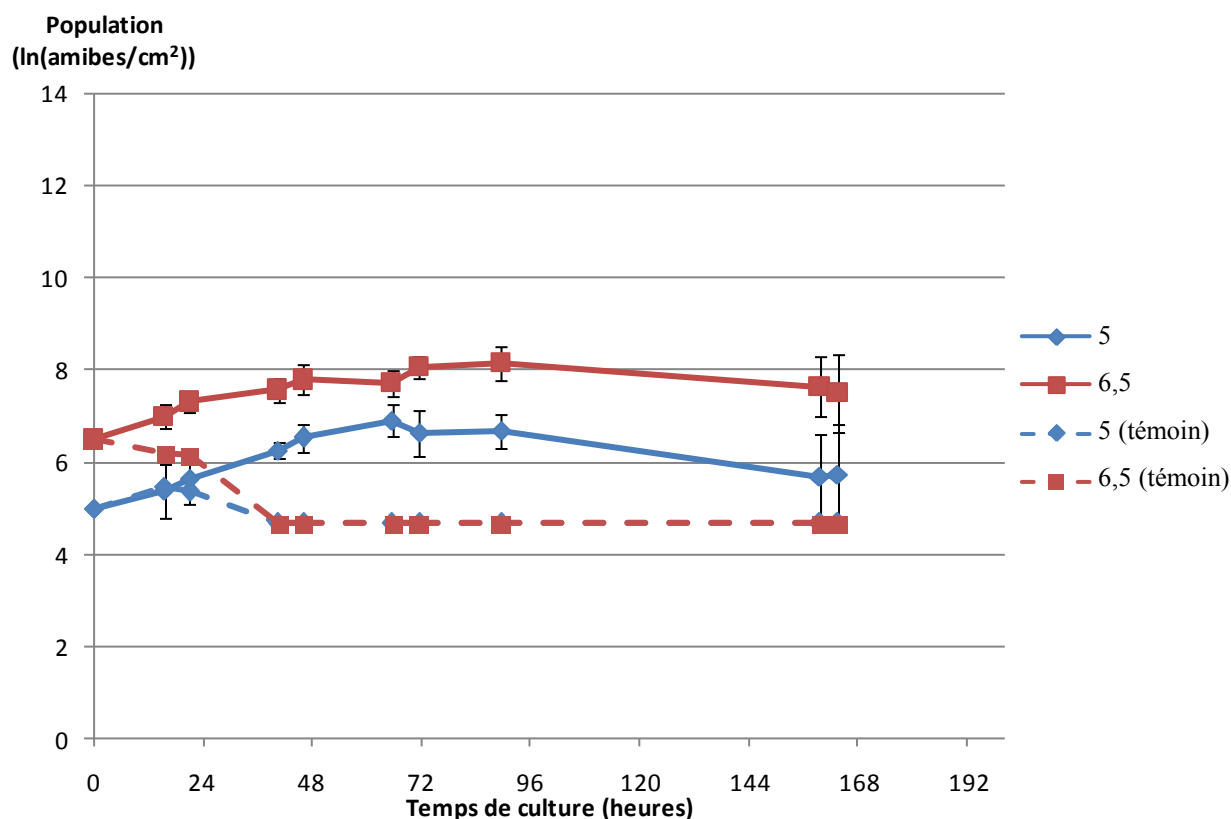


Figure 9. Croissance de *Naegleria lovaniensis* à 28°C en milieu axénique en ln(densité amibienne/cm²) en fonction du temps (h). Concentrations initiales d'amibes de 5 et 7 en ln d'amibes par cm².

Les courbes de croissance obtenues à 28°C et en milieu axénique montrent que *N. lovaniensis* semble capable de croître lentement. Les temps de doublement de la population sont respectivement de 19 heures et de 31 heures pour les concentrations initiales de 5 et 6,5 ln par cm² et les vitesses spécifiques de croissance μ sont de 0,036 et de 0,023 h⁻¹. Cependant, la population amibienne atteint une phase stationnaire, sans pour autant que la confluence soit atteinte dans les puits. En effet, la concentration maximale atteinte entre 7 et 8 ln d'amibes par puits environ alors qu'à confluence, ce chiffre peut atteindre environ 12 ln d'amibes par puits en milieu xénique. Une légère décroissance survient ensuite, mais les valeurs sont toujours supérieures aux populations initiales après 160 heures de culture. Une température de 28°C permettrait donc à *N. lovaniensis* de croître, mais d'après les observations faites lors des essais, l'amibe n'utilise pas toute la surface à sa disposition, et ce pour une raison inconnue mais sûrement liée à la température.

1.3 Croissance à 34°C

1.3.1 Suivi de la croissance d'*Acanthamoeba castellanii* en milieu axénique à 34°C

La **Figure 10** montre la croissance d' *A. castellanii* à 34°C en milieu axénique.

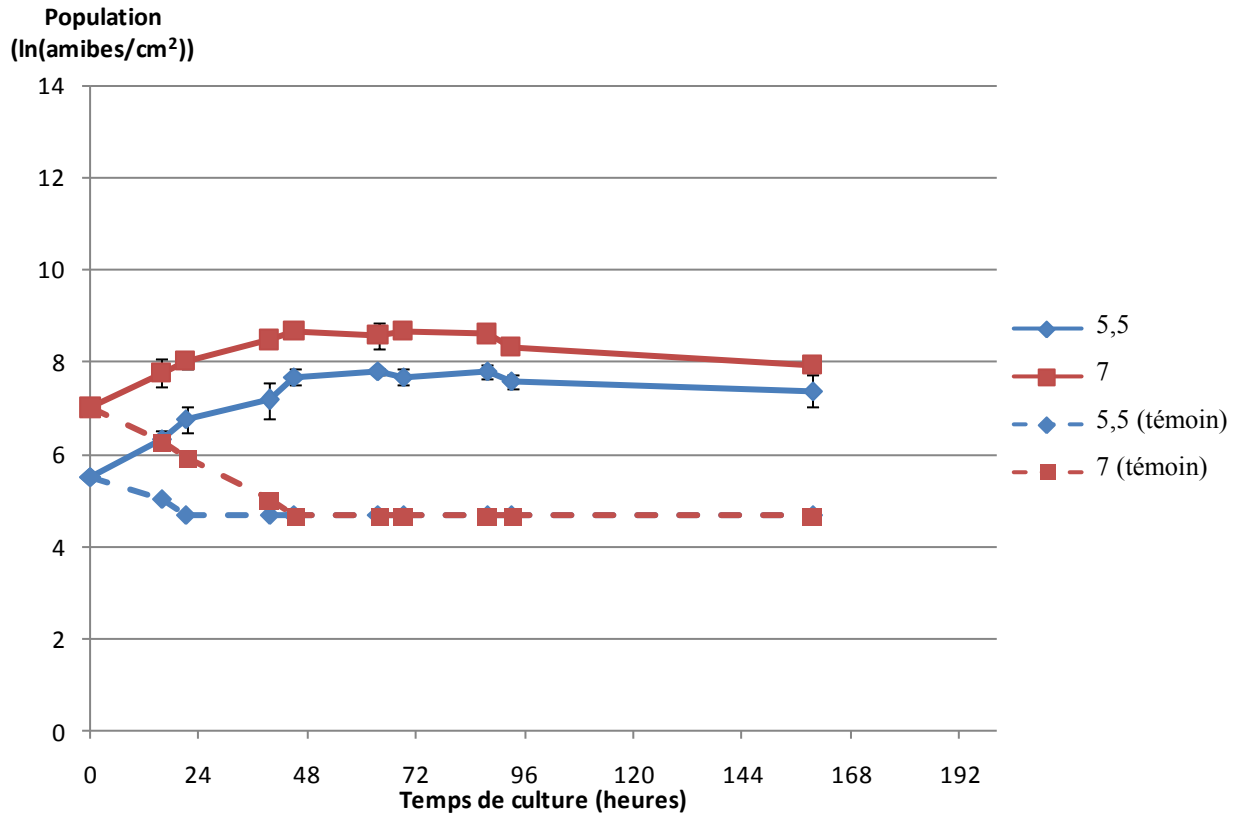


Figure 10. Croissance d'*Acanthamoeba castellanii* à 34°C en milieu axénique en ln(densité ambiante/cm²) en fonction du temps (h). Concentrations initiales d'amibes de 5,5 ln et 7 ln d'amibes par cm².

A. castellanii se multiplie à 34°C durant 48 heures. Les temps de doublement de la population durant cette phase de croissance sont respectivement de 18 heures et de 24 heures pour les concentrations initiales de 5,5 et 7 ln d'amibes par cm². Les valeurs de μ correspondantes sont de 0,039 et 0,029 h⁻¹. Cependant, tout comme *N. lovaniensis* à 28°C, le plateau atteint, entre 8 et 9 ln d'amibes par puits approximativement, ne correspond pas à la confluence de l'amibe. Les conditions sont donc réunies pour assurer la croissance de l'amibe, mais elle n'utilise pas tout l'espace à sa disposition pour se multiplier. Une température de 34°C serait donc certainement trop importante pour permettre à *A. castellanii* de croître dans des conditions favorables.

1.3.2 Suivi de la croissance de *Naegleria lovaniensis* en milieu axénique à 34°C

La **Figure 11** montre la croissance de *N. lovaniensis* à 34°C en milieu axénique.

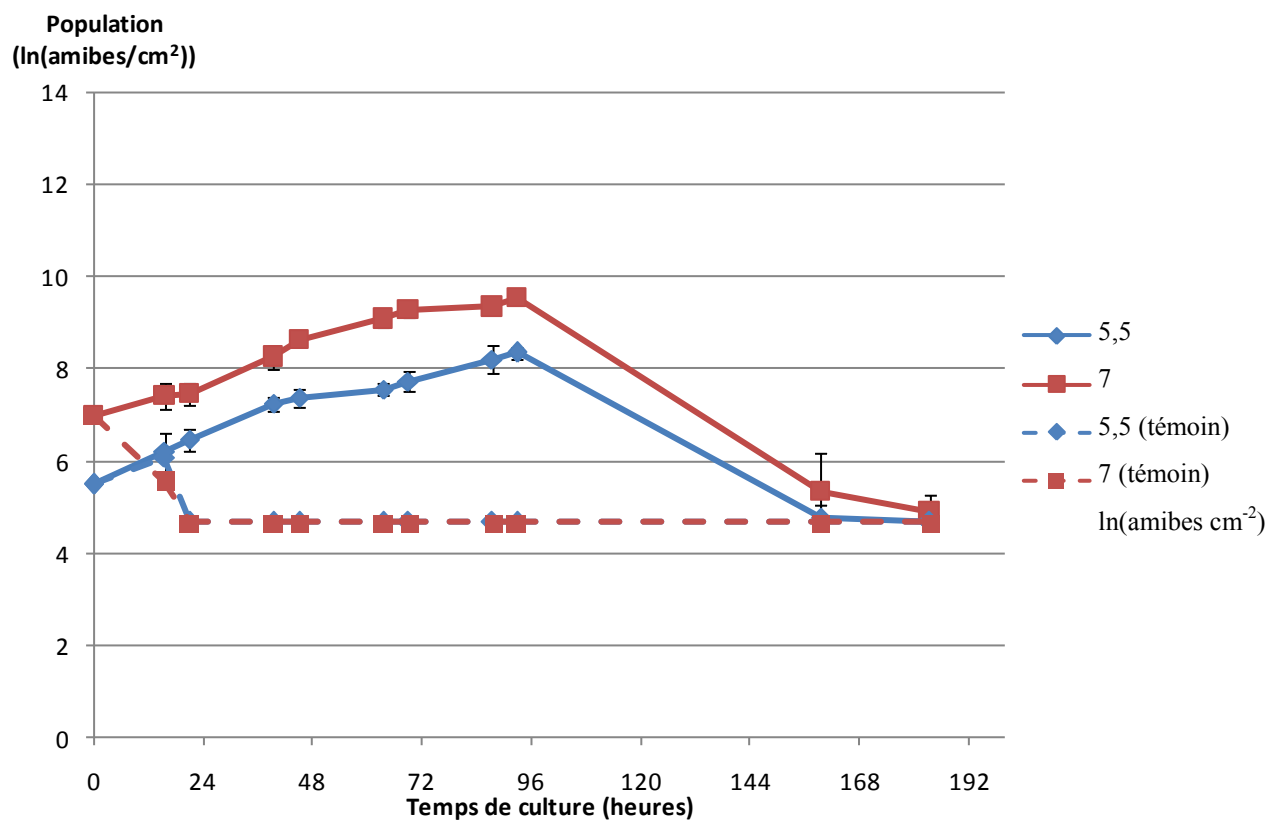


Figure 11. Croissance de *Naegleria lovaniensis* à 34°C en milieu axénique en $\ln(\text{densité amibienne}/\text{cm}^2)$ en fonction du temps (h). Concentrations initiales d'amibes de 5,5 et 7 en \ln d'amibes par cm^2 .

La croissance de *N. lovaniensis* à 34°C s'effectue à une vitesse relativement rapide durant 96 heures. Les temps de doublement de la population sont alors respectivement de 16 heures et 15 heures pour les concentrations initiales de 5,5 et 7 \ln d'amibes par cm^2 (valeurs de μ de 0,043 et 0,048 h^{-1}). Cependant, la concentration amibienne a diminué à 150 heures de culture sans avoir atteint la confluence au préalable. Une grande quantité de kystes est observée au microscope. L'hypothèse d'un manque de nutriments à ce stade n'est pas certaine et il aurait été intéressant de suivre la concentration de glucose dans les puits.

1.4 Croissance à 39°C

1.4.1 Suivi de la croissance d'*Acanthamoeba castellanii* en milieu axénique à 39°C

La **Figure 12** montre les courbes de croissance obtenues pour *A. castellanii* à 39°C en milieu axénique.

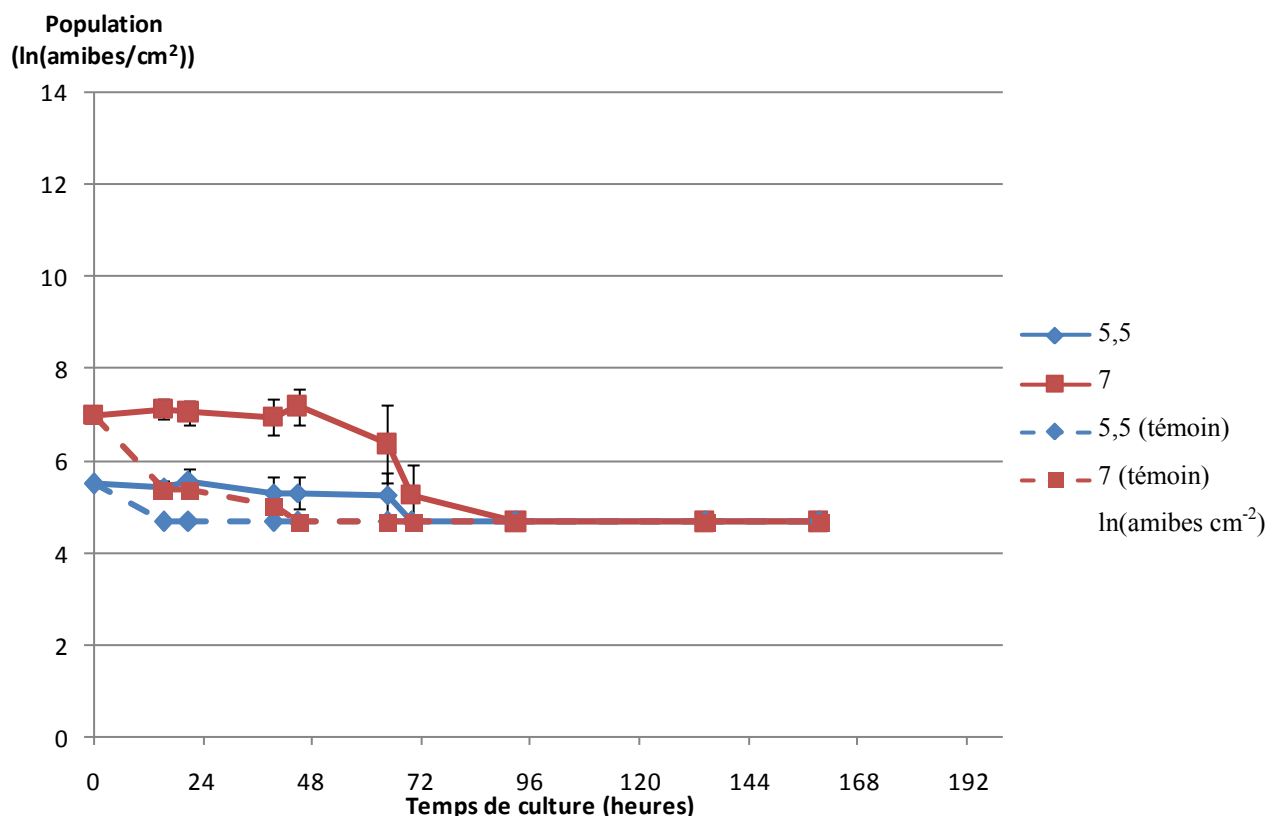


Figure 12. Croissance d'*Acanthamoeba castellanii* à 39°C en milieu axénique en ln(densité amibienne/cm²) en fonction du temps (h). Concentrations initiales d'amibes de 5,5 et 7 en ln d'amibes par cm².

Il n'a pas été observé d'augmentation de la concentration amibienne au cours des premières heures. Une température de 39°C semble trop élevée pour garantir une croissance d'*A. castellanii* en milieu axénique. La population décroît après 48 heures environ pour rejoindre rapidement le niveau du témoin. *A. castellanii* étant une amibe non thermotolérante, ces résultats sont attendus. Cependant, l'amibe est capable de se reproduire à des températures supérieures à 40°C lors d'une EAG. **Griffin** a proposé en **1972** que la thermotolérance d' *A. castellanii* était liée à son pouvoir pathogène. Si cette hypothèse est retenue, la souche utilisée au laboratoire dans la présente étude serait une souche à faible pouvoir pathogène, n'ayant pas la capacité de croître à 40°C.

1.4.2 Suivi de la croissance de *Naegleria lovaniensis* en milieu axénique à 39°C

La **Figure 13** montre la croissance de *N. lovaniensis* à 39°C en milieu axénique.

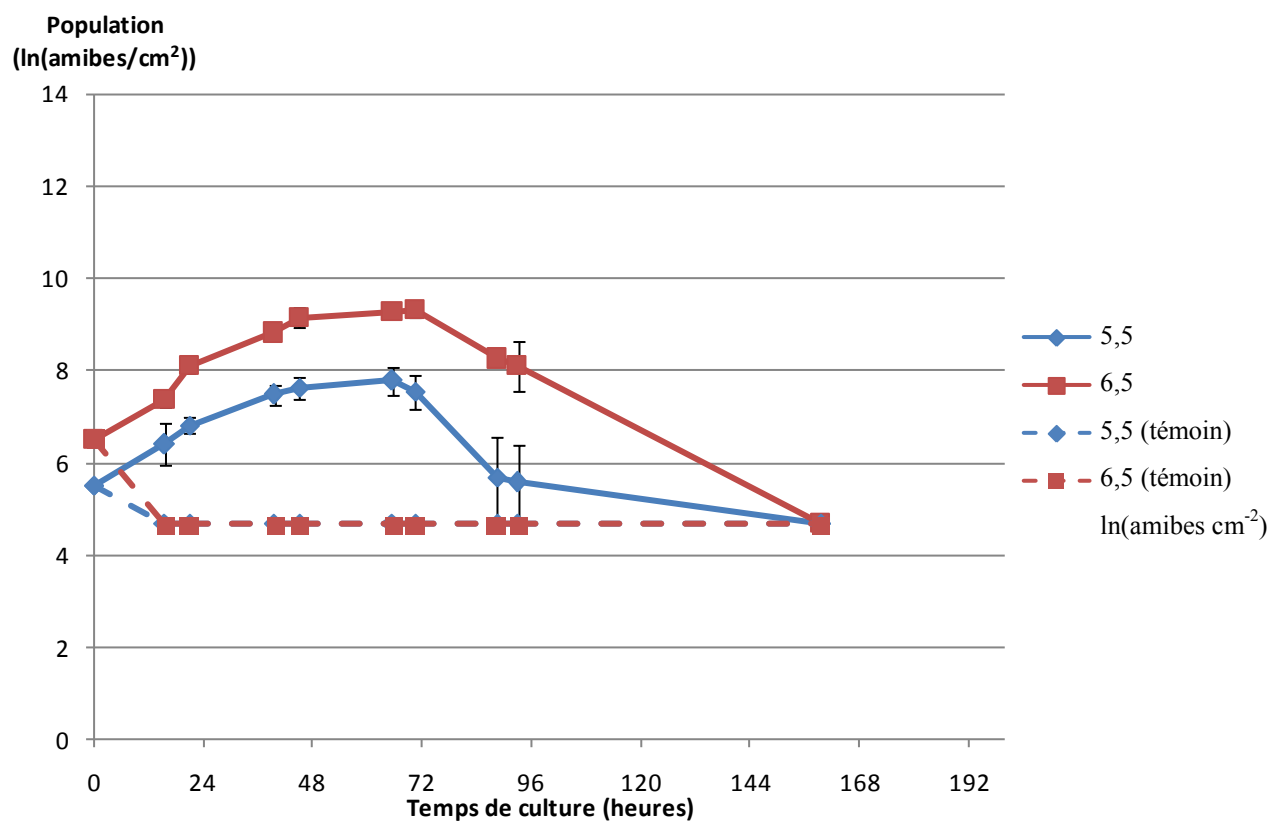


Figure 13. Croissance de *Naegleria lovaniensis* à 39°C en milieu axénique en ln(densité amibienne/cm²) en fonction du temps (h). Concentrations initiales d'amibes de 5,5 et 6,5 en ln d'amibes par cm².

Le nombre d'amibes augmente durant 72 heures. La croissance rapide permet d'atteindre une concentration de 9 ln d'amibes par cm². A 39°C la croissance de *N. lovaniensis* est plus rapide qu'à 34°C. Les temps de doublement de la population pour les concentrations amibiennes initiales de 5,5 et 6,5 ln d'amibes par cm² sont respectivement de 16 heures et de 13 heures, avec des valeurs de μ de 0,043 et 0,054 h⁻¹. Les concentrations maximales atteintes par la population amibienne sont similaires à celles obtenues à 34°C. Une décroissance de la population est observée après que ces valeurs aient été atteintes à 72 heures de culture. Cette décroissance intervient plus tôt, dès 96h, la croissance ayant été plus rapide à 39°C qu'à 34°C.

1.5 Synthèse des résultats en milieu axénique

La croissance des deux amibes *N. lovaniensis* et *A. castellanii* a été évaluée à quatre températures différentes : 21, 28, 34 et 39°C afin d'estimer leur vitesse spécifique de croissance et de définir les températures auxquelles les deux amibes pourraient entrer en compétition.

Au sens premier, on utilise les termes de température optimale de croissance pour désigner la température à laquelle les micro-organismes se multiplient avec la vitesse la plus élevée. Le paramètre μ , ou vitesse spécifique de croissance, inversement proportionnel au temps de doublement de la population, est utilisé pour évaluer cette vitesse de croissance.

Les résultats sont résumés dans le **Tableau 4**.

1.5.1 Température optimale de croissance

Tableau 4. Valeurs moyennes de μ pour *Naegleria lovaniensis* et *Acanthamoeba castellanii* en fonction de la température en milieu axénique.

Amibe	μ à 21°C en h ⁻¹	μ à 28°C en h ⁻¹	μ à 34°C en h ⁻¹	μ à 39°C en h ⁻¹
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	0,032±0,008	0,062±0,003	0,034±0,005	-
<i>Naegleria lovaniensis</i>	-	0,029±0,007	0,045±0,002	0,049±0,006

Les résultats obtenus lors des essais de croissance en milieu axénique montrent que les températures de croissance de 21 et 34°C ne sont pas les températures optimales de croissance respectives d'*A. castellanii* et de *N. lovaniensis*.

En effet, *A. castellanii* se cultive bien plus rapidement à 28°C ($\mu = 0,062 \pm 0,003$ h⁻¹) qu'à 21°C ($\mu = 0,032 \pm 0,008$ h⁻¹). Au-delà de 34°C, l'amibe n'est plus capable de croître, sa température maximale de croissance dans ces conditions de culture se situe donc entre 34 et 39°C.

Concernant *N. lovaniensis*, la température optimale de croissance se situe plutôt vers 39°C, sa vitesse spécifique de croissance ($\mu = 0,049 \pm 0,006$ h⁻¹) étant légèrement plus élevée qu'à 34°C ($\mu = 0,045 \pm 0,002$ h⁻¹). L'amibe est incapable de croître à 21°C, mais se cultive à 28°C. Sa température minimale de croissance se situe donc entre 21 et 28°C.

Ainsi, à supposer que la croissance des amibes dans l'environnement s'effectue de façon similaire à la croissance en milieu axénique, l'apparition de « blooms » (proliférations incontrôlées) amibiens serait plus probable aux températures auxquelles les vitesses de croissance sont les plus rapides. Entre 28 et 34°C existe une zone de compétition possible entre les deux amibes, ce qui signifie que la présence de chacune est envisageable, mais qu'en fonction des paramètres environnementaux il se peut qu'une seule des deux soit présente si un phénomène de compétition entre effectivement en jeu. Si la capacité du protozoaire à s'imposer face à ses compétiteurs est liée

à sa capacité à croître rapidement, on peut supposer qu'*A. castellanii* dominerait à 28°C et que *N. lovaniensis* serait quant à elle présente à 34°C.

Ont également été constatées des différences de vitesse de croissance selon les concentrations initiales d'amibes. Les amibes proviennent d'une même suspension de départ et disposent d'une même quantité de substrat au démarrage de l'expérience, l'une des hypothèses pouvant être émise serait liée au pourcentage d'occupation de la surface de culture. En effet, nous avons observé empiriquement au cours d'autres expériences que des amibes dans des cultures avec un trop faible nombre d'individus ne se multipliaient pas mais s'enkystaient. Le nombre initial d'amibes par cm² serait donc un facteur qui pourrait favoriser ou inhiber la croissance de l'amibe. Un ralentissement de la vitesse de croissance s'observe également lorsque l'amibe est proche de la confluence. Dans le cas présent, les valeurs de μ sont globalement supérieures lorsque la concentration initiale en ln d'amibes par cm² est de 5,5 (250 amibes par cm² environ) pour *A. castellanii* et, inversement, plus importantes pour une concentration initiale de 7 en ln d'amibes par cm² (1100 amibes par cm² environ) pour *N. lovaniensis*. Cependant, le diamètre moyen de *N. lovaniensis* (17,5 μ m) étant inférieur à celui d'*A. castellanii* (32,5 μ m), si on ramène ces chiffres à un pourcentage d'occupation initial de la surface des puits (1,883 cm²), on obtient des valeurs proches : 2,0‰ pour *A. castellanii* et de 2,6‰ pour *N. lovaniensis*. Ces conditions initiales pourraient garantir une meilleure croissance, mais d'autres tests sont nécessaires pour pouvoir l'affirmer. Les mécanismes mis en jeu pourraient être similaires au *quorum sensing* bactérien ou se rapprocher de mécanismes de signalisation utilisés par des organismes pluricellulaires, comme cela a déjà été mis en évidence chez *D. discoideum* (Eichinger *et al.* 2005).

1.5.2 Rendement de la croissance

Si la température influence la capacité d'une amibe à se reproduire rapidement, d'autres facteurs doivent être pris en compte pour apprécier la qualité d'une croissance amibienne à une température donnée. En effet, une température peut être optimale pour la vitesse de croissance et conduire en même temps à diminuer la concentration de formes végétatives par la suite au profit de formes enkystées. On peut ainsi constater en regardant les courbes de croissance que les populations amibiennes ayant effectué leur croissance à des températures élevées diminuent rapidement par la suite. Le **Tableau 5** récapitule les rendements maximaux (nombre maximum de trophozoïtes atteint / nombre initial de trophozoïtes) et les rendements après 150 heures de culture environ par rapport à la quantité initiale d'amibes (nombre de trophozoïtes encore présents après 150 heures / nombre initial de trophozoïtes), ainsi que le nombre total d'amibes ayant été produites par puits durant l'opération (en supposant qu'il n'y a plus d'amibes produites en phase stationnaire ou de déclin).

Tableau 5. Rendements de croissance maximaux, rendements de croissance après 150 heures et quantité d'amibes produite au total pour *A. castellanii* et *Naegleria lovaniensis* en milieu axénique.

21°C	Quantité initiale d'amibes par cm ²	Rendement de croissance maximal	Rendement de croissance après 150h	Quantité d'amibes produites par puits
<i>A. castellanii</i>	245	376	134	91797
	1100	46	51	49417
<i>N. lovaniensis</i>	245	0,9	0,4	0,0
	665	1,6	0,5	249,0

28°C	Quantité initiale d'amibes par cm ²	Rendement de croissance maximal	Rendement de croissance après 150h	Quantité d'amibes produites par puits
<i>A. castellanii</i>	245	347	344	84721
	1100	79	79	85585
<i>N. lovaniensis</i>	150	6,7	2,0	844
	665	5,3	3,1	2833

34°C	Quantité initiale d'amibes par cm ²	Rendement de croissance maximal	Rendement de croissance après 150h	Quantité d'amibes produites par puits
<i>A. castellanii</i>	245	10	6,5	2196
	1100	5,2	2,5	4614
<i>N. lovaniensis</i>	245	17	0,5	3985
	1100	13	0,2	12948

39°C	Quantité initiale d'amibes par cm ²	Rendement de croissance maximal	Rendement de croissance après 150h	Quantité d'amibes produites par puits
<i>A. castellanii</i>	245	1,0	0,4	10
	1100	1,2	0,1	229
<i>N. lovaniensis</i>	245	9,8	0,4	2148
	665	17	0,2	10383

D'après ces résultats, on observe nettement qu'*A. castellanii* possède la capacité de croître et de maintenir sa population entre 21 et 34°C en milieu axénique. Les quantités d'amibes produites sont très importantes à 21 et 28°C. A 39°C, l'amibe ne semble plus capable de croître de manière significative.

N. lovaniensis est quant à elle capable de croître en milieu axénique entre 28 et 39°C au vu des résultats. Cependant, certaines nuances sont à apporter. En effet, si les quantités d'amibes produites à 34°C et 39°C sont relativement importantes (inférieures d'un facteur 10 à celles produites avec *A. castellanii* aux températures de 21 et 28°C cependant), la population amibienne chute rapidement et

après environ 150 heures et se retrouve à un niveau inférieur au niveau de départ. En pratique, cela se traduit par la nécessité d'entretenir ces cultures de manière plus stricte que les cultures d'*A. castellanii* au laboratoire. Il pourrait ainsi être judicieux de conserver les cultures de *N. lovaniensis* à une température plus proche de 28°C que de 34°C afin d'améliorer l'entretien des cultures en termes de gestion du temps et des milieux. En effet, la décroissance de la population intervient plus tard lorsque la température est inférieure.

Dans l'hypothèse où ces résultats seraient transposables à un environnement « naturel » (naturel ou comportant des installations anthropiques), quelques observations peuvent être ajoutées. On rappelle que l'amibe la plus indésirable est, eu égard à son caractère pathogène imprévisible, bien entendu *N. fowleri* dont le modèle est ici *N. lovaniensis*. Un environnement aquatique de température constante élevée ne semble pas être un idéal pour *Naegleria* qui, bien que capable d'une croissance rapide à cette température, verrait certainement sa population s'écrouler faute de nutriments ou pour une autre raison liée à la température élevée. Cependant, les observations faites ici pourraient aller dans le même sens que celles faites par **Delattre et Oger (1981)**. Ces derniers, partant du principe que des pics de population de *Naegleria* étaient fréquemment observés en milieux anthropisés (circuits de refroidissement de centrales thermiques notamment) ont utilisé un pilote de laboratoire pour confirmer ces observations. Il s'agit d'un circuit d'eau contenant un « point chaud » à 45°C. Si le circuit de contrôle de température constante à 45°C a vu la population amibienne décroître très rapidement, les circuits à 37°C et à 20°C contenant un point chaud ont permis une multiplication importante de *N. fowleri* et le maintien de la population pendant au moins 3 semaines.

Cet avantage sélectif à haute température de *Naegleria* viendrait s'ajouter à l'avantage sélectif procuré par la capacité à flageller de l'amibe. Cependant, aucune forme flagellée n'a été observée durant ces essais. Sachant que les tests de flagellation sont effectués en général entre 27 et 37°C, la température n'est pas en cause ici. Les conditions expérimentales (petite taille du puits) ont peut-être empêché ce processus. Cependant, aucune forme flagellée n'a été observée auparavant lors de l'entretien hebdomadaire des cultures de l'amibe. L'hypothèse que l'on peut émettre alors est que l'amibe ne flagelle pas lorsque des nutriments sont dissous dans le milieu (les tests de flagellation s'effectuent dans de l'eau distillée). Les essais effectués sur tapis bactérien, tout en se rapprochant des conditions naturelles dans lesquelles l'amibe évolue, ont permis par la suite d'observer des formes flagellées.

2 Croissance amibienne en présence d'un tapis bactérien

Les tests en milieu axénique sont simples à mettre en œuvre et fournissent de précieux renseignements sur les conditions de culture optimales des amibes en laboratoire. Cependant, l'exploitation des résultats comme modèle d'un environnement naturel est limitée. En effet, l'amibe se nourrit principalement de bactéries. Des expériences ont déjà été menées dans ce sens (**Jung et al. 2008, Wang et Ahearn 1997**). Cependant, les sources nutritionnelles étaient toujours des bactéries en suspension, or l'amibe est attachée à un support (biofilm) dans son environnement et se nourrit de bactéries sessiles. La croissance en présence d'un substrat bactérien en suspension est donc limitée pour l'amibe. Pour se rapprocher des conditions naturelles, les essais suivants ont été effectués sur un tapis bactérien.

Les tests de croissance en milieu xénique (tapis bactérien d'*E. coli* K12) ont été effectués aux températures de 21°C et 34°C pour les deux amibes *N. lovaniensis* et *A. castellanii*. Des augmentations de températures de 21 à 34°C ont également été mises en œuvre afin de mimer l'augmentation de température qui peut exister dans un circuit de refroidissement. Différentes concentrations de départ d'amibes (de 4,5 à 9 ln d'amibes par cm²) et de bactéries (de l'ordre de 10⁶ bactéries par cm² à 10⁹ bactéries par cm²) ont été testées (voir le **Tableau 3**). Seuls certains résultats seront présentés sous forme graphique dans le présent rapport, sous forme d'un exemple de courbe de croissance pour chaque condition testée. Au total, 55 tests de croissance pour *A. castellanii* et 50 pour *N. lovaniensis* ont été effectués. Les mesures ont été effectuées toutes les 24 heures pendant 7 jours environ, sur trois puits pour chaque concentration et sur un puits pour les témoins, avec une observation par puits. Tous les résultats obtenus ont été exploités dans la synthèse.

2.1 Croissance à 21°C

2.1.1 Suivi de la croissance d'*Acanthamoeba castellanii* sur tapis bactérien à 21°C

La **Figure 14** présente les résultats sur la croissance d' *A. castellanii* à 21°C en milieu xénique.

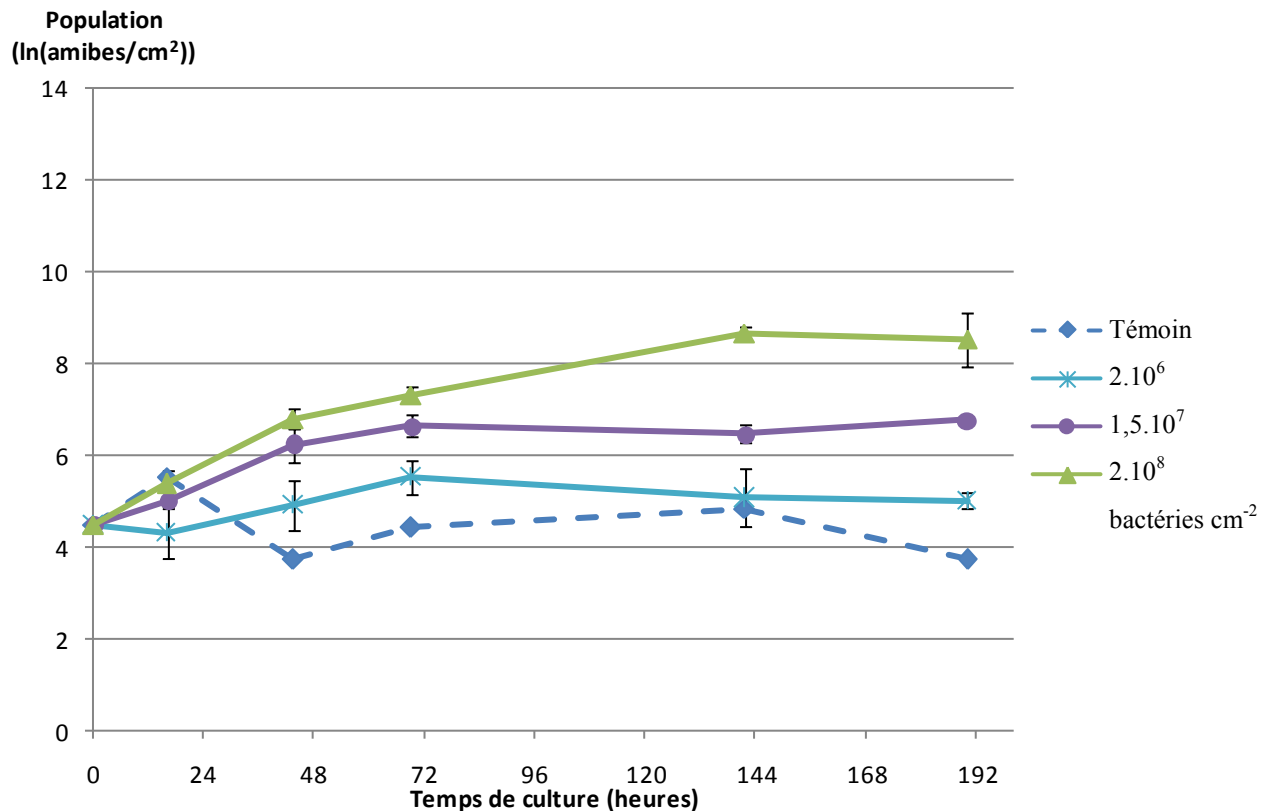


Figure 14. Croissance d'*Acanthamoeba castellanii* à 21°C en ln(densité amibienne/cm²) en fonction du temps (h) en présence de différentes concentrations d'*E. coli* K12 (2×10^6 à 2×10^8 bactéries/cm²) et d'un témoin sans bactérie.

Concentration initiale d'amibes : $4,5 \ln$ d'amibes par cm².

Les résultats obtenus pour la croissance d'*A. castellanii* à 21°C sont conformes à ceux attendus. La croissance de l'amibe est possible. Les temps de doublement de la population amibienne en présence des concentrations initiales de 2×10^8 et $1,5 \times 10^7$ bactéries par cm² sont respectivement de 14 heures et de 19 heures. La croissance s'arrête plus tôt en présence d'une charge bactérienne initiale inférieure, la quantité finale d'amibes obtenue semble ainsi corrélée à la quantité initiale de bactéries.

2.1.2 Suivi de la croissance de *Naegleria lovaniensis* sur tapis bactérien à 21°C

La **Figure 15** montre la croissance de *N. lovaniensis* à 21°C en milieu xénique.

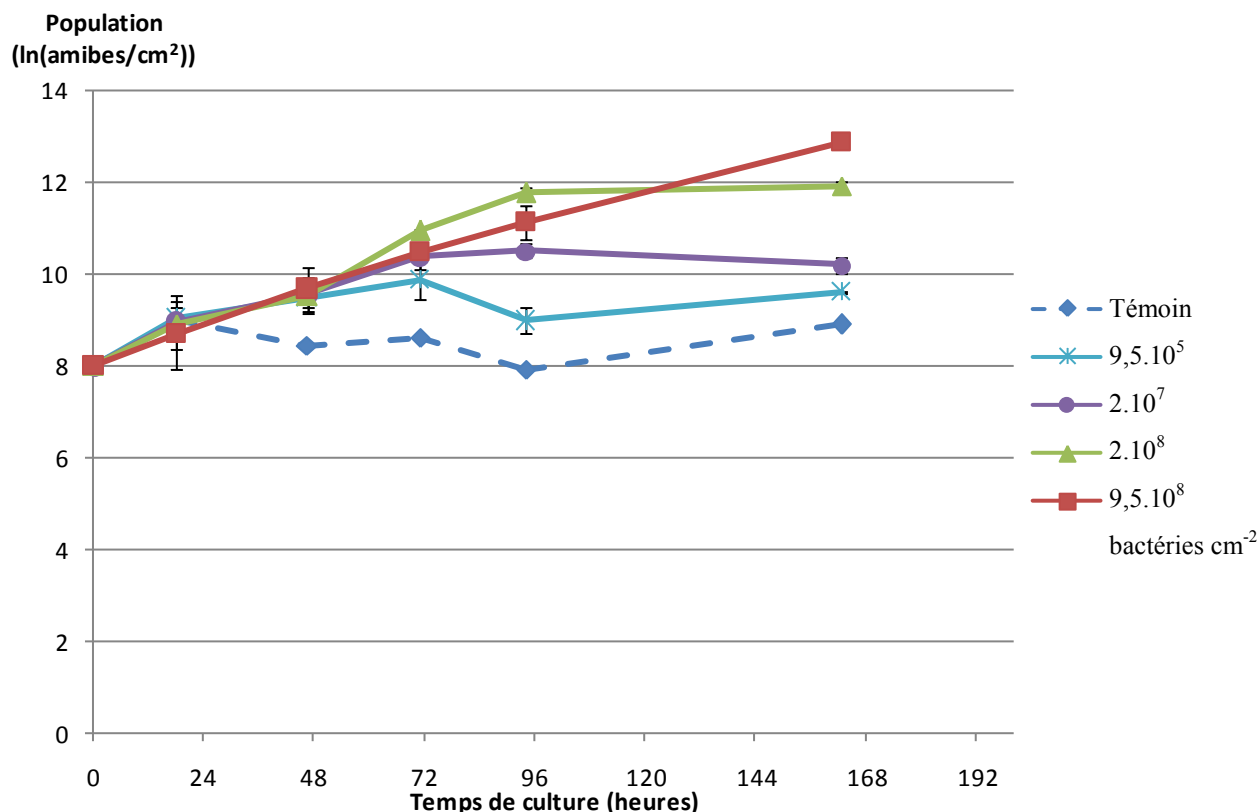


Figure 15. Croissance de *Naegleria lovaniensis* à 21°C en $\ln(\text{densité amibienne/cm}^2)$ en fonction du temps (h) en présence de différentes concentrations d'*E. coli* K12 ($9,5 \times 10^5$ à $9,5 \times 10^8$ bactéries/cm²) et d'un témoin sans bactérie. Concentration initiale d'amibes : 8 \ln d'amibes par cm².

Contrairement aux résultats des tests en milieu axénique, les résultats des tests de croissance sur tapis bactérien à 21°C montrent une croissance de *N. lovaniensis*. La croissance est assez lente. Les temps de doublement de la population sont respectivement de 15 heures et 24 heures pour les concentrations initiales de 2×10^8 et $9,5 \times 10^8$ bactéries par cm², mais la croissance s'arrête plus tôt en présence d'une charge bactérienne initiale inférieure. Il faut noter la croissance régulière de *N. lovaniensis* à cette température lors d'un apport initial important en bactéries.

Tout comme pour *A. castellanii*, il semblerait donc d'après les observations que la quantité d'amibes produite soit corrélée à la quantité de bactéries disponible au début de l'expérience. Ainsi, la croissance s'est arrêtée avant que l'amibe ne soit à confluence et la totalité de la source de nutriments a sûrement été utilisée. Il a également été constaté la présence d'amibes sous forme flagellée à 163 heures pour une concentration initiale en bactéries de 9×10^8 bactéries par cm², alors qu'aucune observation de forme flagellée n'a été faite au cours des tests de croissance en

milieu axénique pour la même température. Ces formes flagellées peuvent être responsables d'une dissémination de l'amibe dans l'environnement, mais les conditions nécessaires à leur apparition sont pour l'instant mal connues.

2.2 Croissance à 34°C

2.2.1 Suivi de la croissance d'*Acanthamoeba castellanii* sur tapis bactérien à 34°C

La **Figure 16** montre la croissance d' *A. castellanii* à 34°C en milieu xénique.

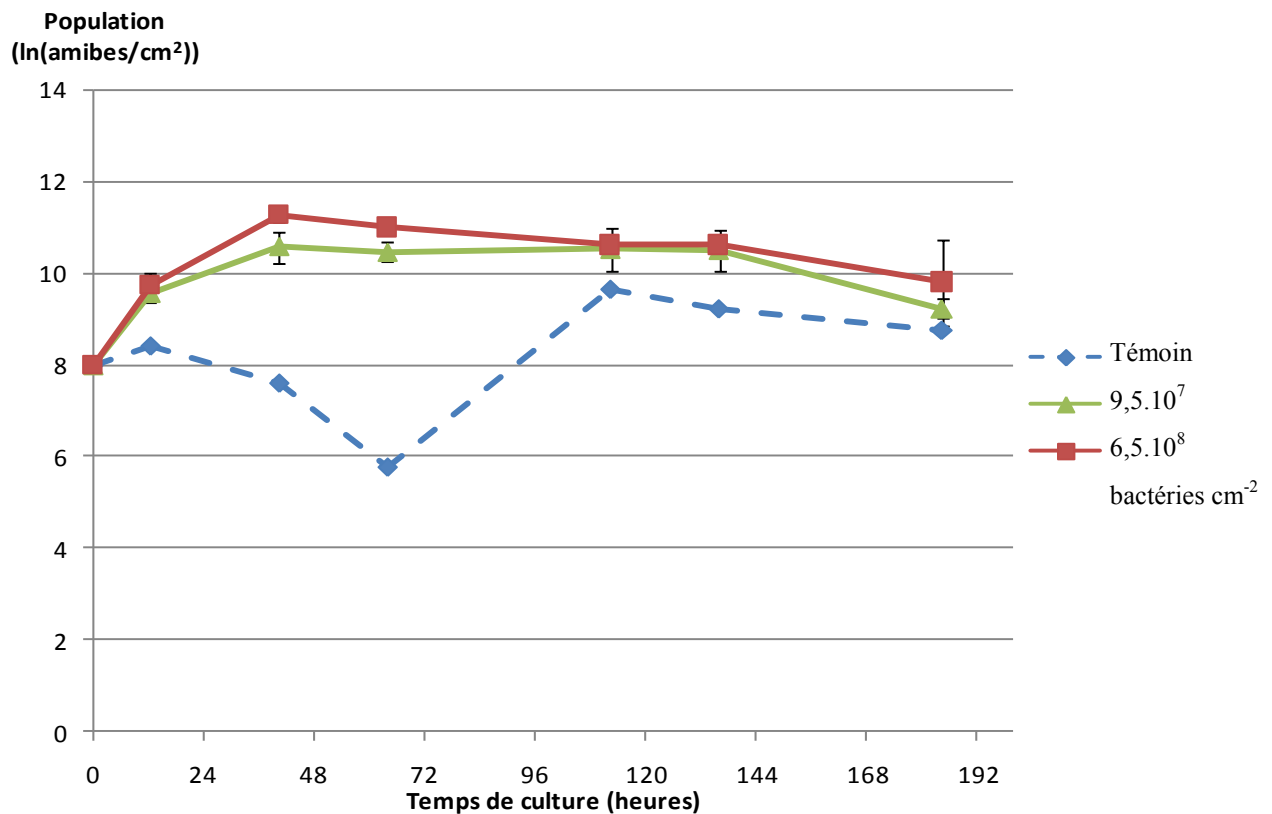


Figure 16. Croissance d'*Acanthamoeba castellanii* à 34°C en ln(densité amibienne/cm²) en fonction du temps (h) en présence de différentes concentrations d'*E. coli* K12 ($9,5 \times 10^7$ à $6,5 \times 10^8$ bactéries/cm²) et d'un témoin sans bactérie.

Concentration initiale d'amibes : 8 ln d'amibes par cm².

A. castellanii se multiplie rapidement à 34°C en présence du tapis bactérien. Les temps de doublement de la population sont respectivement de 11 heures et 9 heures pour les concentrations bactériennes initiales de $9,5 \times 10^7$ et $6,5 \times 10^8$ bactéries par cm². La croissance est plus rapide qu'en milieu axénique, et l'amibe est à confluence lorsque la courbe de croissance atteint son plateau, qui persistera jusqu'à la fin de l'essai. Les deux concentrations bactériennes ont permis à l'amibe d'atteindre ce plateau. La croissance observée sur le témoin serait due à une contamination bactérienne (certainement due à un aérosol pendant la manipulation).

2.2.2 Suivi de la croissance de *Naegleria lovaniensis* sur tapis bactérien à 34°C

La **Figure 17** donne les courbes de croissance de *N. lovaniensis* obtenues à 34°C en milieu xénique.

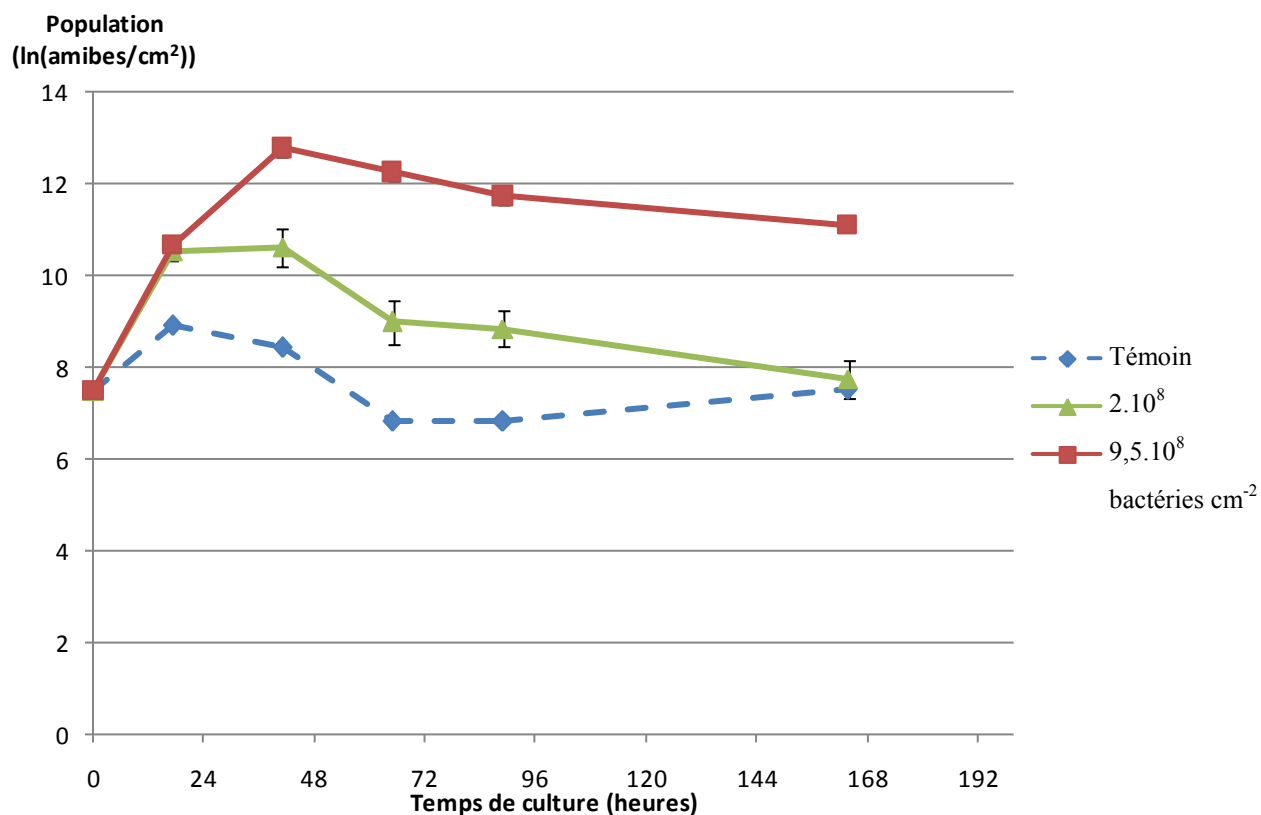


Figure 17. Croissance de *Naegleria lovaniensis* à 34°C en ln(densité amibienne/cm²) en fonction du temps (h) en présence de différentes concentrations d'*E. coli* K12 (2×10^8 à $9,5 \times 10^8$ bactéries/cm²) et d'un témoin sans bactérie.
Concentration initiale d'amibes : 7,5 ln d'amibes par cm².

La croissance de *N. lovaniensis* en milieu xénique à 34°C est significativement plus rapide qu'à 21°C en présence des mêmes nutriments et qu'à 34°C en milieu axénique. Les temps de doublement de la population sont de 4 heures pour les concentrations initiales de 2×10^8 et $9,5 \times 10^8$ bactéries par cm². On observe une diminution de la population après que la confluence soit atteinte dès la 48^{ème} heure. Les concentrations amibiennes diminuent peu lors d'un apport initial important de bactéries (les amibes restent toujours à confluence, mais avec des individus un peu plus petits), mais rejoignent le niveau du témoin sans bactérie pour une concentration bactérienne initiale de 2×10^8 bactéries par cm². Des formes flagellées ont été observées après 41 heures de culture et jusqu'à 65 heures, pour la concentration bactérienne initiale la plus élevée uniquement. L'observation ayant été faite à 21°C également, la température ne semble pas être le facteur déterminant pour la flagellation

de *N. lovaniensis*. Les points communs avec l'observation effectuée à 21°C sont une charge bactérienne de départ importante, et un tapis amibien à confluence au moment de l'observation.

2.3 Augmentations de température de 21 à 34°C

Ces essais sont effectués dans le but de mimer un réchauffement rapide du milieu aqueux dans lequel l'amibe est présente. L'essai démarre à 21°C et la température est augmentée après 23, 43 ou 63 heures, soit respectivement en de phase exponentielle de croissance, en fin de phase exponentielle et en phase stationnaire pour *A. castellanii*. Les résultats devraient procurer des renseignements utiles quant à l'impact d'une augmentation de température sur les populations amibiennes dans l'environnement. En effet, ces populations se trouvent dans un état asynchrone dans la nature. La **Figure 18** illustre les augmentations de température réalisées à différents moments de la phase de croissance. Les mesures pour les différentes conditions testées ont été effectuées toutes les 24 heures pendant 7 jours environ, sur trois puits pour chaque concentration et sur un puits pour les témoins, avec une observation par puits. Les témoins correspondent à des essais en l'absence de bactérie.

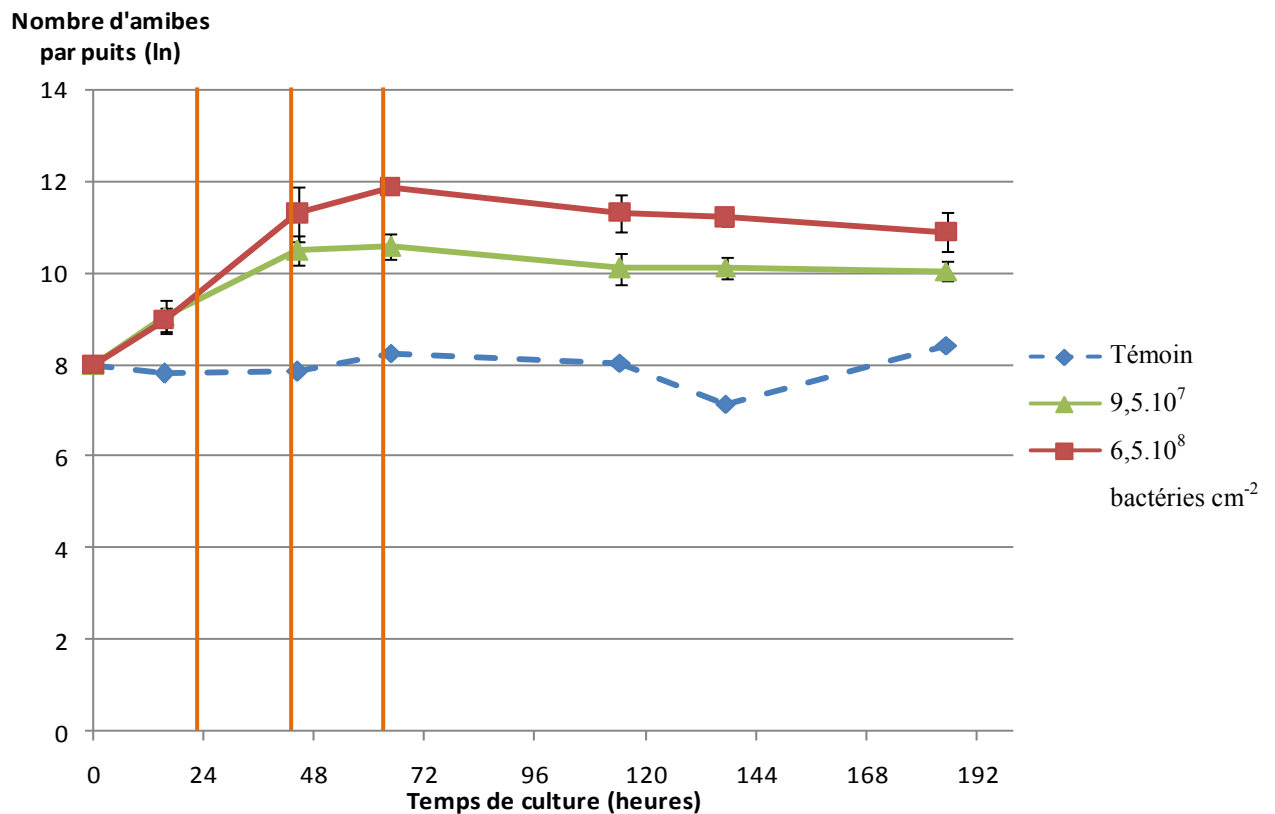


Figure 18. Croissance d'*Acanthamoeba castellanii* à 21°C en ln(densité amibienne/cm²) en fonction du temps (h) en présence de différentes concentrations d'*E. coli* K12 et d'un témoin sans bactérie. Concentration initiale d'amibes : 8 en ln d'amibes par cm². Les traits verticaux représentent les différentes étapes de la croissance auxquelles les augmentations de température sont testées.

La température dans une plaque à puits passe de 21°C à 34°C en 40 minutes environ lorsque la boîte est déplacée d'une enceinte à 21°C dans une enceinte à 34°C. La **Figure 19** montre la courbe d'augmentation de température enregistrée par une sonde.

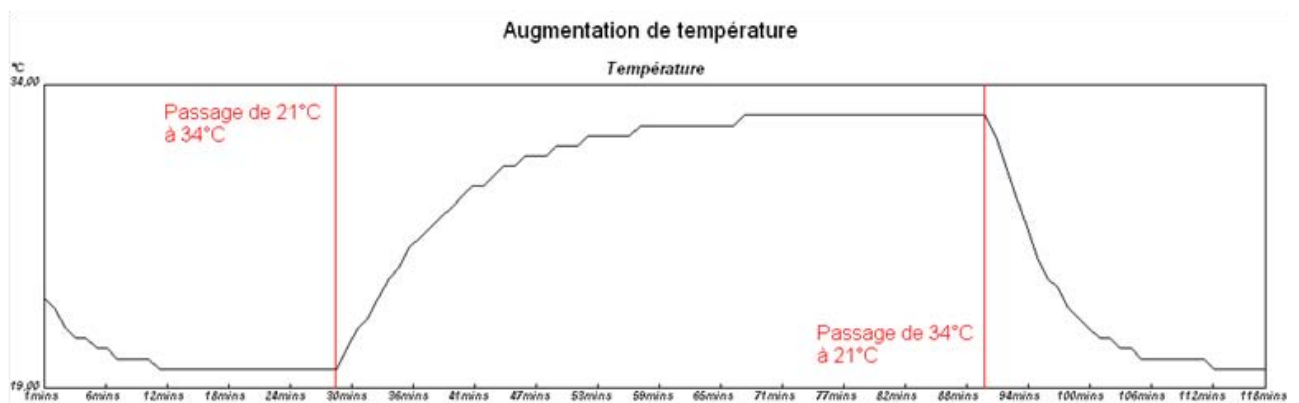


Figure 19. Résultat du test d'augmentation de température. Les traits verticaux rouges correspondent au passage d'une enceinte à une autre.

2.3.1 Suivi de la croissance d'*Acanthamoeba castellanii* sur tapis bactérien à 21°C avec augmentation de la température à 34°C après 23h de culture

La **Figure 20** montre la croissance d'*A. castellanii* à 21°C en milieu xénique, avec une augmentation de température à 34°C après 23h de culture.

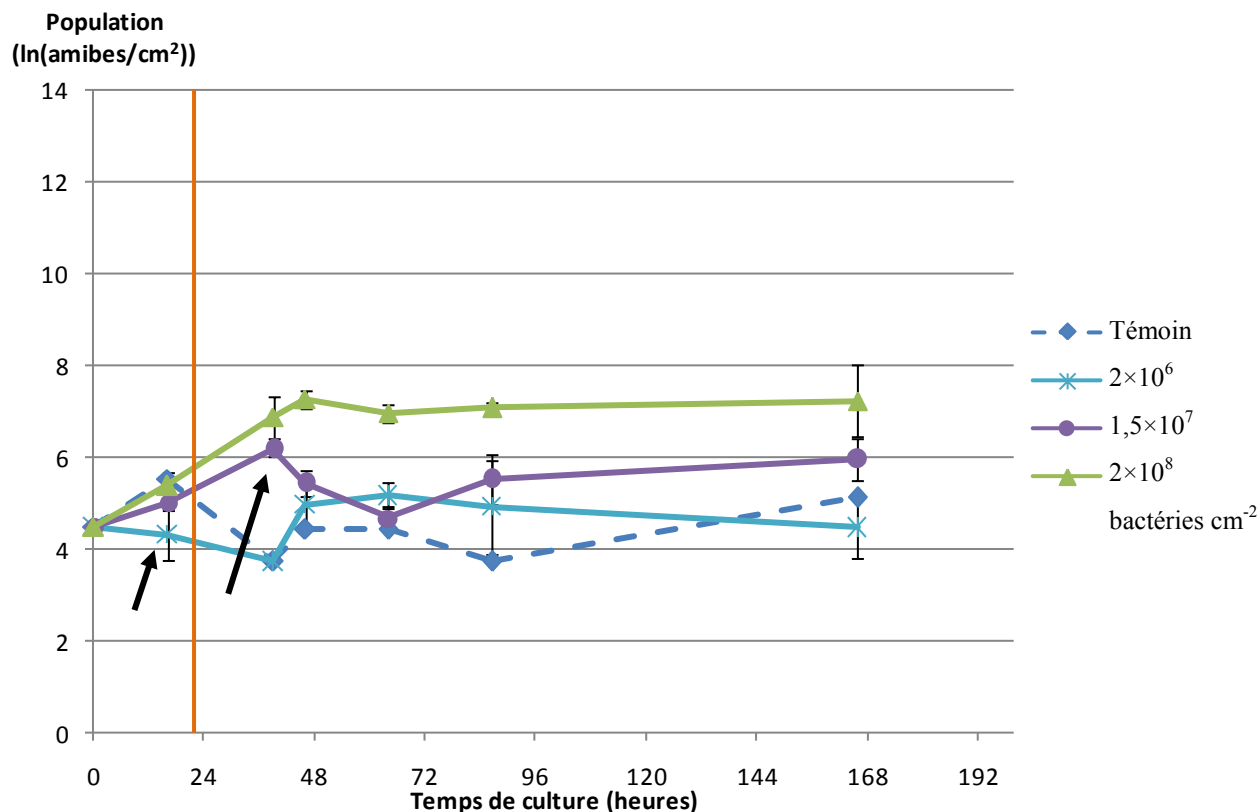


Figure 20. Croissance d'*Acanthamoeba castellanii* à 21°C, avec augmentation de la température à 34°C après 23 heures en ln(densité amibienne/cm²) en fonction du temps (h), en présence de différentes concentrations d'*E. coli* K12 et d'un témoin sans bactérie. Concentration initiale d'amibes : 4,5 en ln d'amibes par cm².

L'augmentation de température à 34°C après 23 heures de culture semble avoir peu d'effets sur *A. castellanii*. Un décochement dans la courbe est présent, surtout visible pour les concentrations bactériennes initiales inférieures ou égales à $1,5 \times 10^7$ bactéries par cm², qui pourrait correspondre à un temps d'adaptation à la nouvelle température. Les temps de doublement de la population sont respectivement de 15 heures et 11 heures pour les concentrations bactériennes initiales de $1,5 \times 10^7$ et 2×10^8 bactéries par cm².

2.3.2 Suivi de la croissance de *Naegleria lovaniensis* sur tapis bactérien à 21°C avec augmentation de la température à 34°C après 23h de culture

La **Figure 21** représente les courbes de croissance de *N. lovaniensis* à 21°C en milieu xénique, avec une augmentation de température à 34°C après 23h de culture.

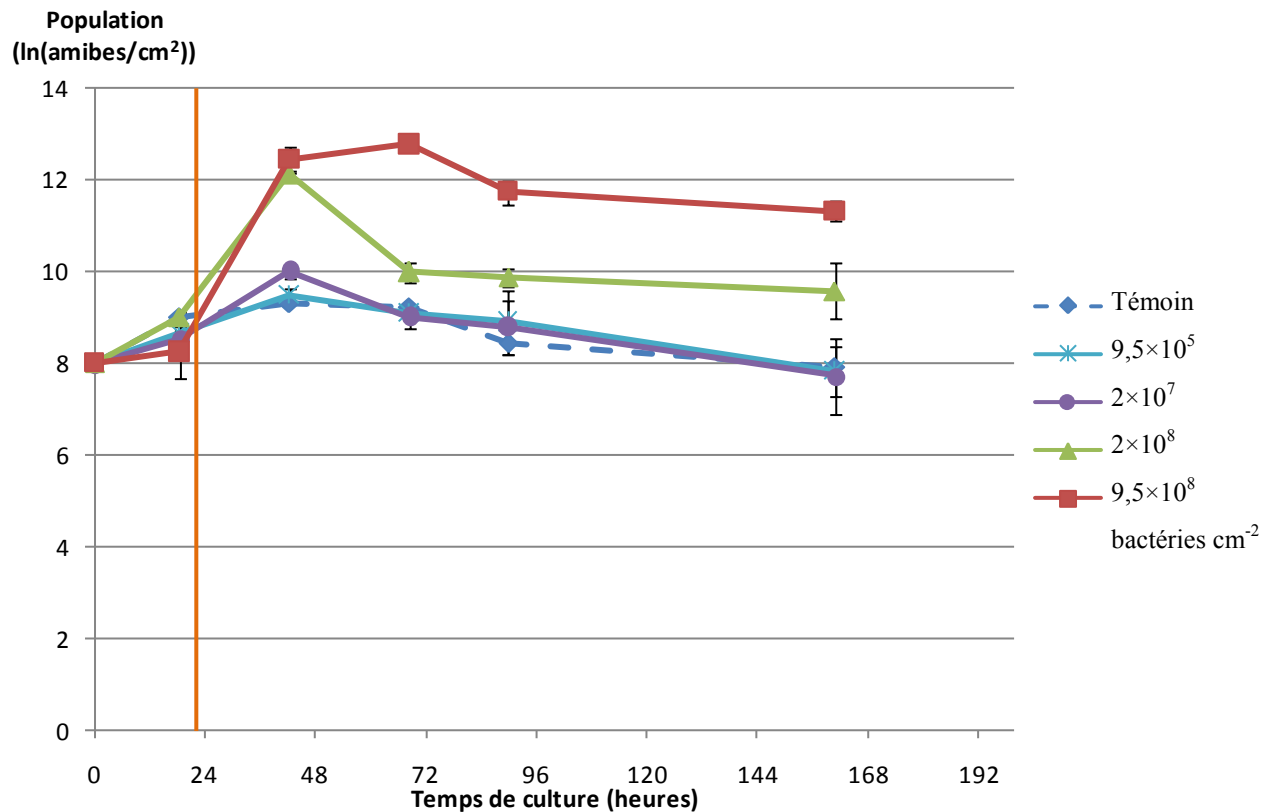


Figure 21. Croissance de *Naegleria lovaniensis* à 21°C, avec augmentation de la température à 34°C après 23 heures en $\ln(\text{densité amibienne}/\text{cm}^2)$ en fonction du temps (h), en présence de différentes concentrations d'*E. coli* K12 et d'un témoin sans bactérie. Concentration initiale d'amibes : 8 en \ln d'amibes par cm^2 .

La réaction de *N. lovaniensis* au changement de température est très rapide. Au début de l'essai, la croissance est lente, mais elle s'accélère après l'augmentation de température, pour atteindre des temps de doublement de la population de 5 heures pour la concentration initiale de 2×10^8 bactéries par cm^2 , et de 4 heures pour la concentration initiale de $9,5 \times 10^8$ bactéries par cm^2 . Ces vitesses sont de l'ordre de celles observées à 34°C en présence d'*E. coli*. A nouveau, la concentration bactérienne influe sur la capacité de l'amibe à maintenir sa population à un niveau élevé, et seule la plus forte concentration bactérienne semble le garantir ici. Une concentration de 2×10^8 bactéries par cm^2 permet néanmoins à la population de se stabiliser à un niveau significativement supérieur à celui du témoin, ce qui n'était pas le cas à 34°C. De plus, des formes flagellées ont été observées entre 42,5 et 68,5 heures pour la concentration bactérienne initiale de $9,5 \times 10^8$ bactéries par cm^2 , ce qui

correspond, comme précédemment, à une culture à confluence avec une forte concentration bactérienne initiale. On peut également noter qu'après un temps à confluence (plateau), les concentrations amibiennes diminuent tout comme pour la culture en milieu axénique, mais pour se stabiliser ici à un niveau plus bas.

2.3.3 Suivi de la croissance d'*Acanthamoeba castellanii* sur tapis bactérien à 21°C avec augmentation de la température à 34°C après 43h de culture

La **Figure 22** montre la croissance d'*A. castellanii* à 21°C en milieu xénique, avec une augmentation de température à 34°C après 43h de culture.

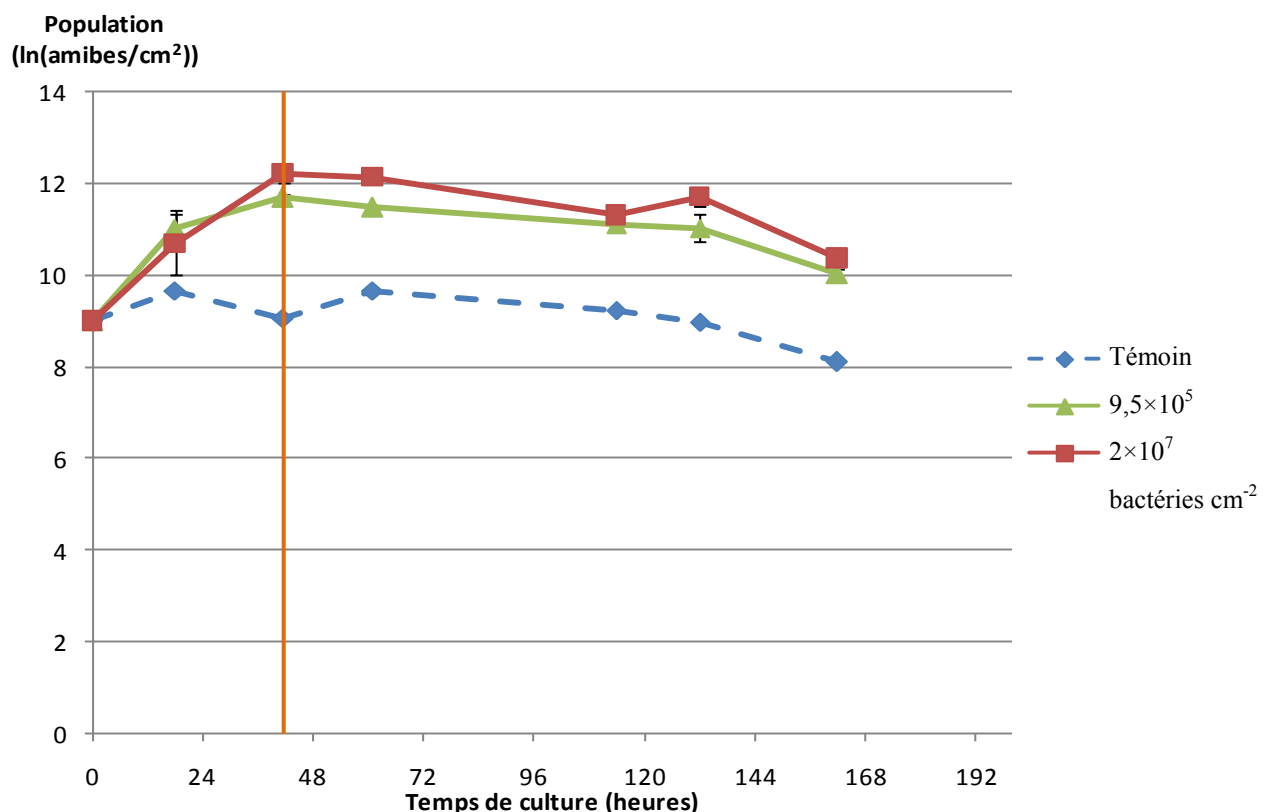


Figure 22. Croissance d'*Acanthamoeba castellanii* à 21°C, avec augmentation de la température à 34°C après 43 heures en ln(densité amibienne/cm²) en fonction du temps (h), en présence de différentes concentrations d'*E. coli* K12 et d'un témoin sans bactérie. Concentration initiale d'amibes : 9 en ln d'amibes par cm².

L'effet de l'augmentation de la température à 34°C après 43 heures ne semble pas très marqué sur *A. castellanii*. La phase de croissance est presque terminée au moment où cette augmentation intervient. Cependant, on constate en phase plateau que la population semble baisser continuellement pour atteindre un niveau proche de la population initiale après 162 heures. Les temps de doublement de la population pour les concentrations initiales en *E. coli* de $9,5 \times 10^5$ et

2×10^7 bactéries par cm^2 sont respectivement de 12 et 10 heures. Ils correspondent à une croissance à 21°C , l'augmentation de température à 34°C n'intervenant qu'après la phase permettant le calcul de la vitesse de croissance.

2.3.4 Suivi de la croissance de *Naegleria lovaniensis* sur tapis bactérien à 21°C avec augmentation de la température à 34°C après 43h de culture

La **Figure 23** présente les courbes de croissance de *N. lovaniensis* à 21°C en milieu xénique, avec une augmentation de température à 34°C après 43h de culture.

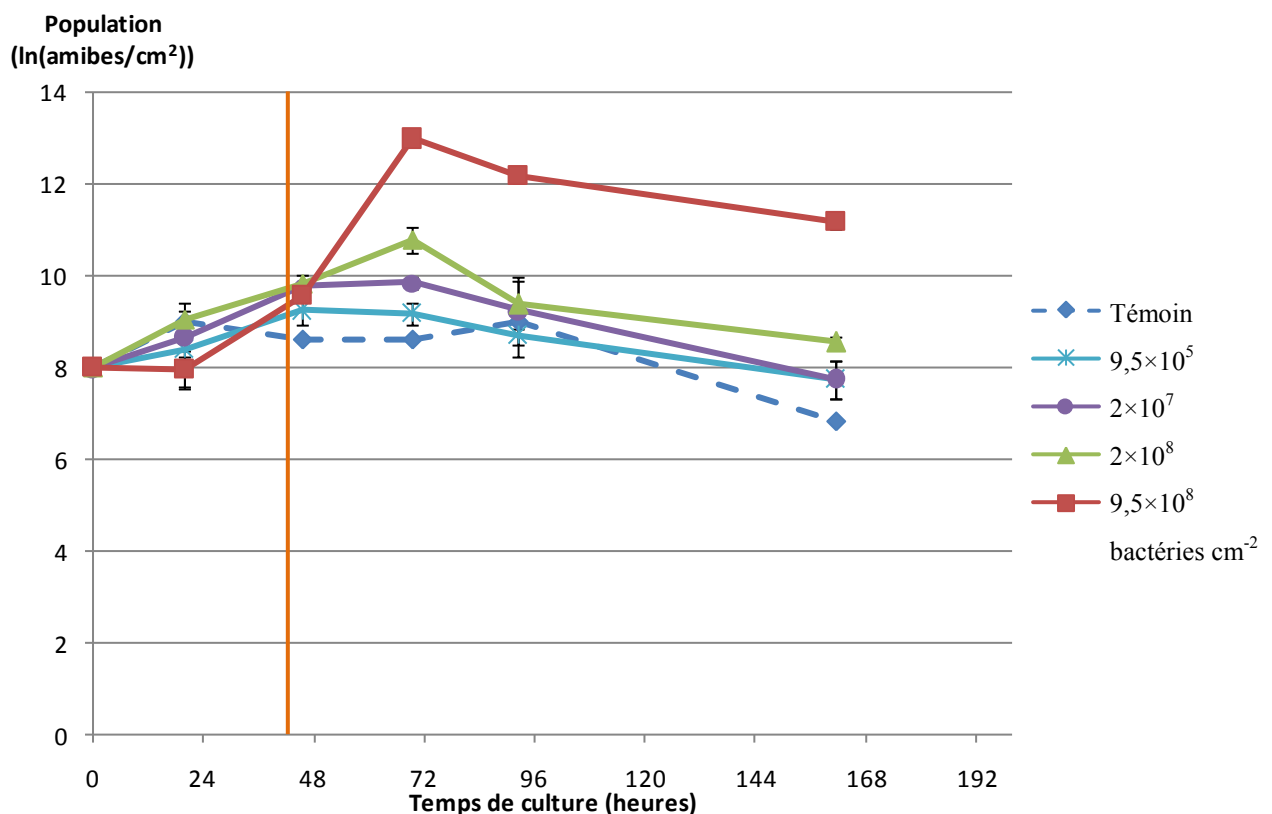


Figure 23. Croissance de *Naegleria lovaniensis* à 21°C , avec augmentation de la température à 34°C après 43 heures en $\ln(\text{densité amibienne}/\text{cm}^2)$ en fonction du temps (h), en présence de différentes concentrations d'*E. coli* K12 et d'un témoin sans bactérie. Concentration initiale d'amibes : 8 en \ln d'amibes par cm^2 .

Lorsque l'augmentation de température à 34°C intervient après 43 heures pour *N. lovaniensis*, les constatations sont similaires à celles faites pour l'augmentation de température après 23 heures de culture à 21°C . La vitesse de croissance n'augmente cependant pas pour une population en contact avec une concentration initiale inférieure ou égale à 2×10^8 bactéries par cm^2 . Le manque de nutriments a sans doute contribué à freiner la croissance de l'amibe dans ce cas. Le temps de doublement de la population reste à 17 heures pour 2×10^8 bactéries par cm^2 au départ, mais passe à

5 heures pour une concentration initiale en *E. coli* de $9,5 \times 10^8$ bactéries par cm^2 . On peut faire les mêmes observations qu'à 34°C concernant la population après la phase de croissance : la concentration amibienne diminue pour se stabiliser à un niveau élevé lorsque la quantité de bactéries initiale est importante, et rejoint le niveau du témoin pour les autres conditions.

Au temps $t = 69,5$ heures, des formes flagellées ont été observées pour la population ayant bénéficié de la plus forte concentration de départ en bactéries. A nouveau, cette observation est faite lorsque les amibes sont à confluence.

2.3.5 Suivi de la croissance d'*Acanthamoeba castellanii* sur tapis bactérien à 21°C avec augmentation de la température à 34°C après 63h de culture

La **Figure 24** montre la croissance d'*A. castellanii* à 21°C en milieu xénique, avec une augmentation de température à 34°C après 63h de culture.

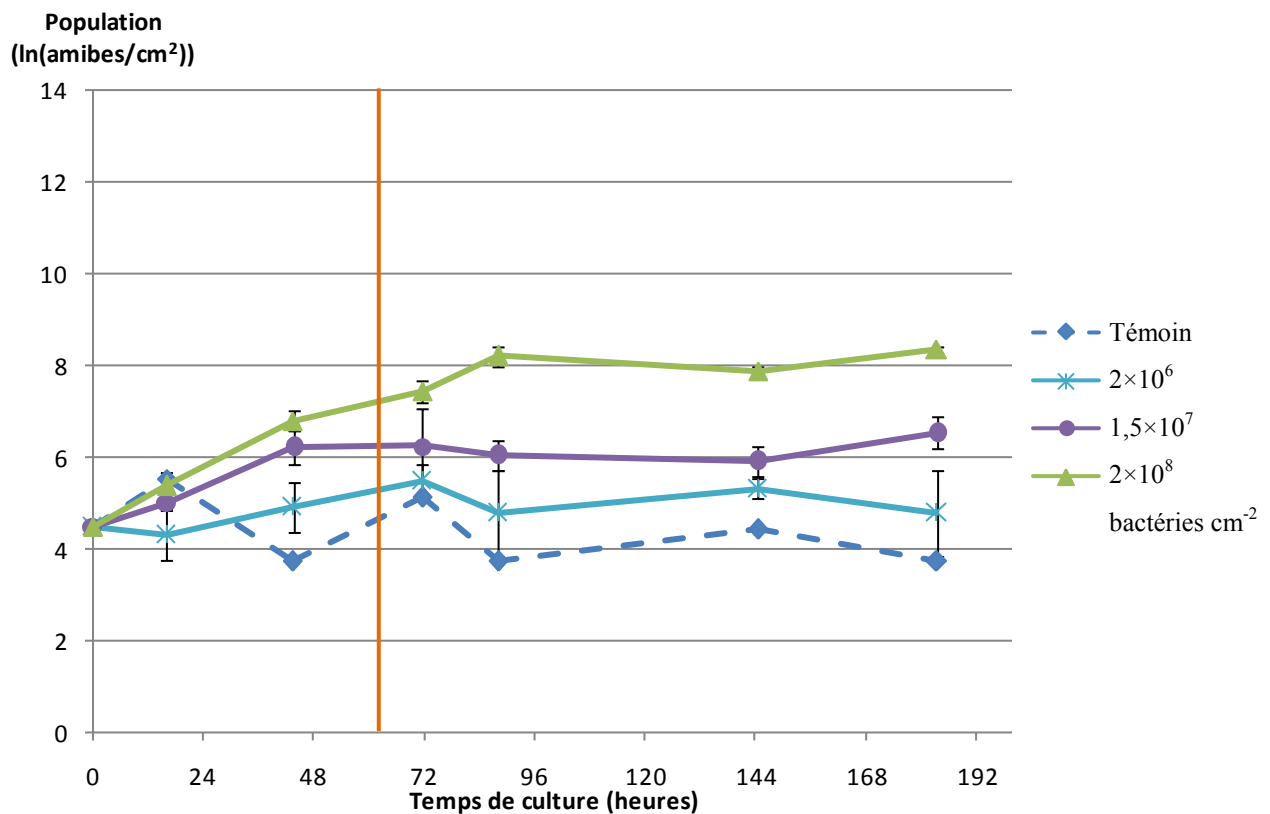


Figure 24. Croissance d'*Acanthamoeba castellanii* à 21°C , avec augmentation de la température à 34°C après 63 heures en $\ln(\text{densité amibienne}/\text{cm}^2)$ en fonction du temps (h), en présence de différentes concentrations d'*E. coli* K12 et d'un témoin sans bactérie. Concentration initiale d'amibes : 4,5 en \ln d'amibes par cm^2 .

Une augmentation de température à 34°C après 63 heures de croissance ne semble pas avoir d'effet sur *A. castellanii*. Les niveaux atteints par les populations en phase stationnaire sont du

même ordre que lorsque la croissance a eu lieu à 21°C et la population ne diminue pas comme cela a été le cas pour une augmentation de température après 43 heures de culture. Les temps de doublement de la population, calculés pendant la phase de croissance à 21°C sont de 19 heures pour les deux concentrations bactériennes initiales de 1×5.10^7 et 2×10^8 bactéries par cm^2 .

2.3.6 Suivi de la croissance de *Naegleria lovaniensis* sur tapis bactérien à 21°C avec augmentation de la température à 34°C après 63h de culture

La **Figure 25** montre la croissance de *N. lovaniensis* à 21°C en milieu xénique, avec une augmentation de température à 34°C après 63h de culture.

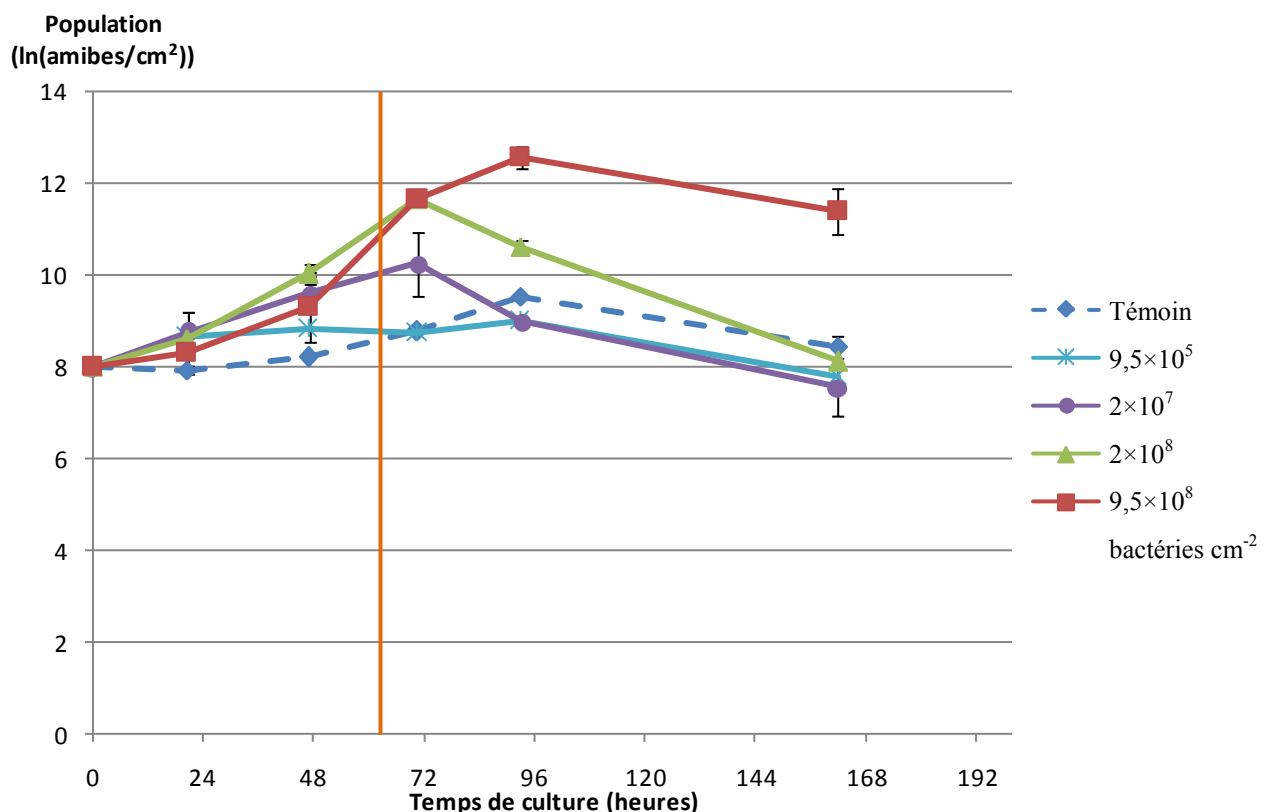


Figure 25. Croissance de *Naegleria lovaniensis* à 21°C, avec augmentation de la température à 34°C après 63 heures en $\ln(\text{densité amibienne}/\text{cm}^2)$ en fonction du temps (h), en présence de différentes concentrations d'*E. coli* K12 et d'un témoin sans bactérie. Concentration initiale d'amibes : 8 en \ln d'amibes par cm^2 .

La croissance de *N. lovaniensis* est faiblement impactée par le changement de température lorsque celui-ci intervient après 63 heures de culture.

Cependant, même pour une concentration initiale de $9,5 \times 10^8$ bactéries par cm^2 , elle n'atteint pas une vitesse aussi élevée que dans les autres essais à 34°C ou avec une augmentation de température après 23 et 43 heures car la population amibienne entre en phase de ralentissement de sa croissance.

Pour la concentration bactérienne initiale de 2×10^8 bactéries par cm^2 , il n'y a pas de différence de vitesse visible après l'augmentation de température (temps de doublement de 11 heures) qui intervient trop tardivement. Ici encore, la population amibienne tend à diminuer après la fin de la phase de croissance.

Comme pour les autres essais avec *N. lovaniensis*, la présence de flagellés a été mise en évidence pour la concentration initiale bactérienne de 9×5.10^8 bactéries par cm^2 lorsque l'amibe est à confluence (à 93 heures de culture).

2.4 Synthèse des résultats obtenus avec une croissance amibienne sur tapis bactérien

Nous avons constaté de manière empirique que les amibes *N. lovaniensis* et *A. castellanii* semblaient se multiplier plus rapidement en présence d'un tapis bactérien qu'avec un milieu nutritif en suspension. Les relations entre température, substrat et vitesse de croissance sont des facteurs importants qui sont étudiés dans ce paragraphe.

2.4.1 Température optimale de croissance

L'indicateur utilisé pour juger de la température optimale de croissance est la vitesse spécifique de croissance μ tout comme pour les expériences en milieu axénique. Les résultats obtenus sur l'ensemble des expériences effectuées sont consignés sur les **Figures 26 et 27**.

Température optimale de croissance d'*Acanthamoeba castellanii*

Les **Figures 26 et 26bis** présentent les valeurs de μ obtenues lors des tests de croissance d'*A. castellanii* en fonction du nombre initial de bactéries par amibe, avec une valeur maximale de 4×10^5 bactéries par amibe en abscisse dans la **Figure 26bis**.

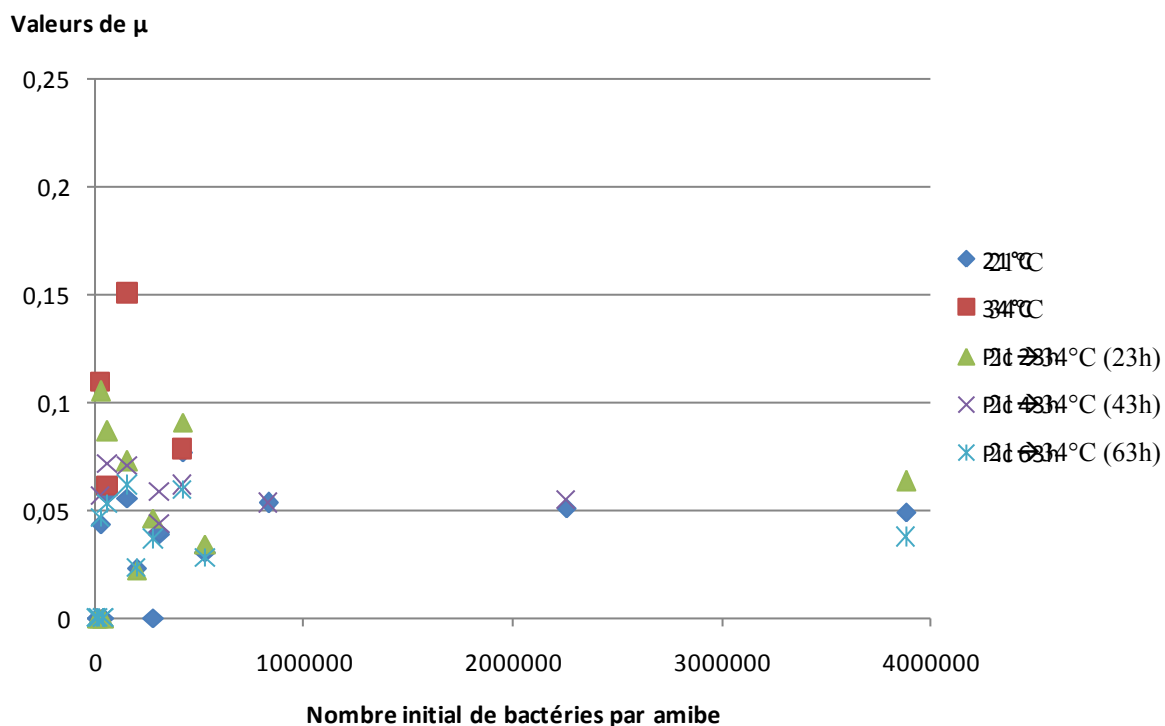


Figure 26. Vitesses spécifiques de croissance (μ) d'*Acanthamoeba castellanii* en fonction du rapport initial bactéries/amibes. Chaque température testée (21°C, 34°C, et les augmentations de température de 21°C à 34°C après 23, 43 et 63 heures) est figurée par un symbole différent.

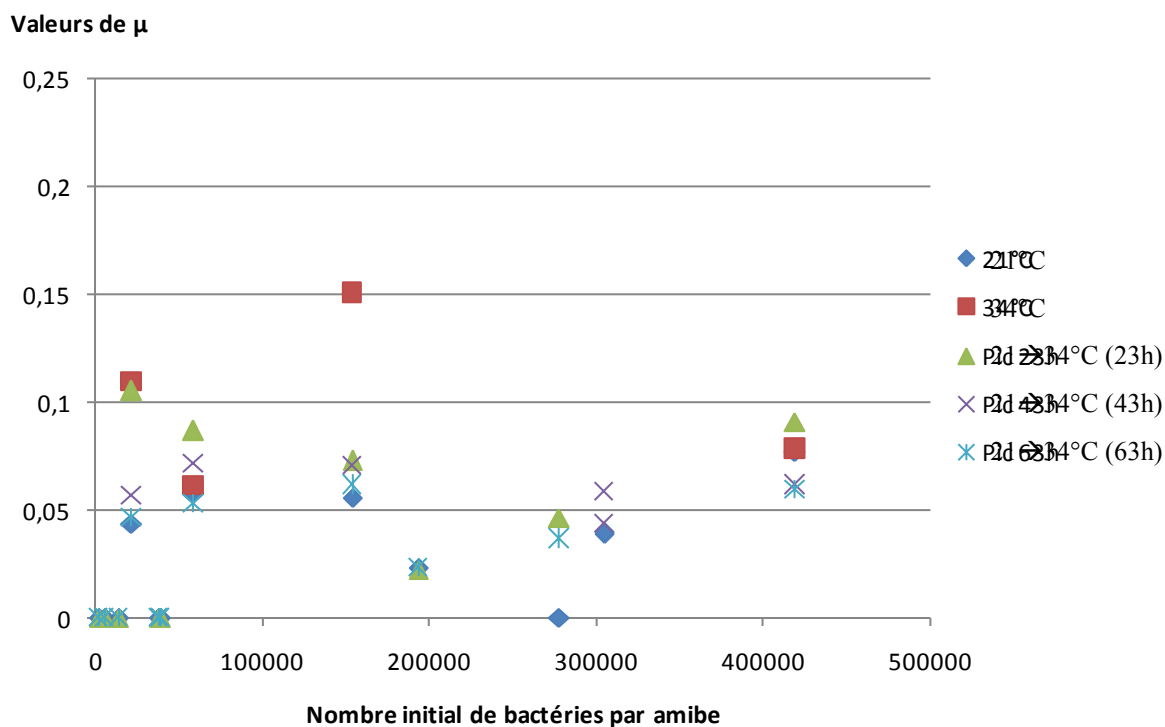


Figure 26bis. Vitesses spécifiques de croissance (μ) d'*Acanthamoeba castellanii* en fonction du rapport initial bactéries/amibes. Chaque température testée (21°C, 34°C, et les augmentations de température de 21°C à 34°C après 23, 43 et 63 heures) est figurée par un symbole différent. Résultats avec un rapport initial bactéries par amibe inférieur à 5×10^5 .

Lors des différents essais, 55 conditions ont été testées. Lorsque la croissance n'est pas significative, ou que la population décroît, la valeur de μ est considérée comme étant de zéro. Les essais concernés sont tous des essais pour lesquels les rapports de bactéries par amibe étaient faibles, de l'ordre de 1×10^3 environ.

Tout comme en milieu axénique, *A. castellanii* est capable de croître à 21 et à 34°C. Cependant, la vitesse de croissance est ici plus importante à 34°C : les valeurs de μ s'échelonnent de 0,062 à 0,151 h⁻¹ à 34°C ($\mu = 0,100 \pm 0,039$ h⁻¹) contre 0,023 à 0,077 h⁻¹ à 21°C ($\mu = 0,047 \pm 0,015$ h⁻¹).

Si on compare les vitesses spécifiques de croissance d'*A. castellanii* en milieu axénique et xénique, on observe :

- à 21°C, les vitesses de croissance sont assez proches dans les deux conditions : $\mu = 0,047 \pm 0,015$ h⁻¹ en milieu xénique contre $\mu = 0,032 \pm 0,008$ h⁻¹ en milieu axénique,
- à 34°C, les vitesses spécifiques de croissance diffèrent, et l'amibe se multiplie plus rapidement en milieu xénique avec $\mu = 0,100 \pm 0,039$ h⁻¹ contre $\mu = 0,034 \pm 0,005$ h⁻¹ en milieu axénique.

Les augmentations de température donnent des résultats intermédiaires en termes de vitesse spécifique de croissance : $\mu = 0,065 \pm 0,029$ h⁻¹ lorsque l'augmentation de température intervient après 23 heures à 21°C, $\mu = 0,059 \pm 0,009$ h⁻¹ lorsque l'augmentation de température intervient après 43 heures à 21°C et $\mu = 0,043 \pm 0,014$ h⁻¹ lorsque l'augmentation de température intervient après 63 heures à 21°C.

La température optimale de croissance d'*A. castellanii* en présence d'un tapis bactérien est plus proche de 34°C que de 21°C. Cependant et tout comme cela a été fait en milieu axénique, d'autres paramètres doivent être analysés afin de pouvoir conclure quant à la capacité de l'amibe à se maintenir à cette température sur le long terme.

On peut remarquer à partir de la **Figure 26bis** qu'il n'existe pas de corrélation claire entre la vitesse spécifique de croissance et le nombre initial de bactéries par amibe. La quantité initiale de bactéries disponibles ne semblerait avoir que peu ou pas d'incidence sur la vitesse de croissance de l'amibe (le substrat est à saturation), alors qu'elle paraît importante pour le nombre d'amibes produites. Concernant la vitesse de croissance, on constate simplement un effet de type seuil, puisque les essais effectués avec peu de bactéries n'ont que rarement donné lieu à une croissance acceptable de l'amibe. Ce paramètre sera examiné en détails plus loin dans ce rapport.

Température optimale de croissance de *Naegleria lovaniensis*

Les **Figures 27** et **27bis** présentent les valeurs de μ obtenues lors des tests de croissance de *N. lovaniensis* en fonction du nombre initial de bactéries par amibe.

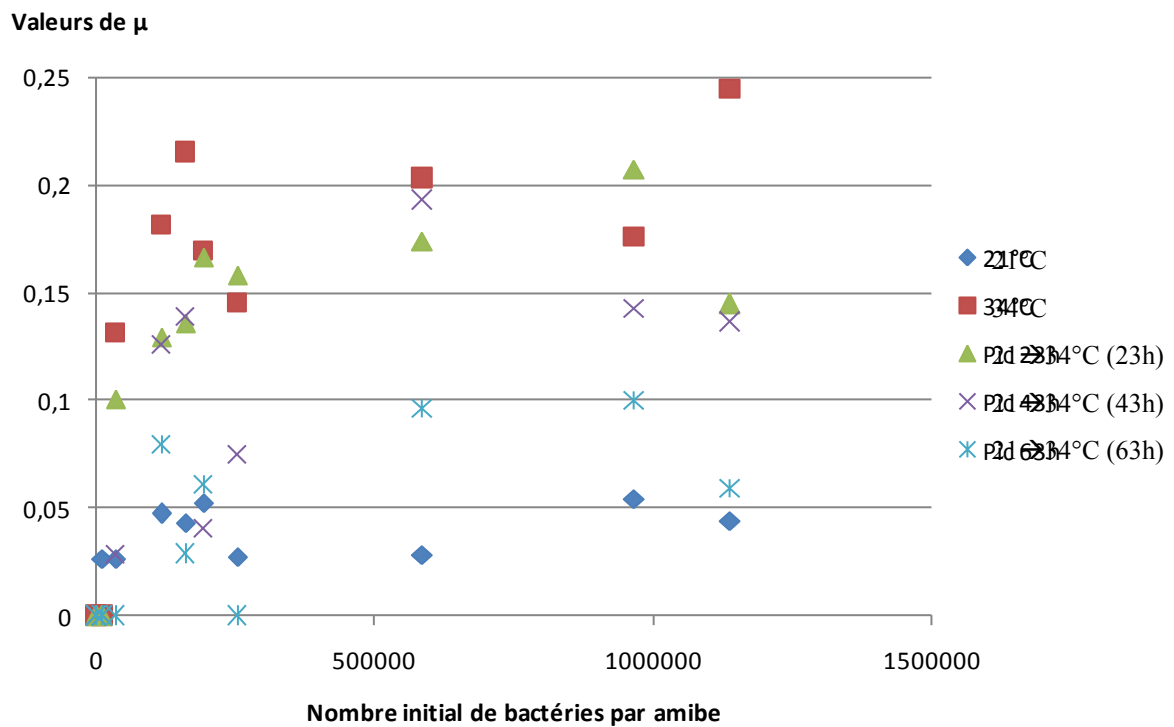


Figure 27. Vitesses spécifiques de croissance (μ) de *Naegleria lovaniensis* en fonction du rapport initial bactéries/amibes. Chaque température testée (21°C, 34°C, et les augmentations de température de 21°C à 34°C après 23, 43 et 63 heures) est figurée par un symbole différent.

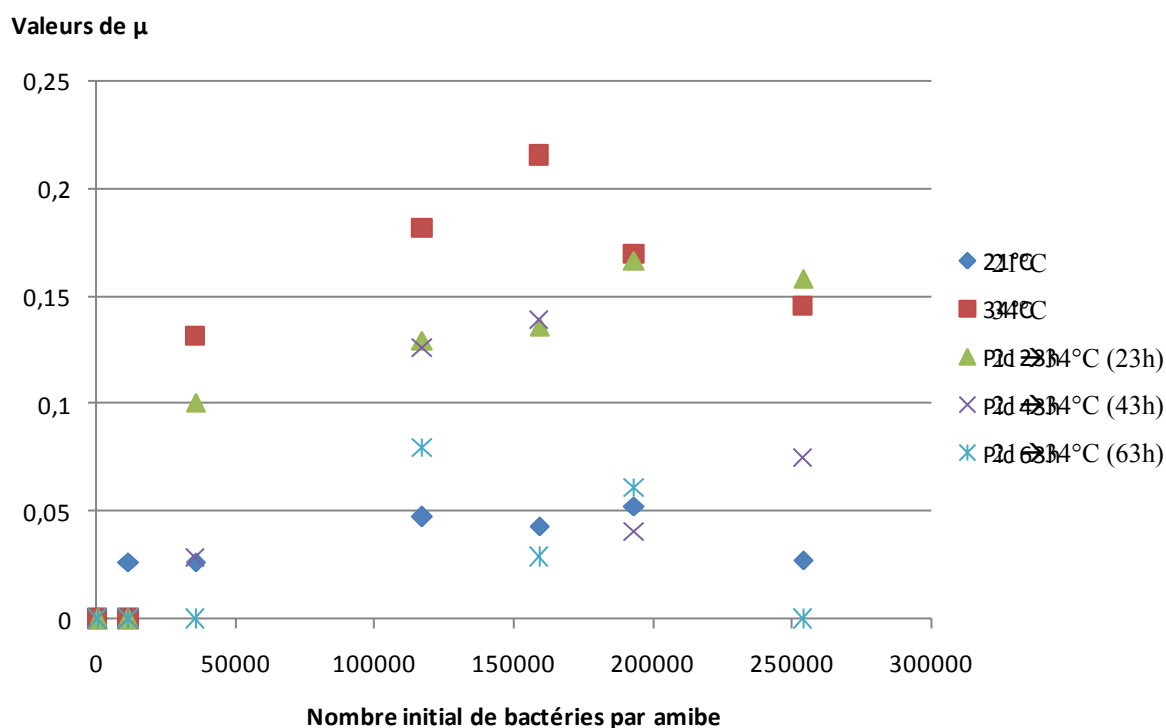


Figure 27bis. Vitesses spécifiques de croissance (μ) de *Naegleria lovaniensis* en fonction du rapport initial bactéries/amibes. Chaque température testée (21°C, 34°C, et les augmentations de température de 21°C à 34°C après 23, 43 et 63 heures) est figurée par un symbole différent. Résultats avec un rapport initial bactéries/amibe inférieur à 3×10^5 .

Lors des différents essais sur *N. lovaniensis*, 50 conditions ont été testées. Lorsque la croissance n'est pas significative, ou que la population décroît, la valeur de μ est considérée comme étant de zéro. Les essais concernés sont tous des essais pour lesquels les quantités de bactéries par amibe étaient faibles, de l'ordre de 1×10^3 environ.

Tout comme en milieu axénique, l'amibe est capable de croître à 34°C, mais également à 21°C, ce qui n'était pas le cas sans bactéries. Les vitesses de croissance sont nettement plus importantes à 34°C qu'à 21°C: les valeurs de μ s'échelonnent de 0,131 à 0,245 h⁻¹ à 34°C ($\mu = 0,183 \pm 0,037$ h⁻¹) et de 0,026 à 0,054 h⁻¹ à 21°C ($\mu = 0,039 \pm 0,012$ h⁻¹).

Si on compare les vitesses spécifiques de croissance de *N. lovaniensis* en milieu axénique et en milieu xénique, on observe :

- à 21°C, la croissance est impossible en milieu axénique, alors qu'en milieu xénique l'amibe croît avec une vitesse spécifique de croissance $\mu = 0,039 \pm 0,012$ h⁻¹.

- à 34°C, les vitesses de croissance sont nettement supérieures en milieu xénique : $\mu = 0,183 \pm 0,037 \text{ h}^{-1}$ contre $\mu = 0,045 \pm 0,002 \text{ h}^{-1}$ en milieu axénique.

Les augmentations de température donnent ici aussi des résultats intermédiaires en termes de vitesse spécifique de croissance : $\mu = 0,152 \pm 0,032 \text{ h}^{-1}$ lorsque l'augmentation de température intervient après 23 heures à 21°C, $\mu = 0,110 \pm 0,057 \text{ h}^{-1}$ lorsque l'augmentation de température intervient après 43 heures à 21°C et $\mu = 0,071 \pm 0,027 \text{ h}^{-1}$ lorsque l'augmentation de température intervient après 63 heures à 21°C. Les valeurs de μ sont proches de celles obtenues à 34°C lorsque l'augmentation de température intervient suffisamment tôt, et plus proches des valeurs de μ à 21°C lorsque l'augmentation de température intervient en fin de phase de croissance (ces valeurs correspondent donc à des valeurs obtenues à 21°C pour la plupart, puisque mesurées avant l'augmentation de température).

Afin d'affiner les résultats, il a été possible de relier par une relation logarithmique satisfaisante la vitesse spécifique de croissance de l'amibe avec le nombre de bactéries par amibe initialement présentes. Cette relation n'a pas pu être établie pour *A. castellanii* au vu des résultats plus erratiques obtenus avec cette amibe. La **Figure 28** présente les régressions logarithmiques appliquées aux résultats obtenus pour *N. lovaniensis*.

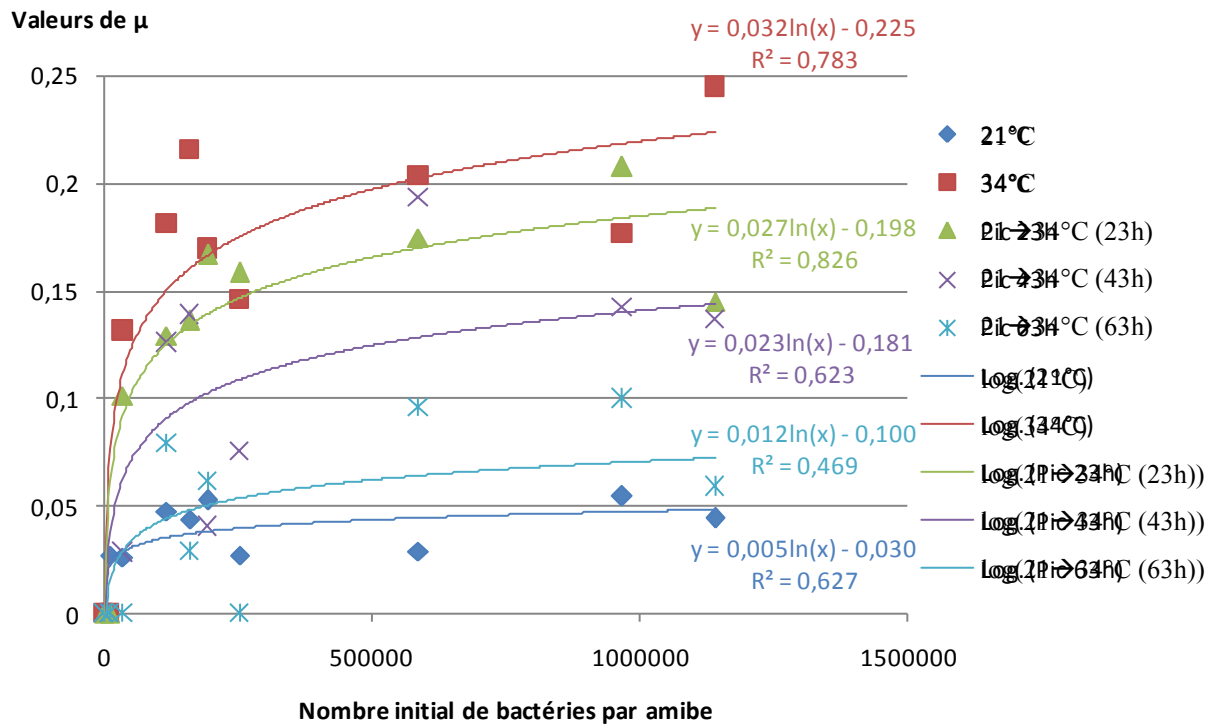


Figure 28. Vitesses spécifiques de croissance (μ) de *Naegleria lovaniensis* en fonction du ratio initial bactéries/amibes et régressions logarithmiques. Chaque température testée (21°C, 34°C, et les augmentations de température de 21°C à 34°C après 23, 43 et 63 heures) est figurée par un symbole différent.

Les observations effectuées sur la **Figure 27** sont confirmées par l'allure des courbes de la **Figure 28**.

La linéarisation de Lineweaver et Burke (**Figure 29**) permet d'approcher les résultats par des droites et de calculer la constante d'affinité K_S , qui correspond au nombre de bactéries initiales nécessaires par amibe pour que l'amibe puisse croître à une vitesse égale à la moitié de sa vitesse maximale de croissance. μ_{\max} donne la valeur maximale théorique de μ pouvant être atteinte.

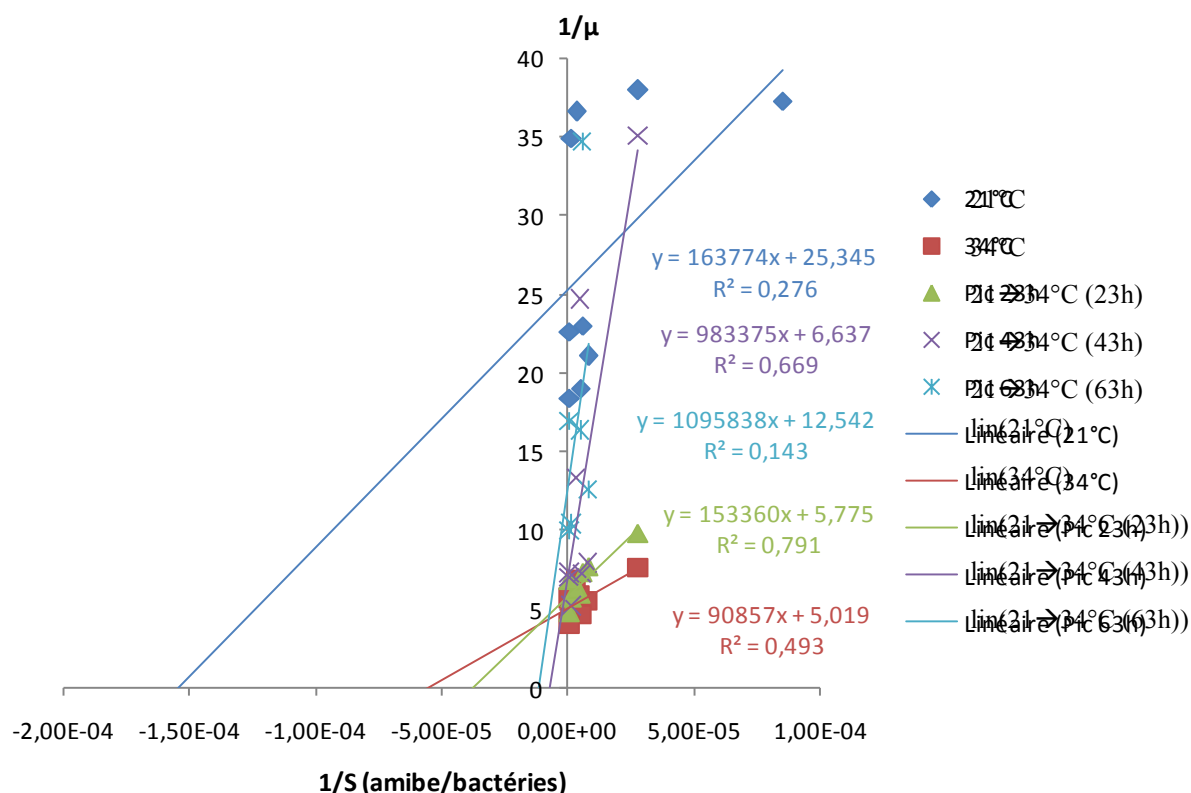


Figure 29. Linéarisation de Lineweaver et Burke (lin) de la relation entre la vitesse spécifique de croissance (μ) de *Naegleria lovaniensis* et du ratio initial bactéries/amibes. Chaque température testée (21°C, 34°C, et les augmentations de température de 21°C à 34°C après 23, 43 et 63 heures) est figurée par un symbole différent.

Les paramètres calculés sont résumés dans le **Tableau 6**.

Tableau 6. Calcul des valeurs de K_S (bactéries/amibe) et μ_{\max} (h^{-1}) pour *Naegleria lovaniensis* à partir des paramètres extraits de la linéarisation.

	$-1/K_S$	$1/\mu_{\max}$	K_S (bactéries/amibe)	μ_{\max} (h^{-1})	R^2
21°C	$-1,55 \times 10^{-4}$	25,35	$6,46 \times 10^3$	0,039	0,276
34°C	$-5,52 \times 10^{-5}$	5,02	$1,81 \times 10^4$	0,199	0,493
Pic 23h	$-3,77 \times 10^{-5}$	5,78	$2,66 \times 10^4$	0,173	0,791
Pic 43h	$-6,75 \times 10^{-6}$	6,64	$1,48 \times 10^5$	0,151	0,669
Pic 63h	$-1,14 \times 10^{-5}$	12,54	$8,74 \times 10^4$	0,080	0,143

Les valeurs de K_S calculées sont plus faibles pour les essais à 21°C et à 34°C. Elles sont légèrement plus élevées pour les populations amibiennes ayant subi une élévation de la température, en particulier pour une élévation après 43 heures de culture. *N. lovaniensis* semble donc avoir besoin d'une plus grande quantité de bactéries que lors d'une culture à 34°C d'emblée pour

s'assurer une croissance rapide lorsque la température de son environnement augmente pendant sa phase de croissance. Ces observations complètent celles rapportées par **Delattre et Oger (1981)**. En effet, leur étude a mis en évidence que *Naegleria* était capable de se multiplier rapidement et de se maintenir dans un circuit contenant un point chaud. L'hypothèse émise par **Delattre et Oger** est que *Naegleria* est mieux adaptée que ses compétiteurs à cette température. Le fait que les valeurs de K_S obtenues ici soient plus élevées pour les populations ayant subi une augmentation de température viendrait étayer le fait que *N. lovaniensis* possède une bonne faculté d'adaptation aux changements de température et qu'elle peut rapidement augmenter son activité prédatrice lorsque cela est nécessaire. Cependant, cette observation n'est valable que si les conditions, plus spécifiquement la quantité de proies disponibles, sont favorables.

Les valeurs de μ_{\max} ne sont pas corrélées aux valeurs de K_S . En effet, la vitesse spécifique de croissance maximale la plus élevée est de $0,199 \text{ h}^{-1}$ à 34°C , alors que la plus faible est de $0,039 \text{ h}^{-1}$ à 21°C , pour des K_S assez proches. Les temps de génération correspondants sont de 3,48 heures et 17,8 heures. Comme observé de façon empirique précédemment, les augmentations de températures donnent des valeurs de μ_{\max} intermédiaires. La croissance est donc plus rapide à 34°C et lors d'augmentations de température à 34°C . Plus ces augmentations interviennent tôt, plus l'effet est bénéfique sur la croissance de *N. lovaniensis*.

Ces données devront être complétées par d'autres études. En effet, certaines valeurs de R^2 suggèrent que les données de départ sont insuffisantes pour l'application du modèle de Michaelis-Menten ou que ce modèle ne peut pas s'appliquer à la cinétique d'absorption de bactéries par des amibes.

Comparaison entre les deux amibes

En comparant les vitesses spécifiques de croissance des deux amibes, il est à remarquer :

- à 21°C en milieu axénique, *A. castellanii* est capable de croître ($\mu = 0,032 \pm 0,008 \text{ h}^{-1}$) alors que *N. lovaniensis* voit sa population diminuer lentement.

- à 21°C en milieu xénique, *A. castellanii* croît à une vitesse assez proche de celle relevée en milieu axénique ($\mu = 0,047 \pm 0,015 \text{ h}^{-1}$). *N. lovaniensis* est capable de croître à une vitesse assez proche également ($\mu = 0,039 \pm 0,012 \text{ h}^{-1}$).

- à 34°C en milieu axénique, $\mu = 0,034 \pm 0,005 \text{ h}^{-1}$ pour *A. castellanii* contre $\mu = 0,045 \pm 0,002 \text{ h}^{-1}$ pour *N. lovaniensis*, qui se multiplie légèrement plus rapidement à cette température.

- à 34°C en milieu xénique, la vitesse de croissance d'*A. castellanii* ($\mu = 0,100 \pm 0,039 \text{ h}^{-1}$) est nettement inférieure à celle de *N. lovaniensis* ($\mu = 0,183 \pm 0,037 \text{ h}^{-1}$).

2.4.2 Rendement de la croissance

Tout comme pour les essais en milieu axénique, il est judicieux ici d'examiner un paramètre permettant d'évaluer la capacité de la population amibienne à se maintenir à un niveau élevé. Le rendement de croissance après 150 heures (rapport entre la population après 150 heures et la population initiale), ainsi que la quantité d'amibes produites pendant les essais (calculée en soustrayant le nombre initial d'amibes au nombre maximal atteint) seront examinés comme précédemment. Les résultats sont présentés sous forme de graphiques car trop nombreux pour l'être sous forme de tableaux.

Rendement de la croissance d'*Acanthamoeba castellanii*

La **Figure 30** résume les quantités d'amibes produites pour chaque test de croissance effectué avec *A. castellanii*. Au total, 55 conditions ont été testées.

Les valeurs s'échelonnent entre zéro et $3,73 \times 10^5$.

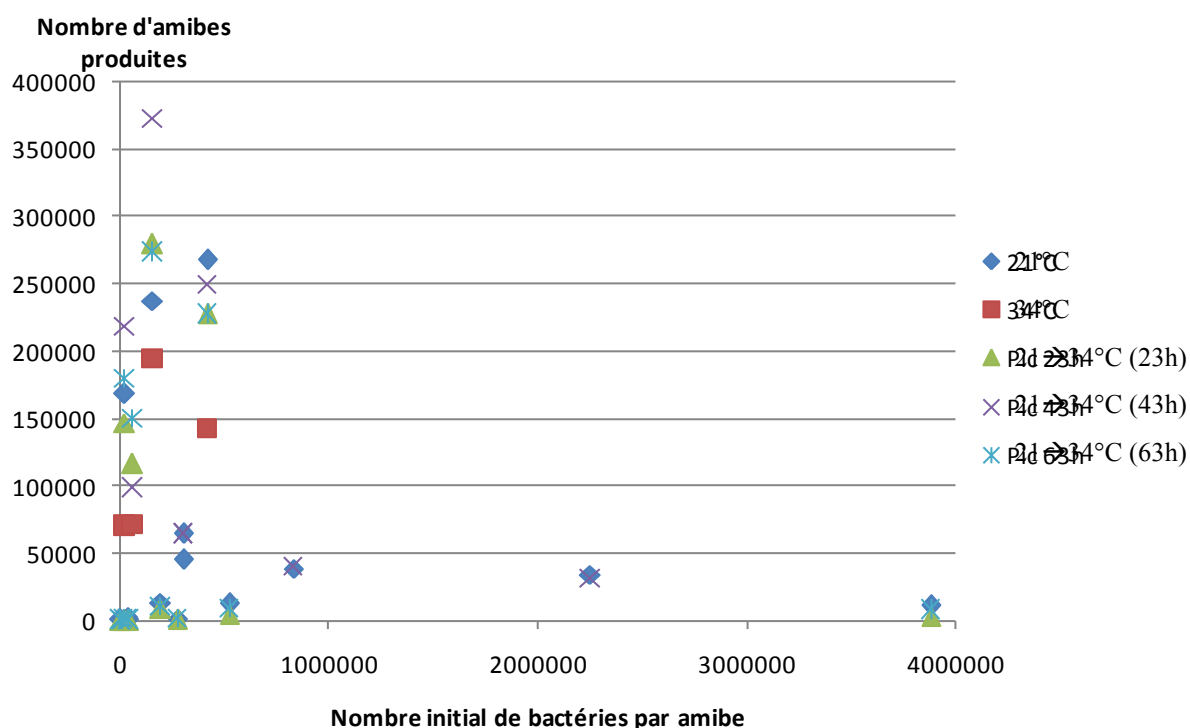


Figure 30. Nombre d'amibes *Acanthamoeba castellanii* produites après la phase de croissance en fonction du rapport initial bactéries/amibes. Chaque température testée (21°C, 34°C, et les augmentations de température de 21°C à 34°C après 23, 43 et 63 heures) est figurée par un symbole différent.

La **Figure 30bis** présente uniquement les résultats des essais avec un rapport initial bactéries/amibe inférieur à 5×10^5 pour plus de lisibilité.

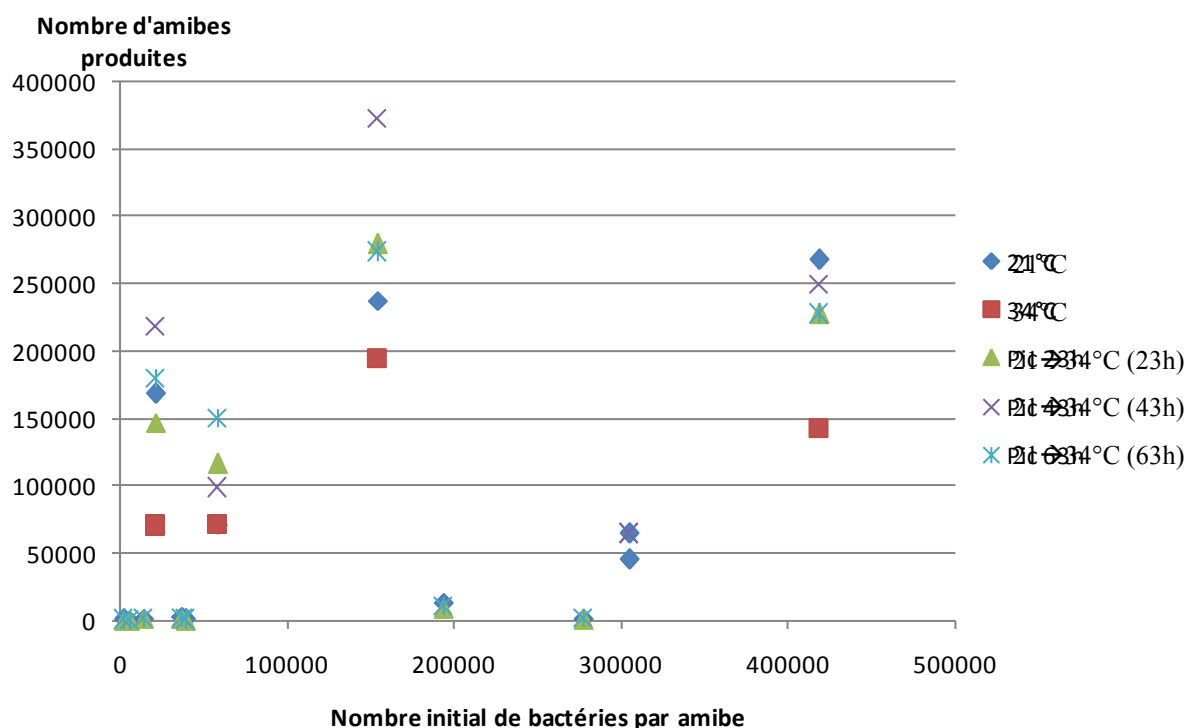


Figure 30bis. Nombre d'amibes *Acanthamoeba castellanii* produites après la phase de croissance en fonction du rapport initial bactéries/amibes. Chaque température testée (21°C, 34°C, et les augmentations de température de 21°C à 34°C après 23, 43 et 63 heures) est figurée par un symbole différent. Résultats avec un rapport initial bactéries/amibe inférieur à 5×10^5 .

Il est difficile d'établir une relation claire entre la quantité de bactéries disponibles par amibe et le nombre total d'amibes produites pendant l'expérience au vu de ces résultats. On notera cependant une grande quantité d'essais n'ayant produit aucune amibe lorsque le ratio initial de bactéries par amibe était faible (inférieures à 10^4).

Le paramètre température, quant à lui, ne semble pas non plus être un argument prédictif du nombre d'amibes que l'essai pourra produire.

Cependant de nombreuses conditions multiparamétriques ont été testées au cours des expérimentations, influençant la croissance qui devient difficile à décrire. Ces analyses montrent la complexité des phénomènes que l'on peut rencontrer dans les réseaux de refroidissement, avec les difficultés d'interprétations des phénomènes de prolifération amibienne.

La **Figure 31** présente sous forme de graphique les rendements de croissance après 150 heures pour chaque test de croissance effectué avec *Acanthamoeba*.

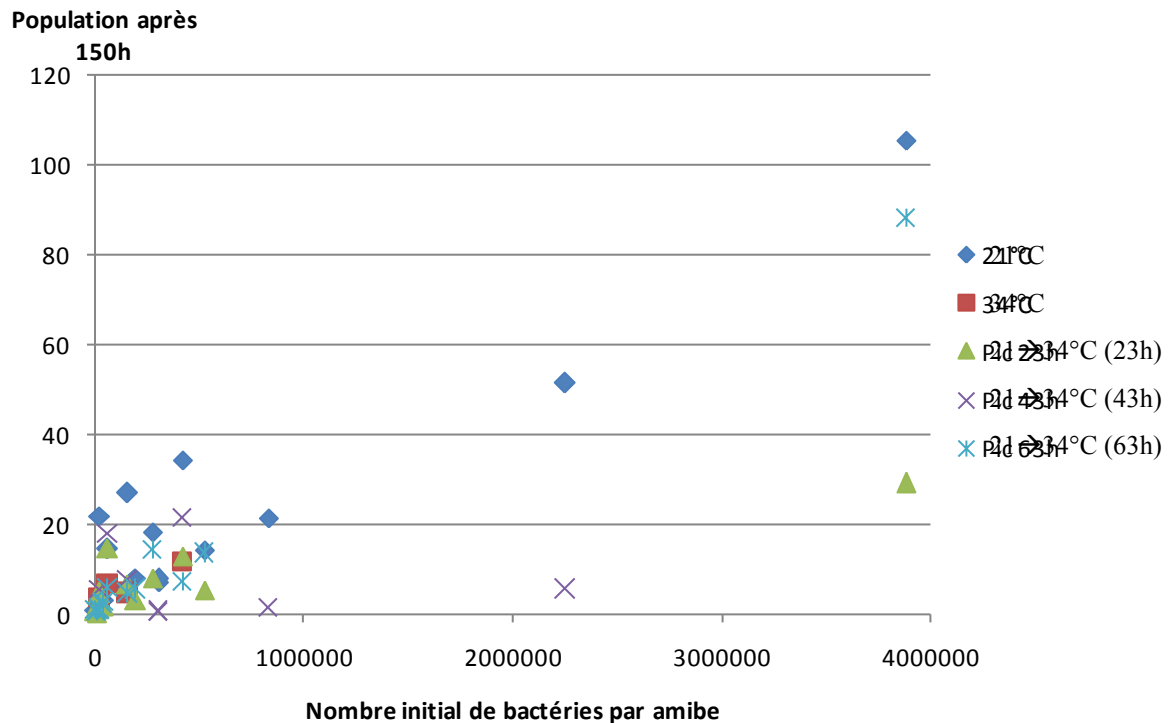


Figure 31. Rendement de croissance d'*Acanthamoeba castellanii* après 150 heures de culture en fonction du rapport initial bactéries/amibes. Chaque température testée (21°C, 34°C, et les augmentations de température de 21°C à 34°C après 23, 43 et 63 heures) est figurée par un symbole différent.

La **Figure 31bis** présente uniquement les résultats des essais avec un rapport initial bactéries/amibe inférieur à 5×10^5 pour plus de lisibilité.

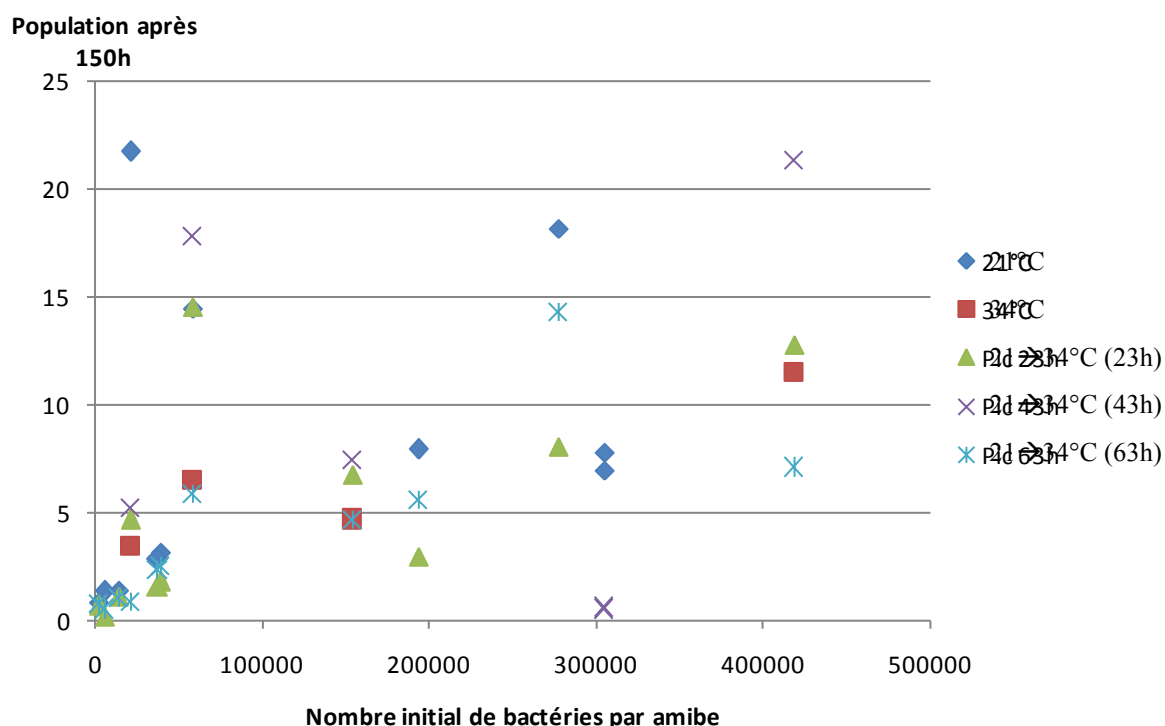


Figure 31bis. Rendement de croissance d'*Acanthamoeba castellanii* après 150 heures de culture en fonction du rapport initial bactéries/amibes. Chaque température testée (21°C, 34°C, et les augmentations de température de 21°C à 34°C après 23, 43 et 63 heures) est figurée par un symbole différent. Résultats avec un rapport initial bactéries/amibe inférieur à 5×10^5 .

Le rendement de croissance d'*A. castellanii* après 150 heures permet d'estimer la capacité de l'amibe à se maintenir sur le long terme dans des conditions nutritionnelles et de température données.

Si la quantité de bactéries initiale semblait ne pas avoir d'impact sur le nombre total d'amibes produites, une plus grande quantité de bactéries disponible semble assurer un meilleur maintien de la population amibienne sous forme de trophozoïtes sur une période prolongée.

Cela est d'autant plus vrai qu'*A. castellanii* se trouve dans un environnement à 21°C, ou que l'augmentation de température est intervenue tardivement (après 63 heures d'essai). Concernant les essais avec augmentation de température après 23 heures, la quantité d'amibes après 150 heures est régulièrement plus faible. Pour les essais avec augmentation après 43 heures, les résultats confirment les observations empiriques : la population amibienne active (trophozoïtes) ne parvient pas à se maintenir à un niveau satisfaisant dans la plupart des cas.

La population d'*A. castellanii* semble ainsi pouvoir se maintenir à un niveau satisfaisant lorsque la quantité initiale de bactéries par amibe est supérieure à 10^4 et le fait de façon optimale pour une température de 21°C. Les augmentations de température à 34°C lui sont délétères.

Rendement de la croissance de *Naegleria lovaniensis*

La **Figure 32** résume les quantités de *N. lovaniensis* produites pour chaque essai. Au total, 50 conditions ont été testées.

Les valeurs s'échelonnent entre $1,25 \times 10^4$ et $8,21 \times 10^5$ amibes. En comparaison, le maximum d'amibes produites en milieu axénique était de $1,29 \times 10^4$ amibes.

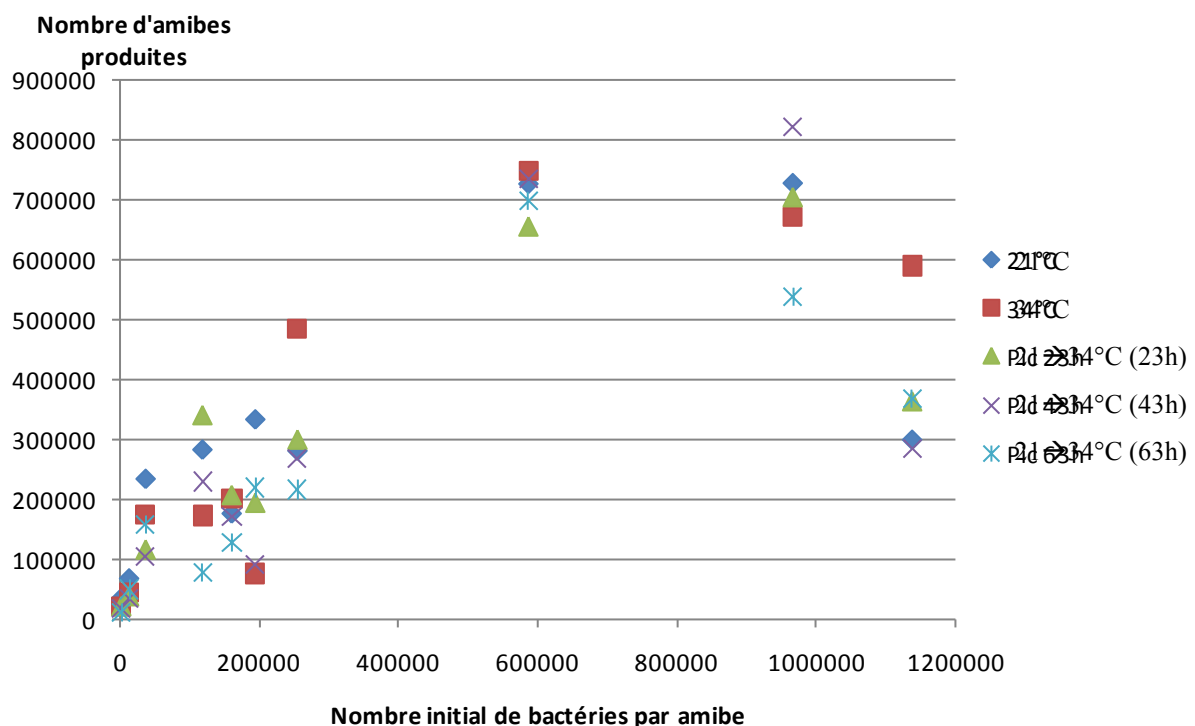


Figure 32. Nombre d'amibes *Naegleria lovaniensis* produites en fonction du rapport initial bactéries/amibes. Chaque température testée (21°C, 34°C, et les augmentations de température de 21°C à 34°C après 23, 43 et 63 heures) est figurée par un symbole différent.

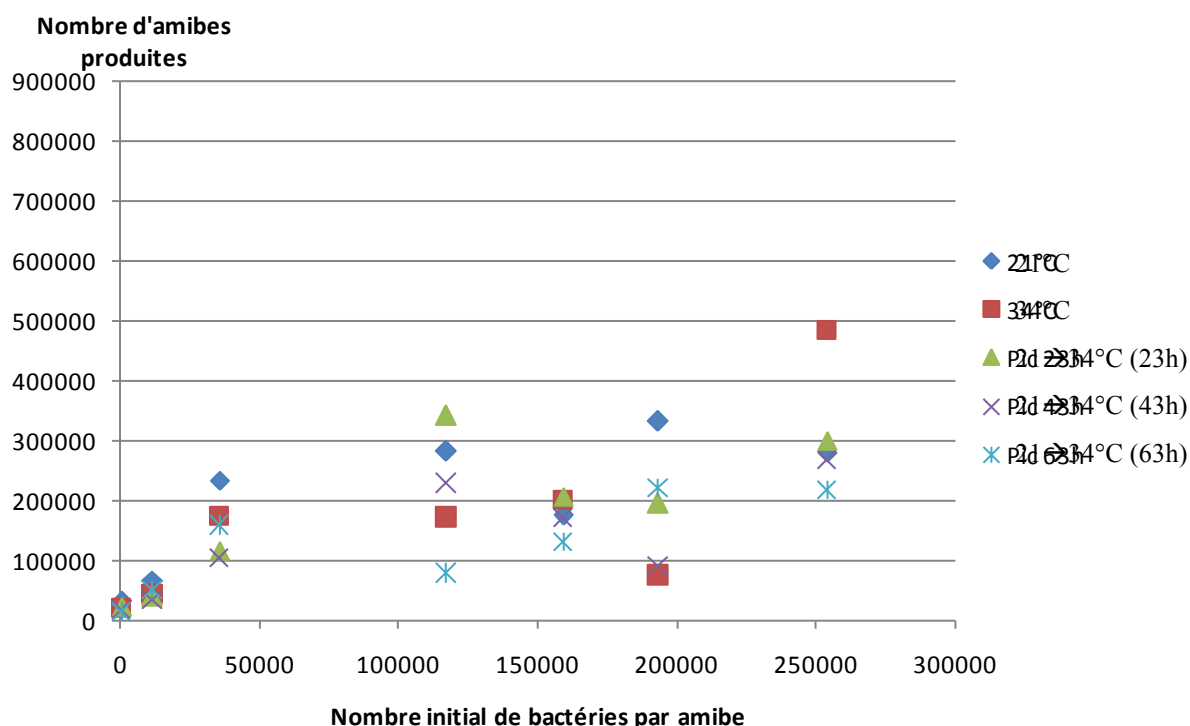


Figure 32bis. Nombre d'amibes *Naegleria lovaniensis* produites en fonction du rapport initial bactéries/amibes. Chaque température testée (21°C, 34°C, et les augmentations de température de 21°C à 34°C après 23, 43 et 63 heures) est figurée par un symbole différent. Résultats avec un ratio initial bactéries/amibe inférieur à 3×10^5 .

Peu de variations dans le nombre total d'amibes produites sont visibles en fonction de la température de croissance de *N. lovaniensis*. On notera cependant que dans les cultures à 21°C et lorsque les conditions nutritionnelles étaient les plus sévères (inférieures à 1×10^5 bactéries par amibe environ), le nombre d'amibe produite est plus important que celui observé dans les essais à 34°C et avec augmentations de température. Les résultats montrent que *N. lovaniensis* est capable de croître et de se multiplier dans un milieu à 21°C.

Contrairement aux observations faites pour *A. castellanii*, la quantité de nutriments disponible joue clairement un rôle dans la quantité d'amibes produite dans les essais avec *N. lovaniensis*. En effet, les plus grandes quantités d'amibes ne sont produites que lorsque les quantités de nutriments disponibles sont importantes. Les quantités de *N. lovaniensis* produites après la phase de croissance exponentielle peuvent atteindre des valeurs qui s'approchent de 1×10^6 amibes ($8,21 \times 10^5$), deux degrés de magnitude au-dessus des résultats observés en milieu axénique ($1,29 \times 10^4$ amibes). Si ces valeurs obtenues pour *N. lovaniensis* en milieu axénique étaient inférieures d'un degré de magnitude à celles obtenues pour *A. castellanii* (9×18.10^4 amibes), *N. lovaniensis* est capable de produire plus d'individus qu'*A. castellanii* en présence d'*E. coli* K12. Ces résultats signent certainement un mode de nutrition plus prédateur pour *N. lovaniensis* qui pourrait ainsi plus

facilement s'imposer dans un environnement possédant une source de nutriments xénique suffisante.

La **Figure 33** présente sous forme de graphique les quantités de trophozoïtes après 150 heures de culture environ pour chaque test de croissance effectué avec *N. lovaniensis*.

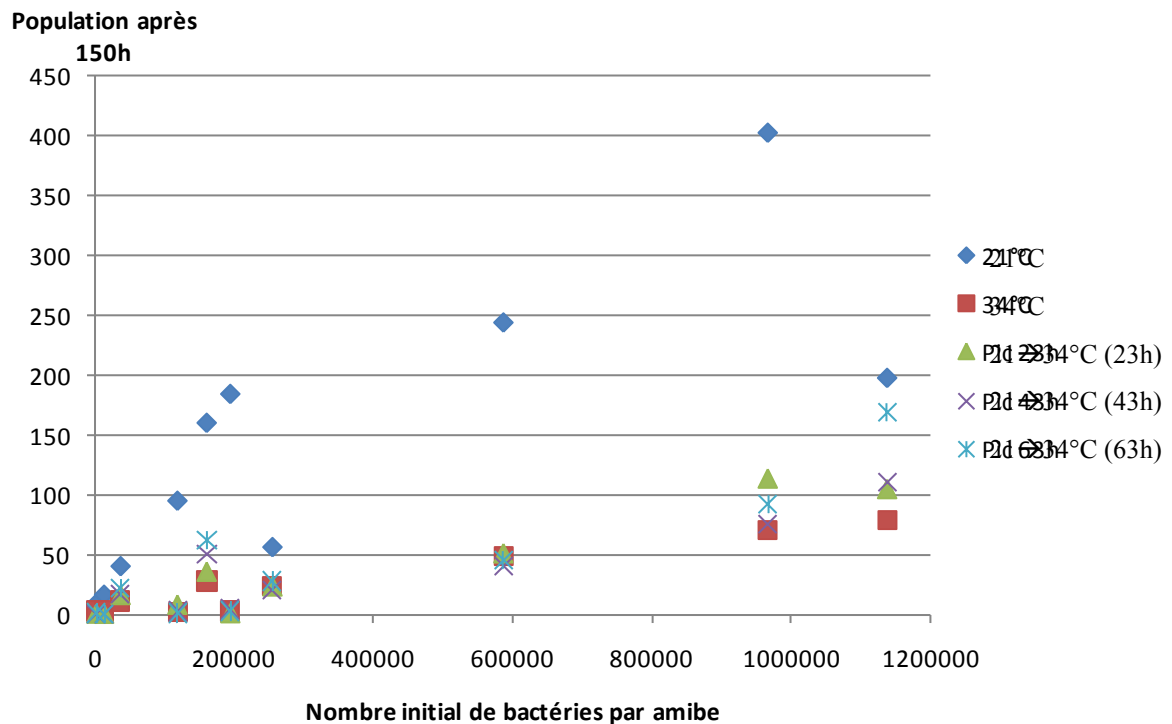


Figure 33. Rendement de croissance de *Naegleria lovaniensis* après 150 heures de culture en fonction du rapport initial bactéries/amibes. Chaque température testée (21°C, 34°C, et les augmentations de température de 21°C à 34°C après 23, 43 et 63 heures) est figurée par un symbole différent.

La **Figure 33bis** présente uniquement les résultats des essais avec un rapport initial bactéries/amibe inférieur à 4×10^5 pour plus de lisibilité.

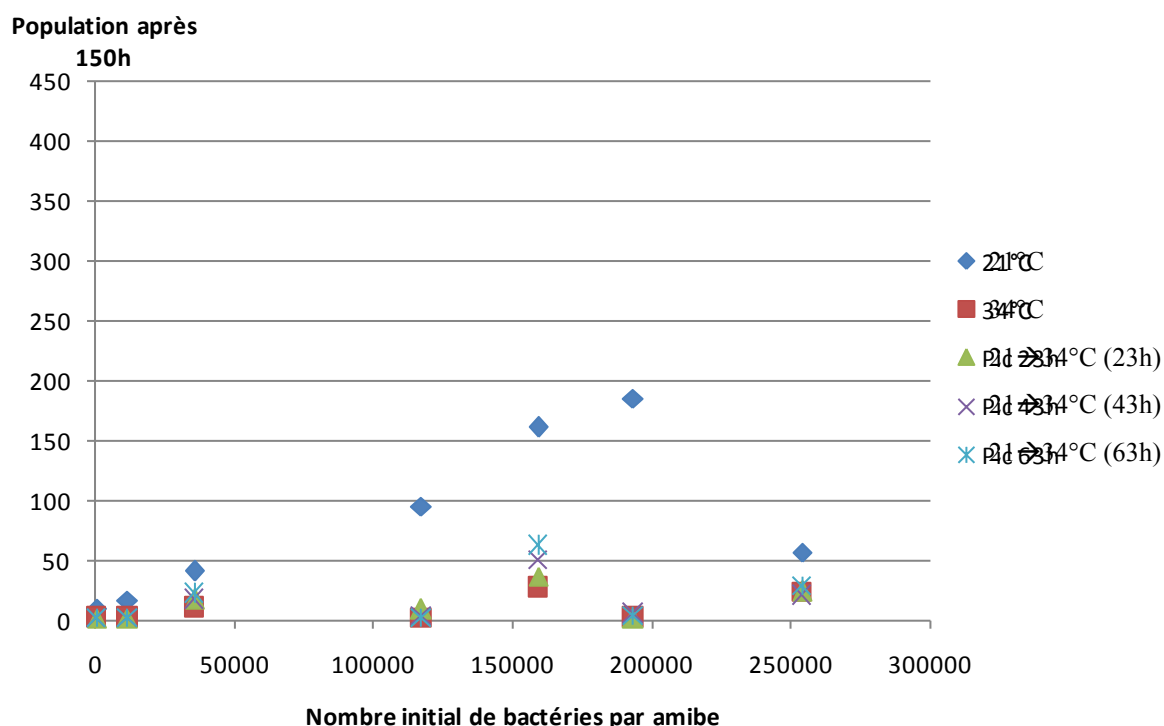


Figure 33bis. Rendement de croissance de *Naegleria lovaniensis* après 150 heures de culture en fonction du rapport initial bactéries/amibes. Chaque température testée (21°C, 34°C, et les augmentations de température de 21°C à 34°C après 23, 43 et 63 heures) est figurée par un symbole différent. Résultats avec un ratio initial bactéries/amibe inférieur à 3×10^5 .

Tout comme pour *A. castellanii*, la quantité de bactéries initiale semble influencer sur le rendement après 150 heures de culture, surtout à 21°C. En effet, plus la quantité de nutriments disponibles au départ était élevée, plus *N. lovaniensis* a pu maintenir sa population à un niveau élevé, avec des valeurs atteignant jusqu'à 400 fois la population initiale à 21°C.

N. lovaniensis s'est comportée de façon similaire pour toutes les autres conditions de température, avec des valeurs finales en-deçà de celles relevées à 21°C. Plus particulièrement, les essais pour lesquels le rapport initial bactéries/amibe était inférieur à 10^5 n'ont pas permis à l'amibe de maintenir la population à un niveau supérieur au niveau de départ. *N. lovaniensis* semble donc nécessiter dix fois plus de nutriments qu'*A. castellanii* pour se maintenir sous forme végétative.

2.4.3 Flagellation de *Naegleria lovaniensis*

Durant les essais en présence d'un substrat bactérien, il a été possible d'observer des formes flagellées de *N. lovaniensis* à de nombreuses reprises (contrairement aux essais en milieu axénique), et ce indépendamment de la température de croissance de l'amibe.

Le **Tableau 7** résume le pourcentage d'essais positifs (c'est-à-dire pour lesquels au moins une amibe sous forme flagellée a été observée) en fonction de la température de croissance de l'amibe.

Tableau 7. Pourcentage d'essais pour lesquels au moins une forme flagellée de *N. lovaniensis* a été observée en fonction de la température de croissance.

Condition	Pourcentage d'essais positifs
21°C	40%
34°C	40%
21→34°C (23h)	50%
21→34°C (43h)	50%
21→34°C (63h)	50%

Ces résultats font apparaître une tendance plus importante au passage à la forme flagellée lorsque *N. lovaniensis* subit une augmentation de température. De façon empirique, les formes flagellées ont en effet été observées principalement après le passage à 34°C. Les résultats identiques à 34 et à 21°C confirment que c'est bien l'augmentation de température et non la température de 34°C qui a une influence sur ce changement de forme. **Delattre et Oger (1981)** ont émis l'hypothèse que ce n'est pas une température élevée, mais une augmentation de température qui serait l'élément-clé de l'apparition de blooms de *Naegleria*. Le passage à la forme flagellée pourrait ainsi être un mécanisme permettant à l'amibe de se disséminer et de coloniser massivement une niche écologique.

Ces résultats suggèrent donc que *N. lovaniensis* est capable de flageller à 21°C tout comme à 34°C. L'augmentation de température semble avoir un effet positif sur le changement de forme de l'amibe, mais il existe certainement un autre facteur qui déclenche ce processus.

La quantité de *N. lovaniensis* présente au moment de l'observation de formes flagellées était, tous essais confondus, de $2,41 \times 10^5 \pm 1,24 \times 10^5$ amibes par cm^2 , avec des valeurs s'échelonnant de $5,74 \times 10^4$ à $4,37 \times 10^5$ amibes par cm^2 . Ces valeurs correspondent à une occupation très importante de la surface du puits, voire à la confluence des amibes : $1,29 \pm 0,67 \text{ cm}^2$ occupés sur 1,883 disponibles (c'est-à-dire $69 \pm 36\%$) si on considère que le diamètre moyen d'une amibe est de $17,5 \mu\text{m}$ (**Visvesvara et al. 2007**).

Le passage à la forme flagellée pour *Naegleria* s'effectuerait donc préférentiellement lorsque l'espace disponible dans une niche donnée devient trop exigü pour la quantité d'amibes. L'amibe pourrait ainsi avoir accès à d'autres sources de nutriments que celles directement accessibles depuis

les surfaces sur lesquelles elle croît habituellement et, comme dans l'hypothèse de **Griffin (1983)**, conquérir rapidement des niches écologiques adjacentes.

2.4.4 Comparaison des différents protocoles expérimentaux

Les deux protocoles utilisés durant cette étude (croissance en milieu axénique ou xénique) ont donné des résultats différents tant au niveau de la capacité des amibes à croître à une température donnée qu'au niveau de la quantité de population obtenue durant chaque essai.

Peu de données dans la littérature sont disponibles sur le sujet et les protocoles expérimentaux utilisés sont tous différents. Les résultats les plus intéressants sont discutés ci-dessous.

Température de croissance

A. castellanii a été capable de croître à 21°C et à 34°C quelle que soit la source de nutriments (xénique ou axénique) employée dans les essais. Elle a cependant été incapable de croître à 39°C en milieu axénique. Ce seuil de tolérance se rapproche de celui documenté par **Griffin (1972)**, qui a été capable de cultiver une souche d'*Acanthamoeba* jusqu'à une température de 36°C en présence de bactéries.

N. lovaniensis quant à elle n'a pas pu se multiplier à 21°C lorsque la source nutritionnelle était constituée de milieu Chang, qui est pourtant le milieu utilisé en routine au laboratoire pour cultiver l'amibe. Avec *E. coli* K12 comme source nutritionnelle, les résultats montrent à l'inverse que l'amibe est capable de croître à 21°C. Ces résultats ne sont cependant pas surprenants, compte tenu du mode de nutrition essentiellement prédateur de l'amibe (**Rodriguez-Zaragoza 1994**).

Dans une étude récente, **Goudot et al. (2012)** ont étudié la croissance de *N. fowleri* dans un biofilm en réacteur continu alimenté par de l'eau de rivière. Les réacteurs étaient maintenus à 32 ou 42°C pendant une durée de 45 jours. A 32°C, la population de *N. fowleri* se maintient mais aucune croissance n'est visible. Par contre, une autre espèce de *Naegleria*, possiblement *N. lovaniensis* se multiplie et prend le dessus. Il paraîtrait en effet logique que *N. lovaniensis*, étant très proche génétiquement de *N. fowleri*, soit un compétiteur de cette dernière. Dans la même étude, à 42°C, *N. fowleri* croît de manière importante, mais sa population chute après quelques jours, vraisemblablement à cause de la pression de compétiteurs ou d'un manque de proies comme il a été constaté à plusieurs reprises pour *N. lovaniensis* dans la présente étude lorsque la température était de 34°C.

Quantité de nutriments nécessaire

En présence de bactéries, les amibes ont pu croître de façon importante dans nos essais, mais seulement à partir d'un certain nombre initial de bactéries par amibe : de l'ordre de 10^4 pour *A. castellanii*, et 10^5 pour *N. lovaniensis*.

Dans leur étude sur *A. castellanii*, **Wang et Ahearn (1997)** ont noté que les rapports bactéries/amibes les plus favorables au développement de l'amibe étaient de l'ordre de 1 à 10 bactéries par amibe. Au-delà de 10^4 bactéries par amibe, les bactéries empêchaient la croissance de l'amibe (température de croissance : 24°C). Ces résultats peuvent s'expliquer par trois principales différences entre la présente étude et les essais de **Wang et Ahearn**. Dans ces derniers, les bactéries se trouvent en suspension dans le milieu, contrairement au tapis bactérien réalisé dans la présente étude, elles sont donc moins accessibles à la prédation des amibes qui se déplacent sur un support solide. De plus, l'étude de **Wang et Ahearn** est réalisée en milieu nutritif, ce qui a pu favoriser une croissance significative de bactéries et un milieu déséquilibré voire toxique pour l'amibe lorsque le nombre initial de bactéries était important. Enfin, la nature de la souche d'*Acanthamoeba* peut également influencer ces données. Contrairement à notre souche environnementale, la souche utilisée par **Wang et Ahearn** est une souche issue d'un isolat pathogène de kératite. Cette dernière possède peut-être une capacité de prédation supérieure, comme le suggèrent **Jung et al. (2008)**.

A notre connaissance, deux auteurs ont calculé des valeurs de K_S lors de tests de croissance sur des amibes des genres *Acanthamoeba* et *Naegleria*.

Pickup et al (2007) avancent une valeur de K_S de $8,631 \times 10^5$ bactéries par amibe dans le cas d'une croissance d'*A. castellanii* à 20°C sur agar en présence d'*E. coli* K12. Ce paramètre n'a pas été calculé dans la présente étude pour *A. castellanii* car les résultats étaient trop disparates. Cependant, on peut affirmer que cette valeur, si elle avait pu être calculée, aurait été supérieure à 1×10^4 puisque l'amibe ne croît pas de manière satisfaisante en-deçà de cette valeur.

Goudot et al (2012) ont calculé une valeur de K_S de $1,2 \times 10^5$ pour *N. fowleri* dans un biofilm complexe en réacteur alimenté par eau de rivière à 42°C. Cette valeur est bien plus élevée que celle de $1,81 \times 10^4$ relevée dans notre étude pour *N. lovaniensis* à 34°C. Cela pourrait s'expliquer par le fait qu'*E. coli* K12 est une source nutritionnelle bactérienne idéale pour l'amibe, contrairement au biofilm qui renferme une grande variété de bactéries. La température peut également être un facteur influençant les valeurs de K_S .

Vitesse de croissance

Dans nos essais, *A. castellanii* s'est multipliée le plus rapidement à une température de 34°C avec *E. coli* K12 comme source nutritionnelle. Sa vitesse de croissance était plus importante à 28°C en milieu axénique qu'à 21°C en présence d'*E. coli* K12, ce qui pourrait signifier que la température est un facteur plus déterminant que le type de nutriments disponibles pour la croissance d'*A. castellanii*.

Dans tous nos essais, plus la température était élevée, plus la vitesse de croissance de *N. lovaniensis* était importante. Cependant, les valeurs de μ relevées en présence de bactéries sont bien plus élevées qu'en milieu axénique. La qualité de la source nutritionnelle semble donc importante pour la croissance de *N. lovaniensis*.

Pickup et al. (2007) ont réalisé une étude de croissance d'*A. castellanii* sur support solide (agar) en présence de différentes bactéries dont *E. coli* K12. L'étude est réalisée à 20°C avec des concentrations bactériennes initiales allant jusqu'à 5×10^7 bactéries cm^{-2} pour 5 amibes cm^{-2} . La valeur de μ_{\max} relevée pour *A. castellanii* en présence d'*E. coli* K12 est de $0,063 \text{ h}^{-1}$ assez proche de la valeur de $0,077 \text{ h}^{-1}$ relevée dans la présente étude à 21°C en présence de bactéries, malgré un mode opératoire légèrement différent. Les valeurs maximales ont été atteintes par **Pickup et al** avec des rapports initiaux entre bactérie et amibe supérieures à 2×10^6 bactéries par amibe contre $2,5 \times 10^5$ bactéries par amibe environ dans notre étude.

Dans l'étude de **Goudot et al (2012)**, la croissance de *N. fowleri* a permis de calculer le paramètre μ_{\max} à 42°C. La valeur obtenue par les auteurs est de $0,23 \text{ h}^{-1}$. Cette valeur est très proche de la valeur de μ_{\max} calculée pour *N. lovaniensis* durant nos essais à 34°C en présence de bactéries : $0,199 \text{ h}^{-1}$. Ainsi, une source de nutriments constituée d'une souche bactérienne pure en tapis semble donner des résultats proches de ceux d'une source complexe présente dans un biofilm en termes de vitesse de croissance. De plus, la vitesse de croissance de *N. lovaniensis* semble très proche de celle de *N. fowleri*, réaffirmant sa place en tant que modèle de laboratoire non pathogène.

Nombre d'amibes produites

Le nombre d'amibes produites après la phase de croissance lors des essais avec *A. castellanii* a été globalement plus important (environ quatre fois plus) en présence de bactéries. Cette constatation est également valable pour *N. lovaniensis*, dont les écarts sont encore plus importants puisque les quantités maximales produites étaient 60 fois plus importantes en présence de bactéries.

Conclusion

Les essais menés lors de l'étude ont permis d'obtenir de nouveaux résultats quant au comportement de *Naegleria lovaniensis* (modèle de *Naegleria fowleri*) et d'*Acanthamoeba castellanii* cultivées dans différentes conditions nutritives et de température. L'objectif du travail de recherche était d'obtenir des informations sur la croissance des deux amibes en présence d'une solution nutritive axénique ou d'un tapis bactérien, à des températures situées entre 21 et 39°C ainsi que lors d'augmentations de température de 21 à 34°C comme cela pourrait se produire pour une eau de circuit de refroidissement d'une centrale thermique.

En milieu axénique (milieu PYG), la température minimale de croissance d'*A. castellanii* est inférieure ou égale à 21°C ($\mu = 0,032 \pm 0,008 \text{ h}^{-1}$ à 21°C), sa température maximale de croissance est située entre 34 et 39°C ($\mu = 0,034 \pm 0,005 \text{ h}^{-1}$ à 34°C) et sa température optimale de croissance se situe autour de 28°C ($\mu = 0,062 \pm 0,003 \text{ h}^{-1}$ à 28°C). Pour *N. lovaniensis*, la température minimale de croissance en milieu axénique (milieu SCGYEM) se situe entre 21 et 28°C ($\mu = 0,029 \pm 0,007 \text{ h}^{-1}$ à 28°C), sa température maximale de croissance, qui semble proche de sa température optimale de croissance, est égale ou supérieure à 39°C ($\mu = 0,049 \pm 0,006 \text{ h}^{-1}$ à 39°C).

Entre 28 et 34°C, il existe une zone de compétition entre les deux amibes qui pourrait être exploitée dans de futures expériences, avec mise en contact des deux amibes dans un même puits. Leur différenciation est difficile en microscopie classique mais de récentes techniques (comme l'utilisation du colorant Cell Tracker par exemple) rendent la chose possible. Par ailleurs, *N. lovaniensis* ne se maintient pas longtemps aux températures les plus chaudes. Il est donc judicieux de modifier les habitudes de culture en laboratoire et de conserver les cultures axéniques à 28°C au lieu de 34°C. Ainsi, le milieu de culture peut être changé moins souvent, d'où une économie de consommables et de temps.

Le protocole utilisé en milieu xénique permet d'obtenir des cinétiques de croissance en présence d'un tapis bactérien alors que dans la grande majorité des études publiées les amibes sont mises en contact avec des suspensions bactériennes. Le protocole utilisé dans notre étude permet ainsi d'obtenir des résultats plus proches d'une réalité environnementale tout en s'affranchissant des contraintes liées au maintien d'un véritable biofilm en réacteur.

En présence d'un tapis bactérien (*E. coli* K12), la température minimale de croissance d'*A. castellanii* est inférieure ou égale à 21°C ($\mu = 0,047 \pm 0,015 \text{ h}^{-1}$ à 21°C) et sa température maximale de croissance est supérieure ou égale à 34°C ($\mu = 0,100 \pm 0,039 \text{ h}^{-1}$ à 34°C). Il en va de même pour

N. lovaniensis ($\mu = 0,039 \pm 0,012 \text{ h}^{-1}$ à 21°C et $\mu = 0,183 \pm 0,037 \text{ h}^{-1}$ à 34°C). Les deux amibes privilégient donc un mode de nutrition prédateur pour une multiplication rapide.

Lors d'augmentations de températures de 21 à 34°C, *N. lovaniensis* est capable d'augmenter sa vitesse de croissance très rapidement et atteint des valeurs presque aussi importantes qu'en culture à 34°C ($\mu = 0,152 \pm 0,032 \text{ h}^{-1}$ lorsque l'augmentation de température survient après 23 heures). Cependant, ses besoins nutritifs augmentent puisque la constante d'affinité K_s passe de $1,81 \times 10^4$ bactéries par amibe, pour des cultures à 34°C, à $1,48 \times 10^5$ au maximum lors d'augmentations de température à 34°C. Ainsi, dans un circuit de refroidissement de centrale thermique, des populations d'amibes du genre *Naegleria* qui survivent à de faibles concentrations dans les biofilms pourraient se multiplier de manière très importante lors d'augmentations de température si les proies sont suffisamment abondantes. Ainsi, le contrôle des populations bactériennes dans ces milieux peut être un moyen intéressant de limiter les proliférations amibiennes indésirables. Dans notre étude, lorsque les concentrations bactériennes sont inférieures ou égales à 1.10^3 *E. coli* K12 par cm^2 , les deux amibes ne sont pas capables de se multiplier. Cette valeur pourrait servir de base pour calculer une valeur « seuil » de bactéries à ne pas dépasser dans un circuit de refroidissement de centrale thermique afin d'éviter la multiplication d'amibes.

Les conditions dans lesquelles les amibes du genre *Naegleria* passent à la forme flagellée sont pour le moment méconnues. Dans notre étude, le pourcentage d'essais pour lesquels au moins une forme flagellée a été observée est de 40% à 21°C et 34°C, mais il passe à 50% pour toutes les conditions dans lesquelles *N. lovaniensis* a subi une augmentation de température. Au moment de l'observation de ces formes flagellées, le pourcentage d'occupation de la surface du puits était de $69 \pm 36\%$, proche de la confluence. L'augmentation de la température du milieu, mais aussi le manque d'espace sont donc des facteurs cruciaux pour le passage à la forme flagellée qui facilite la dissémination de l'amibe.

Des essais complémentaires pourront être effectués dans l'avenir pour confirmer ces données. Il faut envisager de dénombrer le nombre de bactéries restantes dans les puits (au DAPI par exemple) pour affiner les résultats relatifs à la nutrition des amibes. Les phénomènes de compétition étant importants dans les milieux naturels, ils peuvent conditionner l'émergence d'une espèce amibienne au détriment des autres. Les prochaines études pourraient faire intervenir des essais sur les deux amibes simultanément dans un même puits. Les différencier au microscope est difficile, mais différentes solutions sont envisageables pour pallier à cette lacune, comme l'utilisation de colorants tels que le Cell Tracker ou la PCR quantitative.

Bibliographie

Articles scientifiques

- Behets J, Declerck P, Delaedt Y, Verelst L, et Ollevier F. **2007**. "Survey for the presence of specific free-living amoebae in cooling waters from Belgian power plants." *Parasitology Research* 100: 1249-1256.
- Brown T.J, Cursons R.T, et Keys E.A. **1982** "Amoebae from antarctic soil and water." *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 491-493.
- Caruzo G et Cardozo J. **2008** "Primary amoebic meningoencephalitis: a new case from Venezuela." *Tropical Doctor* 38: 256-257.
- Cavalier-Smith T. **1993** "Kingdom protozoa and its 18 phyla." *Microbiological Reviews* 57: 953-994.
- Cordingley J.S, Wills R.A, et Villemez C.L. **1996** "Osmolarity is an independent trigger of *Acanthamoeba castellanii* differentiation." *Journal of Cellular Biochemistry* 61: 167-171.
- De Jonckheere J. **2004**, "Molecular Definition and the Ubiquity of Species in the Genus *Naegleria*." *Protist* 155 : 89-103.
- Delattre J.M, et Oger C. **1981** "*Naegleria fowleri* and heated aquatic environments: A possible mechanism." *Annales de la Societe Belge de Medecine Tropicale* 61: 441-452.
- Detterline J.L, et Wilhelm W.E. **1991** "Survey of Pathogenic *Naegleria fowleri* and Thermotolerant Amebas in Federal Recreational Waters." *Transactions of the American Microscopical Society* 110: 244-261.
- Dive D.G, Leclerc H, De Jonckheere J, et Delattre J.M. **1981** "Isolation of *Naegleria fowleri* from the cooling pond of an electric power plant in France." *Annales de Microbiologie* 132 A: 97-105.
- Eichinger L, Pachebat J.A, Glöckner G, Rajandream M.-A, Sucgang R. et al. **2005** "The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*." *Nature* 435: 43-57.
- Goudot S, Herbelin P, Mathieu L, Soreau S, Banas S, et Jorand F. **2012** "Growth dynamic of *Naegleria fowleri* in a microbial freshwater biofilm." *Water Research* 46: 3958-3966.
- Greub G, et Raoult D. **2004** "Microorganisms Resistant to Free-Living Amoebae." *Clinical Microbiology Reviews* 17: 413-433.
- Griffin J.L. **1972** "Temperature tolerance of pathogenic and nonpathogenic free-living amoebas." *Science* 178: 869-870.

- Griffin J.L. **1983** "The pathogenic amoeboflagellate *Naegleria fowleri*: Environmental isolations, competitors, ecologic interactions, and the flagellate-empty habitat hypothesis." *Journal of Protozoology* 30: 403-409.
- Hsu B.-M, Lin C.-L, Shih F.-C. **2009** "Survey of pathogenic free-living amoebae and *Legionella* spp. in mud spring recreation area." *Water Research* 43: 2817-2828.
- Jamerson M, Remmers K, Cabral G, et 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." *Parasitology Research* 104: 969-978.
- Jung S.-Y, Alsam S, Kim K.S, et Khan N.A. **2008** "Pathogen-pathogen interactions: A comparative study of *Escherichia coli* interactions with the clinical and environmental isolates of *Acanthamoeba*." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24: 2339-2348.
- Marciano-Cabral F, et Cabral G. **2003** "*Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans." *Clinical Microbiology Reviews* 16: 273-307.
- Murga R, Forster T.S, Brown E, Pruckler J.M, Fields B.S, et Donlan R.M. **2001** "Role of biofilms in the survival of *Legionella pneumophila* in a model potable-water system." *Microbiology* 147: 3121-3126.
- Pickup Z.L, Pickup R, et Parry J.D. **2007** "Effects of bacterial prey species and their concentration on growth of the amoebae *Acanthamoeba castellanii* and *Hartmannella vermiformis*" *Applied and Environmental Microbiology* 73: 2631-2634.
- Preston T.M, Richards H, et Wotton R.S. **2001** "Locomotion and feeding of *Acanthamoeba* at the water-air interface of ponds." *FEMS Microbiology Letters* 194: 143-147.
- Pushkarew B.M. **1913** "Über die Verbreitung der Süsswasserprotozoen durch die Luft." *Arch Protistent* 23: 323-362.
- Rodriguez-Zaragoza S. **1994** "Ecology of free-living amoebae." *Critical Reviews in Microbiology* 20: 225-241.
- Rodriguez-Zaragoza S, Rivera F, Bonilla P, Ramirez E, Gallegos E, Calderon A, Ortiz R, et Hernandez D. **1993** "Amoebological study of the atmosphere of San Luis Potosi, SLP, Mexico.." *Journal of exposure analysis and environmental epidemiology* 3 Suppl 1: 229-241.
- Schuster F.L. **2002** "Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amebas." *Clinical Microbiology Reviews* 15: 342-354.

- Schuster F.L, et Visvesvara G.S. **2004** "Amebae and ciliated protozoa as causal agents of waterborne zoonotic disease." *Veterinary Parasitology* 126: 91-120.
- Seal D.V. **2003** "*Acanthamoeba* keratitis update - Incidence, molecular epidemiology and new drugs for treatment." *Eye* 17: 893-905.
- Smirnov A.V, et Brown S. **2004** "Guide to the methods of study and identification of soil gymnamoebae." *Protistology* 3: 148-190.
- Stanley S.L. **2003** "Amoebiasis." *Lancet* 361: 1025-1034.
- Sykora J.L, Keleti G, et Martinez J. **1983** "Occurrence and pathogeny of *Naegleria fowleri* in artificially heated waters." *Applied and Environmental Microbiology* 45: 974-979
- Thom S, Warhurst D, et Drasar B.S. **1992** "Association of *Vibrio cholerae* with fresh water amoebae." *J Med Microbiol* 36: 303-306.
- 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 Immunology and Medical Microbiology* 50: 1-26.
- Wang X, et Ahearn D.G. **1997** "Effect of bacteria on survival and growth of *Acanthamoeba castellanii*." *Current Microbiology* 34: 212-215.

Autres publications

- Abel M. **2009** "Compétition entre amibes in vitro." *Travaux universitaires*.
- Page F.C. **1988** "A new key to freshwater and soil gymnamoebae. *Freshwater Biological Association, Ambleside*.
- Khan N.A. **2009** "*Acanthamoeba*: biology and pathogenesis" Caister Academic Press.

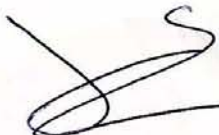



Sites internet

http://circulaire.legifrance.gouv.fr/pdf/2011/07/cir_33479.pdf

INSTRUCTION N°DGS/EA4/2011/264 du 1er juillet 2011 relative aux modalités de recensement, d'exercice du contrôle sanitaire et de classement des eaux de baignade pour la saison balnéaire de l'année 2011 (réfère notamment à l'avis du 4 mai 2004 du CSHPF).

DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 04 septembre 2013

<p>DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE</p> <p>présenté par : Yannick HELUIN</p> <p><u>Sujet</u> : Suivi de la croissance des amibes <i>Naegleria lovaniensis</i> et <i>Acanthamoeba castellanii</i> en milieux xénique et axénique</p> <p><u>Jury</u> :</p> <p>Président : Frédéric JORAND, Professeur Directeur : Sandrine BANAS, Maître de Conférences Juges : Laurence Mathieu, Maître de Conférences Jean-François MUNOZ, Directeur de laboratoire Ilan THOUVENIN, Pharmacien</p>	<p>Vu, Nancy, le 24/07/2013</p> <p>Le Président du Jury Directeur de Thèse</p> <p> </p>
<p>Vu et approuvé, Nancy, le 20.08.2013</p> <p>Doyen de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Lorraine,</p> <p> Francine PAULUS</p>	<p>Vu, Nancy, le 27.08.2013</p> <p>Le Président de l'Université de Lorraine,</p> <p> Pierre MUTZENHARDT</p> <p>N° d'enregistrement : 6513</p>

N° d'identification :

TITRE

Suivi de la croissance des amibes *Naegleria lovaniensis* et *Acanthamoeba castellanii* en milieux xénique et axénique

Thèse soutenue le 4 septembre 2013

Par M. HELUIN Yannick

RESUME :

Les microorganismes qui font l'objet de la présente étude sont des amibes, plus particulièrement *Naegleria lovaniensis*, modèle non pathogène de *Naegleria fowleri*, et *Acanthamoeba castellanii*. Il s'agit de protozoaires vivant en milieu aquatique et qui se nourrissent de particules en suspension et de proies. Leur distribution est ubiquitaire et elles ont été mises en évidence dans des prélèvements d'eau douce sur tous les continents. Certaines prolifèrent de manière très rapide lorsque ces eaux douces sont chauffées naturellement (soleil) ou non (circuits de refroidissement), ce qui pose de nos jours un problème de santé publique préoccupant.

En effet, ces amibes sont des amibes libres, ce qui signifie, par opposition aux amibes parasitaires, qu'elles sont capables de vivre et de se reproduire dans un milieu naturel. Cependant, durant les 50 dernières années, un nombre non négligeable de cas d'infections (dont certaines se sont révélées fatales) a été rapporté. Le terme d'amibes amphizoïques a été choisi pour désigner les amibes chez lesquelles on a découvert cette capacité à parasiter l'Homme et à provoquer chez lui une pathologie bien qu'elles semblent à la base adaptées pour une existence en milieu naturel.

Le présent travail se propose de compiler dans une première partie une revue bibliographique sur les amibes des genres *Naegleria* et *Acanthamoeba*, ainsi que sur les facteurs environnementaux pouvant favoriser leur multiplication.

Dans une seconde partie, le rapport rend compte des résultats expérimentaux obtenus au laboratoire sur la culture de *Naegleria lovaniensis* et d'*Acanthamoeba castellanii*.

Les amibes ont été cultivées en milieux xénique et axénique (en présence d'un tapis bactérien d'*Escherichia coli* K12) à des températures allant de 21°C à 39°C. Les amibes ont également été soumises à des augmentations de température de 21°C à 34°C afin de mimer les conditions d'une eau dans un circuit de refroidissement de centrale thermique.

Les résultats permettront de mieux comprendre le rôle des facteurs « température » et « substrat » sur le développement de ces amibes amphizoïques.

MOTS CLES :

Acanthamoeba castellanii, amibe pathogène, circuit de refroidissement, *Escherichia coli* K12, *Naegleria fowleri*, *Naegleria lovaniensis*, tapis bactérien, température, vitesse de croissance.

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Mme BANAS Sandrine, Maître de Conférences	LCPME, Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement UMR 7564	Expérimentale <input checked="" type="checkbox"/> Bibliographique <input type="checkbox"/> Thème 5

Thèmes

1 – Sciences fondamentales
3 – Médicament
5 – Biologie

2 – Hygiène/Environnement
4 – Alimentation – Nutrition
6 – Pratique professionnelle