

Thèse d'exercice

Faculté de Pharmacie

Année 2021

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

Le lundi 13 septembre 2021

Par

Guillaume MAILLER

Né(e) le 23 août 1996 à Bergerac

LES AMIBES MANGEUSES DE CERVEAU

Thèse dirigée par Bertrand COURTIoux

Examineurs :

Mme Catherine FAGNERE, Professeur des universités
M. Bertrand COURTIoux, Professeur des universités
M. Fabrice LEPINE, Docteur en pharmacie
M. Jean-Charles GORSE, Docteur en pharmacie

Présidente du Jury
Directeur et Juge
Juge
Juge



Thèse d'exercice

Faculté de Pharmacie

Année 2021

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

Le lundi 13 septembre 2021

Par Guillaume MAILLER

Né(e) le 23 août 1996 à Bergerac

LES AMIBES MANGEUSES DE CERVEAU

Thèse dirigée par Bertrand COURTIOUX

Examineurs :

Mme Catherine FAGNERE, Professeur des universités

M. Bertrand COURTIOUX, Professeur des universités

M. Fabrice LEPINE, Docteur en pharmacie

M. Jean-Charles GORSE, Docteur en pharmacie

Présidente du Jury

Directeur et Juge

Juge

Juge



Liste des enseignants

Le 1^{er} octobre 2020

DOYEN DE LA FACULTE :

Monsieur le Professeur Bertrand **COURTIOUX**

VICE-DOYEN :

Monsieur David **LEGER**, Maître de conférences

ASSESEURS :

Monsieur le Professeur Serge **BATTU**, Monsieur le Professeur Nicolas **PICARD**

PROFESSEURS DES UNIVERSITES :

BATTU Serge	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
CARDOT Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
COURTIOUX Bertrand	MICROBIOLOGIE, PARASITOLOGIE, IMMUNOLOGIE ET HÉMATOLOGIE
DESMOULIERE Alexis	PHYSIOLOGIE
DUROUX Jean-Luc	BIOPHYSIQUE ET MATHÉMATIQUES
FAGNERE Catherine	CHIMIE ORGANIQUE, THÉRAPEUTIQUE ET PHARMACIE CLINIQUE
LIAGRE Bertrand	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
MAMBU Lengo	PHARMACOGNOSIE
TROUILLAS Patrick	BIOPHYSIQUE ET MATHÉMATIQUES
VIANA Marylène	PHARMACIE GALÉNIQUE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

PICARD Nicolas	PHARMACOLOGIE
ROGEZ Sylvie	MICROBIOLOGIE, PARASITOLOGIE, IMMUNOLOGIE ET HÉMATOLOGIE
SAINT-MARCOUX Franck	TOXICOLOGIE

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

CHAUZEIX Jasmine	MICROBIOLOGIE, PARASITOLOGIE, IMMUNOLOGIE ET HÉMATOLOGIE
JOST Jérémy	CHIMIE ORGANIQUE, THÉRAPEUTIQUE ET PHARMACIE CLINIQUE

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES :

BASLY Jean-Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
BEAUBRUN-GIRY Karine	PHARMACIE GALÉNIQUE
BÉGAUD Gaëlle	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
BILLET Fabrice	PHYSIOLOGIE
CALLISTE Claude	BIOPHYSIQUE ET MATHÉMATIQUES
CHEMIN Guillaume	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
CLÉDAT Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
COMBY Francis	CHIMIE ORGANIQUE, THÉRAPEUTIQUE ET PHARMACIE CLINIQUE
COOK-MOREAU Jeanne	MICROBIOLOGIE, PARASITOLOGIE, IMMUNOLOGIE ET HÉMATOLOGIE
DELEBASSÉE Sylvie	MICROBIOLOGIE, PARASITOLOGIE, IMMUNOLOGIE ET HÉMATOLOGIE
DEMIOT Claire-Elise	PHARMACOLOGIE
FABRE Gabin	BIOPHYSIQUE ET MATHÉMATIQUES
FROISSARD Didier	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
JAMBUT Anne-Catherine	CHIMIE ORGANIQUE, THÉRAPEUTIQUE ET PHARMACIE CLINIQUE
LABROUSSE Pascal	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
LAVERDET Betty	PHARMACIE GALÉNIQUE
LAWSON Roland	PHARMACOLOGIE
LEGER David	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

MARRE-FOURNIER Françoise	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
MERCIER Aurélien	MICROBIOLOGIE, PARASITOLOGIE, IMMUNOLOGIE ET HÉMATOLOGIE
MILLOT Marion	PHARMACOGNOSIE
PASCAUD-MATHIEU Patricia	PHARMACIE GALÉNIQUE
POUGET Christelle	CHIMIE ORGANIQUE, THÉRAPEUTIQUE ET PHARMACIE CLINIQUE
VIGNOLES Philippe	BIOPHYSIQUE ET MATHÉMATIQUES

ATTACHE TEMPORAIRE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE :

AUDITEAU Émilie	ÉPIDÉMIOLOGIE, STATISTIQUE, SANTÉ PUBLIQUE
MARCHAND Guillaume	CHIMIE ORGANIQUE, THÉRAPEUTIQUE ET PHARMACIE CLINIQUE

ENSEIGNANTS D'ANGLAIS :

HEGARTY Andrew	CHARGÉ DE COURS
VERCELLIN Karen	PROFESSEUR CERTIFIÉ

Remerciements

A mon directeur de thèse, Monsieur Bertrand COURTIoux, Doyen de la faculté de pharmacie, professeur des universités

Je vous remercie très chaleureusement d'avoir accepté de diriger cette thèse. Merci d'avoir cru en moi dès le début, de m'avoir écouté, motivé et conseillé tout au long de ces années. Je vous remercie pour votre disponibilité, pour votre aide, vos conseils et corrections apportées à la réalisation de cette thèse. Grâce à vous je sors grandi de cette expérience et je vous en serai toujours reconnaissant. Je tiens à vous assurer, Monsieur, de mon profond respect.

A mon président de jury, Madame Catherine FAGNERE, Professeur des universités,

Je vous remercie de m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de cette thèse. Je tiens à vous remercier pour la rigueur et la précision de votre enseignement. Soyez assurée de ma profonde gratitude.

A Monsieur Fabrice LEPINE, Pharmacien titulaire à la pharmacie du Mas Cerise,

Je vous suis extrêmement reconnaissant de m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail. Je vous remercie pour m'avoir permis d'effectuer mon stage de 6^{ième} année dans votre officine, de m'avoir accordé votre confiance et de m'avoir offert l'opportunité d'enrichir mes connaissances. Recevez ici l'assurance de ma profonde considération.

A Monsieur Jean-Charles GORSE, Docteur en pharmacie,

Je t'adresse mes sincères remerciements pour avoir accepté de faire partie de ce jury. Je te remercie pour ta spontanéité, ta bonne humeur ainsi que pour ton aide franche et cordiale tout au long de mon stage de 6^{ième} année. Sois assuré de ma profonde reconnaissance.

A mes parents,

Je vous remercie d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir soutenu, encouragé et réconforté dans les moments difficiles. Vos conseils, votre écoute, votre amour sont ce que j'ai de plus précieux. Merci d'avoir fait de moi ce que je suis et je vous en remercie infiniment. Que cette thèse soit la consécration de tous nos efforts. Elle vous est offerte en témoignage de ma profonde affection et de ma sincère reconnaissance.

A ma petite sœur Chloé,

Je te remercie pour tes encouragements et ton soutien inconditionnel qui ont toujours été très importants. Merci pour ta complicité et tous ces bons moments passés ensemble. Avec toute mon affection.

A ma famille,

Un grand merci pour votre affection et tous les instants uniques et inoubliables vécus depuis mon enfance. Je vous dédie ce travail.

A Yaëlle,

Un grand merci pour ton soutien dans toutes les épreuves et tes encouragements au quotidien. Merci pour ta joie de vivre, pour ton amour et tous les moments que l'on a pu vivre durant ces années d'études. Je t'aime.

A mes amis,

Je vous remercie pour les moments exceptionnels passés en votre présence et j'espère qu'ils continueront. Bonne chance à vous tous.

Un grand **MERCI** à vous tous et à tous ceux que j'ai pu oublier.

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Table des matières

Liste des abréviations :	19
Introduction	22
I. Les amibes	23
I.1. Généralités sur les amibes	23
I.1.1. Définition	23
I.1.2. Historique	23
I.1.3. Classification	25
I.1.4. Structure	29
I.1.4.1. Le système cytomembranaire	30
I.1.4.2. Le noyau	30
I.1.4.3. Le cytosol	31
I.1.4.4. Le cytosquelette	32
I.1.4.5. Les organites intra-cytoplasmiques	33
I.1.4.6. Organites moteurs	35
I.1.4.7. La thèque	38
I.1.5. Morphologie	38
I.1.5.1. Le trophozoïte	38
I.1.5.2. Le kyste	40
I.1.5.3. La forme flagellée	42
I.1.6. Locomotion	43
I.1.7. Nutrition	44
I.1.7.1. Sources nutritives	44
I.1.7.2. Phagocytose	45
I.1.7.3. Interactions des amibes avec les bactéries	49
I.1.7.4. Osmorégulation	51
I.1.7.5. Respiration	52
I.1.8. Reproduction	52
I.2. Les amibes pathogènes pour l'Homme en fonction de leur mode de vie	53
I.2.1. Les amibes parasites	53
I.2.2. Les amibes telluriques	55
I.2.3. Les amibes amphizoïques	55
II. L'amibe mangeuse de cerveau : <i>Naegleria fowleri</i>	58
II.1. Classification	58
II.2. Morphologie	58
II.2.1. Le trophozoïte	59
II.2.2. Le kyste	61
II.2.3. La forme flagellée	63
II.2.4. Cycle évolutif	65
II.3. Ecologie	66
II.3.1. Les sources d'eau douce	67
II.3.2. Les eaux de réseaux de distribution	67
II.3.3. Les piscines	68
II.3.4. Les eaux usées	69

II.3.5. Les eaux industrielles	69
II.4. Alimentation	72
II.5. Association avec des bactéries	73
II.6. Génome	74
II.7. Epidémiologie	75
II.8. Pathologie : la méningo-encéphalite amibienne primitive (MEAP).....	78
II.8.1. Physiopathologie	78
II.8.2. Clinique	81
II.8.3. Diagnostic	84
II.8.3.1. Examen microscopique	84
II.8.3.2. Sérologie.....	87
II.8.3.3. Diagnostic moléculaire	89
II.8.3.4. Diagnostic post-mortem	89
II.8.4. Traitement	90
II.8.4.1. Amphotéricine B.....	90
II.8.4.2. Miltéfosine.....	91
II.8.4.3. Les thérapies adjuvantes :	92
II.8.4.3.1. Fluconazole	93
II.8.4.3.2. Azithromycine	93
II.8.4.3.3. Rifampicine.....	94
II.8.4.4. Autres molécules	94
II.8.5. Pronostic	95
III. Prophylaxie.....	96
III.1. Contamination lors de baignade.....	96
III.1.1. Typologie des baignades.....	96
III.1.1.1. Baignades en piscines privées ou publiques	97
III.1.1.2. Baignades en eau libre	98
III.1.2. Baignades en bassins artificiels.....	98
III.1.3. Typologie des baignades et finalité du dispositif de gestion du risque sanitaire	100
III.1.4. Réglementation française	100
III.2. Méthodes de détection.....	102
III.2.1. Prélèvements	102
III.2.2. Mise en culture	103
III.2.3. Dénombrement.....	104
III.2.4. Identification	105
III.2.4.1. Identification par méthodes d'observation microscopique.....	105
III.2.4.2. Identification par méthodes immunologiques.....	105
III.2.4.2.1. Méthode d'immuno-adsorption enzymatique.....	106
III.2.4.2.2. Méthode d'immunofluorescence couplé à la cytométrie en phase solide	107
III.2.4.3. Identification par méthodes biochimiques.....	108
III.2.4.3.1. Identification par méthodes moléculaires	110
III.2.4.3.1.1. Par réaction en chaine par polymérase	110
III.2.4.3.1.2. Par réaction en chaine par polymérase quantitative	112
III.3. Désinfection des eaux de baignade	115
III.3.1. Influence des paramètres physico-chimiques	115
III.3.1.1. La température.....	115
III.3.1.1.1. Tolérance thermique et rôle saisonnier	115

III.3.1.1.2. Rôle de la température	116
III.3.1.2. Le pH	117
III.3.1.3. L'hygrométrie	118
III.3.1.4. La salinité.....	118
III.3.1.5. La conductivité	119
III.3.1.6. Le taux d'oxygène dissous	119
III.3.1.7. Les métaux	119
III.3.1.8. Matières en suspension, matières organiques, sédiments et biofilms.....	122
III.3.2. Influence des paramètres biologiques	123
III.3.2.1.1. Présence de bactéries	123
III.3.2.1.2. Interaction avec d'autres compétiteurs	125
III.3.3. Influence des traitements biocides.....	126
III.3.3.1. Le chlore	126
III.3.3.2. Le dioxyde de chlore	132
III.3.3.3. L'ozone et l'acide paracétique	133
III.3.3.4. Les rayonnements ultraviolets.....	135
III.4. Ampleur du risque sanitaire et mesures préventives	137
III.4.1. Risque pour la santé publique	137
III.4.2. Recommandations aux baigneurs	138
III.4.3. Recommandations aux gérants des baignades	139
III.4.4. Recommandations en fonction du type de baignade	143
III.4.4.1. Pour les piscines.....	143
III.4.4.2. Pour les baignades artificielles	143
III.4.4.3. Pour les baignades en eau libre	144
III.4.4.4. Pour les sites aménagés ou naturels, alimentés par de l'eau chaude.....	145
III.4.4.5. Pour tous les types de baignade	147
Conclusion	148
Références bibliographiques	149
Serment De Galien.....	167

Table des illustrations

Figure 1 : Premières illustrations du « petit <i>Proteus</i> » par August Johann Rösel von Rosenhof en 1755. (6).....	24
Figure 2 : Classification des protozoaires. (11).....	25
Figure 3 : Classification des Rhizopodes. (11).....	26
Figure 4 : Arbre phylogénétique des Eucaryotes. (14).....	27
Figure 5 : Schéma d'une cellule eucaryote (22) :.....	29
Figure 6 : Schéma d'une amibe. (23).....	30
Figure 7 : Structure d'un trophozoïte de l'amibe <i>Thecamoeba sp.</i> montrant les 2 parties du cytoplasme. (27).....	32
Figure 8 : Schématisation du cytosquelette. (28).....	32
Figure 9 : Filaments d'actine retrouvés dans le cytosquelette. (25,28).....	33
Figure 10 : Vacuole contractile d' <i>Amoeba spp.</i> et d' <i>Hartmannella spp.</i> au microscope électronique à contraste de phase. (29).....	35
Figure 11 : Trophozoïte d' <i>Acanthamoeba spp.</i> montrant des filopodes pointus. (30).....	36
Figure 12 : Trophozoïtes d'amibes possédant des lobopodes de type polypodial (31,32) :...36	36
Figure 13 : Trophozoïte d'amibes possédant des lobopodes de type monopodial (31,33) : ..37	37
Figure 14 : Photo de la forme flagellée de <i>N. fowleri</i> par Karen Graham. (34).....	37
Figure 15 : Amibes à thèque (37,38):	38
Figure 16 : Schéma d'un trophozoïte d' <i>Amoeba proteus</i> . (40).....	39
Figure 17 : Photo représentant un trophozoïte d' <i>Amoeba proteus</i> . (41).....	39
Figure 18 : Photos de trophozoïtes d'amibes (42–45):.....	40
Figure 19 : Photos de kystes d'amibes (47–50) :.....	41
Figure 20 : Kyste d' <i>Acanthamoeba castellanii</i> au microscope électronique à transmission (flèche noire, en bas) ostiole avec opercule. (2).....	42
Figure 21 : Forme flagellée de <i>N. fowleri</i> , au microscope électronique. (51).....	42
Figure 22 : Flux du cytoplasme lors du mouvement amiboïde. (53).....	43
Figure 23 : Courant endoplasmique observé lors du mouvement amiboïde. (52).....	43
Figure 24 : Schéma du mouvement amiboïde (54) :	44
Figure 25 : Amibe absorbant des particules alimentaires. (58)	45
Figure 26 : Trophozoïte d' <i>Hartmannella vermiformis</i> au microscope électronique à transmission (2) :	46
Figure 27 : Observation des vacuoles digestives (59) :.....	46
Figure 28 : Etapes de l'exocytose (60) :	47

Figure 29 : Etapes de la phagocytose chez une amibe. (61)	48
Figure 30 : Trophozoïtes illustrant la présence de structures de surface appelées « food cups », au microscope électronique à balayage (64) :	48
Figure 31 : Etapes de la pinocytose. (65)	49
Figure 32 : Cycle de vie de <i>L. pneumophila</i> dans une amibe (67) :	50
Figure 33 : <i>Amoeba proteus</i> avec une vacuole contractile ; (CV) contractile vacuole. (51) ...	51
Figure 34 : Schéma illustrant l'excrétion chez l'amibe (d'après Griffin). (70)	51
Figure 35 : Fission binaire simple chez les amibes. (73).....	53
Figure 36 : Trophozoïte d' <i>Entamoeba histolytica</i> (forme <i>histolytica</i>), seule amibe parasite pathogène pour l'homme. (79).....	54
Figure 37 : Trophozoïtes d'amibes libres amphizoïques pathogènes pour l'homme (30,82–84) :	57
Figure 38 : Photos des trois formes morphologiques de <i>Naegleria fowleri</i> (86) :	58
Figure 39 : Représentation générée par ordinateur de <i>N. fowleri</i> aux stades trophozoïte, flagellé et kyste. (87)	59
Figure 40 : Forme végétative de <i>N. fowleri</i> . (89)	59
Figure 41 : Ultrastucture du trophozoïte de <i>N. fowleri</i> au microscope électronique (85) :	60
Figure 42 : Photos d'amoebostomes de <i>Naegleria fowleri</i> (85) :	61
Figure 43 : Morphologie externe des kystes de <i>Naegleria fowleri</i> d'après CIUREA-VAN SAANEN. (93)	62
Figure 44 : Ultrastucture d'un kyste de <i>N. fowleri</i> au microscope électronique ; (P) pore ou ostiole. (95)	63
Figure 45 : Forme flagellée de <i>N. fowleri</i> . (96)	63
Figure 46 : Schéma représentatif de la forme flagellée. (99).....	64
Figure 47 : Forme amoébo-flagellée de <i>N. fowleri</i> . (100,101)	65
Figure 48 : Cycle de vie de <i>N. fowleri</i> présentant les 3 formes de l'amibe et temps approximatifs nécessaires pour se transformer entre elles. (102)	65
Figure 49 : Concentration de <i>N. fowleri</i> dans la Vienne exprimée en Nf/L. (121)	72
Figure 50 : Multiplication de <i>L. pneumophila</i> en association avec <i>N. fowleri</i> et seule ou avec des cellules de <i>Naegleria</i> lysées. (125)	73
Figure 51 : Répartition mondiale des cas de MEAP. (46)	76
Figure 52 : Nombre de cas de MEAP entre 1961 et 2018 aux USA et dans le reste du monde. (46).....	76
Figure 53 : Profil d'âge des patients ayant développé une MEAP aux USA et au niveau du sous-continent indien. (46)	77
Figure 54 : Nombre de cas de MEAP en fonction de l'âge et du sexe. (46)	78
Figure 55 : Cycle de vie <i>N. fowleri</i> et mode de contamination. (90)	79

Figure 56 : Pathogénèse et cycle de vie <i>Naegleria fowleri</i> (135) :	79
Figure 57 : Schéma de l'infection à <i>N. fowleri</i> (91) :	81
Figure 58 : Illustration du trophozoïte de <i>N. fowleri</i> dans le LCR, entouré de polynucléaires neutrophiles. (140)	84
Figure 59 : Photo de trophozoïtes de <i>Naegleria fowleri</i> cultivés à partir du LCR d'un patient atteint de MEAP. Microscope à contraste de phase. Grossissement, x600. (138)	85
Figure 60 : Liquide céphalo-rachidien montrant un trophozoïte de <i>N. fowleri</i> (flèche), coloré avec Giemsa-Wright, parmi des polynucléaires neutrophiles et quelques lymphocytes, Grossissement x1000. (138).....	86
Figure 61 : Test de flagellation après 100 min d'incubation dans l'eau distillée (143) :	87
Figure 62 : Immunoblot montrant plusieurs bandes d'IgM dans le sérum de deux patients infectés par <i>Naegleria fowleri</i> mais ayant survécu, ainsi que celles de nageurs en bonne santé, en Californie et en Géorgie. (88).....	88
Figure 63 : Eléments permettant de diagnostiquer une infection à <i>N. fowleri</i> (136) :.....	90
Figure 64 : Effet in vitro de l'amphotéricine B contre <i>N. fowleri</i> (150) :	91
Figure 65 : Effet in vitro de la miltéfosine contre <i>N. fowleri</i> (150) :	92
Figure 66 : Survie des souris traitées par azithromycine, après inoculation avec 2×10^4 <i>N. fowleri</i> (149) :	94
Figure 67 : Typologie des baignades. (164).....	97
Figure 68 : Schéma de baignade en système fermé. (164)	99
Figure 69 : Schéma de baignade en système ouvert. (164).....	99
Figure 70 : Mise en place d'un dispositif de gestion du risque sanitaire en fonction de la typologie des baignades. (164).....	100
Figure 71: Différents test ELISA. (178)	106
Figure 72: Principe du test ELISA indirect. (179)	106
Figure 73 : Observation lors d'un test d'immunofluorescence classique de la présence de trophozoïtes de <i>N. fowleri</i> (181) :.....	107
Figure 74 : Observation au microscope épifluorescent de <i>N. fowleri</i> à la suite d'une coloration par immunofluorescence couplé à la cytométrie de flux solide avec les fluorochromes RPE-Cy5 (182) :	108
Figure 75 : Modèles isoenzymatiques de différentes souches de <i>Naegleria</i> pour plusieurs activités enzymatiques (184) :	109
Figure 76 : Amplification par test PCR de l'ADN in vitro. (186)	111
Figure 77 : Résultats de la PCR pour trois espèces de <i>Naegleria</i> thermophiles (187) :	112
Figure 78 : Principe de la qPCR. (190)	113
Figure 79 : Courbes d'amplifications obtenues lors d'un test qPCR à cible unique et multiplex pour la détection d' <i>Acanthamoeba</i> , <i>Balamuthia mandrillaris</i> et <i>N. fowleri</i> (193) :.....	114

Figure 80 : Dégradation par les protéases de <i>N. fowleri</i> , dans un milieu conditionné avec différentes protéines de liaison au fer (204) :.....	120
Figure 81 : Effets de la dégradation par les protéases de <i>N. fowleri</i> , dans un milieu conditionné avec de la ferritine, à 37°C et à différents pH (204) :	121
Figure 82 : Dégradation par les protéases de <i>N. fowleri</i> , dans un milieu conditionné avec de l'holo-lactoferrine à 37°C et à différents pH (a) et effets des inhibiteurs de protéase dans un milieu conditionné avec de l'holo-lactoferrine à pH 7 et à 37°C (b) (204) :.....	122
Figure 83 : Phagocytose de bactéries par <i>N. fowleri</i> . (63)	124
Figure 84 : Différents types de chlore. (218).....	127
Figure 85 : Acide hypochlorite neutre pénétrant les enveloppes des cellules des micro-organismes pathogènes par rapport à l'ion hypochlorite négativement chargé. (218).....	128
Figure 86 : Proportion d'acide hypochloreux et d'ions hypochlorites en fonction du pH. (218)	128
Figure 87 : Evolution de la concentration en acide hypochloreux en fonction du pH et de la température. (218).....	129
Figure 88 : Inactivation des kystes d'amibe par traitement au dioxyde de chlore (courbe avec ronds : <i>Acanthamoeba</i> , courbe avec triangles : <i>Hartmannella</i> et courbe avec carrés : <i>Naegleria</i>). (228)	133
Figure 89 : Principe de désinfection UV. (234)	136
Figure 90 : Risque de MEAP après baignade, en fonction de la concentration en <i>N. fowleri</i> dans l'eau. (240).....	138
Figure 91 : Panneau d'information à Dolé Gourbeyre en Guadeloupe mettant en garde sur la présence d'amibes, notamment <i>N. fowleri</i> . (245,246).....	140
Figure 92 : Panneau d'avertissement du danger de la présence de <i>N. fowleri</i> au lac Mead, Nevada, USA. (247)	140
Figure 93 : Panneau de mise en garde sur le risque de méningite amibienne et consignes à suivre, au lac Lanier, Géorgie, USA. (248)	140
Figure 94 : Répartition géographique des sites faisant l'objet d'une recherche de <i>N. fowleri</i> , en Guadeloupe. (244).....	141
Figure 95 : Panneaux d'information sur les amibes, réalisés par l'ARS de Guadeloupe. (243,246).....	142
Figure 96 : Logique de définition du profil de baignade. (250)	145
Figure 97 : Panneau d'avertissement du danger lié à la présence de <i>N. fowleri</i> , retrouvé à Rogers Spring, source d'eau chaude située près du Lac Mead, Nevada, USA. (254,255)..	146
Figure 98 : Panneaux de mise en garde de la présence de <i>N. fowleri</i> , en Guadeloupe (246,256–258) :.....	146

Table des tableaux

Tableau 1 : Classification des principaux genres d'amibes ; (violet) : espèces pathogènes pour l'homme. (15–20)	28
Tableau 2 : Caractéristiques nucléaires des amibes du genre <i>Acanthamoeba</i> . (26).....	31
Tableau 3 : Etude morphologique comparative des kystes d'amibes du genre <i>Naegleria</i> d'après CIUREA-VAN SAANEN. (93).....	62
Tableau 4 : Concentrations moyennes de <i>Naegleria fowleri</i> mesurées en amont et en aval de la CNPE de Civaux. (35)	71
Tableau 5 : Résultats des analyses de suivi de la concentration en <i>Legionella pneumophila</i> et en <i>Naegleria fowleri</i> calculés en aval du fleuve. (36)	71
Tableau 6 : État clinique lors de la présentation initiale à un établissement de santé pour les patients atteints de MEAP (N = 89). (138)	83
Tableau 7 : Séquençage ITS1 de différents génotypes de <i>N fowleri</i> . (146).....	89
Tableau 8 : Exemple de cas signalés de MEAP entre 2013 et 2017 avec leurs stratégies de traitement et leurs résultats. (152)	92
Tableau 9 : Survie et temps moyen avant la mort (MTD) de souris infectées par <i>N. fowleri</i> puis traitées avec divers médicaments. (150).....	95
Tableau 10 : Textes réglementaires des différents types de baignade. (166,167,169,170).102	
Tableau 11 : Milieu spécifique SCGYEM pour la culture de <i>N. fowleri</i> . (175).....	104
Tableau 12 : Liste des espèces de <i>Naegleria</i> utilisées pour réaliser l'isoélectrofocalisation précédente. (184).....	110
Tableau 13 : Identification des différentes espèces de <i>Naegleria</i> en fonction de leur séquençage. (Tableau personnel)	111
Tableau 14 : Seuils de résistance des trophozoïtes et des kystes en fonction de la température extérieure.	115
Tableau 15 : Résistance des souches de <i>N. fowleri</i> après séchage de 26°C et humidité relative 22%. (197)	118
Tableau 16 : Capacité amibicide du chlore. (224).....	130
Tableau 17 : Destruction des kystes d'amibe en fonction de la teneur en chlore et du temps de contact. (110)	131
Tableau 18 : Capacité amibicide du dioxyde de chlore. (224).....	132
Tableau 19: Efficacité de l'acide peracétique sur les trophozoïtes de <i>N. fowleri</i> et <i>A. polyphaga</i> . (226)	134
Tableau 20 : Efficacité de l'acide peracétique sur les kystes de <i>N. fowleri</i> et <i>A. polyphaga</i> . (226).....	134
Tableau 21 : Dose d'ultraviolet nécessaire pour inactiver 99% des trophozoïtes et kystes de <i>N. fowleri</i> . (238).....	136

Tableau 22 : Résultats de la campagne de l'ANSES 2018, sur plusieurs sites de baignade en eaux douces chaudes de Guadeloupe, pour la recherche des amibes thermophiles. (243)142

Liste des abréviations :

A. castellani : *Acanthamoebida castellani*

A.culbertsoni : *Acanthamoebida culbertsoni*

A. hatchetti : *Acanthamoebida hatchetti*

Ac : Anticorps

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AFNOR : Association Française de NORmalisation

AFSSET : Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail

ANSES : Agence Nationale de la Sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'Environnement et du travail

AP : Phosphatase Acide

ARB : Amoeba Resistant Bacteria

ARN : Acide RiboNucléique

ARNm : Acide RiboNucléique messenger

ARNr : Acide RiboNucléique ribosomique

ARNt : Acide RiboNucléique de transfert

ARS : Agence Régionale de Santé

B. mandrillaris : *Balamuthia mandrillaris*

BC : Brain Cortex

CAC : Combined Available Chlorine

CDC : Centre for Disease Control

CMI : Concentration Minimale d'Inhibition

CNPE : Centrale Nucléaire de Production Electrique

CP : Cribriform Plate

CSF : Found in Cerebrospinal Fluid

CSHPF : Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France

CSP : Code de la Santé Publique

CT : Temps de Contact

CV : Contractile Vacuole

E. coli : *Entamoeba coli*

E. dispar : *Entamoeba dispar*

E. histolytica : *Entamoeba histolytica*

EAG : Encéphalite Amibienne Granulomateuse

ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FMI : Fréquentation Maximale Instantanée
FMJ : Fréquentation Maximale Journalière
G6PD : Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase
GPI : Glucose Phosphate Isomérase
H. agrícola : *Hartmannella agrícola*
H. hibernica : *Hartmannella hibernica*
H. hyalina : *Hartmannella hyalina*
IEF : Isoenzyme Electrophoresis Focusing
IgM : Immunoglobuline M
ISC : Sous Continent Indien
ITS : Internal Transcribed Spacer
KA : Kératite Amibienne
Kb : Kilobases
L. pneumophila : *Legionella pneumophila*
LAP : Leucine Amino Peptidase
LCR : Liquide Céphalo-Rachidien
LCV : Légionella-Containing Vacuole
LDH : Lactate DésHydrogénase
MAC : Membrane Attack Complex
Mb : Millions bases
MEAP : Méningo-Encéphalite Amibienne Primitive
MET : Microscopie Electronique à Transmission
MTD : Mean Time to Death
N. australiensis : *Naegleria australiensis*
N.f. : *Naegleria fowleri*
N. fowleri : *Naegleria fowleri*
N. gruberi : *Naegleria gruberi*
N. lovaniensis : *Naegleria lovaniensis*
NI : Nucléole
NNA : Agar Non Nutritive
NPP : Nombre le Plus Probable
NTU : Nephelometric Turbidity Unit
OB : Olfactory Bulb

Pb : Paires de bases
PCR : Polymerase Chain Reaction
PE : Propionyl Estérase
PI3K : Phosphatidylinositol 3-Kinase
PK : Protéine Kinase
Ps : Pseudopode
qPCR : quantitative Polymerase Chain Reaction
Rb : Ribosome
RER : Réticulum Endoplasmique Rugueux
RPE-Cy5 : R-PhycoErythrine et Cyanine
S. diploidea : *Sappinia diploidea*
S. pedata : *Sappinia pedata*
S. platani : *Sappinia platani*
SCGYEM : Calf Serum-Casein-Glucose-Yeast Extract Médium
SNC : Système Nerveux Central
TAC : Total Available Chlorine
UFC : Unité Formant Colonie
USA : United States of America
UT : Unité Territoriale
UV : Ultra-Violet
VD : Vacuole Digestive
V. vermiformis : *Vermamoeba vermiformis*

Introduction

Les amibes sont des protozoaires eucaryotes unicellulaires, de 10 à 800 μm , caractérisées par un corps déformable émettant des pseudopodes, qui leur permettent de se déplacer ou de se nourrir par phagocytose.

Retrouvées de manière ubiquitaire dans la nature, on distingue tout d'abord les amibes parasites qui survivent dans l'environnement mais se développent dans la muqueuse intestinale d'un organisme hôte. On retrouve ensuite les amibes libres ou telluriques capables de mener une vie autonome dans un milieu naturel humide. Cependant, certaines d'entre elles, appelées amibes amphizoïques, peuvent être responsables de pathologies humaines rares mais graves, aux conséquences parfois fatales. A ce jour, parmi la multitude d'espèce d'amibes libres existantes, seules quelques espèces sont responsables de pathologies humaines : *Naegleria fowleri* responsable de la méningo-encéphalite amibienne primitive, les *Acanthamoeba* responsables de kératites amibiennes et d'amibiases cutanées, *Balamuthia mandrillaris* et les *Acanthamoeba* à l'origine d'encéphalites amibiennes granulomateuses ainsi que *Sappinia pedata* dont un seul cas d'encéphalite a été rapporté chez l'homme.

Dans cette étude, nous nous intéresserons plus particulièrement à *Naegleria fowleri*, espèce hautement pathogène pour l'homme dont la pathogénie a été rapportée pour la première fois en Australie-Méridionale par Malcolm Fowler en 1965. Surnommée amibe mangeuse de cerveau, cette espèce est responsable d'une encéphalite généralement mortelle, la méningo-encéphalite amibienne primitive, dont plusieurs cas ont été rapportés ces dernières années. Le micro-organisme appartient au super-groupe monophylétique des *Excavata* et prolifère dans les eaux douces dont la température dépasse 25°C mais également dans les eaux de refroidissement industrielles, ce qui pose de nos jours un réel problème de santé publique. La contamination de l'homme se fait souvent lors de bain en eaux douces, tièdes et stagnantes, réservoir naturel de ces amibes libres mais également lors de baignades en piscines insuffisamment désinfectées. Cette amibe libre flagellée est pathogène par inhalation, jamais par ingestion : les fosses nasales étant la porte d'entrée. Le parasite pénètre alors dans l'encéphale, en traversant l'épithélium olfactif, provoquant une réaction inflammatoire, des dommages tissulaires étendus et une nécrose hémorragique du tissu nerveux. L'infection est de pronostic catastrophique en quelques jours seulement.

Quelle est l'ampleur du risque sanitaire relatif aux baignades dans des milieux contaminés par *N. fowleri* et quelles mesures peut-on prendre pour limiter ce risque?

Dans un premier temps, nous nous attacherons à décrire les amibes en général, avant de nous intéresser plus particulièrement, dans la seconde partie, à *N. fowleri*, l'amibe mangeuse de cerveau. Pour finir, nous analyserons, les différents lieux de contamination, les méthodes de détection et de désinfection afin de mettre en place des mesures efficaces de prévention de l'infection.

I. Les amibes

I.1. Généralités sur les amibes

I.1.1. Définition

Les amibes, du grec amoibê signifiant « perturbation, transformation », sont des micro-organismes eucaryotes unicellulaires hétérotrophes, se déplaçant par projections cytoplasmiques. Inclues dans le règne des protistes, les amibes ont été décrites pour la première fois par August Johann Rösel von Rosenhof, en 1755. De taille comprise entre 10 et 800 μm (*Amoeba proteus*), généralement aérobies et non photosynthétiques, les amibes se multiplient principalement de façon asexuée, par fission binaire. On distingue les amibes parasites qui ont besoin d'un hôte pour se développer et les amibes libres qui peuvent mener une vie autonome dans la nature. Elles peuvent être nues ou posséder une coquille siliceuse appelée thèque, pour se protéger. Très répandues dans les différents compartiments de l'environnement et sur toute la planète, ces micro-organismes sont retrouvés en milieu humide, riches en matières organiques, dans les sols, les milieux aquatiques naturels et artificiels ainsi que dans l'air. (1–4)

I.1.2. Historique

Les amibes ont été découvertes au XVIIIe siècle, dès l'arrivée des premiers microscopes. August Johann Rösel von Rosenhof, autrichien, peintre, naturaliste et entomologiste, a été le premier à décrire et représenter une amibe (figure1). En 1755, il a observé le mouvement du protoplasme et la formation des pseudopodes. En référence à Protée, divinité marine grecque qui avait la faculté de changer de forme, il baptisa sa découverte le « petit *Proteus* » (« *Der Kleine Proteus* »). C'est en 1822, en référence au grec amoibê signifiant changement, que le terme « amibe » a été créé par le naturaliste et géographe français, Jean Baptiste Bory de Saint-Vincent. En 1841, Félix Dujardin a défini les amibes « *Limax* » et a été le premier à soumettre une classification de ces micro-organismes unicellulaires. (5)

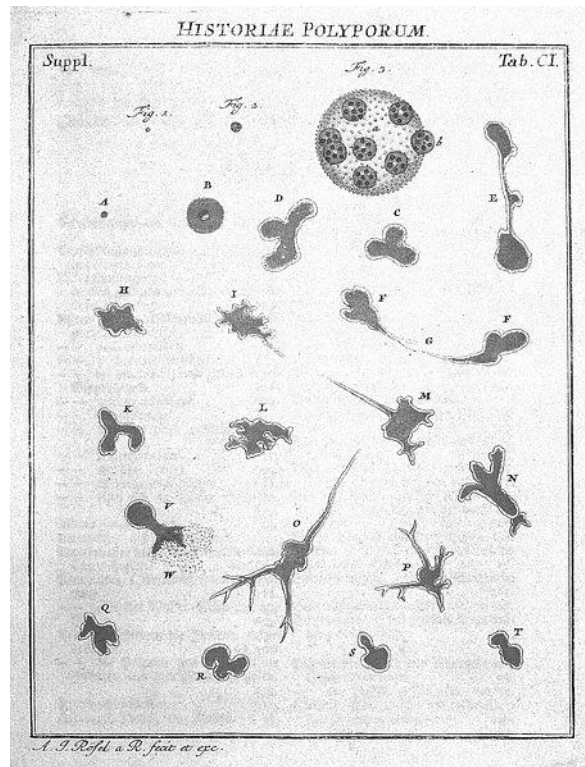


Figure 1 : Premières illustrations du « petit *Proteus* » par August Johann Rösel von Rosenhof en 1755. (6)

Dès 1875, l'existence d'amibes parasites est évoquée par Fyodor Lösch, médecin russe, suite à la découverte de trophozoïte dans les selles d'un malade atteint de dysenterie. La dénomination d'*Entamoeba histolytica* a été donnée en 1903 par Fritz Schaudinn, zoologiste allemand. Mais, c'est seulement en 1928 que le cycle de cette amibe a définitivement été décrit par Dobell. La première description d'une amibe libre a été faite en 1899 par Schardinger qui a isolé et identifié une espèce capable de se différencier en une forme flagellée, il l'a alors nommé *Amoeba gruberi*. De 1905 à 1931, plusieurs auteurs ont proposé la création de nouveaux genres. En 1910, Hartmann a décrit *Entamoeba histolytica*, en 1912 Alexeïff a proposé la création du genre *Naegleria* et a suggéré celle du genre *Hartmannella*. En 1930, Castellani et Volkonsky ont décrit le genre *Acanthamoeba*. (4,7)

Il faudra attendre le XXe siècle pour que soit clairement identifiées les amibes libres et que soit démontrée leur pathogénicité. En 1965, Fowler a suspecté le premier cas humain de méningo-encéphalite mortelle causée par une amibe. Cette même année, Fowler et Carter ont décrit quatre cas de méningites amibiennes survenues chez des personnes australiennes jeunes, ayant nagé dans des eaux douces. En 1966, Butt a décrit la maladie qu'il a nommé méningo-encéphalite amibienne primitive (MEAP) et en 1968 il a isolé l'espèce responsable qu'il a alors dénommé *Naegleria fowleri*. En 1975, la pathogénicité des *Acanthamoeba spp.* a été découverte et il a alors été établi que ces dernières étaient responsables de l'encéphalite granulomateuse amibienne mais aussi de la kératite amibienne. Le pouvoir pathogène de *Balamuthia mandrillaris*, a été découvert en 1986, date à laquelle il a été établi que c'était la seule espèce du genre responsable d'encéphalite amibienne granulomateuse. En 1998, un cas d'encéphalite amibienne a été signalé et rapporté à *Sappinia pedata*. Il est à préciser que *Hartmannella vermiformis* a été reclassée

en 2011 dans un nouveau genre dénommé *Vermamoeba* dont *vermiformis* est la seule espèce du genre. (8–10)

I.1.3. Classification

La classification des amibes a beaucoup évolué au cours du temps. Les premières classifications reposaient essentiellement sur des critères morphologiques. En effet, toutes les amibes à pseudopodes étaient placées dans le règne des *Protista*, sous-règne des *Protozoa*, phylum des *Sarcomastigophora*, sous phylum des *Sarcodina*, classe des *Rhizopodea* (figure 2).

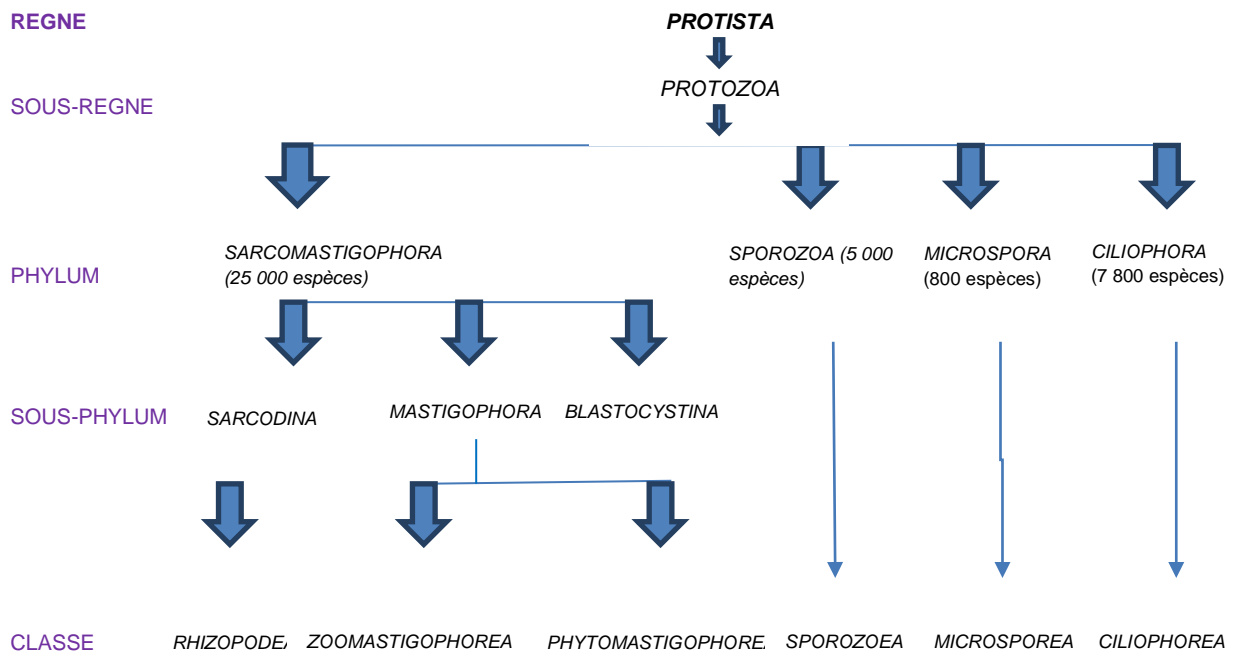


Figure 2 : Classification des protozoaires. (11)

Les amibes étaient ensuite divisées en 3 familles, la famille des *Entamoebidae* comprenant les genres *Entamoeba*, *Endolimax* et *Pseudolimax*, la famille des *Acanthamoebidae* comprenant le genre *Acanthamoeba* et la famille des *Vahlkampfiidae* avec les genres *Balamuthia* et *Naegleria* (figure 3).

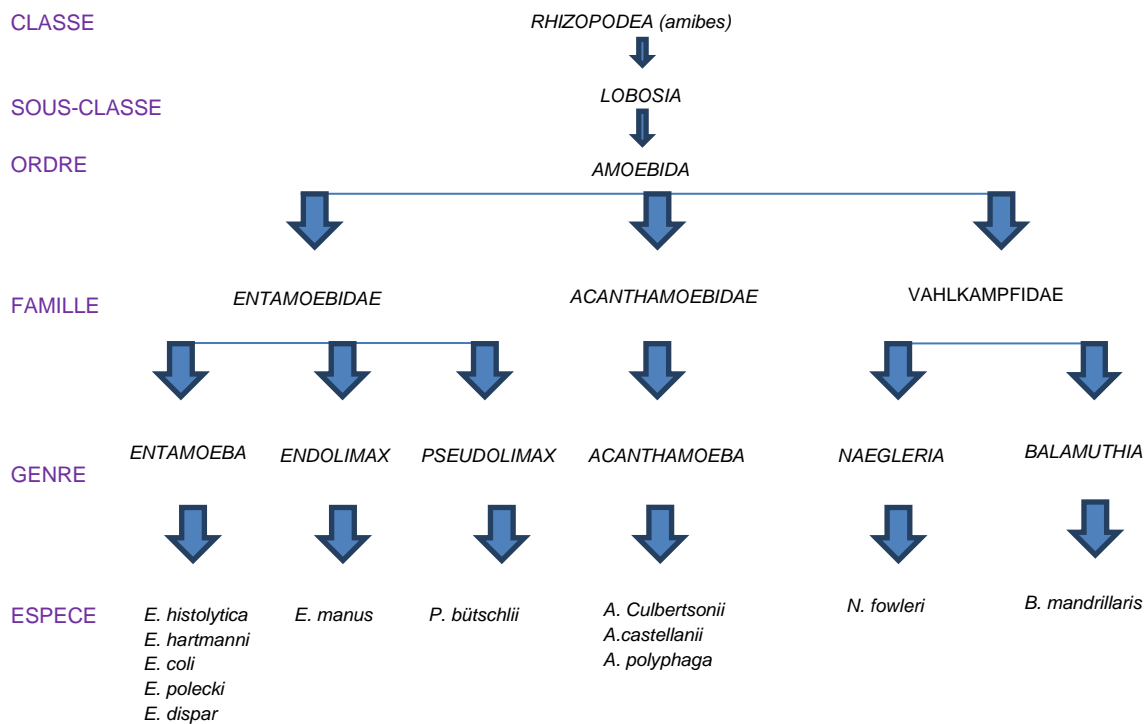


Figure 3 : Classification des Rhizopodes. (11)

L'utilisation conjointe des critères morphologiques, biochimiques, ultra structuraux ainsi que le développement des techniques de biologie moléculaire ont permis d'établir plusieurs classifications. (12)

Les eucaryotes sont tout d'abord divisés en deux clades : le clade Unikonte regroupant les cellules eucaryotes qui possèdent un flagelle postérieur propulsif et le clade Bikonte regroupant les cellules eucaryotes qui possèdent initialement 2 flagelles antérieurs les tirant vers l'avant. Ensuite, les eucaryotes sont répartis en 6 super-groupes monophylétiques (voir arbre phylogénétique des eucaryotes ci-dessous). Il est à noter que la majorité des amibes d'eau douce sont retrouvées dans les super-règnes des *Amoebozoa* et *Excavata*, et très peu au sein des autres super-règnes. (12,13)

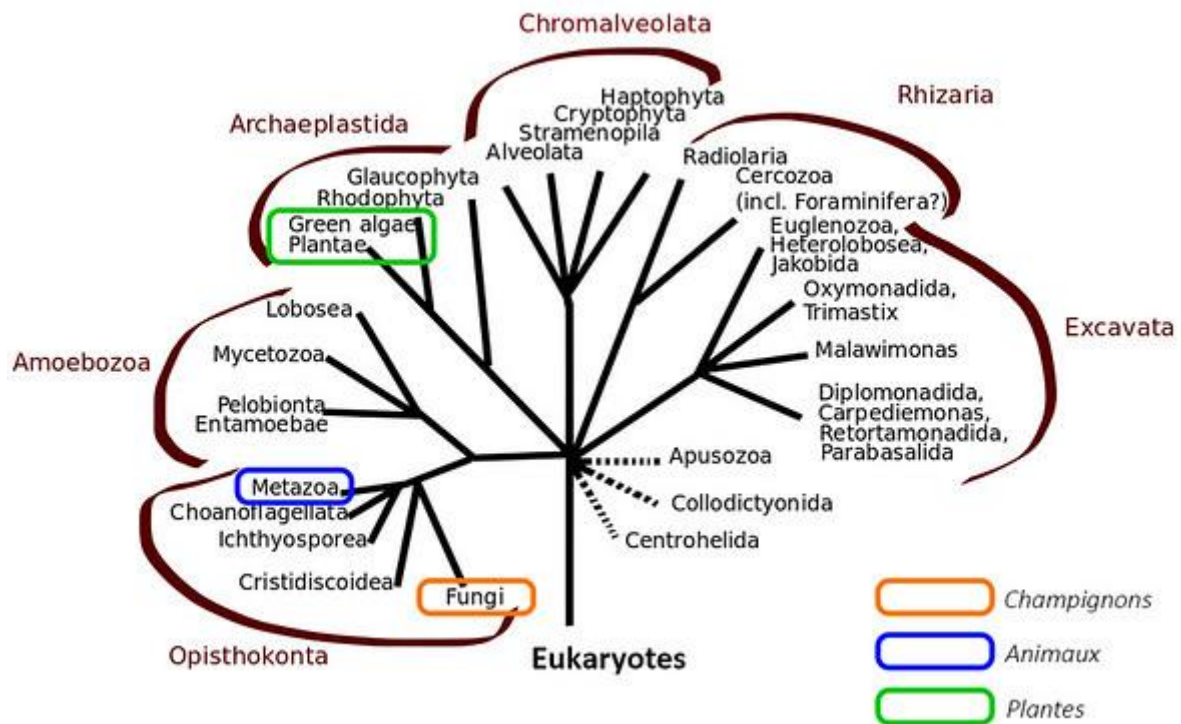


Figure 4 : Arbre phylogénétique des Eucaryotes. (14)

Les principales amibes peuvent être classées entre différents taxons (ci-dessous) et les principaux genres peuvent se répartir comme indiqué dans le tableau 1.

Répartition des principales amibes entre les différents taxons :

- Parmi le clade des *Unikonta* on trouve :
 - Les *Opisthokonta*
 - Les *Amoebozoa* comprenant :
 - Les *Lobosea* avec *Entamoeba*
 - Les *Tubulinea* avec *Hartmannella* et *Vermamoeba*
 - Les *Discosea* avec *Acanthamoeba*, *Balamuthia* et *Sappinia*
- Parmi le clade des *Bikonta* on trouve :
 - Les *Archaeplastida*
 - Les *Chromalveolata*
 - Les *Rhizaria*
 - Les *Excavata* comprenant :
 - Les *Heterolobosea* avec *Naegleria*

Tableau 1 : Classification des principaux genres d'amibes ; (violet) : espèces pathogènes pour l'homme. (15–20)

Eucaryota	Unikonta	Amoebozoa	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Lobosea</i> - - <i>Amoebida</i> - - - <i>Entamoebidae</i> - - - - <i>Entamoeba</i> - - - - - <i>E. coli</i>, <i>E. dispar</i>, <i>E. histolytica</i>...
			<ul style="list-style-type: none"> - <i>Tubulinea</i> - - <i>Euamoebida</i> - - - <i>Hartmannellidae</i> - - - - <i>Hartmannella</i> - - - - - <i>H. agricola</i>, <i>H. hibernica</i>, <i>H. hyalina</i>... - - <i>Arcellinida</i> - - - <i>Echinamoebida</i> - - - - <i>Echinamoebidae</i> - - - - - <i>Vermamoeba</i> - - - - - <i>V. vermiformis</i>
<ul style="list-style-type: none"> - <i>Discosea</i> - - <i>Longamoebida</i> - - - <i>Centramoebida</i> - - - - <i>Acanthamoebidae</i> - - - - - <i>Acanthamoebida</i> - - - - - <i>A. castellani</i>, <i>A. culbertsoni</i>, <i>A. hatchetti</i>... - - - - <i>Balamuthiidae</i> - - - - - <i>Balamuthia</i> - - - - - <i>B. mandrillaris</i> - - <i>Flabellinea</i> - - - <i>Thecamoebidae</i> - - - - <i>Stenamoebidae</i> - - - - - <i>Sappinia</i> - - - - - <i>S. diploidea</i>, <i>S. pedata</i>, <i>S. platani</i> 			
	Bikonta	Excavata	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Discoba</i> - - <i>Heterolobosea</i> = <i>Percolozoa</i> - - - <i>Heterolobosidea</i> - - - - <i>Vahlkampfiidae</i> - - - - - <i>Naegleria</i> - - - - - <i>N. fowleri</i>, <i>N. gruberi</i>, <i>N. lovaniensis</i>...

I.1.4. Structure

La cellule eucaryote est formée d'une membrane plasmique et d'un noyau entouré d'une double membrane. Le cytoplasme contient des organites tels que les mitochondries, le réticulum endoplasmique, les ribosomes, l'appareil de golgi, les lysosomes, des vacuoles et enfin le cytosquelette constitué de microtubules et microfilaments (figures 5 et 6). (21)

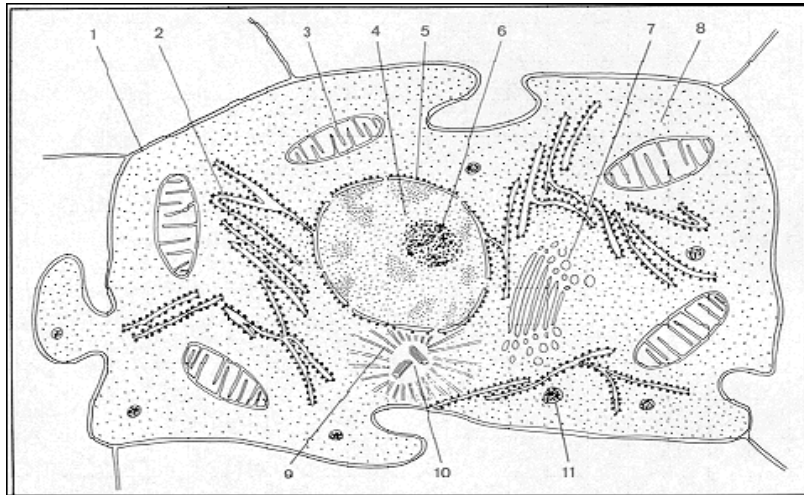


Figure 5 : Schéma d'une cellule eucaryote (22) :

- 1) membrane cytoplasmique, 2) réticulum endoplasmique et ribosomes, 3) mitochondrie, 4) nucléoplasme, 5) membrane nucléaire, 6) nucléole, 7) appareil de Golgi, 8) cytoplasme, 9) aster, 10) centrosomes, 11) lysosome.

La présence, la forme, la taille, le nombre et la disposition de ces différents éléments permettent de différencier les différentes espèces d'amibes.

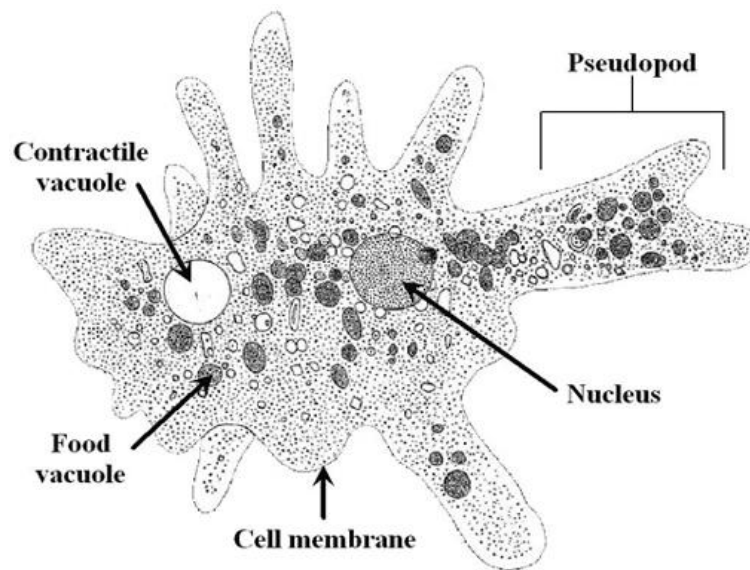


Figure 6 : Schéma d'une amibe. (23)

I.1.4.1. Le système cytomembranaire

Il s'agit de la membrane plasmique et de ces invaginations endocytaires. Ces dernières vont former un réseau de membranes internes et la diviser ainsi en plusieurs compartiments ayant des spécificités différentes. Les organites délimités par une membrane sont le noyau, les mitochondries, le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, les lysosomes, les vésicules et les vacuoles.

Ce système cytomembranaire se compose d'une bicouche de phosphoglycérolipides ainsi que d'autres lipides associés à différentes protéines. La membrane plasmique permet d'isoler le milieu interne du milieu extracellulaire. Elle permet également le transport passif des molécules par les mécanismes d'osmose, et le transport actif des ions grâce au système de pompes. Elle peut donner naissance à des vacuoles alimentaires par phagocytose, des vésicules par pinocytose et permet l'élimination des déchets cellulaires par exocytose (mécanisme présenté plus loin dans le texte). (22,24)







I.1.4.2. Le noyau

Le noyau, le plus souvent unique, est entouré d'une double membrane, en continuité avec le réticulum endoplasmique. Il peut être rond ou ovale et occuper une position variable selon les espèces. Le nucléoplasme contient un ou plusieurs nucléoles appelés caryosomes et des granulations de chromatines correspondant à l'enchevêtrement de l'ADN avec des protéines, généralement en périphérie. La disposition et la morphologie de ces éléments, permettent de distinguer les espèces (voir tableau 2). Ainsi, le trophozoïte d'*Entamoeba histolytica* possède

un noyau avec une chromatine périphérique et un très petit nucléole, celui d'*Endolimax nana* possède un noyau sans chromatine périphérique mais avec un gros nucléole irrégulier, celui de *Dientamoeba fragilis* possède deux noyaux ayant un nucléole central formé de granules, et celui de *Naegleria fowleri* comporte un noyau avec un nucléole très volumineux entouré d'un halo clair. (25)

Le noyau renferme le patrimoine génétique et permet donc la reproduction des cellules (mécanisme développé ultérieurement). (11,24)

Tableau 2 : Caractéristiques nucléaires des amibes du genre *Acanthamoeba*. (26)

Caractéristiques nucléaires					
					
Chromatine disposée en couronne et en amas	Caryosome central Granule de chromatine présent au cours de la division	Caryosome excentré	Présence d'un seul et volumineux caryosome	Présence d'un seul caryosome avec éléments ressemblant à des vésicules	2 noyaux sans couronne et amas de chromatine périphérique Pas de caryosome individualisé
Genre <i>Entamoeba</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Entamoeba coli</i>	<i>Endolimax nana</i>	<i>Pseudolimax butschili</i>	<i>Dientamoeba fragilis</i>

I.1.4.3. Le cytosol

Le cytoplasme est l'ensemble formé par le cytosol et ses organites. Le cytosol est donc la partie dans laquelle baignent les organites cellulaires. De consistance semi-liquide, il présente le plus souvent deux parties. En effet, on retrouve d'une part l'endoplasme, partie d'aspect granuleux, riche en organites et inclusions et d'autre part, l'ectoplasme, partie hyaline sans organite. Composé essentiellement d'eau, en moyenne 85%, le cytosol renferme tout d'abord des substances solubles dans l'eau comme les protéines enzymatiques, ARNr, ARNm et ARNt, acides aminés, ions et sucres. Il contient également des substances insolubles dans l'eau tels que les protéines de structures et globules lipidiques. Il occupe toute la surface, entre la membrane plasmique et le noyau et il peut changer de viscosité. (24,25)

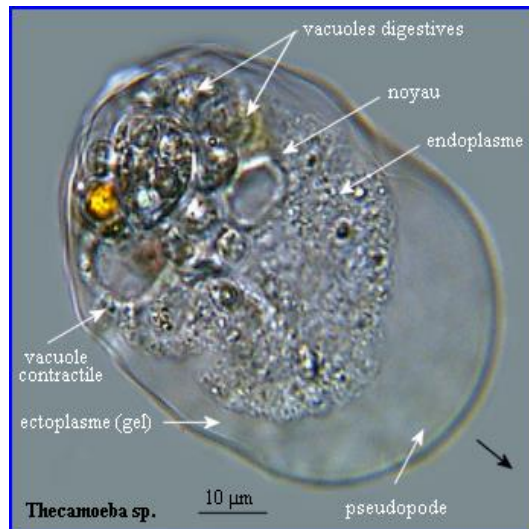


Figure 7 : Structure d'un trophozoïte de l'amibe *Thecamoeba sp.* montrant les 2 parties du cytoplasme. (27)

I.1.4.4. Le cytosquelette

Il correspond au réseau de fibres parcourant le cytoplasme. Il est formé de microtubules, de filaments intermédiaires et des microfilaments appelés filaments d'actine (figure 8).

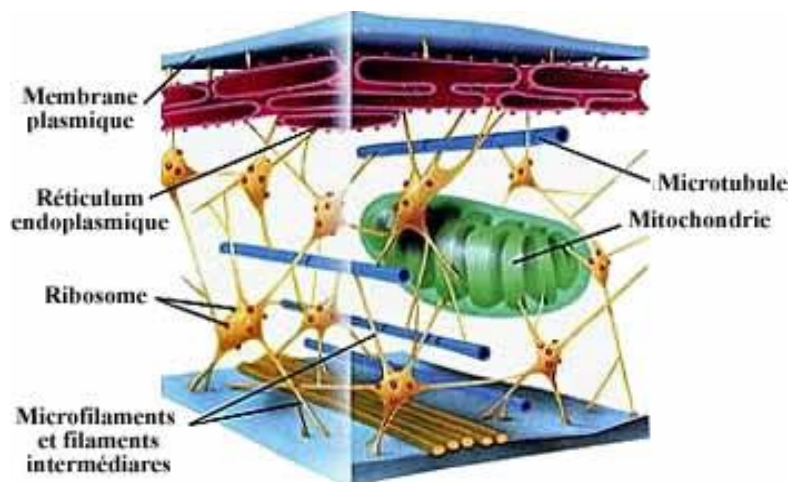


Figure 8 : Schématisation du cytosquelette. (28)

Constituée de 375 acides aminés, l'actine est une protéine que l'on retrouve dans la cellule sous deux formes : l'actine G (globulaire et monomérique), et l'actine F (filamenteuse et polymérique) résultant de la polymérisation de l'actine G. La polymérisation de l'actine G en micro filaments d'actine F, s'effectue selon un processus réversible, l'actine F se

dépolymérisant quand la force ionique de la solution s'abaisse. Dans la cellule, il existe un équilibre dynamique entre ces deux formes. (25,28)

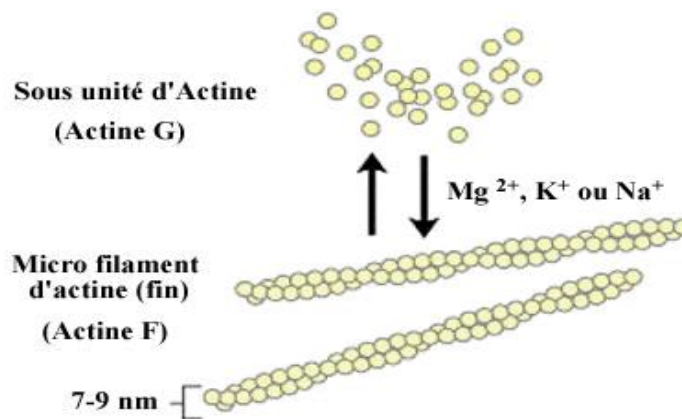


Figure 9 : Filaments d'actine retrouvés dans le cytosquelette. (25,28)

Le cytosquelette assure la mobilité de la cellule, des organites intracellulaires, permet à la cellule de changer de forme et de se nourrir (mécanismes étudiés plus loin). (24)

I.1.4.5. Les organites intra-cytoplasmiques

Les mitochondries sont des petits organites allongés, entourés d'une membrane double, présentant de nombreuses crêtes et une matrice. Dans le cytosol, elles peuvent être soit dispersées, soit rassemblées en masse unique ou regroupées autour du noyau.

Elles sont le site des réactions énergétiques de la cellule. En effet, grâce aux enzymes présentes dans la matrice, notamment les déshydrogénases, elles vont brûler les substances ingérées par la cellule afin de produire de l'énergie. (11,24)

Le réticulum endoplasmique est un réseau de membranes lié à la membrane nucléaire et réparti dans tout le cytoplasme. Il peut être rugueux, lorsque certaines parties sont recouvertes de grains appelés ribosomes, ou lisse s'il ne possède aucun ribosome à sa surface.

Le réticulum endoplasmique rugueux, avec l'intervention des ribosomes, participe à la production de deux types de protéines. D'une part, il joue un rôle dans la synthèse des protéines de sécrétion qui vont se diriger vers l'appareil de Golgi grâce aux vésicules de transition. Et, d'autre part, il produit des protéines qui assemblées à des phosphoglycérolipides vont constituer les membranes des différents organites de la cellule. Le transfert s'effectue alors grâce aux vésicules de transition.

Le réticulum endoplasmique lisse intervient dans la synthèse des lipides mais aussi dans le métabolisme glucidique. (22,24)

Les ribosomes sont des organites composés d'ARN (ARNr) et de protéines.

Les ribosomes libres réalisent la synthèse des protéines cytoplasmiques alors que les ribosomes liés aux membranes du réticulum endoplasmique servent de support à la synthèse de protéines spécifiques telles que les protéines membranaires et les protéines de sécrétion. (22)

L'appareil de Golgi est constitué de plusieurs saccules empilées appelés dictyosomes.

Il s'agit d'un lieu de réservoir, de transit et de maturation finale des protéines fabriquées dans le réticulum endoplasmique. Ces protéines seront ensuite renvoyées vers d'autres organites ou le milieu extracellulaire et ceci grâce aux vésicules de sécrétion. (11,24)

Les lysosomes sont des sacs sphériques contenant de nombreuses enzymes lytiques telles que les phospholipases, protéases, glycases, peroxydases, phosphatases acides et hydrolases. Ils participent à la digestion des particules ingérés dans le phagosome lors de la phagocytose (mécanisme présenté plus loin). (24)

Les vacuoles sont des sacs intracellulaires entourés d'un fragment de membrane plasmique. On retrouve :

- Les vacuoles alimentaires ou phagosomes, élaborés lors de la phagocytose.
- Les vacuoles contractiles ayant un rôle osmo-régulateur. En effet, grâce à un système de diastole au cours de laquelle s'effectue le remplissage et de systole au moment de l'expulsion de leur contenu, ces vacuoles vont collecter un excédent d'eau afin de l'éliminer, à l'extérieur de la cellule. (7,11,24)

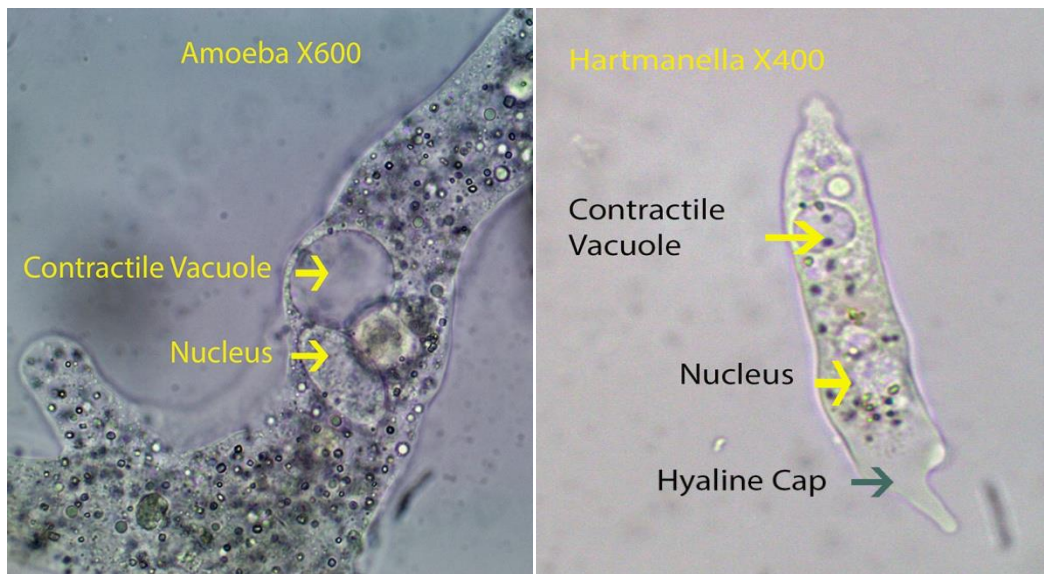


Figure 10 : Vacuole contractile d'*Amoeba spp.* et d'*Hartmannella spp.* au microscope électronique à contraste de phase. (29)

I.1.4.6. Organites moteurs

Les pseudopodes sont des prolongements transitoires provoqués par les déformations de la membrane plasmique.

Il existe deux types de pseudopodes. Tout d'abord, on trouve, les pseudopodes appelés filopodes qui peuvent être minces, parfois pointus ou parfois en forme de doigt de gant et composés d'ectoplasme comme par exemple le genre *Acanthamoeba* (figure 11). D'autre part, on rencontre les pseudopodes appelés lobopodes qui au contraire sont gros, arrondis, à base large, formés d'endoplasme et d'ectoplasme. Ces lobopodes peuvent être de type polypodial (voir figure 12), comme *Amoeba proteus*, ou le genre *Mayorella*, se formant à partir d'un point quelconque de la membrane ou de type monopodial (voir figure 13), comme pour *Entamoeba histolytica* ou *N. fowleri*, se formant à la partie antérieure de l'amibe et pouvant ou non s'étaler latéralement ou avoir un aspect frangé. (11)

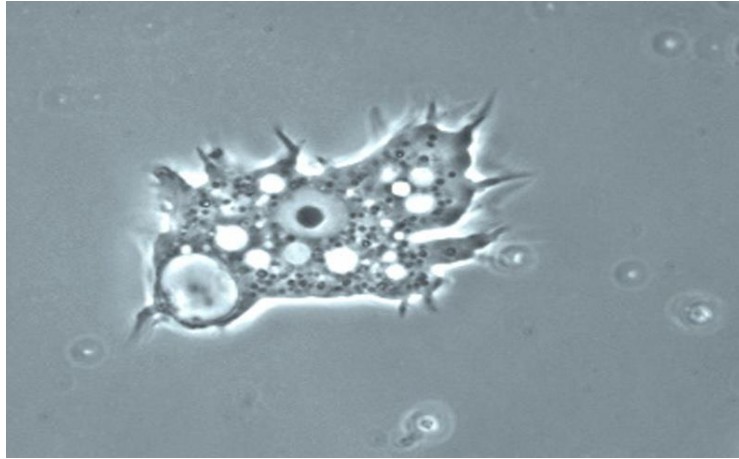


Figure 11 : Trophozoïte d'*Acanthamoeba spp.* montrant des filopodes pointus. (30)

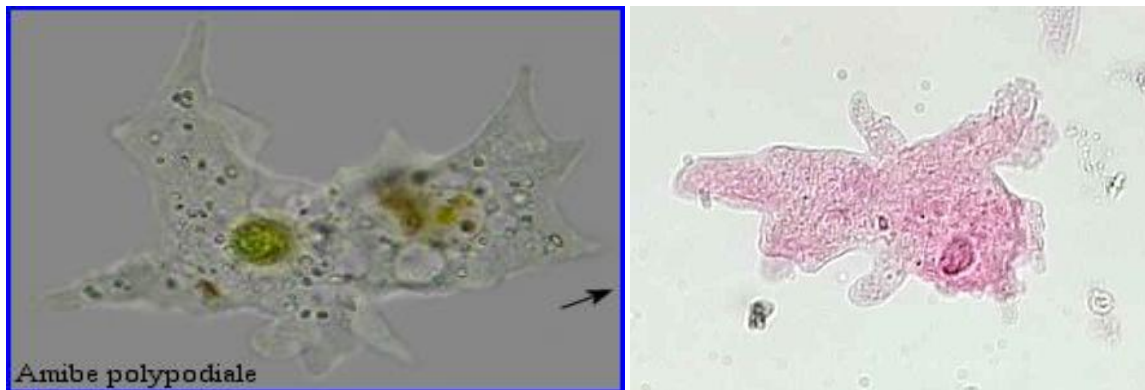


Figure 12 : Trophozoïtes d'amibes possédant des lobopodes de type polypodial (31,32) :
A gauche trophozoïte de *Mayorella spp.*, à droite d'*Amoeba proteus*.



Figure 13 : Trophozoïte d'amibes possédant des lobopodes de type monopodial (31,33) : (en haut, à gauche) trophozoïtes d'amibes non définies, (en haut, à droite) trophozoïte d'*Entamoeba histolytica*, (en bas) trophozoïte de *Naegleria fowleri*.

Ils permettent le déplacement de la cellule et la phagocytose (mécanismes étudiés ultérieurement). (24)

Le flagelle est un prolongement du cytoplasme qui ressemble à un filament fin, long, se développant de manière polaire (figure 14). Ils sont élaborés autour de l'axonème, complexe central cylindrique constitué d'une paire centrale de microtubules et de neuf autres en doublet espacés autour de lui : on parle de structure en « 9 + 2 ». Leur activation provoque une déformation produisant une onde dans le flagelle. (10,24)

Il permet la locomotion de la forme flagellée des amibes libres du genre *Naegleria*.

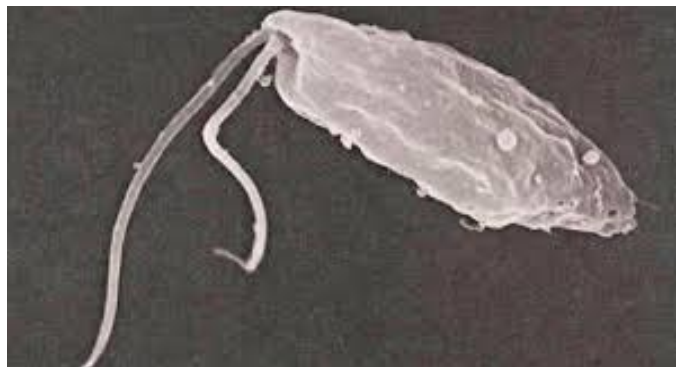


Figure 14 : Photo de la forme flagellée de *N. fowleri* par Karen Graham. (34)

I.1.4.7. La thèque

Certaines amibes sécrètent une coquille externe ou test appelée thèque, percée d'un orifice appelé pseudostome par lequel sortent les pseudopodes. Cette carapace est constituée d'écaillés imprégnées de silice. Ce sont les thécamoebiens ou amibes testacées qui regroupent les amibes ayant une thèque. Les amibes ne possédant pas de thèque sont dites amibes nues. (35,36)



Figure 15 : Amibes à thèque (37,38):

(à droite) : *Arcella spp.* possédant une forme discoïdale aplatie, ayant une ultrastucture classique entourée d'une coquille et de petits pseudopodes; (à gauche) : *Centropyxis spp.* ayant une thèque hérissée d'épines et ayant des pseudopodes digitiformes s'allongeant en longs filaments.

I.1.5. Morphologie

En général, les amibes ont un cycle de vie comportant la forme trophozoïte et la forme kyste. Cependant, certaines amibes comme *Naegleria* possèdent une troisième forme appelée forme flagellée.

I.1.5.1. Le trophozoïte

Il s'agit de la forme végétative permettant à l'amibe de se mouvoir, se reproduire et se nourrir. La taille des trophozoïtes varie de 10 à 800 μm en fonction des espèces. Cette forme possède une structure proche de celle des eucaryotes (voir figures 16 à 18). Généralement on trouve, un noyau avec un ou plusieurs nucléoles, parfois deux noyaux accolés, un appareil de Golgi, un réticulum endoplasmique lisse ou rugueux, des mitochondries dispersées ou regroupées autour du noyau, des ribosomes, des lysosomes, des vacuoles

digestives et contractiles et un cytosquelette de composition variable. Le trophozoïte a une forme très variable (figures 16 à 18) et le cytoplasme est constitué d'un endoplasme fluide contenant les organites et d'un ectoplasme hyalin. On retrouve également soit des pseudopodes appelés lobopodes de type monopodial comme pour *N. fowleri* ou polypodial comme pour *Amoeba proteus* ou *Balamuthia mandrillaris*, soit des pseudopodes appelés filopodes comme pour *Acanthamoeba castellanii* (figures 16 à 18). (3,39)

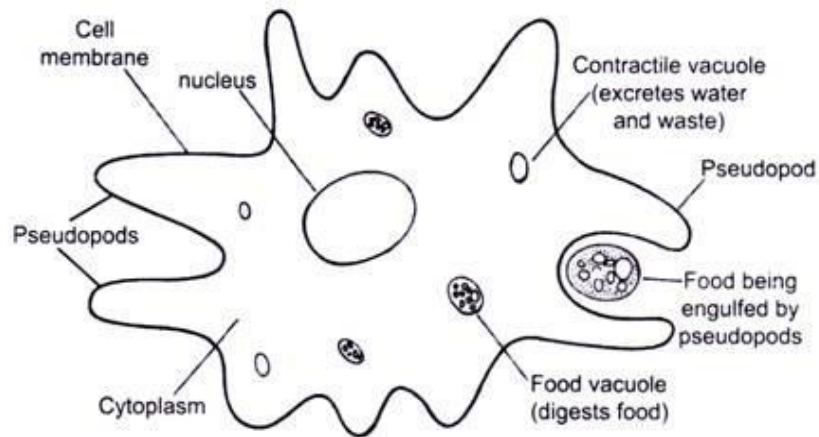


Fig. 9.7 *Amoeba proteus*

Figure 16 : Schéma d'un trophozoïte d'*Amoeba proteus*. (40)



Figure 17 : Photo représentant un trophozoïte d'*Amoeba proteus*. (41)

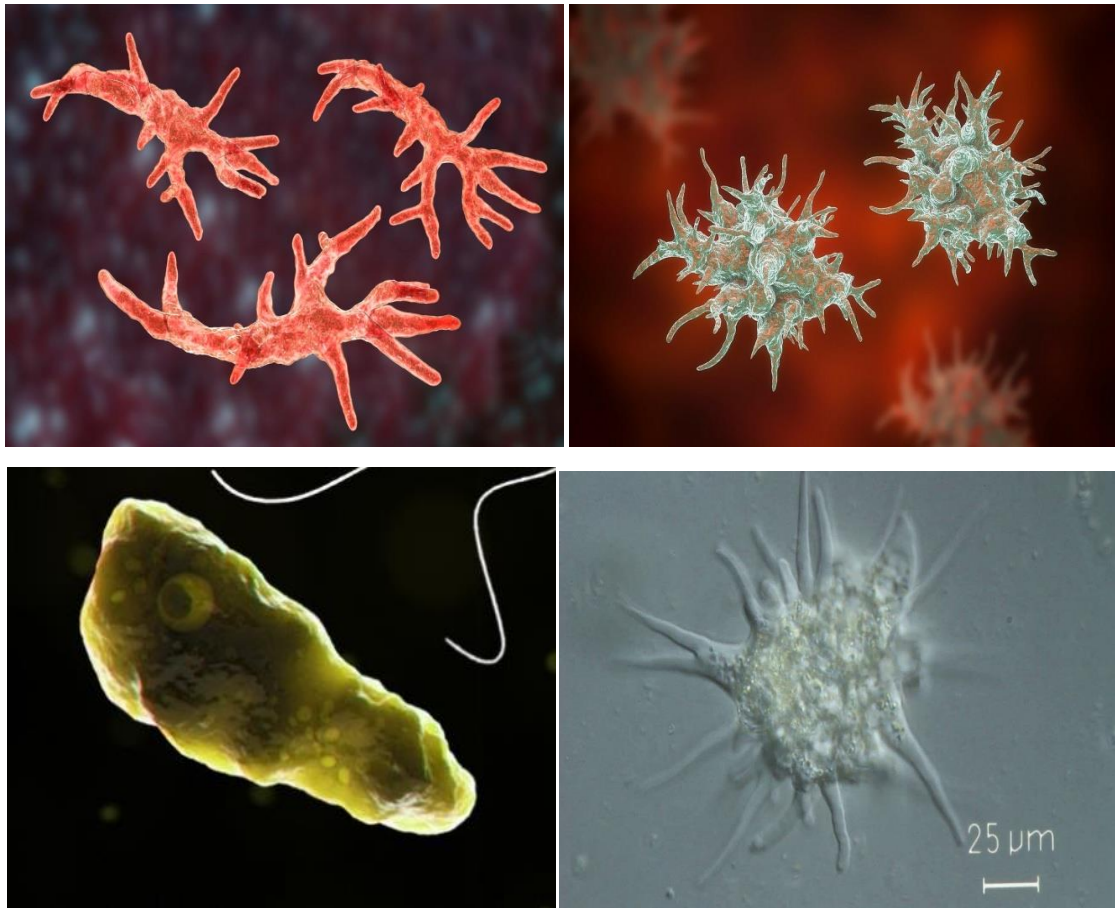


Figure 18 : Photos de trophozoïtes d'amibes (42–45): Trophozoïte de *Balamuthia mandrillaris* (en haut, à droite), d'*Acanthamoeba castellanii* (en haut, à gauche), de *N. fowleri* (en bas, à gauche) et de *Mayorella spp.* (en bas, à droite).

I.1.5.2. Le kyste

Il s'agit de la forme dormante du micro-organisme. Cette forme ne se nourrit pas, elle reste immobile, généralement au fond des sédiments. Il s'agit donc d'une forme de résistance qui apparaît lorsque les conditions de température, de taux d'humidité, de manque de nourritures, de pH... sont défavorables. Cette forme peut survivre pendant des années dans un environnement hostile. Plusieurs jours sont nécessaires pour que le trophozoïte se transforme en kyste, alors que le passage inverse se déroule en quelques heures seulement. C'est la forme permettant la dissémination aquatique, mais aussi aérienne, expliquant la présence des amibes dans tous les espaces; d'où son nom d'amibe ubiquitaire. (46)

Le kyste mesure de 5 à 20 µm, et résiste à des températures comprises entre – 20 °C et + 56 °C. Deux ou trois couches composent sa paroi : l'ectokyste correspondant la couche externe, l'endokyste correspondant à la couche interne et parfois le mesokyste correspondant à la couche intermédiaire comme pour *Balamuthia mandrillaris*. On observe

également un noyau comme par exemple pour *N. fowleri* et *Acanthamoeba castellanii*, ou plusieurs noyaux comme c'est le cas par exemple pour *Entamoeba coli* qui en possède généralement quatre. La présence d'un ou plusieurs pores appelés ostioles permet également de différencier les espèces. En effet, on retrouve un ostiole chez *N. fowleri* et plusieurs chez *Acanthamoeba castellanii*. (4,24,25)

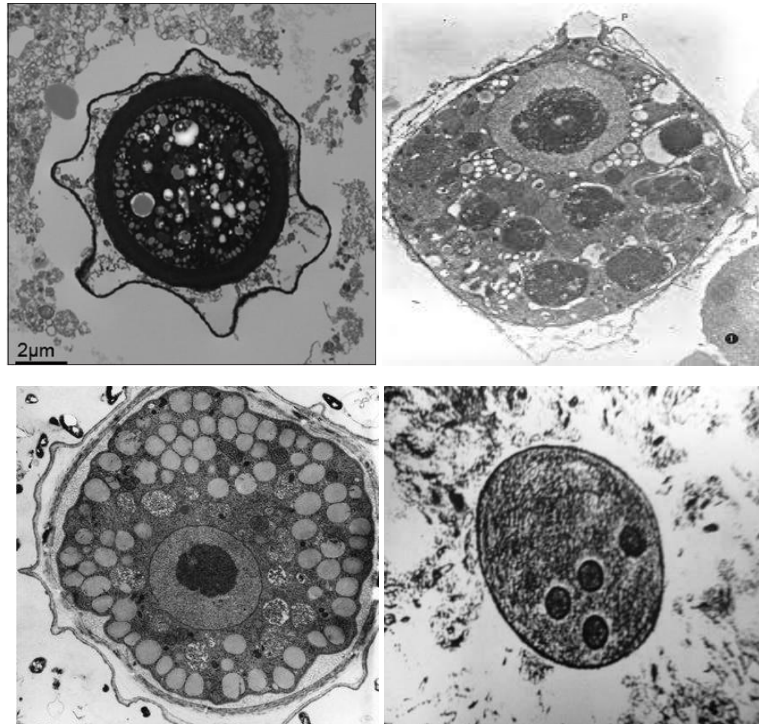


Figure 19 : Photos de kystes d'amibes (47–50) :
Kyste de Balamuthia mandrillaris (en haut à gauche), de *N. fowleri* (en haut, à droite),
d'*Acanthamoeba castellanii* (en bas, à gauche) et d'*Entamoeba coli* (en bas, à droite).

Le phénomène d'enkystement commence par l'immobilisation du trophozoïtes et l'expulsion de différents organites, de particules phagocytées, de produits métaboliques puis s'en suit une déshydratation et enfin la sécrétion de l'enveloppe kystique de nature celluloso-phosphoprotéique. Les ostioles permettent la sortie du trophozoïte lors du déenkystement qui s'effectue directement à travers le pore par étirement et striction du trophozoïte s'il n'y a pas d'opercule comme pour *N. fowleri* par exemple, ou par arrachement d'un des opercules permettant la sortie en force avec étirement et striction caractéristique au niveau de l'ostiole comme c'est le cas par exemple pour le genre *Acanthamoeba* (figure 20). Le kyste présente un cytoplasme très déshydraté. Lorsque les conditions extérieures redeviennent favorables, afin de permettre une réactivation du métabolisme, l'eau rentre dans le cytoplasme par un phénomène osmotique. (11,25)

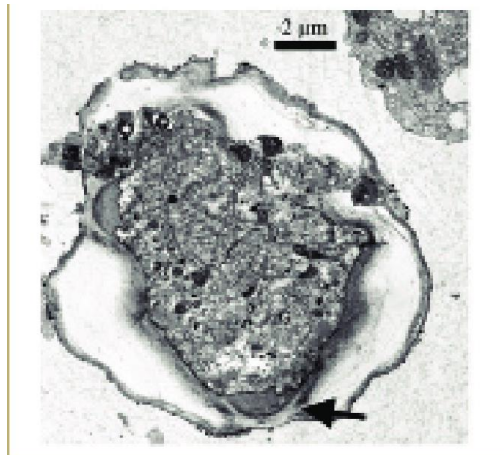


Figure 20 : Kyste d'*Acanthamoeba castellanii* au microscope électronique à transmission (flèche noire, en bas) ostiole avec opercule. (2)

I.1.5.3. La forme flagellée

La forme flagellée, est une forme intermédiaire pouvant être adoptée par certaines amibes libres notamment celles du groupe des Vahlkampfiidae. Elle mesure de 10 à 20 μm , ne se divise pas et ne se nourrit pas. La différenciation en flagellée apparaît lorsque les conditions telles que la raréfaction des substances nutritives et les conditions ioniques du milieu sont défavorables. La transformation s'accomplit en quelques secondes et le retour à la forme trophozoïte s'effectue en quelques heures. (46)

Ce stade a une forme allongée, il est très mobile, et intervient souvent comme élément de dissémination. Il possède un noyau avec un nucléole central mais on observe une diminution du nombre de vacuoles. Les flagelles, prolongement du cytoplasme, sont longs, fins, de deux à quatre et se développent de manière polaire. (10,24,25)



Figure 21 : Forme flagellée de *N. fowleri*, au microscope électronique. (51)

I.1.6. Locomotion

Excepté certaines forme d'amibes, notamment les amibes libres possédant une forme flagellée comme celles du genre *Naegleria* qui peuvent également se déplacer grâce à un ou plusieurs flagelles, les trophozoïtes des amibes se déplacent à l'aide des pseudopodes. Ce mode de déplacement nécessite la présence d'un substrat auquel le micro-organisme va pouvoir adhérer et ramper par un mouvement amiboïde. Les amibes se déplacent alors sur un support grâce à la déformation de la membrane plasmique et l'émission de pseudopodes. (24)

Le mode de locomotion est différent selon que l'amibe est monopodiale ou polypodiale mais aussi selon la forme des pseudopodes. Cependant le mécanisme cellulaire est toujours le même. Ce mouvement se fait toujours grâce à un courant endoplasmique qui va des pseudopodes en rétraction vers les pseudopodes en extension. En effet, l'ectoplasme ou plasmagel (gel), qui comme nous l'avons vu précédemment a une structure gel et est retrouvé à la périphérie du trophozoïte, pousse l'endoplasme ou plasmasol (sol) qui lui a une structure fluide, vers l'extrémité du pseudopode naissant. Parvenu à la périphérie, l'endoplasme se transforme en gel et l'ectoplasme dans la partie arrière reprend alors l'état fluide pour se transformer en endoplasme et ainsi de suite (figures 22 et 23). (24,52,53)

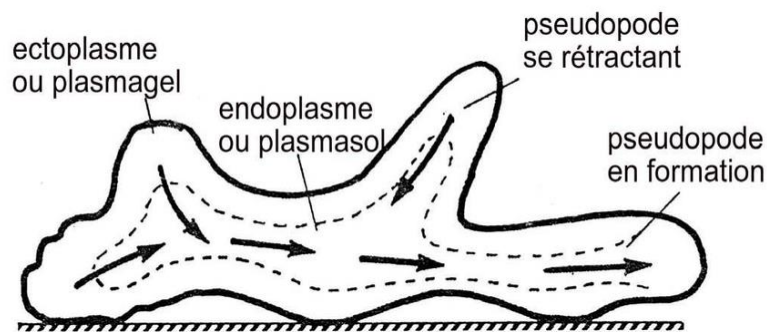


Figure 22 : Flux du cytoplasme lors du mouvement amiboïde. (53)

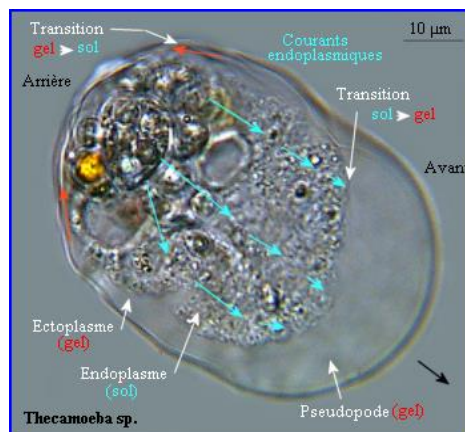


Figure 23 : Courant endoplasmique observé lors du mouvement amiboïde. (52)

Ces changements de structure reposent sur le degré de polymérisation de l'actine. En effet, lors de la formation d'un pseudopode il y a d'une part, dans la partie antérieure, polymérisation des filaments d'actine provoquant l'extension de la membrane cytoplasmique et d'autre part, dans la partie postérieure dépolymérisation des filaments d'actine entraînant la rétractation de la partie postérieure à l'origine du mouvement en avant (voir figure 24). (28)

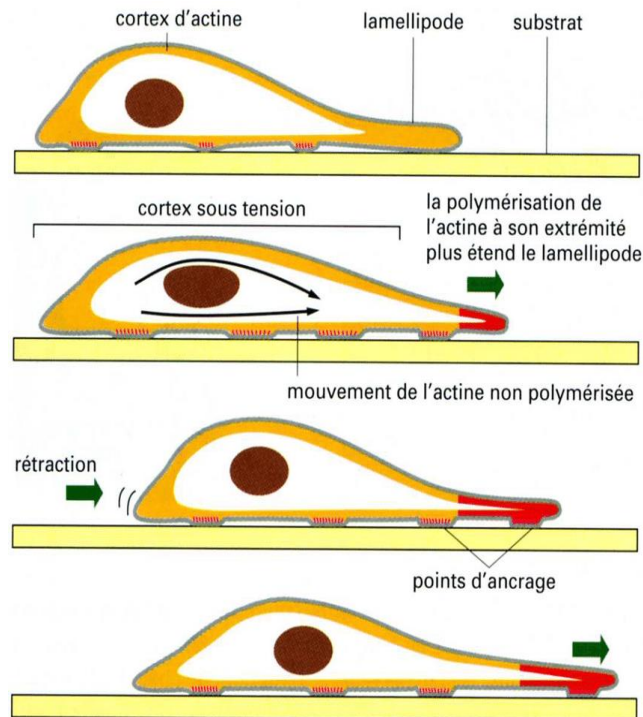


Figure 24 : Schéma du mouvement amiboïde (54) :

1) amibe sur un substrat, 2) extension de la membrane vers l'avant de la cellule grâce à la polymérisation de l'actine, 3) adhésion de la membrane au support grâce au point d'encrage et rétractation de la membrane à l'arrière, 4) mouvement en avant.

I.1.7. Nutrition

I.1.7.1. Sources nutritives

Dans l'environnement, les bactéries constituent la principale source alimentaire indispensable à la croissance des amibes. Elles peuvent également se nourrir d'autres micro-organismes tels que les algues, les champignons ainsi que d'autres amibes ou micro-organismes plus petits qu'elles. C'est pour cela que les amibes libres peuvent être considérées non seulement comme des prédateurs régulant la densité et la composition bactérienne du milieu environnemental mais également comme des régulateurs de

nombreux écosystèmes microbiens. Les amibes parasites se nourrissent de levures, grains d'amidons et bactéries présents dans le microbiote essentiellement intestinal de l'hôte mais également, pour les formes *histolytica* d'*Entamoeba histolytica*, de globules rouges et leucocytes présents dans les tissus en cas d'hémorragie locale. (10,55)

I.1.7.2. Phagocytose

La nutrition des amibes est assurée par la phagocytose (figures 25 et 26). En effet, la phagocytose peut être considérée comme un mécanisme permettant d'internaliser puis de digérer de grosses particules et des micro-organismes comme des bactéries afin d'apporter les nutriments nécessaires à la survie de l'amibe. (24)

La phagocytose comprend différentes étapes : (2,56,57)

→ **L'internalisation** :

L'amibe émet des pseudopodes (figure 25 (B)) qui s'étendent vers la particule alimentaire puis l'entourent progressivement (figure 25 (C)). Les pseudopodes fusionnent pour former une vésicule intra-amibienne appelée phagosome (figure 25 (D)).

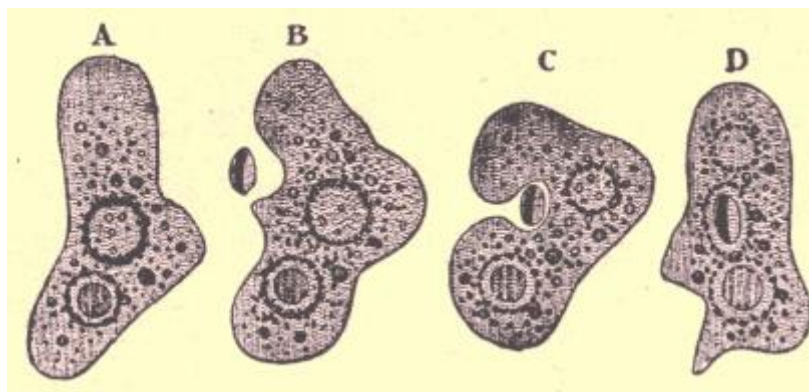


Figure 25 : Amibe absorbant des particules alimentaires. (58)

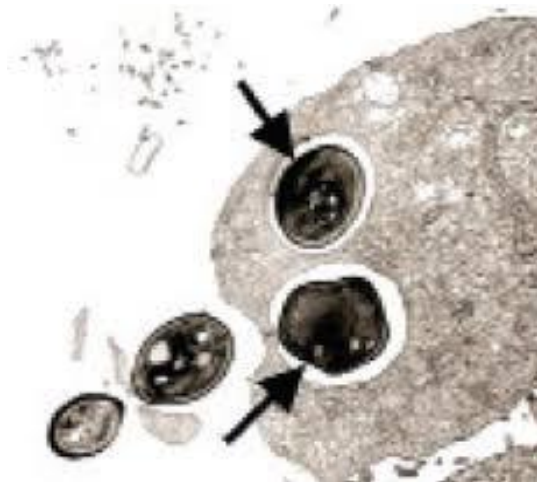


Figure 26 : Trophozoïte d'*Hartmannella vermiformis* au microscope électronique à transmission (2) : (Flèche noire) blastopores de *Candida albicans* internalisés.

→ **La maturation du phagosome :**

Il s'agit de la phase durant laquelle, à l'intérieure du phagosome, il y a production de molécules oxydantes dérivées de l'azote ou de l'oxygène et diminution du pH. Ces modifications vont exercer les premiers effets toxiques sur les particules phagocytées.

→ **La formation du phagolysosome :**

Le phagosome fusionne avec des lysosomes pour former le phagolysosome ou vacuole digestive (figure 27) contenant de nombreuses enzymes lytiques, afin de dégrader complètement les particules alimentaires internalisées.

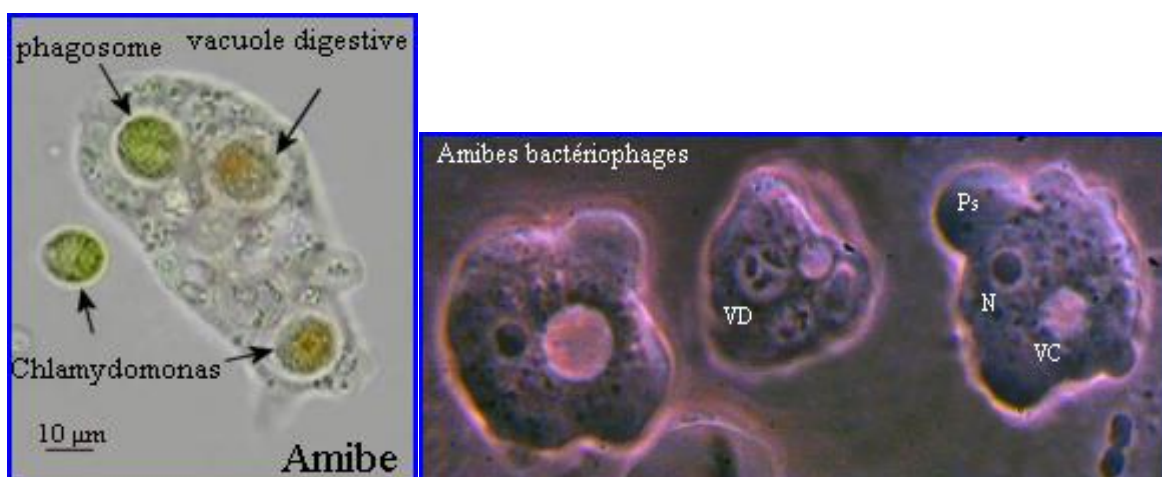


Figure 27 : Observation des vacuoles digestives (59) : (à droite) amibe bactériophage mettant en évidence des vacuoles digestives (VD) contenant des bactéries internalisées et en cours de digestion ((Ps) pseudopode, (N) noyau, (VC) vacuole) ; (à gauche) Chlamydomonas, algue verte, en cours de digestion dans le trophozoïte d'une amibe.

→ **La digestion et l'absorption :**

Dans le phagolysosome les enzymes lytiques telles que les phospholipases, les protéases, les glycases, les peroxydases, les phosphatases acides et les hydrolases commencent la digestion. Puis, les produits de digestion tels que les acides aminés ou sucres simples diffusent à travers la membrane de la vacuole alimentaire, vers le cytoplasme. C'est le phénomène d'absorption des nutriments.

→ **L'exocytose :**

Les résidus et produits non digérés sont rejetés par exocytose. En effet, la digestion et l'absorption étant terminées, le phagolysosome fusionne avec la membrane plasmique pour relâcher son contenu à l'extérieur de la cellule.

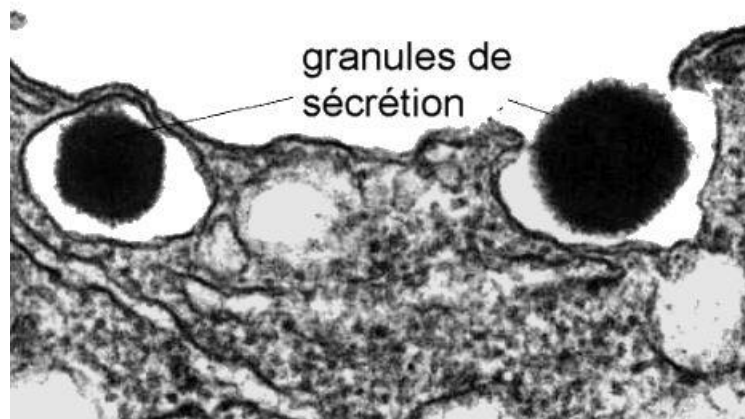


Figure 28 : Etapes de l'exocytose (60) :

(à gauche) phagolysosome fusionnant avec la membrane plasmique ; (à droite) phagolysosome libère son contenu dans le milieu extérieur.

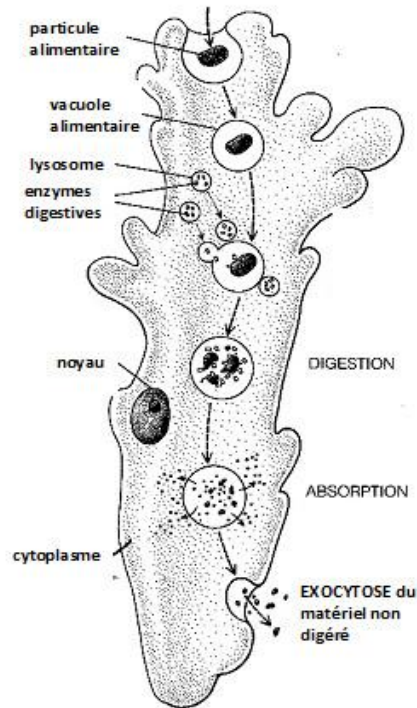


Figure 29 : Etapes de la phagocytose chez une amibe. (61)

Par ailleurs la formation de cupules phagocytaires appelées amoebostomes ou « food cups » est possible sans contact de l'amibe avec la particule alimentaire. Il s'agit d'expansions cytoplasmiques temporaires, en forme de ventouses, qui vont capturer les bactéries, levures, algues. (62,63)

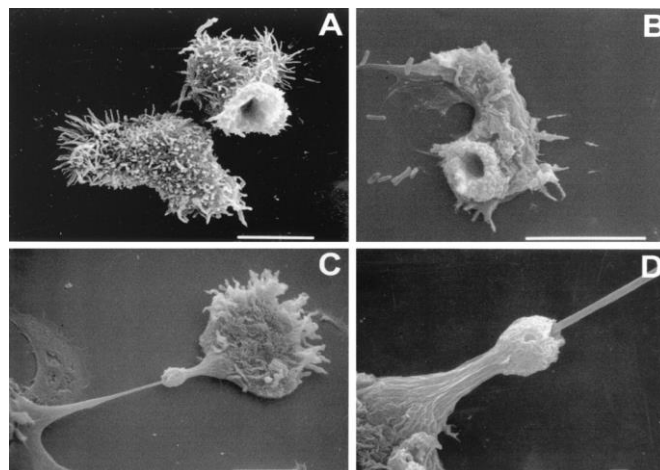


Figure 30 : Trophozoïtes illustrant la présence de structures de surface appelées « food cups », au microscope électronique à balayage (64) :

- (A) « food cup » à la surface d'un trophozoïte d'*Acanthamoeba Culbertsonii*, (B) « food cup » à la surface d'un trophozoïte d'*Acanthamoeba astronyxis*, (C) « food cup » à la surface d'un trophozoïte d'*Acanthamoeba castellanii* lors de l'ingestion d'une cellule nerveuse cultivée, (D) grossissement permettant d'illustrer la structure de la « food cup » lors de l'ingestion de la cellule.

Les amibes utilisent également la pinocytose permettant la capture de très petites particules et de gouttelettes de liquide extracellulaires contenant des éléments nutritifs dissous. De petites vésicules appelées vésicules pinocytiques ou pinosomes, formées par invagination de la membrane plasmique, vont alors se former et être dirigées vers les lysosomes en vue de leur digestion. C'est ce phénomène qui permet la nutrition des amibes cultivées sur un milieu axénique privé de micro-organismes. (11)

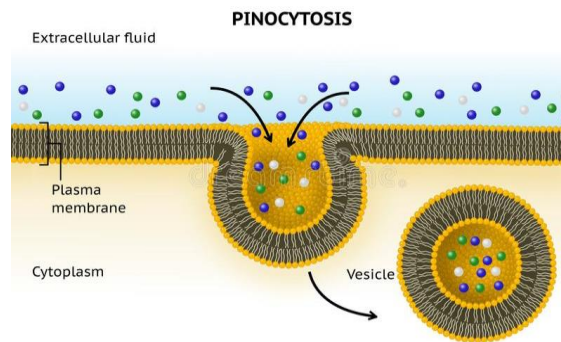


Figure 31 : Etapes de la pinocytose. (65)

Enfin, la membrane plasmique étant semi-perméable, elle laisse passer passivement par un phénomène osmotique les molécules d'eau, et activement par un mécanisme de pompes les ions tels que les ions sodium ou potassium. (24)

I.1.7.3. Interactions des amibes avec les bactéries

Certaines interactions bien particulières peuvent exister entre les bactéries et les amibes. De nombreuses études ont montré que les amibes libres ont la faculté d'héberger, de permettre la prolifération intracellulaire puis la dissémination de bactéries pathogènes. En effet, certaines bactéries ont acquis la faculté de survivre à la phagocytose par l'amibe. Ces bactéries qui résistent à la dégradation par les amibes et qui ont la faculté de se multiplier ou de survivre à l'intérieur des amibes, sont nommées « Bactéries Résistantes aux amibes » (ARB : Amoeba Resistant Bacteria). Les ARB peuvent être impliqués dans des infections humaines graves. On peut citer notamment *Legionella pneumophila* responsable de la légionellose. Il s'agit d'une infection respiratoire aiguë allant de la fièvre de Pontiac sans gravité à la maladie du légionnaire potentiellement mortelle. En effet, la bactérie se multiplie dans les alvéoles pulmonaires entraînant, en l'absence de traitement, une pneumopathie sévère. D'autres bactéries pathogènes telles que *Chlamydomphila pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobactérium avium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*... sont considérées comme des ARB. (2,66)

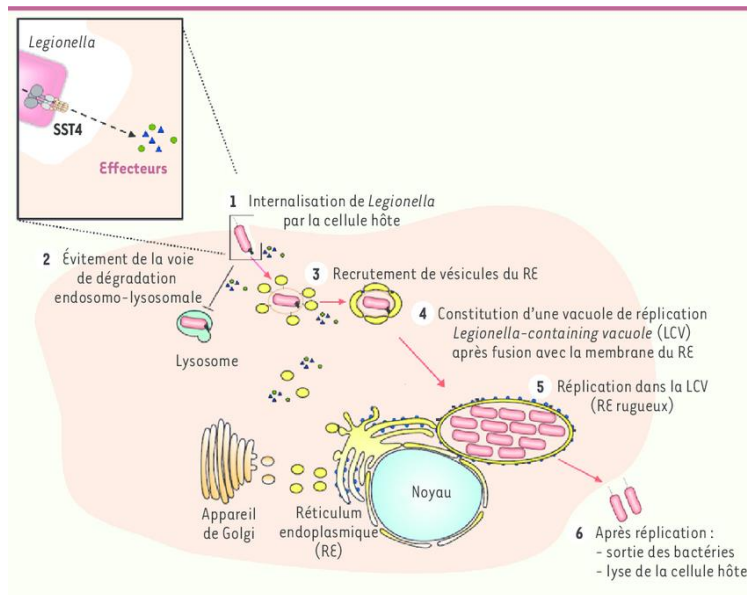


Figure 32 : Cycle de vie de *L. pneumophila* dans une amibe (67) :

- 1) phagocytose, 2) détournement du mécanisme de fusion phagosome-lysosome, 3 et 4) mobilisation du RER et formation d'une vacuole nommée LCV (legionella-containing vacuole), 5) multiplication dans la LCV, 6) rupture de la LCV, lyse de la cellule hôte et fuite des bactéries.

Grace à la sécrétion de protéines, *L. pneumophila* va détourner la phagocytose et transformer le phagosome en une vésicule favorable à sa multiplication (figure 32).

D'autres bactéries ont mis en place divers mécanismes afin de résister à la phagocytose. Certaines comme *Vibrio cholerae* vont coloniser la vacuole contractile, la détruire puis proliférer dans le cytoplasme, comme *Yersinia* vont inhiber la phagocytose pour ne pas être internalisées, comme *Listeria monocytogenes* vont sortir du phagosome et se retrouver dans le cytoplasme, ou d'autres comme *Mycobacterium tuberculosis* vont agir sur la maturation du phagosome pour limiter la production de molécules antibactériennes. (2)

Par ailleurs, les ARB sont capables de se maintenir et de se répliquer à l'intérieur d'une amibe enkystée ce qui lui confère une résistance très importante aux conditions environnementales défavorables mais aussi aux différents traitements bactéricides. En effet, si les bactéries sont présentes dans des kystes amibiens, elles sont encore mieux protégées car les kystes sont plus résistants aux traitements que les trophozoïtes. Certaines études, réalisées sur la multiplication de *L. pneumophila* dans un réseau d'eau sanitaire, ont montré que suite au traitement par choc thermique et chloration continue de 1,5 à 2 ppm de chlore, 30 % des points d'eau étaient encore contaminées par des amibes et que les bactéries libérées avaient une plus grande résistance aux traitements que celles issues de milieux de cultures. Elles sont également plus virulentes chez les mammifères et l'inhalation de vésicules contaminées ou d'amibes infectées augmente leur pathogénicité. (25,68)

Donc, de nombreuses bactéries pathogènes utilisent les amibes comme cheval de Troie pour survivre et proliférer dans les milieux hostiles mais également pour augmenter leur résistance aux traitements et leur virulence vis-à-vis des cellules animales et humaines, notamment au niveau des macrophages. (11,69)

I.1.7.4. Osmorégulation

Les amibes vivant en eaux douces possèdent un environnement hypotonique par rapport à leurs cytoplasmes. Par conséquent, la membrane plasmique étant perméable à l'eau, l'eau tend à s'infiltrer par osmose. Pour éviter sa lyse, l'amibe possède une vacuole contractile (figure 33) qui va évacuer l'excès d'eau causée par l'osmose. La vacuole contractile joue donc un rôle osmorégulateur.

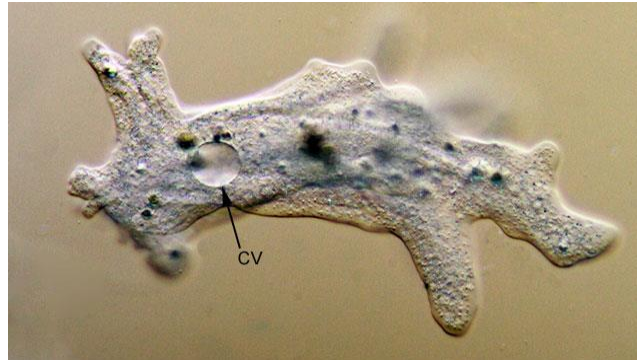


Figure 33 : *Amoeba proteus* avec une vacuole contractile ; (CV) contractile vacuole. (51)

La vacuole contractile collecte cette eau en surplus, puis se contracte pour l'expulser par de fins orifices (figure 34). En effet, située à proximité de la membrane plasmique, elle possède des canaux collecteurs ouverts dans le cytoplasme par lesquels l'eau pénètre. La vacuole se remplit et augmente de volume : c'est la phase de diastole. De même, elle est pourvue d'un canal évacuateur, débouchant au niveau d'un pore dans le milieu extérieur, par lequel l'eau est expulsée : c'est la phase de systole. La pulsation de la vacuole contractile est un phénomène périodique. Un cycle prend plusieurs secondes, selon l'espèce. La plupart des amibes n'ont qu'une seule vacuole contractile, d'autres en ont deux ou plus et certaines comme les amibes marines n'en ont pas. (11,51,70)

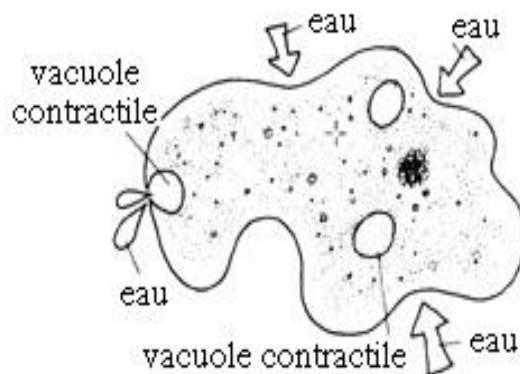


Figure 34 : Schéma illustrant l'excrétion chez l'amibe (d'après Griffin). (70)

I.1.7.5. Respiration

Généralement aérobies, les amibes ne possèdent pas d'organe différencié pour la respiration. Cependant, la membrane plasmique ayant une perméabilité sélective, elle permet l'entrée de l'oxygène dans le cytoplasme, par diffusion. L'oxygène va ensuite circuler grâce aux courants cytoplasmiques existants à l'intérieur de la cellule. Ce phénomène associé au déplacement de l'amibe dans le milieu aquatique, permettant un constant renouvellement de l'eau au contact de la membrane plasmique, facilite la diffusion de l'oxygène à l'intérieur de la cellule. Les amibes parasites du tube digestif telle que *Entamoeba histolytica*, sont des organismes anaérobies qui ne possèdent pas de mitochondries permettant d'oxyder les composés organiques. (71,72)

I.1.8. Reproduction

Lorsque les amibes sont sous la forme trophozoïte, elles se reproduisent de façon asexuée, généralement par division binaire appelée également fission binaire ou scissiparité. Cette méthode de reproduction aboutit à la formation de deux cellules filles génétiquement identiques à partir d'une seule cellule mère. Les amibes n'ayant pas de forme définie, la division binaire peut se produire à n'importe quel endroit de la cellule. On parle alors de fission binaire non orientée ou fission binaire simple. (11,73,74)

Dans ce mode de reproduction clonal, plusieurs phénomènes se succèdent (voir figure 35) (73–76) :

- Les vacuoles contractiles arrêtent de fonctionner et disparaissent.
- Les nucléoles se désagrègent et le noyau se divise par mitose. Cette phase est appelée la caryocinèse.
 - Durant la prophase, la réplication de l'ADN se produit. La chromatine se condense formant des chromosomes constitués de deux chromatides réunies par un centromère. L'enveloppe nucléaire disparaît et le fuseau mitotique apparaît entre les deux pôles de la cellule.
 - Au cours de la métaphase, les chromosomes sont condensés et les centromères se rassemblent dans le plan équatorial du fuseau.
 - Pendant l'anaphase, les chromatides de chaque chromosome se séparent et se déplacent chacune vers les pôles cellulaires opposés.
 - Au cours de la télophase, le noyau est divisé en deux noyaux. Les chromatides sœurs se décondensent et l'enveloppe nucléaire, les nucléoles ainsi que la vacuole contractile commencent à se former. La cellule se resserre en son milieu, le cytoplasme se divise alors et forme deux cellules filles. Cette étape de division du cytoplasme est appelée cytokinèse ou cytodiérèse.

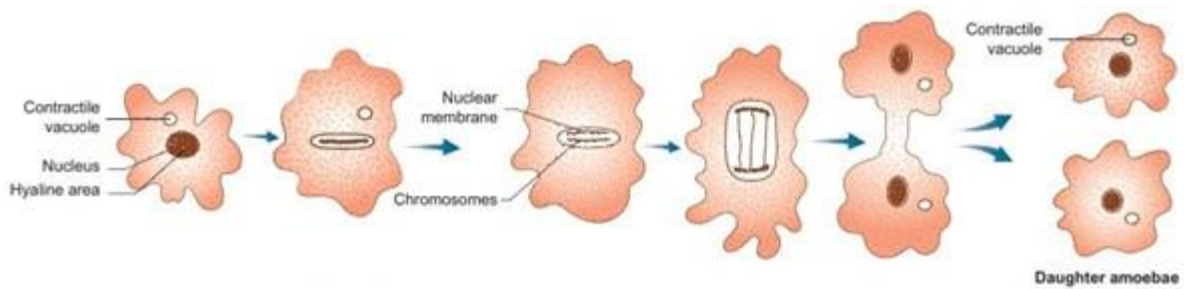


Figure 35 : Fission binaire simple chez les amibes. (73)

I.2. Les amibes pathogènes pour l'Homme en fonction de leur mode de vie

I.2.1. Les amibes parasites

Les amibes parasites peuvent survivre dans l'environnement mais généralement elles s'y développent peu. Elles sont constamment à la recherche d'un hôte car celui-ci est indispensable à leur développement et à leur multiplication.

Les espèces parasites de l'homme, appartiennent à quatre genres différents (10,11) :

- Le genre *Entamoeba* regroupant six espèces : *Entamoeba histolytica histolytica* et *Entamoeba histolytica minuta*, *Entamoeba coli*, *Entamoeba hartmanni*, *Entamoeba polecki*, *Entamoeba dispar* et *Entamoeba gingivalis*.
- Le genre *Pseudolimax* avec une seule espèce : *Pseudolimax buetschlii* (*Iodamoeba bütschlii*).
- Le genre *Endolimax* contenant seulement : *Endolimax nana*.
- Le genre *Dientamoeba* avec uniquement : *Dientamoeba fragilis*.

L'intestin et le colon hébergent la majorité des amibes qui parasitent l'homme mais *Entamoeba histolytica histolytica* peut migrer dans le foie, les poumons et le cerveau ; *Entamoeba gingivalis* se localise dans la cavité buccale.

Ces amibes sont cosmopolites mais certaines, comme notamment *Entamoeba histolytica*, sont retrouvées surtout dans les zones tropicales et subtropicales, c'est-à-dire dans les régions sous-développées où les conditions d'hygiène sont déplorables. En effet, l'absence de système d'épuration des eaux usées favorise la transmission et le développement des amibes.

La contamination est oro-fécale par l'intermédiaire des mains sales, par ingestion d'eau, de boissons polluées ou d'aliments souillés par des matières fécales contenant des kystes amibiens. En effet, la dissémination du micro-organisme dans l'environnement est réalisée par les kystes qui sont éliminés dans les selles. Cette forme kystique est très résistante dans

le milieu extérieur contrairement aux trophozoïtes qui sont détruits en quelques heures. La forme kystique se transforme en forme végétative dans le colon grâce aux sucs digestifs et la transformation inverse se fait au moment de la formation du bol fécal. (10,77,78)

Concernant la pathogénicité (10) :

- *Entamoeba histolytica* est la seule espèce pathogène et l'homme en est le seul réservoir. Elle sévit sur un mode endémique dans les pays du tiers monde. Cette amibe possède un cycle non pathogène responsable de l'amibiase infestation généralement asymptomatique provoquée par la forme *minuta* et un cycle pathogène entraînant l'amibiase maladie, parasitose grave, due à la forme *histolytica*. Le plus souvent l'infection reste asymptomatique. Cependant, le micro-organisme en traversant la muqueuse de l'intestin peut parfois provoquer des diarrhées sans fièvre, avec émission de glaires sanglantes et de fortes douleurs abdominales (dysenterie amibienne, amibiase, amoébose ou bien colite amibienne). Il peut également provoquer des ulcères ou entraîner, dans les formes sévères, des abcès amibiens au niveau du foie, des poumons ou du cerveau (amoébose tissulaire). L'invasion des tissus s'effectue grâce aux trophozoïtes (voir figure 36) qui se développent dans la paroi de l'intestin et du colon. Ces derniers vont alors phagocyter les hématies, provoquer des ulcérations de la paroi colique grâce à leurs nombreuses enzymes protéolytiques, traverser la muqueuse, gagner la sous muqueuse puis migrer dans la circulation pour envahir différents organes tels que le foie, le poumon, le cerveau...Lorsque l'infection est traitée, l'évolution de l'amibiase intestinale se fait rapidement, sans séquelle, vers la guérison. A l'inverse, lorsqu'elle est non traitée, des rechutes et des complications tissulaires peuvent apparaître. En zones tropicales, il existe néanmoins des formes rares, suraigües malignes et toujours mortelles, survenant chez les personnes dénutries, les enfants, les femmes enceintes ou au cours de l'accouchement. En ce qui concerne les localisations extra-intestinales, en l'absence de traitement, l'évolution est toujours défavorable et conduisent le plus souvent à une issue fatale. (10,11,24,25,78)
- *Entamoeba gingivalis* serait responsable de la pyorrhée alvéolaire.
- Les autres amibes intestinales ne jouent aucun rôle pathogène.



Figure 36 : Trophozoïte d'*Entamoeba histolytica* (forme *histolytica*), seule amibe parasite pathogène pour l'homme. (79)

I.2.2. Les amibes telluriques

Les amibes telluriques ou amibes libres sont des espèces présentes dans notre environnement mais qui se développent de façon indépendante des animaux et de l'homme. Elles se développent et se multiplient dans la terre, les sols humides ou les eaux riches en matières organiques, les eaux des marais, les eaux stagnantes ou polluées et ne sont donc pas pathogènes pour l'homme. (10)

I.2.3. Les amibes amphizoïques

Certains genres d'amibes telluriques sont capables d'amphizoïdie, c'est-à-dire qu'ils sont tantôt libres dans l'environnement, tantôt parasites chez l'homme et l'animal en y induisant une infection, le plus souvent grave, au niveau cérébral, oculaire, cutané, pulmonaire, auditif ou sinusien. Les amibes sont opportunistes ou non opportunistes, et ne sont jamais pathogènes suite à leur ingestion. En effet, l'infection est due à l'inhalation du micro-organisme pathogène, ou à sa pénétration par effraction, suite à une blessure.

Ces amibes sont retrouvées dans le monde entier, en milieu humide, dans le sol, dans les eaux stagnantes, les lacs, les eaux de baignades, les canaux d'irrigation, les rivières, les eaux de refroidissement des réacteurs...ainsi que dans l'air.

A ce jour, parmi les nombreuses amibes libres connues, plusieurs espèces du genre *Acanthamoeba*, et seulement une espèce des genres, *Naegleria*, *Balamuthia* et *Sappinia* sont amphizoïques et responsables d'infection chez l'homme. Les pathologies sont très graves, voir mortelles, mais heureusement très rares. Elles peuvent apparaître si les conditions sont favorables au développement de l'agent pathogène et si des mesures de prévention ne sont pas mise en place. (4,10)

Concernant la pathogénicité :

- Tout d'abord, plusieurs espèces du genre *Acanthamoeba* peuvent être la cause : (4,10)
 - De kératites amibiennes (KA) sévères, subaigües et aveuglantes, chez des personnes généralement immunocompétentes utilisant de façon intensive des lentilles de contact, ayant des abrasions de la cornée ou ayant une mauvaise hygiène des lentilles. En cas de diagnostic tardif ou de lésions importantes et profondes, les conséquences de la KA peuvent être la cécité voire l'énucléation, mais elle n'engage jamais le pronostic vital.
 - D'encéphalites amibiennes granulomateuses (EAG) d'évolution chronique ou bien d'infections disséminées, chez des sujets immunodéprimés. L'EAG est une infection du SNC, très rare, engageant généralement le pronostic vital. D'autres affections telles que des ulcères cutanés, des sinusites, des otites ou des pneumonies ont aussi été décrites chez des patients immunodéprimés. La contamination se fait par le nez, la bouche, ou une lésion cutanée.

- Dans le genre *Balamuthia*, *Balamuthia mandrillaris* provoque l'EAG subaigüe ou chronique mais toujours mortelle. Elle touche les patients essentiellement très jeunes ou très âgés, sains et immunodéprimés. Elle peut également provoquer des atteintes pulmonaires et cutanées. (80)
- En ce qui concerne le genre *Sappinia*, *Sappinia pedata* a provoqué un seul cas humain d'EAG. Ce cas d'infection, reportée chez une personne vivant au Texas, en bonne santé, suite à une infection des sinus, n'a pas été fatal. (9)
- Enfin, parmi les espèces de *Naegleria*, *Naegleria fowleri* est la seule espèce pathogène pour l'homme. Elle entraîne la méningo-encéphalite amibienne primitive (MEAP). Il s'agit d'une maladie aigue du SNC, ayant un très fort taux de létalité. Le décès du patient survient en moins de dix jours après la pénétration du parasite dans les fosses nasales et sa multiplication dans la substance cérébrale. Elle touche surtout les enfants et les adultes jeunes, sains et en bonne santé, après un bain dans des eaux douces et chaudes contaminées. *Naegleria fowleri* surnommée l'amibe mangeuse de cerveau sera décrite de façon détaillée dans la seconde et troisième partie de cette thèse. (10,81)
- Il faut savoir également que les amibes libres peuvent héberger certaines bactéries particulièrement pathogènes pour l'homme, les bactéries résistantes aux amibes (ARB), capables de survivre et se reproduire à l'intérieur de ces micro-organismes. Ces bactéries telles que *Legionella pneumophila*, *Salmonella*, *Listeria*, *Chlamydia*, *Vibrio cholerae*, *Mycobacterium tuberculosis* ou encore *Helicobacter pilori* vont alors utiliser ces amibes pour résister aux environnements hostiles et ainsi augmenter leur potentiel de transmission. Les amibes servent alors de vecteur d'épidémie. (69)

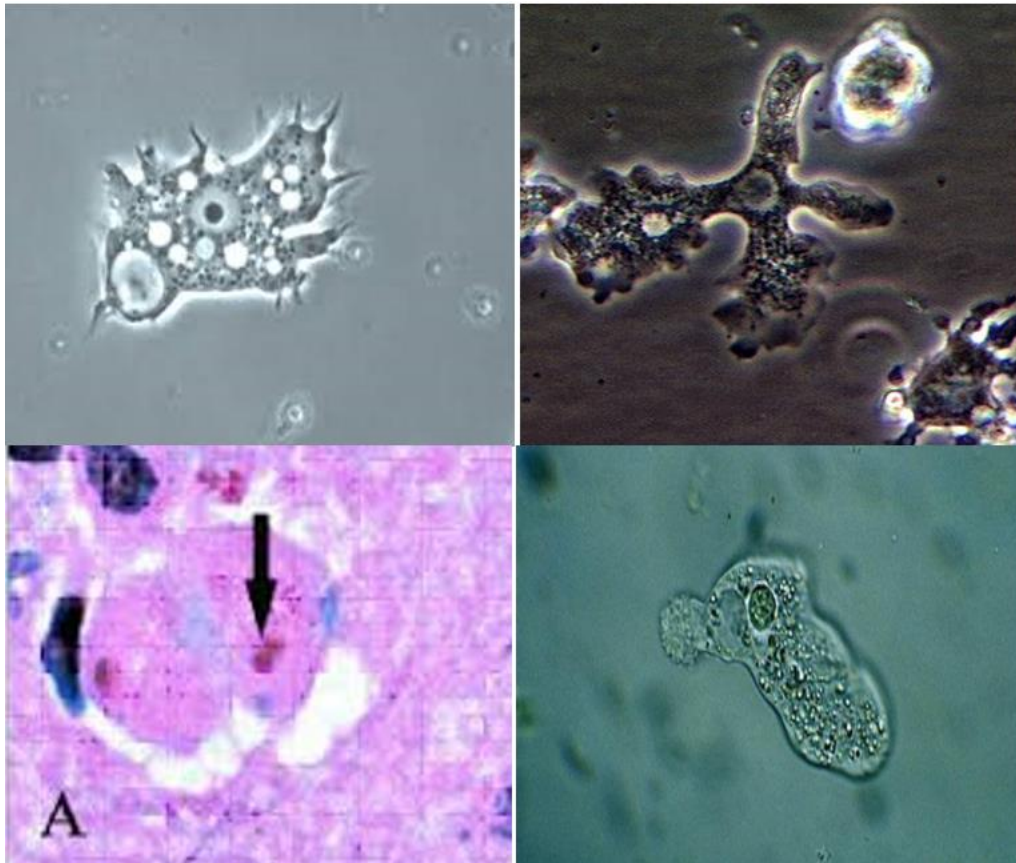


Figure 37 : Trophozoïtes d'amibes libres amphizoïques pathogènes pour l'homme (30,82–84) :
(en haut, à gauche) trophozoïte d'*Acanthamoeba* spp., (en haut, à droite) trophozoïte de *Balamuthia mandrillaris*, (en bas, à gauche, flèche noire indiquant les deux noyaux opposés) trophozoïte de *Sappinia pedata*, (en bas, à droite) trophozoïte de *Naegleria fowleri*.

II. L'amibe mangeuse de cerveau : *Naegleria fowleri*

II.1. Classification

Comme nous l'avons vu précédemment, *N. fowleri* est une amibe libre capable d'amphizoïdie, sans thèque, possédant des lobopodes de type monopodial. Elle appartient au clade des Bikonta appartenant au super-groupe des Excavata. (85)

Sa classification phylogénétique est la suivante :

Eucaryota

Bikonta

Excavata

Discoba

Percolozoa = Heterolobosea

Heterolobosidea

Vahlkampfiidae

Naegleria

Naegleria fowleri

II.2. Morphologie

Naegleria fowleri peut se retrouver sous trois formes morphologiques dans le milieu hydrique : la forme végétative, la forme kystique et la forme flagellée. Ce sont les conditions environnementales qui vont déterminer le passage d'une forme à l'autre (figures 38 et 39).

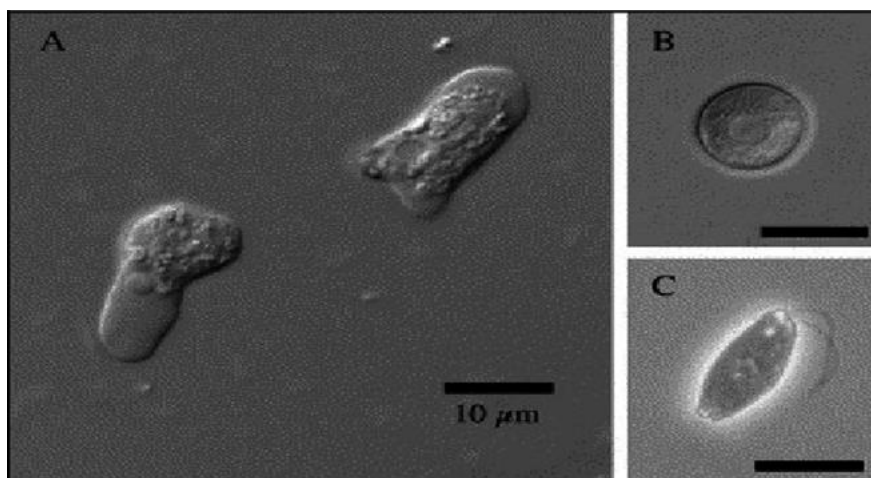


Figure 38 : Photos des trois formes morphologiques de *Naegleria fowleri* (86) :
(a) photo de trophozoïtes, (b) photo de kyste, (c) photo de flagellée, au microscope à contraste d'interférence différentiel et microscope à contraste de phase.

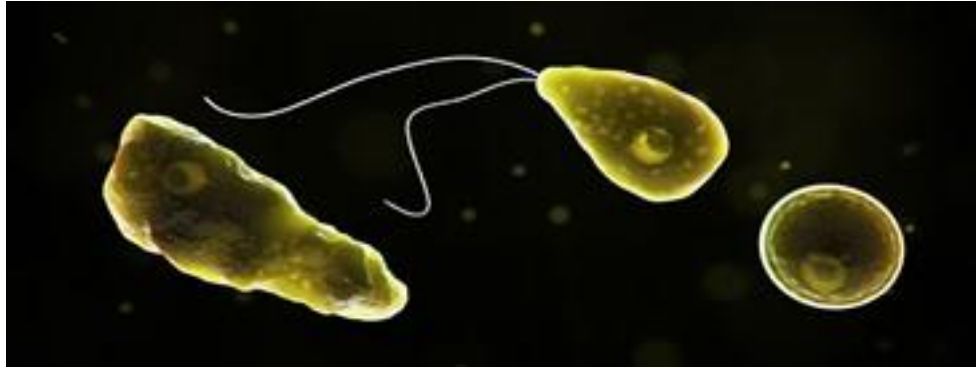


Figure 39 : Représentation générée par ordinateur de *N. fowleri* aux stades trophozoïte, flagellé et kyste. (87)

II.2.1. Le trophozoïte

La forme végétative appelée aussi trophozoïte (figure 38 (a) et figure 40), d'environ 10-30 μm , est plus fine en arrière qu'en avant. Elle correspond à la forme mobile, de nutrition et de multiplication par fission binaire dans le milieu extérieur et dans les tissus. Sous cette forme, le parasite est capable de se déplacer par l'intermédiaire d'un ou plusieurs pseudopodes et ainsi adhérer à différents supports. En effet, la partie antérieure externe et hyaline du cytoplasme appelée ectoplasme est à l'origine de pseudopodes à base large qui sont les lobopodes, se formant alternativement d'un côté puis de l'autre, ce qui donne au trophozoïte un mouvement directionnel sinusoïdal, rapide mais en zigzag. Grâce à leur faculté d'adhésion et de développement sur des surfaces, les trophozoïtes participent également à la constitution des biofilms, couche mince de micro-organismes adhérant aux surfaces en contact de l'eau, dont ils se nourrissent. (88)

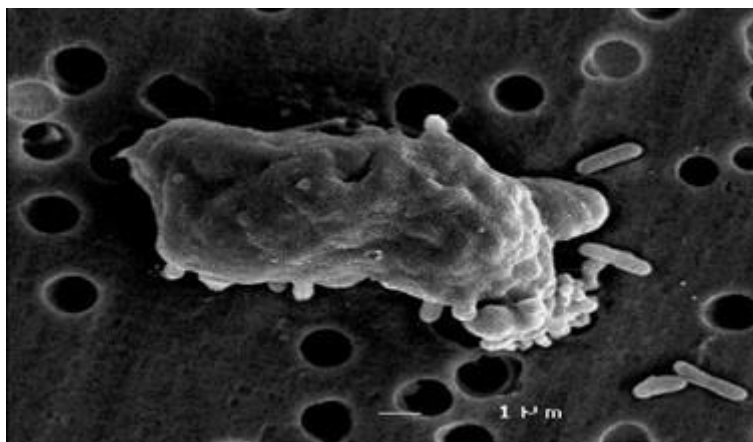


Figure 40 : Forme végétative de *N. fowleri*. (89)

Au niveau ultra structural les trophozoïtes présentent de nombreuses caractéristiques similaires à celle d'une cellule eucaryote, à l'exception des centrioles qui n'ont en revanche pas été observés. On retrouve une membrane, d'environ 10 nm de largeur qui se compose de deux couches denses entourant un espace libre. On peut aussi observer un nombre conséquent de ribosomes en forme d'haltères, attachés au réticulum endoplasmique dispersé dans le cytoplasme. Au niveau de ce cytoplasme, on observe deux aspects distincts. Premièrement, on trouve l'ectoplasme qui est riche en myosine et en microfilaments d'actine et dont la texture ressemble fortement à celui d'un gel. Le second aspect est celui de l'endoplasme qui lui contient de nombreux organites, tels que des lysosomes, de nombreuses mitochondries, des vacuoles alimentaires et la vacuole contractile, qui définissent l'extrémité postérieure appelée uroïde. On distingue clairement un noyau unique et arrondi d'environ 5 µm, localisé le plus souvent à la jonction 2/3 antérieurs et 1/3 postérieur. Visible en microscopie optique équipé d'un condensateur à contraste de phase, le noyau possède un gros nucléole en son centre, limité par la membrane nucléaire et entouré d'un halo de couleur clair (figure 41). (90,91)

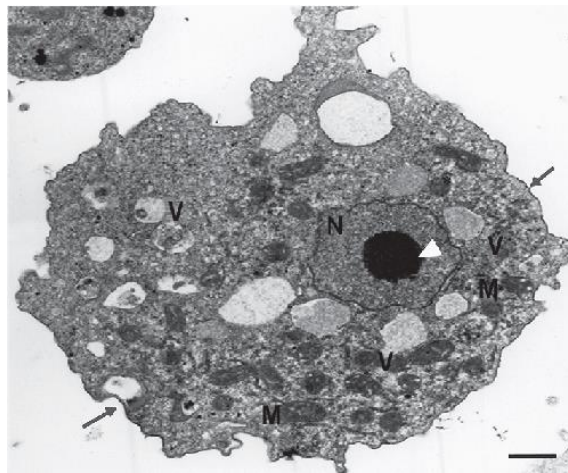


Figure 41 : Ultrastructure du trophozoïte de *N. fowleri* au microscope électronique (85) :

(N) noyau avec en son centre un gros nucléole (flèche blanche), (M) mitochondrie, (V) vacuoles, (les 2 flèches noires) membrane cytoplasmique, vacuole contractile et pseudopode (en haut).

Chez certaines souches de *N. fowleri*, l'identification d'un complexe Golgi primitif, constitué de composants membraneux et de vésicules enrobées, est parfois possible. De plus, sur certains trophozoïtes nous pouvons noter la présence d'expansions cytoplasmiques de la surface, qui sont des amœbostomes (voir figure 42) appelés également « food cups » qui varient en nombre et en taille selon la souche. Leurs fonctions sont dans un premier temps de permettre l'ingestion des bactéries, levures, micro-algues et débris cellulaires qui sont les sources alimentaires principales des amibes libres et dans un deuxième temps vont servir de points d'accroches aux organites. (62,63,92)

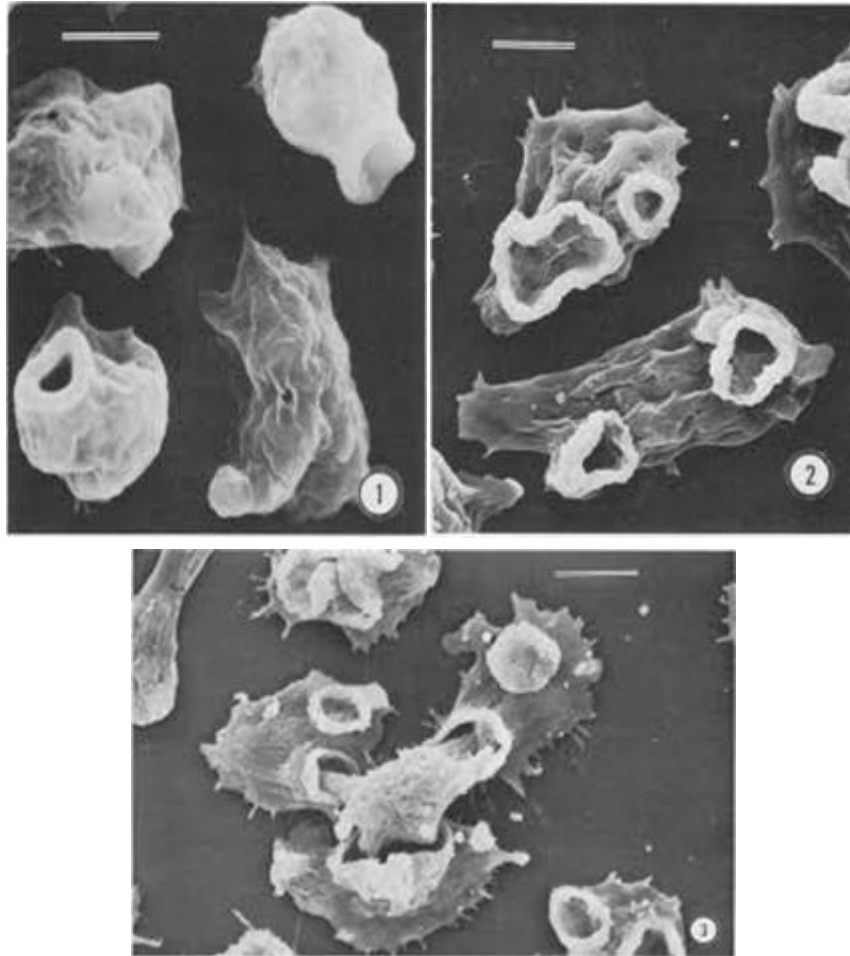


Figure 42 : Photos d'amoebostomes de *Naegleria fowleri* (85) :

1) Trophozoïtes de *Naegleria fowleri* mis en culture sur milieu axénique, observation des amoebostomes, 2) formation de nombreux amoebostomes, 3) alimentation grâce aux amoebostomes.

II.2.2. Le kyste

La forme kystique (figure 38(b) et figures 43 et 44) est observée lorsque les conditions du milieu sont défavorables pour maintenir l'organisme de l'amibe en vie, sur de longues périodes. Cette forme parasitaire correspond à la forme de résistance non infestante et de dissémination de l'amibe. Comme les autres espèces d'amibes libres, la formation des kystes survient donc lorsque les conditions environnementales deviennent critiques. En effet, ce sont les facteurs comme une carence en nourriture, des conditions de croissance devenues défavorables par manque d'oxygène, de place ou bien des températures devenues trop basses, des modifications de pH, ainsi que l'augmentation de la force ionique qui peuvent entraîner l'apparition de la forme kystique.

L'étude comparative des kystes d'amibes du genre *Naegleria* (voir tableau 3) au microscope électronique à balayage, réalisée par CIUREA-VAN SAANEN, nous montre les divers caractères de celui de *N. fowleri*.

Tableau 3 : Etude morphologique comparative des kystes d'amibes du genre *Naegleria* d'après CIUREA-VAN SAANEN. (93)

Amibes	Aspect de la surface	Présence des plis	Nombres moyens de pores	Dimensions	Structure des bords
<i>Naegleria gruberi</i>	Rugueuse	Sans plis	7,2	650 nm	Entourés d'un bourrelet
<i>Naegleria aerobia</i>	Lisse	Sans plis	1,2	800 nm	Simple, sans bords
<i>Naegleria fowleri</i>	Lisse	Sans plis	1,4	800 nm	Simple, sans bords

Les kystes de *N. fowleri* sont sphériques, avec un diamètre d'environ 8 à 20 μm . Ils possèdent une double paroi, la paroi externe est lisse, non plissée (voir figures 43 et 44). L'endokyste est volumineux avec un noyau central et des organites. L'ectokyste est quant à lui beaucoup plus fin et est accolé au précédent. Dans la paroi du kyste, on observe généralement un, parfois deux, pores ou ostioles, à bords simples, sur lesquels on ne retrouve pas d'opercule ou bouchon mucoïde scellant le pore (figure 43 à droite). Le kyste contient bien un noyau mais on note aussi la présence de vacuoles. Les vacuoles alimentaires permettent leur survie et la vacuole contractile est nécessaire à l'expulsion de l'eau pour l'enkystement (figures 43 et 44). (63,93,94)

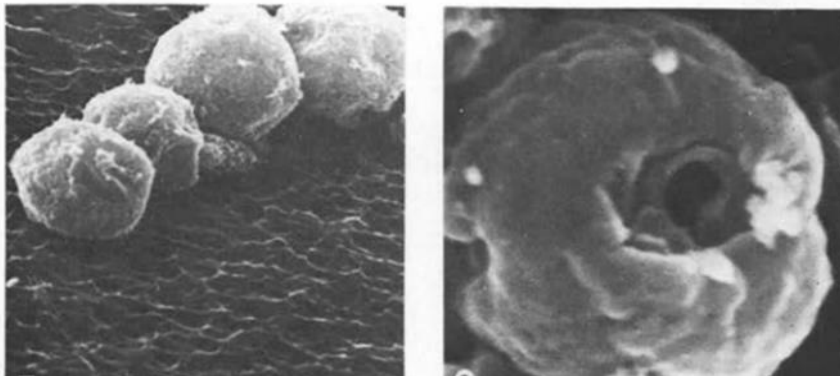


Figure 43 : Morphologie externe des kystes de *Naegleria fowleri* d'après CIUREA-VAN SAANEN. (93)



Figure 44 : Ultrastructure d'un kyste de *N. fowleri* au microscope électronique ; (P) pore ou ostiole. (95)

II.2.3. La forme flagellée

Naegleria fowleri possédant une forme flagellée (figure 38 (c) et figure 45), elle peut être considérée comme un amiboflagellé. Cette forme mesure environ 15 à 20 μm et possède une forme ovale ou piriforme, composée de deux flagelles (figure 45) bien que jusqu'à 4 flagelles aient pu être observés. Cette forme est dépourvue de cytostome, c'est la raison pour laquelle elle ne peut pas assurer la nutrition. Il ne s'agit donc que d'une forme transitoire. On pense que le flagellé joue un rôle dans la dispersion des amibes dans leurs habitats aquatiques. En effet, il permet la locomotion quand les conditions nécessaires au développement ne sont plus favorables. Ce stade est bien évidemment réversible, lui permettant de redonner rapidement une forme trophozoïte lors de meilleures conditions environnementales.

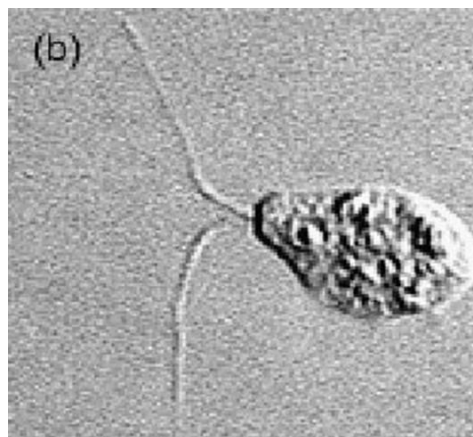


Figure 45 : Forme flagellée de *N. fowleri*. (96)

De plus, la forme flagellée est importante pour le diagnostic. En effet le test de flagellation qui consiste à ajouter de l'eau distillée dans le milieu permet d'observer le passage de la forme trophozoïte en forme flagellée ce qui est notamment propre à cette amibe libre et donc permet sa différenciation lors de son diagnostic. (97,98)

Certaines études permettent de mettre en évidence les facteurs influençant le passage à la forme flagellée. En effet, lorsque les amibes sont mises en culture sur une surface de gélose en présence de bactéries et en fonctions des éléments environnementaux, elles peuvent prendre n'importe quelle forme. Le déplacement des cellules est déterminé par les changements locaux de l'environnement dans lequel se retrouve l'amibe. Les pseudopodes peuvent apparaitre à n'importe quel endroit sur la surface de la cellule, ainsi qu'une ou plusieurs vacuoles contractiles se retrouvant dans le cytoplasme et permettant la propulsion. Le noyau aussi se déplace librement dans la cellule, le nucléole est quant à lui entouré par de nombreux granules rétractiles ce qui donne un aspect perlé visible par contraste de phase. Certaines caractéristiques morphologiques de *N. fowleri* peuvent changer lorsqu'on ajoute en l'absence de bactéries quelques gouttes d'eau distillée à la surface d'une lamelle (voir figure 46). Environ une heure après l'ajout de l'eau distillée une polarité se développe dans les cellules. Les pseudopodes vont apparaitre dans un sens, nous permettant d'observer une moitié antérieure et postérieure. Dans la zone postérieure, les pseudopodes se développent, formant une queue appelée uroïde, à laquelle les bactéries peuvent s'attacher et permettre de s'alimenter (figure 46 (4)). Au niveau de cette zone lorsque les pseudopodes se développent correctement on peut observer de fins fils dirigés vers l'arrière : il s'agit de la forme amoébo-flagellée (figure 46 (5) et 47). Ils peuvent se déplacer, se plier et se replier sur eux-mêmes, s'épaississant au fur et à mesure pour permettre leur réabsorption dans le corps cellulaire ultérieurement. A ce stade-là, la vacuole prend une position postérieure, on la retrouve ensuite sous forme de rosace. En effet elle réapparaît sous forme de groupe de 5/6 petites vacuoles (figure 46 (6)). Ces petites vacuoles s'agrandissent progressivement et fusionnent. Le plus souvent, les amibes ne produisent pas un seul flagelle, généralement deux (figure 46 (7)) mais parfois une grappe de flagelles pouvant aller jusqu'à quatre (figure 46 (8)). (99)

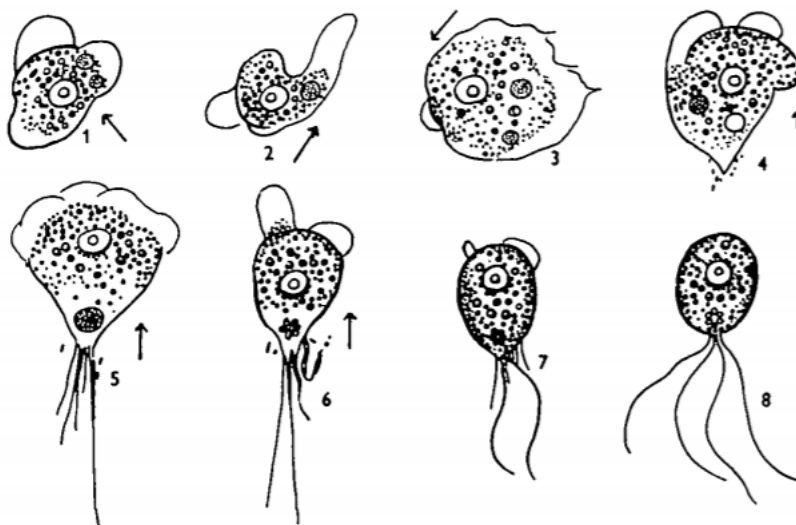


Figure 46 : Schéma représentatif de la forme flagellée. (99)



Figure 47 : Forme amoébo-flagellée de *N. fowleri*. (100,101)

II.2.4. Cycle évolutif

Comme nous venons de le voir, le cycle de vie de *N. fowleri* comprend trois formes. L'amibe peut changer de forme en fonction des conditions environnementales et ceci avec des temps de passage différents selon les types de transformation (figure 48). On peut noter que le passage le plus rapide correspond celui de la forme flagellée à la forme trophozoïtes, en seulement environ 10 secondes, alors qu'il faudra plusieurs jours pour passer de la forme trophozoïtes à la forme kyste. (46)

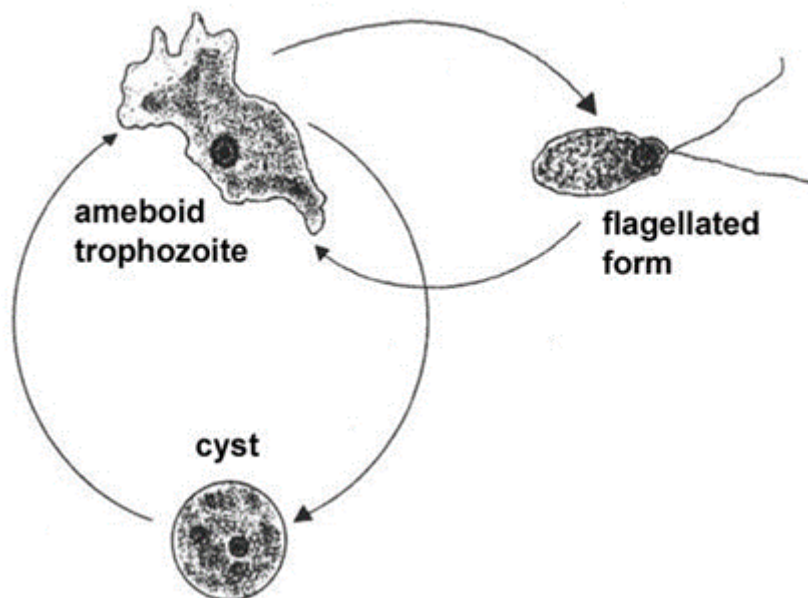


Figure 48 : Cycle de vie de *N. fowleri* présentant les 3 formes de l'amibe et temps approximatifs nécessaires pour se transformer entre elles. (102)

II.3. Ecologie

Naegleria fowleri se retrouve très couramment dans de nombreux milieux aquatiques d'eau douce chaude et sur n'importe quels sols de tous les continents, c'est pour cela qu'elle a été étudiée et isolée selon les saisons.

On les retrouve dans :

- Les plans d'eaux douces chaudes et naturelles comme les lacs, les rivières, les étangs et les canaux.
- L'eau géothermique naturellement chaude, et les sources d'eau potable géothermiques.
- Les rejets d'eau chaude des installations industrielles comme les eaux réchauffées par les centrales électriques ou nucléaires ainsi que les effluents industrialisés et les eaux usées.
- Les piscines, les eaux d'un centre d'hydrothérapie (spa), les aquariums et les parcs de loisirs aquatiques mal entretenus, peu chlorés et / ou non chlorés
- Les chauffe-eaux : *N. fowleri* résiste à de forte température
- Le sol humide (flaques d'eau boueuse, eaux stagnantes des fossés...)
- L'air
- Sur les téguments d'amphibiens, les intestins ou les branchies de poissons.

Néanmoins on ne les retrouve pas dans l'eau salée comme les mers et les océans. En effet, *N. fowleri* ne tolère pas une salinité supérieure à 5 g/L. Néanmoins, les kystes peuvent survivre 24 heures dans l'eau salée à une salinité de 40 g/L.

Naegleria fowleri est un organisme thermophile qui prolifère mieux à des températures élevées allant jusqu'à 46°C, et peut survivre pendant de courtes périodes à des températures encore plus élevées. En revanche, il est rare de la retrouver dans l'eau lorsque les températures baissent en dessous de 20°C. On conçoit que son abondance varie selon les saisons dans les régions tempérées. Cependant, l'élévation de la température n'est pas la seule condition nécessaire à sa croissance. D'autres facteurs sont importants à son bon développement, tels que l'abondance des particules organiques en suspension, la présence de bactéries en suspension ou de nutriments dans les sédiments. De plus, cette amibe peut survivre dans une large gamme de pH généralement compris entre 2,1 et 8,15, jusqu'à 12 pour les kystes. Par contre, elle est très sensible à la dessiccation, à 26°C et humidité relative 22%, les trophozoïtes sont détruits instantanément et les kystes en 5 minutes. A noter que les kystes des amibes libres peuvent survivre en environnement anaérobie dans les sédiments, ce qui explique la réapparition estivale de *N. fowleri* dans les points d'eau où l'échantillonnage est négatif en hiver. En effet, les kystes hiberneraient dans les sédiments profonds. En France, le niveau maximum autorisé est de 100 amibes *N. fowleri* par litre d'eau de rejet en aval des centrales lorsque le risque d'exposition humaine existe. Le contact avec l'Homme peut être très rapide d'où la nécessité de mettre en place des réglementations strictes avec des systèmes de prévention.

Nous verrons aussi par la suite que la présence de *N. fowleri* dans l'eau est liée à la température comme nous venons de le voir mais également à différents paramètres biologiques ainsi qu'à des critères physico-chimiques favorisant le développement de cette amibe. (98)

II.3.1. Les sources d'eau douce

Les premiers cas de méningo-encéphalite primitive amibienne dus à *N. fowleri* ont très vite mis en évidence une corrélation entre les eaux de baignade naturelles et la présence de l'amibe libre pathogène dans ces eaux. En effet, toute eau est favorable à la multiplication des amibes. Ceci est d'autant vrai si la quantité de matières organiques y est présente en abondance. Il est inconcevable de retrouver des amibes dans l'eau sans présence d'éléments nutritifs retrouvés dans les matières organiques en suspension.

Plusieurs études ont pu montrer la présence de *N. fowleri* dans les eaux prélevées que ce soit dans les petites ou grandes rivières, les canaux, les lacs, les étangs.

Chang, en 1971, a mis en évidence *N. fowleri* lors d'une étude réalisée à partir d'eau douce, prélevée dans certains états des Etats-Unis (Missouri, Ohio et lac Falmouth dans le Massachusetts).

Lors d'une étude réalisée sur les lacs de Virginie entre 1976 et 1979, il a été découvert que ¼ des prélèvements présentaient des *Naegleria* dont 6% étaient pathogènes.

Par la suite, les travaux sur les amibes libres dans les eaux de baignade se sont intensifiés. C'est ainsi que *N. fowleri* a été mise en évidence dans des lacs de Rio de Janeiro au Brésil mais aussi en Afrique et en Asie. Plus récemment, en 2006, une étude menée en Amérique du Sud a permis de tester une trentaine d'échantillons d'eau prélevée dans le parc Cocuizas de Maracay au Venezuela. Cette recherche a également mis en évidence la présence de *N. fowleri*. (103–105)

Une étude quantitative a été réalisée au Mexique afin de déterminer la concentration de *N. fowleri* dans une baignade en système ouvert et dans un lagon. Les résultats ont montré que les concentrations maximales de *N. fowleri* entre août et octobre ont été estimées à 201 NPP/L pour la baignade en milieu ouvert et à 18 NPP/L dans le lagon. La méthode du Nombre le Plus Probable (NPP) est une évaluation statistique du nombre de micro-organismes présumés distribués dans l'eau de façon aléatoire. (106,107)

Deux études réalisées aux États-Unis ont permis de comprendre les épidémies déclarées suite à la baignade dans des eaux récréatives, entre 1971 et 2000 et entre 1995 et 2004. Les agents les plus fréquemment identifiés ont été *Cryptosporidium* (15 %), *Pseudomonas* (14 %), *Shigella* (13 %), *Naegleria* (11 %), *Giardia* (6 %), et *E. coli* (6 %).

Ceci nous montre bien que les épidémies liées à *Naegleria* ont été principalement associées à la baignade dans les eaux douces comme les étangs, les rivières, les lacs... (108)

II.3.2. Les eaux de réseaux de distribution

Un réseau de distribution en eau est une structure permettant l'approvisionnement en eau d'une zone à une autre. C'est pour cela qu'il est difficile de séparer les études faites sur l'eau en piscine et celle des réseaux car c'est l'eau des réseaux qui alimente l'eau des piscines. Les amibes ont tout de même été recherchées lors d'analyses dans les réseaux d'eau de

piscines qui étaient bien entretenues mais quotidiennement réapprovisionnées pour rétablir les pertes journalières, dues aux activités.

En Australie, Anderson et Jamieson ont isolé des amibes *N. fowleri* à partir d'eau de réseau d'Adélaïde du Nord. Cette eau était amenée par pipe-line sur un parcours de 250 km. Les pipe-lines étaient installés au-dessus du sol, la température de l'eau aux alentours de 40°C explique la présence de cette amibe.

Souvent dans certaines habitations ou villages, les conduites d'eau potable proches des tuyaux d'eau chaude (ou bien les chauffe-eaux), alimentées par courant électrique maintiennent l'eau à des températures élevées. Des examens sur ces eaux ont permis d'observer de nombreuses amibes pathogènes dont *N. fowleri*.

Naegleria fowleri a même pu être isolée au niveau de l'eau de robinet. En 2011 en Louisiane, Etats-Unis, deux personnes sont décédées suite à des lavages sinusiens effectués avec de l'eau du robinet contaminée. (109)

II.3.3. Les piscines

L'eau de piscine privée ou publique dont la température est maintenue entre 25 et 30°C, constitue sans doute le milieu le plus favorable au développement des amibes. Cela prend en compte la désinfection que subit l'eau, la fréquentation des piscines, de la filtration et du renouvellement de l'eau. Si une de ces caractéristiques n'est pas optimale, l'eau s'enrichit en bactéries et en amibes. Des études ont montré qu'une concentration en chlore actif comprise entre 0,5 et 1 mg/L était nécessaire pour détruire les amibes *Naegleria*. (110)

L'isolement de *N. fowleri* dans les piscines reste difficile, seuls quelques spécialistes ont réussi à les mettre en évidence.

Les auteurs australiens Anderson et Jamieson, ont découvert deux souches de *N. fowleri* à partir de 100 échantillons d'eau de piscine. (109)

En Nouvelle-Zélande, à la suite d'une MEAP, l'amibe pathogène a été mise en évidence dans une piscine alimentée par deux puits contaminés par des eaux provenant d'un camping voisin et des eaux de ruissellement.

En Ex-Tchécoslovaquie, *N. fowleri* a été mise en évidence dans une piscine couverte. De même, un contrôle de routine réalisé dans une piscine couverte a permis de mettre en évidence la présence de *N. fowleri*, et cela 12 ans après plusieurs cas de MEAP. Il a été montré que le micro-organisme a recontaminé le bassin après avoir survécu dans ses cloisons. A la suite de cette découverte, des tests ont été réalisés, sur plusieurs bassins sportifs à Mexico. Les résultats ont mis en avant la présence de plusieurs souches de *N. fowleri*, ceci alors que la concentration en chlore libre était de 0,7 mg/L. (111,112)

A la suite de ces observations, nous comprenons que le maintien prolongé de l'eau à une température élevée ainsi que des règles d'hygiène non respectées favorisent la survenue et le développement de *N. fowleri*. Il faut savoir également qu'à de nombreuses reprises, les filtres à sable ont joué un rôle important dans le développement des amibes. C'est à la sortie de ces filtres que l'on retrouve le taux le plus élevé d'amibes, avant que l'eau soit chlorée à

nouveau. Plusieurs auteurs dont Cerva, Macek et Johnova ont pu retrouver, lors d'une étude, plus d'un million d'amibes par litre d'eau à la sortie d'un filtre à sable, ceci à la piscine de Podoli à Prague. De plus, comme vu précédemment, les amibes ont la capacité d'adhérer à différents supports et de s'y accumuler. La présence d'échelles, de planches, de caoutchouc sont des facteurs d'aggravation. L'apport de matières organiques par les baigneurs représente certainement le facteur essentiel à la multiplication des amibes, d'où l'importance de limiter le nombre de nageurs et d'augmenter les désinfections.

II.3.4. Les eaux usées

Les eaux usées, appelées aussi eaux polluées sont des eaux qui ont été dégradées par l'activité humaine. Cela peut être des eaux provenant d'usines ou bien d'eau d'égout provenant de la communauté. La pluie peut provoquer des débordements des ouvrages de collecte et de traitement des eaux usées ou des ruissellements importants sur des surfaces souillées. Les eaux usées provenant des habitations, les déjections des animaux et les effluents d'élevages rejetés dans le milieu et qui pollueraient des sites de baignades, peuvent être la cause d'une mauvaise qualité de l'eau. A titre d'exemple, la fédération française de triathlon demande impérativement avant toutes compétitions une analyse approfondie des eaux dans lesquelles va se faire la partie natation. En effet, les triathlons se déroulent principalement dans des eaux sujettes aux contaminations d'amibes puisqu'ils se réalisent dans les lacs, les rivières et les cours d'eau. Le contrôle est assuré par les services sanitaires des unités territoriales des agences régionales de santé (UT- ARS). Les résultats d'analyses des eaux de baignade doivent être affichés sur le site de la compétition. Si les conditions ne sont pas favorables, la compétition sera repoussée le temps de traiter l'eau. A ce jour aucune MEAP n'a été déclarée à la suite d'un triathlon. (113)

II.3.5. Les eaux industrielles

En Europe depuis les années 1980, il a été mis en évidence la présence d'amibes pathogènes dans les lacs, rivières à la suite de rejets d'eaux chaudes par les industries.

Un des éléments déclencheur a été le décès d'un jeune garçon en bonne santé, atteint de MEAP en Belgique à la suite d'une baignade dans un cours d'eau chauffée par des rejets d'usine contenant du zinc et du plomb.

Après cette découverte, des travaux ont été réalisés en Pologne entre 1974 et 1980 sur deux lacs, de canaux, de circuits de refroidissement et d'une rivière attenante à deux centres électriques ont permis de découvrir 64 souches de *N. fowleri* dont 13 pathogènes pour les souris. (113,114)

De même, en France les premières souches de *N. fowleri* ont été découvertes dans la région de Metz, dans les petits ruisseaux proches d'une centrale électrique alimentant une lagune de refroidissement installée en dérivation sur la Moselle. Ces travaux se sont poursuivis

dans le Nord-Est de la France sur 23 aires industrielles, et ont révélé la présence d'amibes thermophiles sur 19 sites et sur 12 sites d'amibes *Naegleria* et d'amibes pathogènes sur 2 sites ainsi que dans les décharges industrielles. Les amibes étant plus présentes au printemps qu'à l'automne. (115)

A la même époque, aux Etats Unis des études portant sur la présence de *N. fowleri* au niveau des eaux de refroidissement de 8 centrales électriques au charbon ont révélé la présence de ces amibes sur les échantillons de deux d'entre elles. Une autre étude quantitative réalisée en Géorgie sur une base de plusieurs centaines de prélèvements d'eau et de sédiments menée sur un lac créé pour recevoir un réacteur nucléaire révélait que pendant les périodes d'additions d'eau chaude, les concentrations de *N. fowleri* ont augmenté de 2 log. Il est à noter que les concentrations sont revenues à la normale 1 à 2 mois après l'arrêt des activités thermiques. (116,117)

En 2007, une étude s'est portée sur le lac Anna en Virginie, utilisé pour refroidir une centrale nucléaire et en plus utilisé pour des activités aquatiques. La présence de *N. fowleri* a été détectée par PCR dans 9 des 16 échantillons réalisés. Avec des températures avoisinant les 32°C, la densité d'amibes libres total était de 240 par litre. (118)

En France, sur les centrales nucléaires équipées de condensateurs en acier inoxydable, il a été constaté le développement de *N. fowleri* dans leur système de refroidissement. Les rayonnements UV, ainsi que des traitements anti-amibiens à base de monochloramine ont été mis en place pour traiter l'eau des circuits et les rejets. En France, le suivi des concentrations en *N. fowleri* est défini réglementairement par les arrêtés propres à chaque entreprise. Lorsque le seuil déterminé par Le Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France (le CSHPF), soit 100 *N. fowleri* par litre d'eau (N.f./L ou Nf/L), est dépassé les activités aquatiques sont suspendues en aval du site. (119)

En Poitou-Charentes, depuis l'ouverture de la centrale en 1998 et jusqu'en 2009, des campagnes pour caractériser les concentrations en amibes dans l'eau en aval et en amont de la centrale de Civaux ont été instaurées par l'ARS. Les analyses se sont portées sur différents sites de baignade, les activités nautiques, les zones de captages de productions d'eau pour la consommation et des points estimés significatifs. Durant la période estivale un contrôle plus poussé a été instauré sur plusieurs espaces de baignades à raison de 3 mesures par an (voir tableau 4). *Naegleria fowleri* n'a pas été détectée chaque année, mais cela permet d'avoir une idée de la concentration d'amibes dans la Vienne par année. On remarque que les années à forte chaleur la concentration en amibes est plus élevée (2003). (120,121)

Tableau 4 : Concentrations moyennes de *Naegleria fowleri* mesurées en amont et en aval de la CNPE de Civaux. (35)

	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
Concentration en <i>N. fowleri</i> dans l'eau (N.f./L)	nd	nd	nd	a =2	a < 2 b =57 c < 2 d<2 e< 2	c <2 d<2	nd	nd	nd	nd
Concentration en <i>N. fowleri</i> dans les sédiments (N.f./ 10g)	nd	nd	nd	a = 4	b < 1 e<1	e= 47	c = 4	nd	c = 4 d=3 e=7	nd

nd : non détecté

(a) Eaux de baignade en amont de la centrale

(b) Cubord situé à 2,6 km en aval de la centrale

(c) Chauvigny situé à 14,6 km en aval de la centrale

(d) Bonnes situé à 19 km en aval de la centrale

(e) Bonneuil - Matours situé à 28 km en aval de la centrale

Plus récemment en 2019, toujours à Civaux les valeurs maximales en *Legionella pneumophila* et en *N. fowleri* ont été calculées en aval du fleuve (tableau 5). Pendant toute la durée des analyses, la concentration en *N. fowleri* dans la Vienne n'a jamais atteint le seuil limite de 100 Nf/L. Cela a été rendu possible grâce à un suivi amibien, devenu indispensable. Des analyses dans les circuits de refroidissement et dans les rejets en aval de la centrale ont été effectuées. Afin de limiter le risque lié à la présence de *N. fowleri*, une stratégie basée sur l'action germicide des ultraviolets a été instaurée. Il a alors été constaté que la concentration maximale de *N. fowleri* en aval du rejet dans l'environnement n'a jamais dépassé 29 Nf/L (figure 49). Ceci nous montre bien que les actions préventives limitent les risques de propagation de *N. fowleri*, en Nouvelle Aquitaine ainsi que dans les autres régions de France qui elles aussi sont tenues de respecter les normes de sécurité. (121)

Tableau 5 : Résultats des analyses de suivi de la concentration en *Legionella pneumophila* et en *Naegleria fowleri* calculés en aval du fleuve. (36)

Paramètre	Valeur maximale observée en 2019	Seuil d'action
Legionella pneumophila Tr1	9 400 UFC / L	5 000 000 UFC / L
Legionella pneumophila Tr2	12 000 UFC / L	5 000 000 UFC / L
Naegleria fowleri	29 Nf / L	100 <i>N.fowleri</i> / L

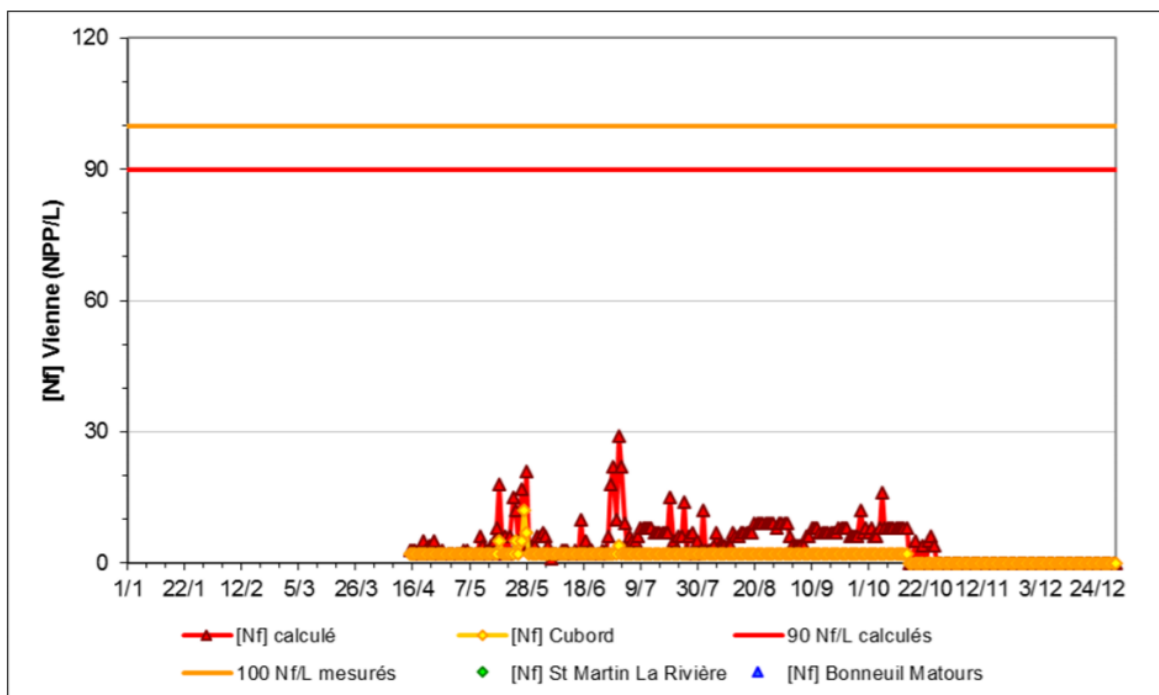


Figure 49 : Concentration de *N. fowleri* dans la Vienne exprimée en Nf/L. (121)

II.4. Alimentation

Les organismes tels que les bactéries constituent la base nutritive indispensable au développement de *N. fowleri*. En effet, la densité bactérienne doit être à un seuil suffisant pour permettre sa nutrition. Les eaux à forte concentration en coliformes totaux représentent un bon environnement pour la croissance de *Naegleria*. (122)

Lors d'une étude réalisée dans une couche sédimentaire de la colonne d'eau de deux lacs de Caroline du Sud aux Etats-Unis, Kyle et Noblet (1987) ont rapporté que la détection de *N. fowleri* était corrélée à la présence de bactéries. (123)

Plus récemment, Goudot (2012) a démontré, en laboratoire, que la prolifération de *N. fowleri* dans les biofilms d'eau de rivière dépendait non seulement de la température ($> 32^{\circ}\text{C}$) mais aussi de la quantité de bactéries disponibles par rapport à l'abondance amibienne (ratio bactéries/amibes libres). (123)

Naegleria fowleri se nourrit également d'autres micro-organismes tels que les champignons, les levures, les algues et également d'autres protozoaires dans la mesure où ils sont de taille inférieure.

II.5. Association avec des bactéries

Bien que les bactéries constituent la source nutritive de référence pour *N. fowleri*, certaines d'entre elles sont capables de survivre à la phagocytose. Comme nous l'avons vu précédemment ces bactéries sont appelées bactéries résistantes aux amibes ou ARB.

Certaines bactéries sont donc capables de se multiplier alors qu'elles devraient normalement être dégradées par les amibes. C'est le cas de *Legionella* qui est responsable de la lyse des trophozoïtes notamment ceux de *N. fowleri*. La bactérie *L. pneumophila* se retrouve dans les habitats aquatiques semblables à ceux de *N. fowleri* et peut entraîner, chez certaines personnes fragilisées, la légionellose qui est une infection respiratoire grave. Considéré comme un parasite intracellulaire, il se multiplie dans les macrophages des alvéoles pulmonaires qu'il finit par détruire, entraînant une pneumonie rapidement mortelle. (119,124)

Une étude réalisée par Anthony L Newsome, a tenté de prouver que les événements cytoplasmiques (voir figure 32 : Cycle de vie de *L. pneumophila*) associés à la multiplication intracellulaire de *L. pneumophila* dans les cellules humaines pourraient être communs avec la multiplication bactérienne dans les amibes. L'étude s'est portée sur la culture de *L. pneumophila* et *N. fowleri*. Au bout de 6 jours, les résultats ont montré que, lorsque *L. pneumophila* est incubée avec *N. fowleri* dans un milieu de croissance (champ SCGYEM) sans supplément antibiotique, le nombre de bactéries présent en CFU est passé de 10^6 à $2,8 \times 10^8$ cellules de *Legionella* par mL. Les bactéries extracellulaires sont alors retrouvées sous forme libres dans le liquide de culture. A contrario, lorsque *L. pneumophila* est incubée seule ou avec des amibes lysées, alors leur nombre a diminué à 10^4 bactéries par mL (voir figure 50). Cela nous prouve donc que le nombre de bactéries augmente en présence d'amibes viables et que *N. fowleri* permet la multiplication de *L. pneumophila*. Cette étude a également confirmé que la bactérie est capable de proliférer dans les vacuoles de l'amibe comme c'est le cas pour d'autres amibes. *Naegleria Fowleri* est par conséquent considérée comme un hôte favorisant la présence, la persistance mais aussi la dissémination de bactéries pathogènes. L'importance de la cellule hôte et du milieu environnemental sont très importants, et peuvent constituer un facteur limitant. (125)

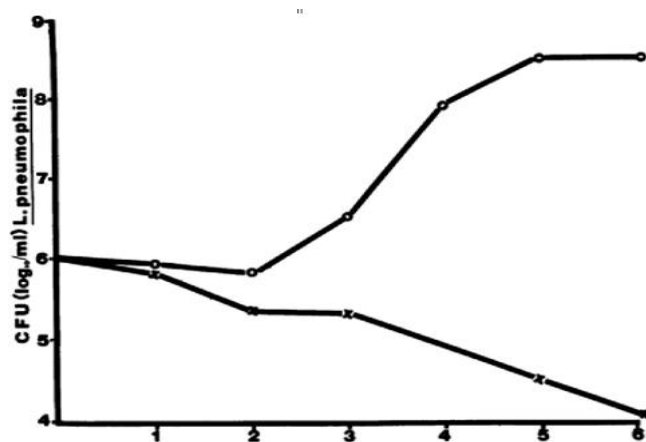


Figure 50 : Multiplication de *L. pneumophila* en association avec *N. fowleri* et seule ou avec des cellules de *Naegleria* lysées. (125)

Aucun des échantillons environnementaux n'ont révélé la présence de *L. pneumophila* dans *N. fowleri* et il existe peu d'études sur d'éventuelles interactions de *N. fowleri* avec d'autres bactéries. Cependant, l'amibe mangeuse de cerveau peut être considérée comme un réservoir potentiel de bactéries hautement pathogènes pour l'Homme, ce qui constitue un risque potentiel non négligeable pour la santé. (126)

II.6. Génome

Le génome des amibes libres, comme pour tous les eucaryotes, comporte de l'ADN nucléaire linéaire, notamment porté par des chromosomes, un ADN plasmatique circulaire extra chromosomique de 14 kb (kilobases), et un ADN mitochondrial circulaire de 50 kb environ. Le nombre de chromosomes reste difficile à définir. Le génome de *N. gruberi* a été séquencé en 2010 et des études comparatives ont été réalisées entre ces deux amibes. Les résultats ont révélé que le génome de *N. gruberi* ne correspondait pas, malgré le fait que *N. fowleri* et *N. gruberi* partagent plus de familles de gènes que *N. fowleri* avec n'importe quelle autre amibe. (127)

Le séquençage de l'ADN génomique a été réalisé en utilisant à la fois les technologies Illumina HiSeq 2000 et Roche 454 GS FLX. Ceci a permis d'établir que le génome nucléaire de *N. fowleri* a une taille de 29,62 pb (paires de bases), possède une teneur en guanine et cytosine de 35,4%, et est riche en adénine et thymine. La cytométrie en flux a permis de calculer la taille complète du génome qui est d'environ 66 Mb (millions de bases). Cela permet de considérer que le génome de *N. fowleri* est diploïde.

Les facteurs de pathogénicité chez *N. fowleri* sont importants à identifier. En effet, cela permet de comprendre les mécanismes responsables de la MEAP en ayant un aperçu des protéomes, et ceci grâce à l'électrophorèse sur gel 2D. La protéine de choc thermique, l'actine 1 et 2 ainsi que la protéine Mp2CL5 sont des facteurs de pathogénicité connus. Ces dernières sont exprimées à des niveaux accrus chez les trophozoïtes de *N. fowleri* peu pathogènes. En revanche, la cyclophiline est fortement exprimée dans les trophozoïtes hautement pathogènes. Ces observations permettent de dire que cette protéine représente un facteur de pathogénicité, contrairement à la protéine hsp20 retrouvé dans les trophozoïtes faiblement pathogènes. Lors d'une électrophorèse sur gel 1D, 22 protéines régulées à la hausse ont présenté des facteurs de pathogénicité potentiels. Néanmoins, la raison de la dégradation rapide de l'état général des patients atteints de MEAP est inconnue. Grâce à l'approche protéomique, 22 nouveaux facteurs de pathogénicité ont été identifiés. De plus, 21 protéines se sont révélées à la baisse dans les trophozoïtes hautement pathogènes issus de la chaîne respiratoire mitochondriale et des voies de biosynthèse de protéines. C'est parce qu'ils survivent au dépend de leur hôte que l'on peut expliquer la différence de métabolisme entre faiblement et hautement pathogène. (128)

La membrane joue aussi un rôle important dans la pathogénèse. En effet, une protéine de liaison à la fibronectine est essentielle pour interagir avec les glycoprotéines de la matrice extracellulaire. Cela suggère donc que *N. fowleri* héberge une protéine membranaire liée au récepteur intégrine. Il s'agit notamment de la protéine Mp2CL5 qui a été retrouvée en très forte concentration dans les trophozoïtes hautement pathogènes. La faculté de *N. fowleri* à

lyser une grande variété de cellules cibles par des mécanismes de contact, indique que des protéines de surface ont un rôle non négligeable dans l'activité lytique. Une glycoprotéine de type CD59 a été mise en évidence sur la membrane de *N. fowleri*. Elle pourrait se lier au composant C9 du complément et inhiber le complexe d'attaque du complément (MAC) lui permettant de résister à la lyse cellulaire. Pour cela, elle doit subir une vésiculation membranaire. De même, les Naegleriapores A et B, glycoprotéines porogènes, stockés dans des vésicules intracellulaires pourraient également être impliqués dans la pathogénèse de *N. fowleri*. En effet, ces protéines exercent une fonction cytotoxique vis-à-vis des cellules cibles, en ayant une activité de perméabilisation irréversible qui détruit la cellule. Par conséquent, le stockage et finalement la sécrétion de protéines capables de détruire les cellules cibles représentent un moyen d'autoprotection contre l'activité cytotoxique de certains facteurs. Les approches génomiques, transcriptomiques et protéomiques ont permis d'identifier 22 protéines pouvant être des facteurs de pathogénicité chez *N. fowleri*. La membrane est un emplacement clé, ainsi que le trafic vésiculaire qui en découle. (128)

II.7. Epidémiologie

Ces dernières années les cas de méningo-encéphalite amibienne primitive sont de plus en plus décrits et cela partout dans le monde. Aujourd'hui, tous les continents sont touchés mais on note que les cas de MEAP sont plus nombreux dans les pays tempérés et tropicaux, en raison des températures plus élevées (voir figure 51). Même si le nombre de cas reportés chaque année est en constante augmentation (voir figure 52), ces chiffres sont minimisés du fait qu'un examen post-mortem, confirmant la contamination, ne soit pas systématiquement réalisé. Comme nous l'avons vu précédemment, le mode de contamination principal de *N. fowleri* est l'exposition aux activités aquatiques, dans des eaux non ou insuffisamment traitées, ayant des températures élevées. Il s'agit notamment des étangs, lacs, rivières, piscines, sources géothermales et des eaux de rejets industriels. (129)

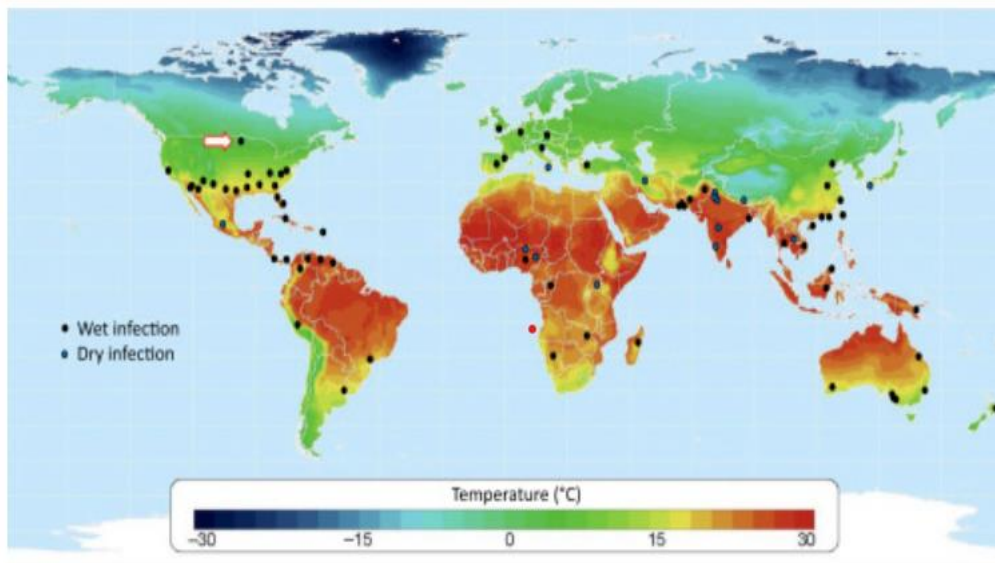


Figure 51 : Répartition mondiale des cas de MEAP. (46)

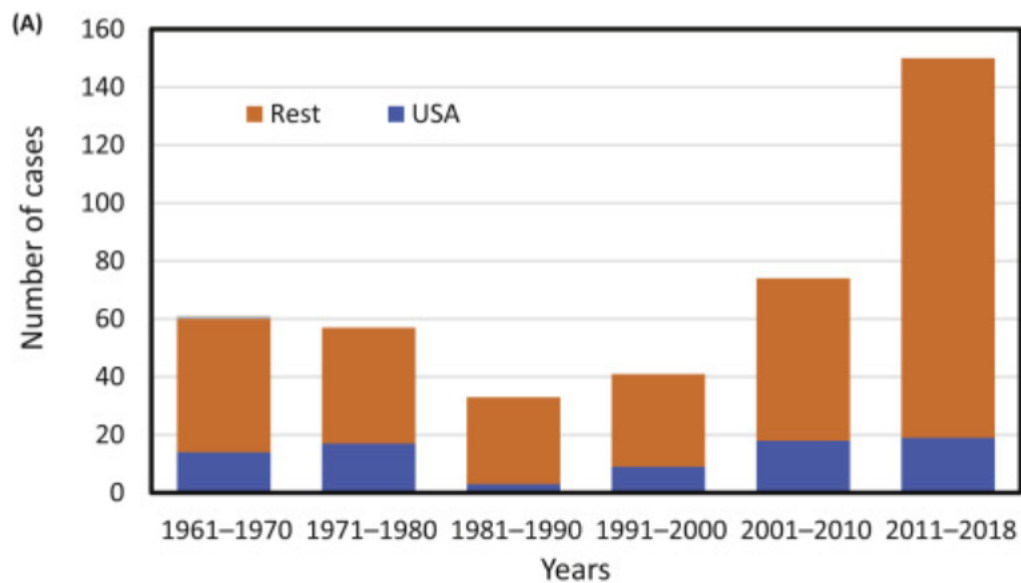


Figure 52 : Nombre de cas de MEAP entre 1961 et 2018 aux USA et dans le reste du monde. (46)

En 1965, en Australie, le premier cas de contamination par *N. fowleri* a été suspecté. En 1966, trois cas ont été décrits en Floride et depuis le nombre annuel d'infections aux États-Unis est en moyenne de 8 cas. Ce nombre est d'autant plus élevé que les températures de l'air et de l'eau sont importantes, comme c'est le cas les années de canicule. L'incidence des rapports montre une tendance à la hausse après les années 2000 dans le reste du monde, alors que le rapport américain montre une augmentation moins marquée (Figure 52). Au Japon et en Thaïlande, l'amibe a été isolée dans des zones de baignade fréquentées par les touristes; en Italie, dans des zones aquatiques, notamment le long de certaines rivières; en

Belgique, Ex-Tchécoslovaquie, en Nouvelle Zélande et en Angleterre dans des piscines et des ruisseaux; dans le sud des Etats Unis, dans des lacs chauds d'eau douce, et en Guadeloupe dans les eaux chaudes de Dolé. Le 12 Juillet 2019, à la suite d'une baignade dans un parc aquatique de la Caroline du nord, *N. fowleri* a fait une victime de 59 ans. Le 8 septembre 2019 une petite fille de 10 ans est décédée de MEAP après s'être baignée dans un cours d'eau au Texas. Le dernier cas rapporté date du 8 septembre 2020, date à laquelle l'amibe mangeuse de cerveau a tué un jeune garçon de 6 ans, qui avait bu l'eau du robinet contaminée à Lake Jackson au Texas. (136 –138)

Les sujets les plus exposés sont les enfants et les jeunes adultes (figures 53 et 54). Cela peut s'expliquer par le fait que la lame criblée, partie de l'os ethmoïde du crâne, est relativement plus poreuse chez les jeunes sujets, facilitant ainsi l'infection. L'âge médian des cas répertoriés dans ce rapport est de 13 ans. Les infections sont le plus souvent observées chez des individus de sexe masculin mais plusieurs cas de contamination chez des sujets féminins de tous âges ont également été rapportés. (46,133,134)

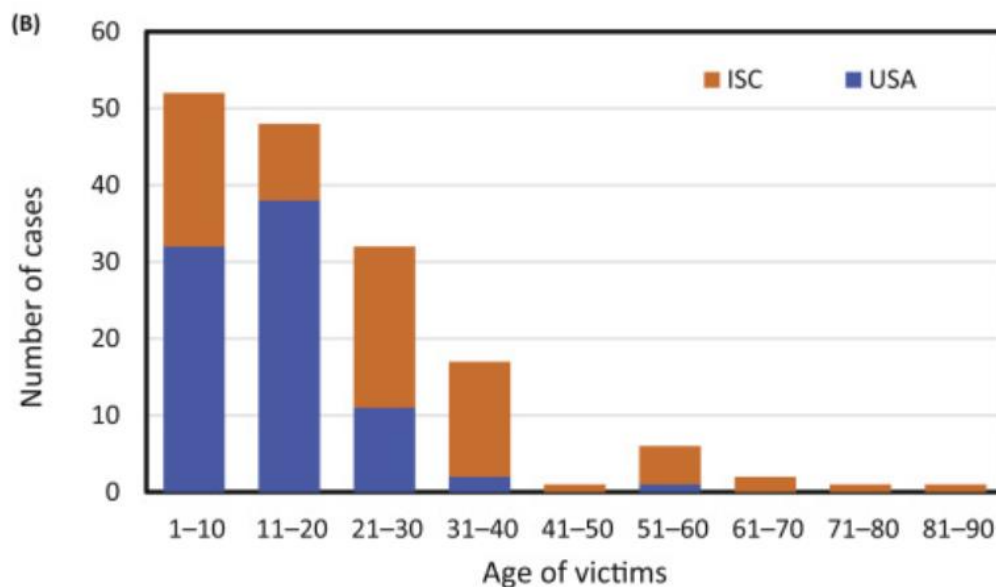


Figure 53 : Profil d'âge des patients ayant développé une MEAP aux USA et au niveau du sous-continent indien. (46)

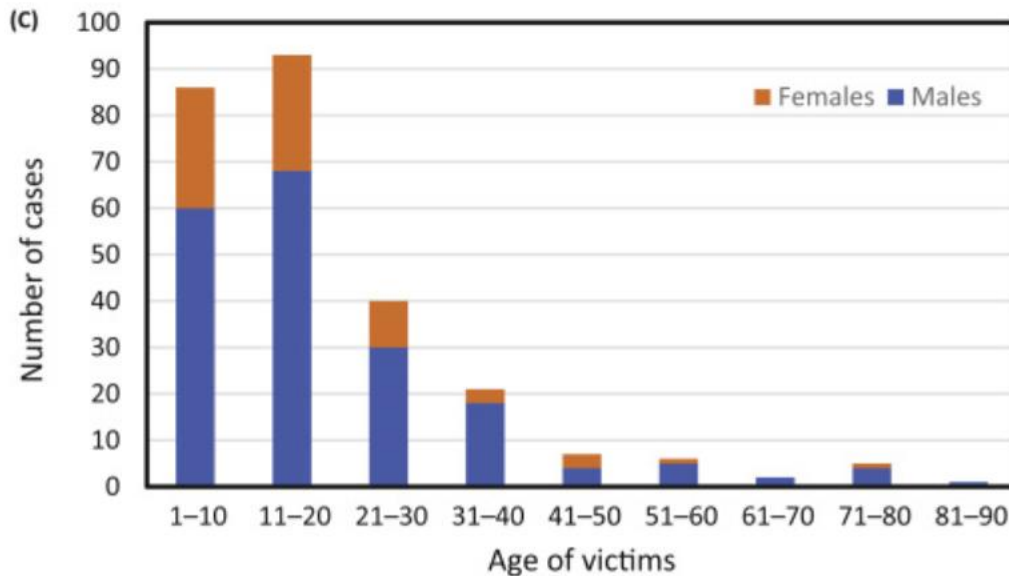


Figure 54 : Nombre de cas de MEAP en fonction de l'âge et du sexe. (46)

II.8. Pathologie : la méningo-encéphalite amibienne primitive (MEAP)

II.8.1. Physiopathologie

L'amibe mangeuse de cerveau est un pathogène, non opportuniste, qui se développe généralement chez des personnes jeunes, entre 1 et 20 ans, en bonne santé. Comme vu précédemment, la contamination s'effectue au cours d'une activité aquatique (figures 55 et 56), dans des eaux chaudes. *Naegleria fowleri* est alors responsable de la méningo-encéphalite amibienne primitive (MEAP), qui est seule pathologie attribuable à cette amibe libre. Il s'agit d'une pathologie aiguë, extrêmement grave, qui progresse très rapidement, causant d'importants dommages cérébraux irréversibles et entraînant le décès du patient en quelques jours seulement.

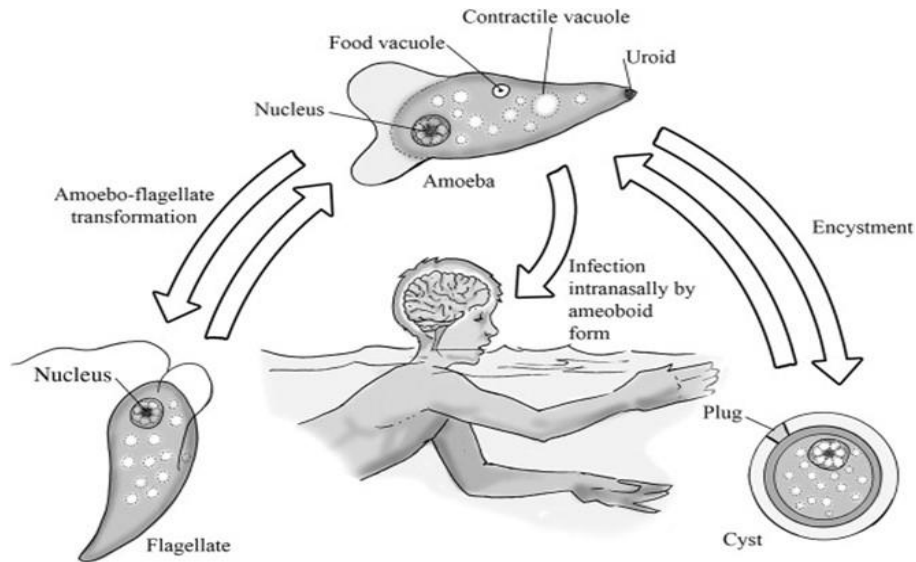


Figure 55 : Cycle de vie *N. fowleri* et mode de contamination. (90)

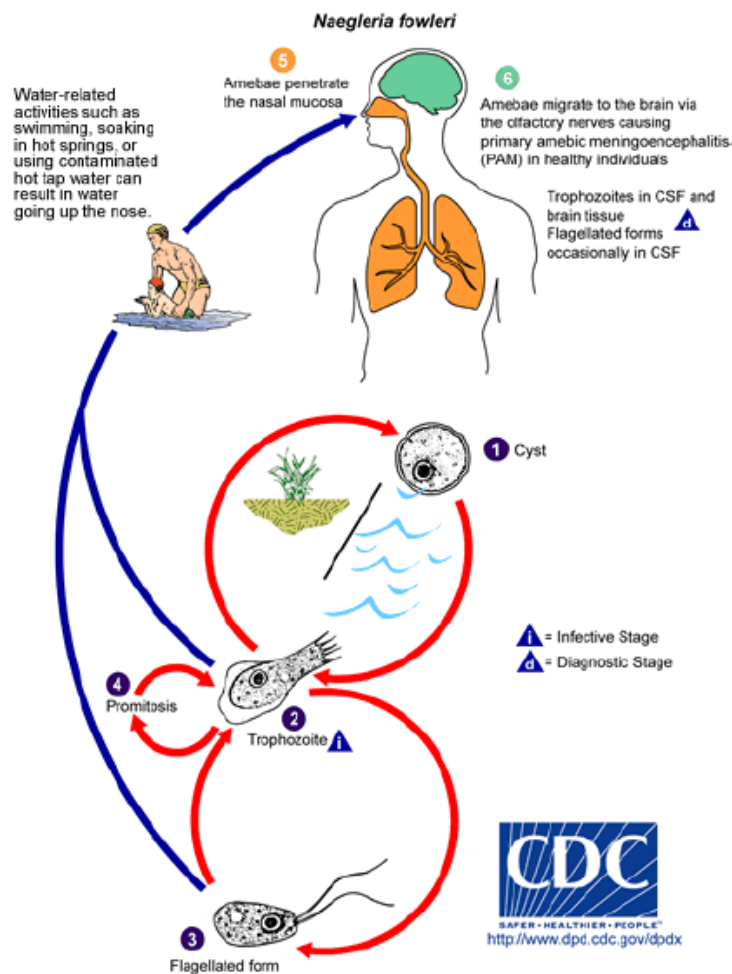


Figure 56 : Pathogénèse et cycle de vie *Naegleria fowleri* (135) :

1) forme kystique, 2) forme trophozoïte, 3) forme flagellée : stade infectieux de l'amibe, parfois la forme flagellée, 4) pro-mitose, 5) infection des nageurs par pénétration au niveau du tissu nasal, 6) migration vers le cerveau, 7) via les nerfs olfactifs entraînant une MEAP.

Dans un premier temps, à la suite d'une exposition à de l'eau contaminée, *N. fowleri*, et plus particulièrement la forme trophozoïte, plus rarement la forme flagellée, infecte l'homme en pénétrant par le nez. Suite à la pénétration des trophozoïtes au niveau du neuroépithélium olfactif, ceux-ci vont se fixer à la muqueuse, migrer le long du nerf olfactif, puis traverser la lame criblée de l'os ethmoïde du crâne. Ensuite, ils vont atteindre les bulbes olfactifs, plus particulièrement l'espace subarachnoïdien où l'on retrouve le liquide céphalorachidien, puis diffuser à l'encéphale. Dans le cerveau, *N. fowleri* se multiplie de manière fulgurante provoquant ainsi une nécrose hémorragique. La pathogénicité de *N. fowleri* dépend de la libération de molécules cytolytiques, tels que les phospholipases, les hydrolases acides, les neuraminidases, et des enzymes phospholipolytiques, jouant un rôle important dans la destruction des cellules nerveuses de l'hôte.

Une fois que les bulbes olfactifs sont atteints, une réaction immunitaire innée, première ligne de défense contre des agents pathogènes, avec mobilisation de polynucléaires neutrophiles et macrophages se met en place. La réaction inflammatoire aigue ainsi déclenchée conduit à la production de cytokines pro inflammatoires responsables de la vasodilatation et donc du gonflement du cerveau. L'augmentation de la pression intracrânienne empêche alors la connexion entre le cerveau et la moelle épinière à l'origine du dysfonctionnement de certaines parties du corps, et notamment du système respiratoire. (figure 57) (136)

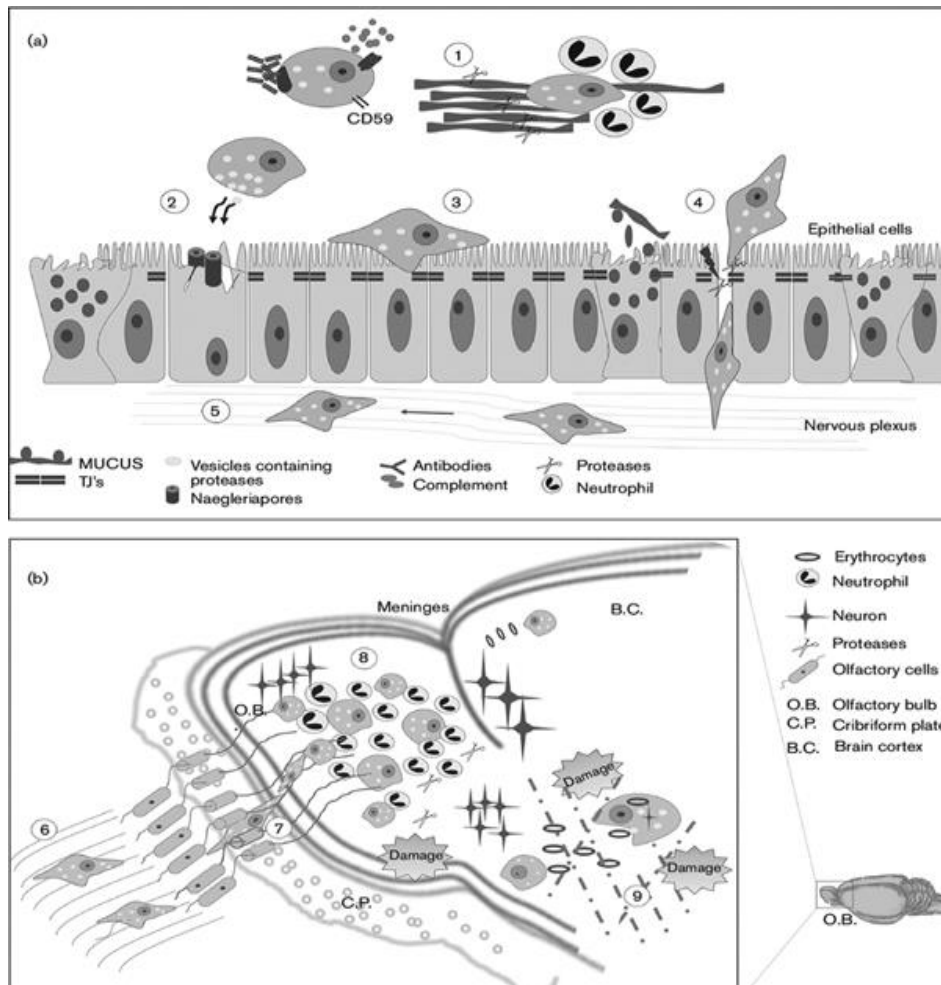


Figure 57 : Schéma de l'infection à *N. fowleri* (91) :

1) mise en place de la réponse immunitaire innée, 2) cytotoxicité de contact, 3) adhésion aux cellules épithéliales, 4) invasion du neuroépithélium, 5) déplacement vers les bulbes olfactifs, 6) migration le long du nerf olfactif, 7) amibe traversant la lame criblée, 8) prolifération de *N. fowleri* dans l'espace subarachnoïdien et réaction inflammatoire dans les bulbes olfactifs, 9) lésions tissulaires du cortex cérébral : hémorragie, phagocytose, libération de protéases.

C'est la combinaison de la cytotoxicité des trophozoïtes, l'infiltration du système immunitaire de l'hôte par les phagocytes, et la libération des cytokines pro-inflammatoires qui est à l'origine des lésions nerveuses et tissulaires de l'encéphale, entraînant la mort en quelques jours seulement. (135,137)

II.8.2. Clinique

La méningo-encéphalite amibienne primitive est une infection et une inflammation grave du système nerveux qui conduit à la destruction des tissus cérébraux. Au début de l'infection, les signes cliniques sont fortement similaires à ceux d'une méningite bactérienne.

La période d'incubation, période allant de l'inoculation du parasite jusqu'au développement des premiers symptômes, oscille entre 1 à 16 jours.

La phase d'invasion est d'apparition soudaine. On note la présence de maux de tête, nausées, vomissements, fièvre, irritabilité avec parfois maux de gorge, nez qui coule et troubles du comportement.

La phase d'état se caractérise par de très fortes céphalées, prédominant en localisation bifrontales ou bitemporales, ainsi qu'une forte fièvre entre 39 et 41°C, aboutissant à une hyperthermie. Durant cette période, on observe également une raideur de la nuque, une photophobie, des nausées et des vomissements en projectile provoqués par une augmentation de la pression intracrânienne. Une altération du goût, de l'odorat, une léthargie accompagnée de confusion, des convulsions pouvant aboutir au coma et traduisant une atteinte cérébrale diffuse ainsi qu'une atteinte des nerfs crâniens sont des symptômes fréquemment retrouvés.

L'évolution est extrêmement rapide. En effet, le décès par arrêt cardiorespiratoire survient généralement au bout de 5 à 10 jours. C'est pour cette raison, qu'un diagnostic précoce est indispensable, afin d'initier une prise en charge immédiate. (98,138)

L'étude sur le diagnostic, l'évolution clinique et le traitement de la MEAP aux Etats-Unis parue dans le « Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society », a montré des résultats cohérents avec nos propos. En effet, lors de cette étude consistant à déterminer les manifestations cliniques de 89 personnes hospitalisées, on retrouve la survenue précoce ou tardive de différents symptômes présentés dans le tableau 6. (138)

Tableau 6 : État clinique lors de la présentation initiale à un établissement de santé pour les patients atteints de MEAP (N = 89). (138)

	Survenu précoce	Survenu tardif	Nombres de patients atteints N (89)
Symptômes pseudo grippaux unique	x		25
Mal de crane	x		82
Nausée	x		58
Fièvre	x		75
Fatigue	x		14
Mal d'oreille	x		2
Raideur de la nuque		x	64
Léthargie		x	33
Confusion		x	26
Anorexie		x	22
Irritation		x	11
Photophobie		x	10
Somnolence		x	8
Saisie		x	8
Vision floue/ hallucination		x	4
Myalgie		x	4
Anomalie des nerfs crâniens		x	4
Réflexes tendineux anormaux		x	3
Trouble de la marche		x	2

II.8.3. Diagnostic

Dans la majorité des cas, c'est lors de l'autopsie que sont détectés les MEAP. Comme nous venons de le voir, l'évolution de la maladie étant sombre et extrêmement rapide, un diagnostic précoce est essentiel. Les symptômes de la MEAP étant très similaires à ceux de la méningite bactérienne et de l'encéphalite amibienne granulomateuse, infection progressive et chronique du SNC, il est indispensable dans un premier temps de rechercher un éventuel contact avec de l'eau contaminée, et cela dans les 1 à 16 jours précédant les symptômes. Le scanner encéphalique met en évidence un œdème cérébral diffus. Ensuite, plusieurs examens peuvent être réalisés afin de confirmer la pathologie. (139)

II.8.3.1. Examen microscopique

Dans l'urgence, le diagnostic de certitude consiste à rechercher les trophozoïtes de *N. fowleri* dans le LCR, avec des microscopes à contraste de phase puissants, car les trophozoïtes peuvent être confondus avec des polynucléaires neutrophiles (voir figure 58).

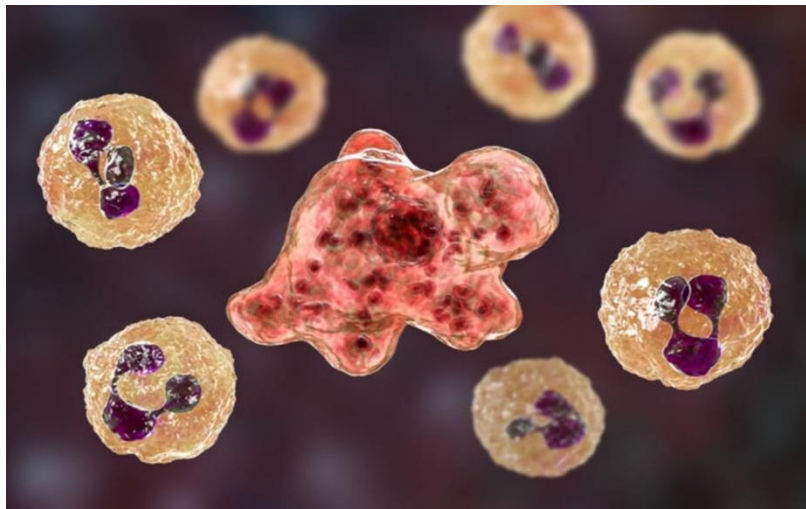


Figure 58 : Illustration du trophozoïte de *N. fowleri* dans le LCR, entouré de polynucléaires neutrophiles. (140)

L'examen direct et immédiat du LCR doit être réalisé en première intention. Pour réaliser cet examen entre lame et lamelle, le LCR doit être conservé au repos durant 5 minutes, à température ambiante, ou subir une centrifugation afin de concentrer les amibes. A l'examen direct, les trophozoïtes mobiles avec leurs pseudopodes peuvent alors être observés (figure 59).

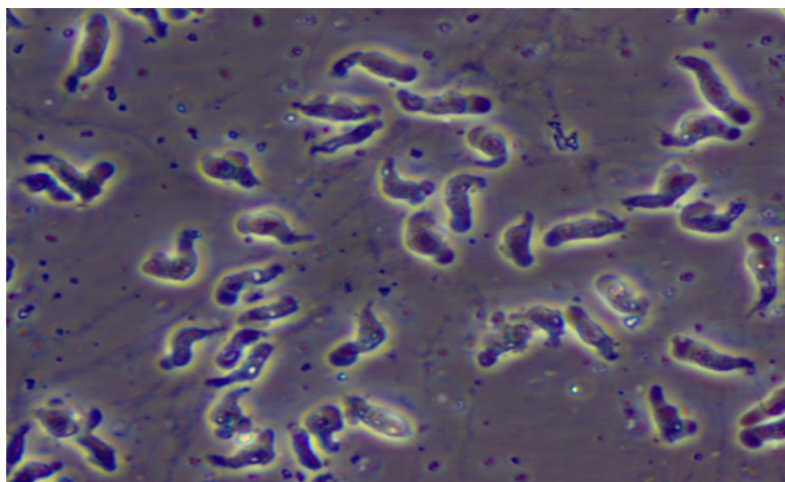


Figure 59 : Photo de trophozoïtes de *Naegleria fowleri* cultivés à partir du LCR d'un patient atteint de MEAP. Microscope à contraste de phase. Grossissement, x600. (138)

Le LCR observé a un aspect purulent, blanc jaunâtre, parfois hémorragique. En début d'infection, le nombre de globules rouges est d'environ $250/\text{mm}^3$ et plus on progresse dans la maladie, plus ce nombre augmente, pouvant aller jusqu'à $25\ 000/\text{mm}^3$. Il en est de même pour les globules blancs, principalement les polynucléaires neutrophiles, qui voient leur nombre varier de $300/\text{mm}^3$ à $26\ 000/\text{mm}^3$. Le taux de glucose présent dans le LCR est faible, souvent inférieur à $0,1\ \text{g/l}$ alors que le taux de protéines est élevé, entre 1 à $10\ \text{g/l}$. (98,141)

L'examen microscopique du LCR, sur étalement fixé et coloré au May-Grünwald-Giemsa, Wright-Giemsa ou au trichrome, permet également l'identification des trophozoïtes de *N. fowleri*. L'amibe peut être facilement différenciée des cellules de l'hôte par le noyau avec son gros nucléole placé au centre (figure 60). Cet examen n'est normalement pas demandé lors d'une simple méningite, mais dans le cas d'une infection aquatique par *N. fowleri*, ce test simple pourrait sauver la vie des patients infectés, d'où l'importance de l'écoute et du questionnement du patient par les professionnels de santé. (88,142)

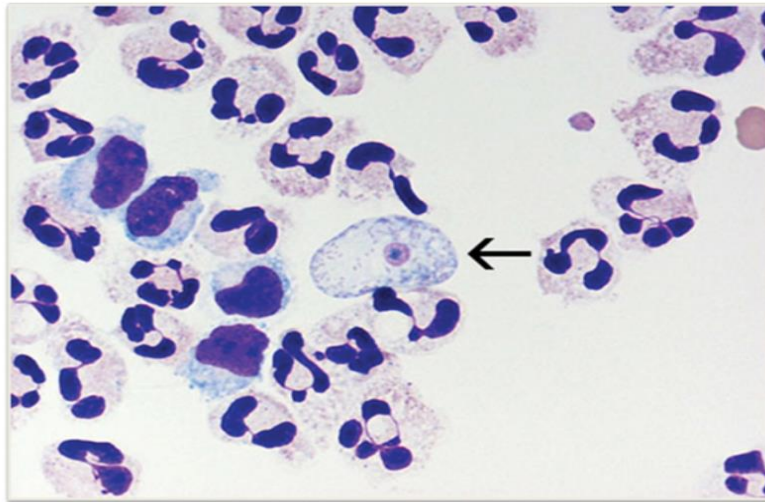


Figure 60 : Liquide céphalo-rachidien montrant un trophozoïte de *N. fowleri* (flèche), coloré avec Giemsa-Wright, parmi des polynucléaires neutrophiles et quelques lymphocytes, Grossissement x1000. (138)

De même, l'étude du LCR après mise en culture sur des milieux spécialisés, notamment une gélose non nutritive, en présence de bactéries, avec une incubation à 37°C, durant 1 à 5 jours, peut être envisagée pour mettre en évidence les trophozoïtes de l'amibe. Le développement des amibes se faisant aux dépens des bactéries, il est possible de cultiver *N. fowleri* en lui donnant pour substrat une culture de colibacilles, comme *Escherichia coli* ou *Enterobacter*. L'amibe va alors phagocyter la bactérie, laissant des plaques claires. Ces plaques peuvent alors être extraites à l'aide d'une boucle de prélèvement stérile, puis examinées au microscope. Les trophozoïtes sont ainsi observables mais cette méthode est longue, difficilement réalisable et la plupart des laboratoires cliniques ne sont pas équipés pour effectuer une telle procédure. Néanmoins, elle peut être utilisée comme test de confirmation de l'infection par *N. fowleri*. (141)

Afin de mettre en évidence l'amibe, le test de flagellation, peut aussi être réalisé. En effet, *N. fowleri* se différencie des autres amibes par la capacité de transformation de sa forme trophozoïte, au contact de l'eau distillée, en forme flagellée. Cette méthode simple consiste à découper un morceau de gélose contenant les trophozoïtes présents dans le LCR puis à le laisser incuber dans 0,5 mL d'eau distillée à 37°C, pendant 2 à 4h. Ce test provoque la flagellation des amibes et un mouvement hélicoïdal confirmant la présence de *N. fowleri* est alors observable au microscope (figure 61). (138)

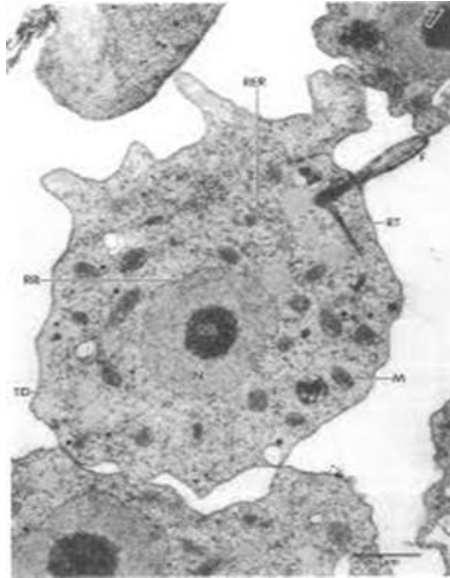


Figure 61 : Test de flagellation après 100 min d'incubation dans l'eau distillée (143) :
 (F) flagelle, (M) mitochondrie, (N) noyau, (NL) nucléole, (RB) ribosome, (RER) réticulum endoplasmique, (RT) racine du flagelle.

II.8.3.2. Sérologie

Les tests sérologiques ne s'avèrent pas très utiles dans le diagnostic de MEAP. En effet, la maladie progresse tellement rapidement que l'organisme du patient n'a pas le temps de développer une réponse immunitaire adéquate. (144)

Néanmoins, la présence de *N. fowleri* peut être recherchée grâce à la détection d'immunoglobulines, apparaissant le plus souvent une semaine après l'infection. La technique d'immunofluorescence indirecte est le plus souvent utilisée. Il s'agit d'une méthode simple, basée sur l'utilisation d'un anticorps primaire monoclonal se fixant sur les antigènes et d'un anticorps secondaire polyclonal, fixé à une protéine fluorescente, qui possède une forte affinité pour l'anticorps primaire. La lecture s'effectue à l'aide d'un microscope à fluorescence et si l'antigène spécifique de *N. fowleri* est présent alors les anticorps vont se fixer et il y aura émission de lumière. Certains scientifiques ont documenté et analysé des productions d'anticorps spécifiques à *N. fowleri*.

La figure 62 nous permet de suivre l'évolution de la sérologie au fil du temps. On constate que les immunoglobulines M, qui constituent la première réponse de l'organisme face à un antigène, sont présents en grandes quantité chez les 2 patients ayant survécu à l'infection. On note que les individus ayant des activités régulières de baignade et d'activités sportives aquatiques possèdent également des IgM mais en quantité plus faible. On ne sait pas à l'heure actuelle si ces anticorps ont une activité protectrice mais la découverte de ces anticorps chez des sujets sains nous montre que l'infection par l'amibe mangeuse de cerveau peut être asymptomatique. (88)

Le test d'agglutination a aussi été utilisé lors de plusieurs études, notamment celle réalisée sur des échantillons de sérum obtenus chez des habitants contaminés, de Caroline du Nord, de Pennsylvanie et de Virginie. Il a été démontré la spécificité des anticorps pour les cellules de *Naegleria spp.*, et le fait que l'anticorps agglutinant était de la classe des IgM. (145)

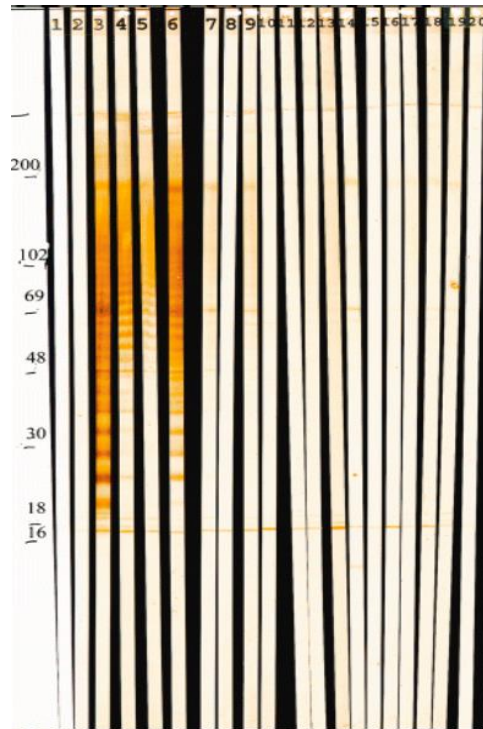


Figure 62 : Immunoblot montrant plusieurs bandes d'IgM dans le sérum de deux patients infectés par *Naegleria fowleri* mais ayant survécu, ainsi que celles de nageurs en bonne santé, en Californie et en Géorgie. (88)

L'Immunoblot ou Western Blot, méthode de recherche par immuno-empreinte, notant la présence et l'évolution de protéines spécifiques nous montre : piste 1, patient témoin; piste 3, échantillon de sérum provenant d'un patient californien contaminé mais ayant survécu; pistes 4 et 5, échantillons de sérum prélevés 6 mois et 4 ans plus tard, chez le même patient californien; piste 6, échantillon de sérum issu d'un patient de Caroline du Sud infesté et vivant ; pistes 2 et 7 à 20, échantillons de sérum obtenus auprès de nageurs californiens et géorgiens, ne présentant aucun symptôme. On constate alors que les transferts des protéines, pour les patients atteints de MEAP, montrent des bandes proéminentes représentant les anticorps IgM comme typiques des infections récentes. Au bout de 6 mois, le titre d'IgM diminue, et 4 ans plus tard la quantité d'anticorps a encore baissé mais est toujours détectable. Les faibles bandes d'IgM, apparaissent chez les nageurs non symptomatiques, indiquent une exposition à *N. fowleri*, mais avec une faible réponse humorale. (88,119)

II.8.3.3. Diagnostic moléculaire

Plus récemment, des techniques de biologie moléculaire ont été développées, afin d'établir un diagnostic fiable et rapide. La confirmation moléculaire de la MEAP est obtenue par la méthode de PCR (Polymerase Chain Reaction) en temps réel, à partir du liquide céphalorachidien ou de biopsies cérébrales. Il s'agit d'une méthode d'amplification d'un segment d'ADN, compris entre deux régions de séquences connues, par un procédé d'extension d'amorce. Il existe des amorces pour l'amplification spécifique des séquences nucléotidiques de *N. fowleri*, incluant le gène de l'ADNr 5,8S. En effet, les amibes possèdent deux ITS (Internal Transcribed Spacer = espaceur interne transcrit). Les séquences des amorces utilisées en PCR, pour l'identification de *N. fowleri* sont : pour l'ITS1, l'amorce NFITSFW correspond à la séquence TGAAAACCTTTTTTCCATTACAAAAAT et pour l'ITS2, l'amorce NFITSRV correspond à la séquence AATAAAAGATTGACCATTGAAA. Le séquençage de l'ADN amplifié avec les amorces spécifiques d'espèce permet ainsi de distinguer les différentes espèces, d'identifier précisément l'espèce responsable et donc de confirmer l'implication ou non de *N. fowleri* dans la pathologie. (voir tableau 7) (146)

Tableau 7 : Séquençage ITS1 de différents génotypes de *N fowleri*. (146)

Origine ou type	ITS1 séquence	Acc. N°
Cas guadeloupéen	ATGGTAAAAAAGGTGAAAACCTTTTTTATGGTAAAAAAGGTGTATGGTAAAAAAGGTGAAAACCTTTTTTCCATTACAAAAAT	ND
Euro-américain 1	ATGGTAAAAAAGGTGAAAACCTTTTTTATGGTAAAAAAGGTGTATGGTAAAAAAGGTGAAAACCTTTTTTCCATTACAAAAAT	<u>X96561</u>
Cas italien	ATGGTAAAAAAGGTGAAAACC-----TTTTTCCATTACAAAAAT	ND
Euro-américain 2	ATGGTAAAAAAGGTGAAAACC-----TTTTTCCATTACAAAAAT	<u>X96564</u>
Australien-Néo-Zélandais-Japonnais	ATGGTAAAAAAGGTGAAAACCTTTTTTATGGTAAAAA--GTGTATGGTAAAAAAGGTGAAAACCTTTTTTCCATTACAAAAAT	<u>X96565</u>

II.8.3.4. Diagnostic post-mortem

Ce sont les biopsies cérébrales, effectuées en post-mortem, qui vont permettre de confirmer le diagnostic.

Lors de l'autopsie on observe un important œdème cérébral (figure 63 D), une hypertrophie des méninges, la présence d'un exsudat purulent à la base du cerveau et du cervelet, ainsi qu'une nécrose hémorragique de l'ensemble du cortex.

L'examen microscopique de l'exsudat inflammatoire montre la présence de macrophages, polynucléaires éosinophiles et neutrophiles, ainsi que la présence d'une infiltration de *N. fowleri* dans les méninges et le parenchyme cérébral. (Figure 63 A et B) (10)

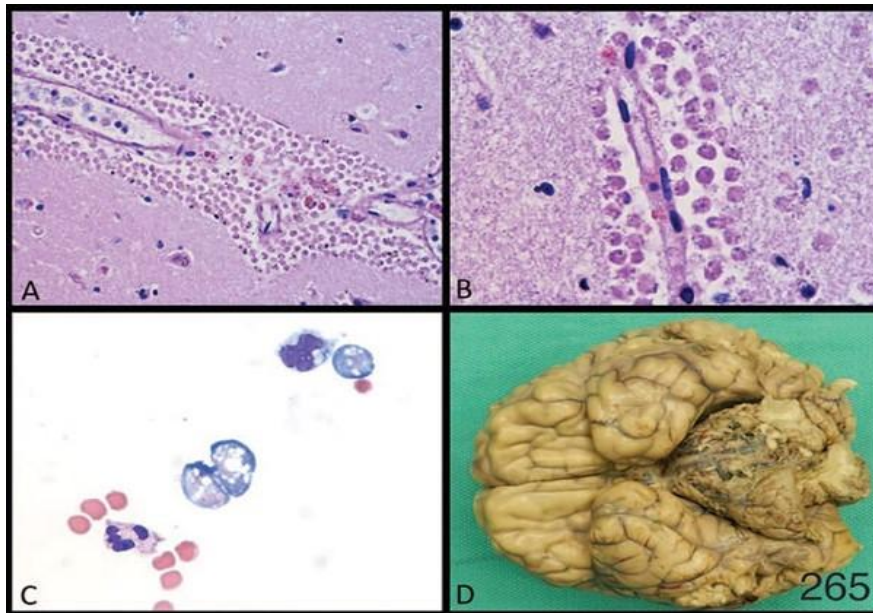


Figure 63 : Eléments permettant de diagnostiquer une infection à *N. fowleri* (136) :

A) et B) Examen post-mortem au microscope du SNC d'un patient infecté, révélant une infiltration de *N. Fowleri* dans les méninges et le parenchyme cérébral. C) L'analyse du LCR révèle la présence de *N. Fowleri*. D) Autopsie révélant des œdèmes cérébraux par Alexander T. Damron et al. 2016.

II.8.4. Traitement

Il faut savoir qu'à ce jour les essais cliniques évaluant l'efficacité d'un schéma thérapeutique par rapport à un autre n'existe pas ou sont très rares. Cela est du fait que les infections à *N. fowleri* chez l'homme restent exceptionnelles et leurs diagnostics difficiles. Ce sont donc des rapports de cas ou des études *in vitro* qui nous informent de l'efficacité des médicaments. Actuellement, c'est l'amphotéricine B, qui a été le plus régulièrement étudié et utilisée car c'est la molécule la mieux tolérée dans le traitement de l'infection à *N. fowleri*.

II.8.4.1. Amphotéricine B

Il s'agit d'un antibiotique, antifongique appartenant à la famille des polyènes, extrait de la culture de *Streptomyces rodosus*. Cette molécule agit par contact direct. En effet, en se fixant à l'ergostérol de la membrane cellulaire, elle crée un pore provoquant ainsi la lyse de la membrane et donc de l'amibe. Des études *in vitro* ont montré qu'une concentration d'amphotéricine B d'au moins 0,39 µg/mL était nécessaire pour supprimer complètement la prolifération des amibes (voir figure 64). Cependant, la concentration moyenne d'inhibition de la croissance bactérienne (CMI) relative à l'amphotéricine B pour tuer 100% des organismes était de 0,78 µg/mL. L'amphotéricine B, qu'elle soit intraveineuse ou intrathécale, est

devenue le traitement de référence et peut être utilisée seule ou en association avec d'autres thérapies. Les CMI de la formulation liposomale (AMBISOME®, médicament à prescription hospitalière) ou celle de l'ester méthylique étant significativement plus élevées pour inhiber la croissance de *N. fowleri* que celle de l'amphotéricine B, (FUNGIZONE®), le Centers for Disease Control and Prevention (CDC) recommande la formulation d'amphotéricine B conventionnel. (147,148)

La dose efficace à injecter par voie intraveineuse est de 1,5 mg/kg/jour en 2 doses fractionnées et ceci pendant 3 jours, suivies de 1 mg/kg/jour une fois par jour pendant 11 jours supplémentaires soit un total de 14 jours de traitement. Pour l'injection d'amphotéricine B intrathécale, la dose recommandée est de 1,5 mg/jour pendant 2 jours, suivie de 1 mg/jour pendant 8 jours supplémentaires soit un total de 10 jours de traitement. (137,141,149)

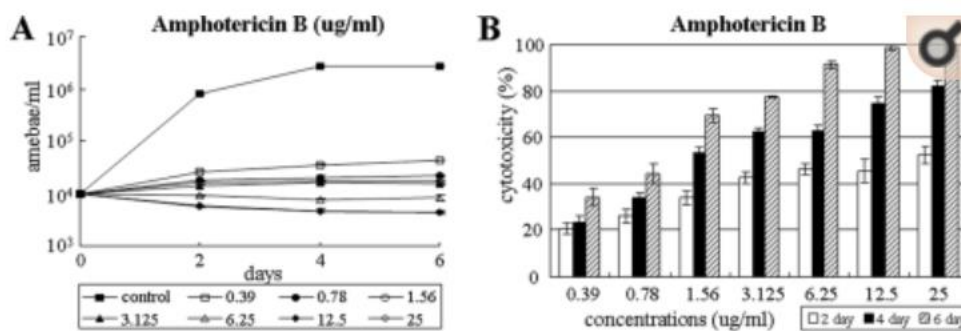


Figure 64 : Effet in vitro de l'amphotéricine B contre *N. fowleri* (150) :
 Courbe de croissance de *N. fowleri* évalué par un test de libération de LDH traitée à des concentrations de 0,39 à 25 µg/mL. La densité optique a été mesurée aux jours 2, 4 et 6, respectivement.

II.8.4.2. Miltéfosine

Cette molécule semble prometteuse. En effet, en 2013, deux patients infectés par *N. fowleri* ont survécu après avoir été traités par miltéfosine. Chimiquement, la miltéfosine est alkylphosphocholine. La molécule globale est amphiphile avec une queue aliphatique. Le mécanisme d'action rapporté de la miltéfosine est une action inhibitrice contre la protéine kinase B (PKB). La miltéfosine (IMPAVIDO® distribué aux Etats-Unis mais non commercialisé en France), est un anticancéreux en raison du rôle de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) et de la PKB dans la survie cellulaire. Il a démontré une biodisponibilité orale favorable (> 80%) chez les rongeurs et les chiens. La miltéfosine démontre un niveau élevé de liaison aux protéines plasmatiques (> 95%) et a également une large distribution tissulaire notamment au niveau du poumon, des glandes surrénales, rate et du foie. De plus, son utilisation lors de la MEAP due *N. fowleri* montre que la miltéfosine pénètre bien dans le SNC. (151)

La miltéfosine a montré une efficacité *in vitro* contre *N. fowleri*. Des études ont montré que l'amibe a survécu à des concentrations de 40 µg, mais pas à celle de 80 µg. Une concentration de 40 µg peut être considérée comme amibostatique c'est-à-dire inhibe le développement de l'amibe, tandis que des concentrations de 55 µg sont amoebicides, c'est-à-dire tue l'amibe (voir figure 65). La dose recommandée par la CDC est de 50 mg par voie orale deux à trois fois par jour avec une dose maximale de 1,5mg/kg/jour et cela durant 28 jours. (137,150)

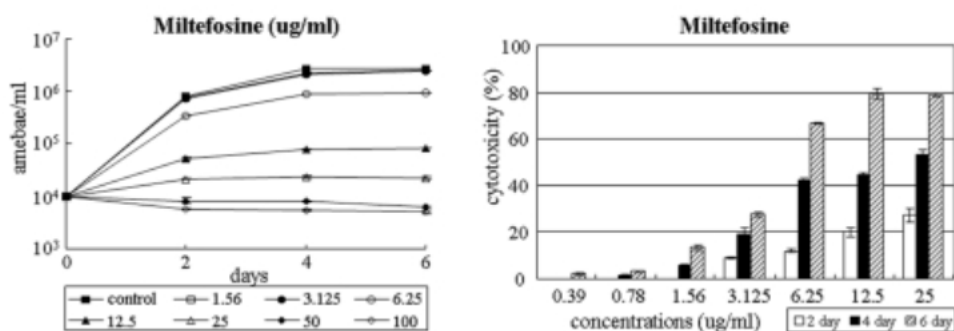


Figure 65 : Effet *in vitro* de la miltéfosine contre *N. fowleri* (150) :
 Courbe de croissance de *N. fowleri* évaluée par un test de libération de LDH traitée à des concentrations de 1,56-100 µg/mL. La densité optique a été mesurée aux jours 2, 4 et 6, respectivement.

II.8.4.3. Les thérapies adjuvantes :

Du fait de la haute gravité de la MEAP, l'utilisation d'une association de molécules doit être envisagée, comme le présente le tableau 8. En effet, cette étude nous montre que les deux personnes ayant survécu à une MEAP ont bénéficié d'une plurithérapie.

Tableau 8 : Exemple de cas signalés de MEAP entre 2013 et 2017 avec leurs stratégies de traitement et leurs résultats. (152)

Gender	Age	Outcome	Treatment	Location	Year of the Incident	Year of Publication
M	4	Death	Amphotericin B IV, fluconazole, rifampin, azithromycin, miltefosine	USA	2015	2017
M	14	Death	Amphotericin B IV/IT, fluconazole, rifampin, azithromycin, miltefosine	USA	2015	2017
M	12	Death	Amphotericin B IV, fluconazole, rifampin, azithromycin, miltefosine	USA	2013	2016
M	8	Survival	Amphotericin B IV, fluconazole, rifampin, azithromycin, miltefosine	USA	2013	2016
F	21	Death	Dead before accurate diagnosis	USA	2015	2016
F	12	Survival	Amphotericin B IV/IT, fluconazole, rifampin, azithromycin, miltefosine	USA	2013	2015
M	11	Death	Dead before accurate diagnosis	USA	2014	2015
M	4	Death	Dead before accurate diagnosis	USA	2013	2015
M	42	Death	Amphotericin B IV/IT	Pakistan	Not reported	2014
M	6	Survival	Amphotericin B, rifampin, fluconazole	India	Not reported	2014
M	10	Death	Rifampin, and vancomycin	USA	2009	2014
M	22	Death	Not reported	USA	2009	2014
F	16	Death	Amphotericin B, azithromycin, fluconazole, rifampin	USA	2011	2014
M	75	Death	Amphotericin B IV	Taiwan	Not reported	2013

II.8.4.3.1. Fluconazole

Le fluconazole (TRIFLUCAN®) est un agent antifongique apparenté à la famille des imidazolés. L'efficacité du fluconazole est certainement due à sa pénétration accrue dans le SNC. (153)

Il est surtout utilisé en association avec l'amphotéricine B car il a été démontré que l'ajout de fluconazole apporte un bénéfice supplémentaire au traitement. En effet, l'association fluconazole + amphotéricine B montre des effets synergiques sur l'éradication de l'infection à *N. fowleri* par le recrutement des polynucléaires neutrophiles, agents de premier plan de l'immunité innée. Le fluconazole est donc considéré comme un traitement d'appoint à l'amphotéricine B, chez les patients suspectés d'infection à *Naegleria fowleri*.

La dose recommandée par le CDC par voie intraveineuse est de 10 mg/kg/jour une fois par jour (dose maximale de 600 mg/jour) pour un total de 28 jours. (137)

II.8.4.3.2. Azithromycine

L'azithromycine (ZITHROMAX®), la forme injectable n'est pas disponible en France) est un antibiotique de la famille des macrolides. Il a été testée *in vitro* contre *N. fowleri* et a montré une suppression de plus de 90% de la croissance des amibes et cela à des concentrations de 10 et 100 µg/mL. (154)

Une étude *in vivo* chez la souris a montré que l'azithromycine administrée à une dose de 75 mg/kg/jour était nécessaire pour éviter la mort des souris infectées par *N. fowleri*. En effet, lors de cette étude, on observe que l'azithromycine à 25 mg/kg/jour a protégé 40% des souris et a significativement augmenté le temps moyen de survie des souris à 14,8 jours. En revanche la dose la plus élevée de 75 mg/kg/jour a protégé 100% des souris pendant toute la période d'observation de 28 jours. Toutes les souris témoins sont mortes, avec un temps moyen jusqu'à la mort de 7,5 jours. (Voir figure 66)

La dose recommandée par le CDC par voie intraveineuse est de 10 mg/kg/jour une fois par jour (dose maximale de 500 mg/jour) pendant 28 jours.(137,149)

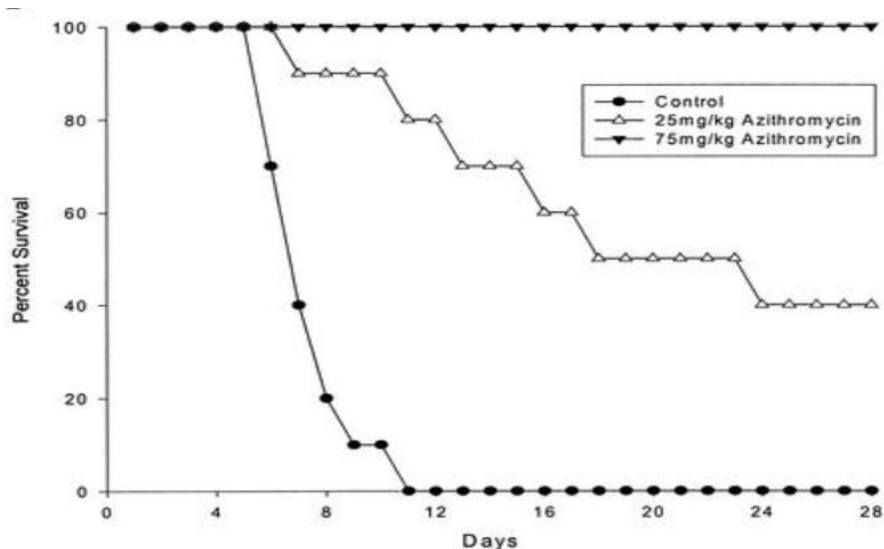


Figure 66 : Survie des souris traitées par azithromycine, après inoculation avec 2×10^4 *N. fowleri* (149) :

Azithromycine injectée une fois par jour, tous les jours. Les souris témoins ont reçu une solution saline stérile. Il y avait 10 animaux par groupe.

II.8.4.3.3. Rifampicine

La rifampicine (RIFADINE®) est un antibiotique antibactérien de la famille des rifamycines, généralement utilisé pour traiter certaines infections bactériennes dont la tuberculose. Son efficacité reste discutable car on ne sait pas si sa pénétration dans le SNC est suffisante. De nombreuses études contradictoires ont été réalisées et à ce jour, il n'existe aucune preuve étayant l'utilisation de la rifampicine à des doses standards pour le traitement de la MEAP. (137)

II.8.4.4. Autres molécules

D'autres molécules ont été étudiées pour le traitement de la MEAP comme notamment dans l'expérimentation de Jong Hyun Kim qui teste sept antibiotiques (clarithromycine, érythromycine, hygromycine B, néomycine, rokitamycine, roxithromycine et zéocine). Les effets de chaque médicament sur la viabilité et la croissance de *N. fowleri* ont été initialement étudiés *in vitro*. Les résultats ont montré que l'hygromycine B (antibiotique aminoside, non commercialisé en France) et la rokitamycine (antibiotique de la famille des macrolides, non commercialisé en France) étaient très efficaces en provoquaient une inhibition de la croissance de 100% à des concentrations respectives de 12,5 µg/mL et 6,25 µg/mL et ceci après 6 jours et en ayant une bonne activité amibicide. La roxithromycine (antibiotique de la famille des macrolides, RULID®) a maintenu l'inhibition de la croissance tout au long de la période expérimentale mais présente une activité amibicide faible. La clarithromycine

(antibiotique de la famille des macrolides, ZECLAR®), l'érythromycine (antibiotique de la famille des macrolides, ERYTHROCINE®), la néomycine (antibiotique de la famille des aminosides, pas de forme orale ni injectable en France) et la zéocine (antibiotique de type bléomycine, non commercialisé en France) n'ont quant à elles pas prouvé leur efficacité aux dosages testés. (155–161)

Des expériences ont été réalisées sur des souris en les traitants 3, 7 et 11 jours après l'infection; ceci afin de reproduire le contexte clinique des patients qui ne présentent les symptômes que plusieurs jours après l'infection (tableau 9). L'étude des résultats montre que le traitement par la rokitamycine conduit à un taux de survie de 80% chez les souris infectées par *N. fowleri* et ceci durant toute la période expérimentale. La roxithromycine montre un taux de survie de 25%. Bien que parmi les médicaments testés, l'hygromycine B présente la plus grande activité amoebicide contre *N. fowleri* in vitro (étude précédente), aucune souris infectée par *N. fowleri* et traitée avec cet antibiotique n'a survécu à la période expérimentale d'un mois. (137,150)

L'activité *in vitro*, *in vivo* et la faible toxicité de la rokitamycine en font un médicament potentiellement attractif dans le traitement du MEAP.

Tableau 9 : Survie et temps moyen avant la mort (MTD) de souris infectées par *N. fowleri* puis traitées avec divers médicaments. (150)

Groupe ^a	Nbre de souris	Nombre de souris survivantes (%) ^b	MTD (jours) ^c
Hygromycine B	20	0	15,9
Rokitamycine	20	16 (80)	16,8
Roxithromycine	20	5 (25)	16,2
Contrôle ^d	20	0	11,2

II.8.5. Pronostic

Naegleria fowleri est une amibe relativement commune dans les régions tempérées. Elle possède un très fort pouvoir pathogène, mais le nombre de cas rapportés jusqu'ici est relativement faible, environ 310 cas dont 145 aux États-Unis, entre 1962 et 2018, et un seul cas en France, chez un garçon de 9 ans en Guadeloupe. Bien que les cas rapportés soient relativement faibles, le nombre de morts est extrêmement important, environ 95%. En effet, les survivants de la méningo-encéphalite amibienne primitive sont rares puisque 11 cas seulement ont été jusqu'à présent publiés. Même l'administration d'un traitement adapté en urgence est le plus souvent suivie d'une évolution fatale car le diagnostic est difficile et la maladie évolue très vite. Le taux de létalité est donc effroyable. C'est pourquoi, la seule solution est de diagnostiquer le plus rapidement possible l'infection afin de pouvoir la traiter efficacement.(162)

III. Prophylaxie

III.1. Contamination lors de baignade

Comme nous l'avons vu précédemment, l'amibe mangeuse de cerveau est une amibe thermophile, qui se développe préférentiellement lorsque les températures sont supérieures à 27°C. On la retrouve naturellement dans des environnements contenant de l'eau douce chaude tels que l'eau géothermique, les rejets industriels d'eau chaude, les puits, les lacs, rivières et aussi les piscines mal entretenues se nourrissant des bactéries de cet environnement.

Il est donc important dans le cadre de notre étude, de décrire les différents types de baignades.

III.1.1. Typologie des baignades

Le terme baignade désigne les zones dans lesquelles se pratiquent des activités de bain comme la natation, le surf, le ski nautique, la plongée...

Plusieurs paramètres sont à prendre en compte pour classer les types de baignades : (163,164)

- La nature de l'eau de baignade : soit c'est une eau captée et captive, c'est-à-dire une eau dérivée d'une eau libre et maintenue artificiellement dans un espace clos ou soit une eau libre, c'est-à-dire une eau en constant renouvellement.
- La présence ou non d'un traitement de l'eau : la notion d'eau désinfectée et désinfectante est le paramètre permettant de distinguer une baignade d'une piscine. C'est ainsi qu'un bassin dont l'eau filtrée, désinfectée et désinfectante est considéré comme une piscine. Le terme « eau désinfectée » correspond à une eau dont les germes sont détruits et « eau désinfectante » correspond à une eau dont l'état de rémanence de désinfection persiste.
- L'organisation hydraulique de la baignade : on distingue les systèmes fermés avec recirculation de l'eau au sein de la zone mais sans ou peu de renouvellement et évacuation de l'eau, ou les systèmes ouverts avec un système d'apport et d'évacuation de l'eau mais sans recirculation de l'eau.

Grace à ces paramètres une typologie des baignades peut être proposée. (Voir figure 67)

Les baignades peuvent aussi être classées selon la température de l'eau et c'est ainsi que 4 classes d'eau peuvent être déterminées :

- Les eaux ayant une température inférieure à 25°C comme les rivières, les étangs, les lacs ou les piscines.
- Les eaux ayant une température supérieure à 25°C, d'origine géothermale comme rivières, étangs, les lacs.
- Les eaux ayant des températures supérieures à 25°C, chauffées de façon naturelle par le soleil comme les piscines, les lacs et les étangs.
- Les eaux ayant une température supérieure à 25°C, chauffées artificiellement par l'homme tel que les bains à remous et les piscines, ou par des rejets industriels.

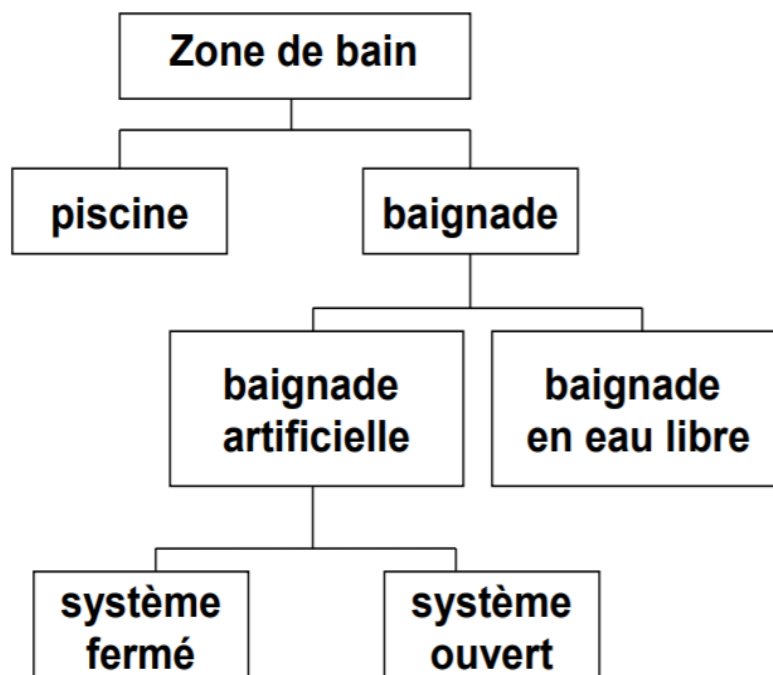


Figure 67 : Typologie des baignades. (164)

III.1.1.1. Baignades en piscines privées ou publiques

Une piscine est, selon l'article D1332-1 du Code de la santé publique, un « établissement ou une partie d'établissement qui comporte un ou plusieurs bassins artificiels utilisés pour les activités de bain ou de natation » ; et selon la commission P91L de l'Afnor, « une piscine est une installation comprenant principalement un ou plusieurs bassins artificiels, étanches, dans un lieu couvert et/ou de plein air, dans lequel se pratiquent des activités aquatiques et dont l'eau est filtrée, désinfectée et désinfectante, renouvelée et recyclée, ainsi que tous les équipements strictement nécessaires à son fonctionnement ». (164)

Les piscines classiques, ludiques ou thermales ainsi que les bassins de rééducation ou de cures sont considérés comme des piscines.

III.1.1.2. Baignades en eau libre

Ces baignades se pratiquent dans une masse d'eau de surface, naturelle et en constant renouvellement comme les rivières, les ruisseaux, les fleuves, les canaux, les étangs, le littoral... Ces sites peuvent être aménagés pour inciter à la baignade. Ils comprennent alors une ou des zones dans lesquelles les activités aquatiques sont autorisées et réglementairement encadrées.

Dans ce type de baignade, l'eau ne fait pas l'objet d'une recirculation et n'est pas traitée. Cependant, des modalités d'échantillonnage sont nécessaires pour le suivi de la qualité sanitaire de l'eau, notamment pendant les périodes estivales. C'est pourquoi le pH, la coloration de l'eau, l'odeur, la présence de matières flottantes, de résidus goudronneux, d'huile ou de graisse peuvent être étudiés. (164)

III.1.2. Baignades en bassins artificiels

Une baignade est dite artificielle lorsque l'eau est captée et maintenue captive grâce à une modification par l'homme du milieu naturel. Cette eau peut être traitée ou non par des techniques autres que la désinfection. L'Afsset propose la définition suivante : « Une baignade artificielle est une masse d'eau captée et maintenue captive à des fins de baignade, par une artificialisation du milieu naturel et/ou par l'utilisation d'un dispositif artificiel, traitée ou non par des procédés biologiques et/ou physico-chimiques, mais de qualité non désinfectée et désinfectante ». (164,165)

Parmi les baignades artificielles on retrouve :

- Les baignades artificielles à système fermé dont le renouvellement de l'eau et son évacuation vers le milieu extérieur sont peu importants (figure 68). Dans ce cas, l'eau est captée depuis une masse d'eau extérieure, est maintenue captive grâce au système d'artificialisation, puis re-circule dans la zone de baignade de manière artificielle. L'eau apportée est généralement faible par rapport à l'eau réutilisée dans le circuit. (164)

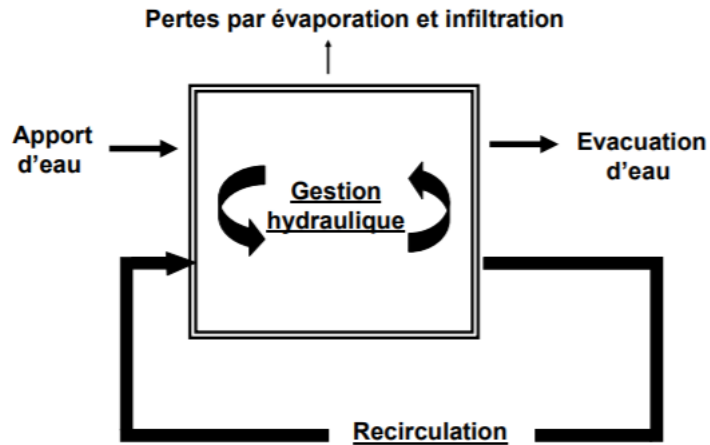


Figure 68 : Schéma de baignade en système fermé. (164)

- Les baignades artificielles à système ouvert dont la circulation et l'évacuation est fonction des aménagements (figure 69). Dans ce cas, la zone de baignade est alimentée en amont puis évacuée en aval. Le renouvellement de l'eau est alors assuré soit en continu comme pour les rivières, soit en discontinu comme pour les bassins à marée. Il n'existe pas de système de recirculation de l'eau au sein de cette zone. (164)

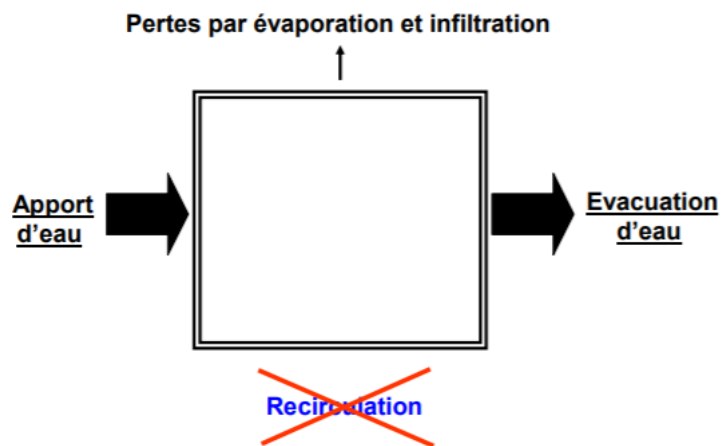


Figure 69 : Schéma de baignade en système ouvert. (164)

III.1.3. Typologie des baignades et finalité du dispositif de gestion du risque sanitaire

La connaissance des différents types de baignade, la caractérisation des dangers physico-chimiques et microbiologiques liés à la qualité de l'eau permettent d'identifier les risques sanitaires pour l'homme et de proposer des règles de gestion de ce risque (figure 70).

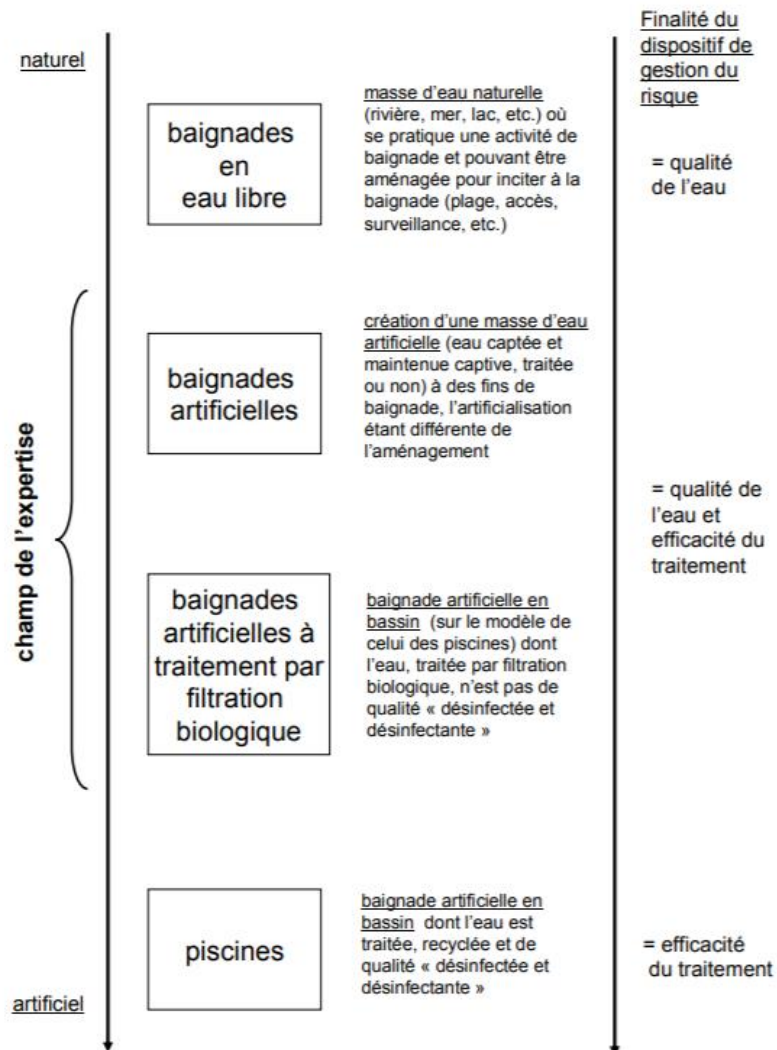


Figure 70 : Mise en place d'un dispositif de gestion du risque sanitaire en fonction de la typologie des baignades. (164)

III.1.4. Réglementation française

En Europe, l'encadrement juridique de la qualité des eaux de baignade en eau libre repose sur la directive européenne 2006/7/CE du Parlement européen et du Conseil du 15 février 2006, transposée en droit français dans le Code de la santé publique (CSP) en septembre

2008 aux articles : L 1332-1 à L 1332-9 pour la partie législative et D 1332-1 à D 1332-1332-13 pour la partie réglementaire. Les eaux de baignade sont également régies par l'article R 322-18 du code du sport. (166)

Les baignades en eau libre aménagées sont également régies par l'article R 322-18 du code du sport. (167)

Cette réglementation exclut :

- Les eaux artificielles
- Les piscines recevant du public
- Les piscines thermales.

La sécurité des baignades artificielles est soumise au décret n°2019-299 du 10 avril 2019. Afin de prendre en compte les risques spécifiques à chaque système, ces nouvelles règles différencient les baignades artificielles à système ouvert de celles à système fermé. (168)

La réglementation des piscines thermales, bassins présents dans un établissement thermal, alimentés par une eau minérale naturelle et utilisés à des fins thérapeutiques, est soumise au décret du 22 octobre 2013. (169)

En ce qui concerne les piscines, en France, elles font l'objet d'une réglementation spécifique. Les textes réglementaires applicables aux piscines privées et publiques, à usage collectif, sont définis aux articles du code de la santé publique L 1332-1 à L 1332-9 pour la partie législative et D 1332-1 à D 1332-1332-13 pour la partie réglementaire et par l'article R 322-18 du code du sport. (167,170)

Le code du sport s'applique également aux baignades aménagées. (Voir tableau 10)

Chaque année les textes en vigueur sont mis à jour. (168,171)

Tableau 10 : Textes réglementaires des différents types de baignade. (166,167,169,170)

Baignades en eau libre	Baignades artificielles à système ouvert et à système fermé	Piscines privées et publiques	Piscine thermale
<p>Directive européenne 2006/7/CE du Parlement européen et du Conseil du 15 février 2006</p> <p>CSP partie législative : L 13221 à L 1332-9</p> <p>CSP partie réglementaire : D 1322-14 à D 1332-13</p> <p>Pour les baignades aménagées code du sport : R 322-18</p>	<p>Décret n°2019-299 du 10 avril 2019</p>	<p>CSP partie législative : L 13221 à L 1332-9</p> <p>CSP partie réglementaire : D 1322-14 à D 1332-13</p> <p>Code du sport : R 322-18</p>	<p>Décret du 22 octobre 2013</p>

III.2. Méthodes de détection

En raison du risque de dissémination et de la sévérité de l'infection, les manipulations de l'amibe mangeuse de cerveau ne peuvent se faire que dans un laboratoire spécialisé.

III.2.1. Prélèvements

Plusieurs méthodes de prélèvement ont été utilisées afin de détecter la présence de l'amibe mangeuse de cerveau dans l'eau, les sédiments et les biofilms. De façon générale, les échantillons peuvent être prélevés en profondeur, au fond des bassins, à moins de 1 m de la surface ou en surface. Les échantillons d'eau sont collectés dans des récipients en verre ou en plastique (polypropylène), généralement stériles. L'échantillonnage des sédiments au fond des rivières, lacs...s'effectue à l'aide de bennes actionnées par un câble ou de tubes de centrifugation stériles. Les biofilms sont quant à eux, prélevés par grattage des parois et surfaces à l'aide d'écouvillons. Lors de ces recueils, le pH, la température, le taux d'oxygène dissous et la conductivité sont mesurés. Les prélèvements sont ensuite transportés dans de la glace ou à température ambiante et doivent être ensemencés le plus rapidement possible (délai de 2 à 4 h). Pour obtenir des résultats significatifs, certains auteurs précisent qu'en raison du phénomène de compétition existant entre *N. fowleri* et *N. lovaniensis*, il est

préférable d'effectuer un traitement de l'échantillon immédiatement après son prélèvement. (172,173)

Il n'existe donc pas de méthodes d'échantillonnage standardisées permettant d'acquérir un résultat fiable.

III.2.2. Mise en culture

D'une manière générale, la mise en culture de *N. fowleri* se fait après centrifugation ou filtration de l'eau prélevée. L'écouvillon, le culot ou les sédiments récupérés peuvent être déposés sur deux types de milieux :

- Sur des milieux de cultures xéniques : *N. fowleri* peut être facilement cultivée sur un milieu solide, notamment sur de la gélose d'agar non nutritive (NNA) ou faiblement nutritive (glucose 0,1%, peptone 0,05%, extrait de levure 0,05%), préalablement ensemencé de bactéries vivantes ou mortes qui vont servir de nourriture à l'amibe. Généralement, les bactéries utilisées sont *Enterobacter spp*, *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli*, car ce sont des bactéries non mucoïdes, ne produisant pas de mucus. En effet, le mucus est susceptible d'inhiber la phagocytose et par voie de conséquence il peut limiter la prolifération amibienne au profit de la prolifération bactérienne. (174,175)
- Sur des milieux de cultures axéniques : Les amibes libres peuvent être facilement cultivées sur un milieu nutritif axénique. Il s'agit d'un milieu de culture dénué de bactéries grâce à un ajout d'antibiotiques. On peut alors utiliser le milieu spécifique de type SCGYEM (calf serum-casein-glucose-yeast extract médium = sérum de veau fœtal, caséine, glucose et extrait de levure) auquel on rajoute de la pénicilline et de la streptomycine (voir tableau 11). Par la suite, d'autres milieux ont également été expérimentés, notamment le milieu de Chang qui est un milieu SCGYEM supplémenté d'extrait de foie et de sang de mouton. Le milieu de Cerva, quant à lui cultive les prélèvements dans un milieu composé de casitone (peptone fabriquée par digestion pancréatique de la caséine) et de sérum. Il s'agit d'un milieu beaucoup plus exigeant ne permettant pas la croissance de *N. gruberi* notamment. Un autre milieu celui de Nelson (glucose (1 g), digestion hépatique (2 g), sérum de veau fœtal (50 mL) et d'eau distillée (450 mL), à pH 6,5) a permis une bonne croissance de l'amibe mangeuse de cerveau. La croissance de l'amibe pathogène a été comparée dans plusieurs milieux de culture axénique (Chang, Cerva et Nelson), agités et non agités. Les résultats ont montré une croissance optimale de l'amibe dans le milieu de Nelson agité et dans le milieu de Cerva non agité. Lorsqu'on analyse ces deux milieux, on observe qu'ils sont plus faibles en nutriments organiques par rapport à celui de Chang. (174–176)

La mise en culture en milieu axénique est à éviter pour les prélèvements environnementaux, car la présence d'un milieu enrichi est favorable au développement d'autres amibes, de champignons ou de bactéries susceptibles d'inhiber la prolifération de *N. fowleri*. Le milieu recommandé est donc le milieu xénique telle que la gélose d'agar non nutritive recouverte d'une souche bactérienne notamment *Escherichia coli* (NNA-E). (177)

En parallèle, des différences quantitatives ont été rapportées sur la croissance de *N. fowleri*, lors de l'ajout de différents types de sérums au milieu Nelson. En effet, les sérums de veau,

de singe, de porc et de veau dialysés ont donné une croissance de 10^6 amibes/mL, tandis que les sérums de veau humanisés et foetaux, le liquide céphalo-rachidien ainsi que l'hémine ont donné des résultats plus décevants, avec une croissance de 5×10^4 à 1×10^5 amibes/mL. L'hypothèse émise est donc que la présence de fer dans les points d'eau pourrait être un facteur favorisant la croissance de *N. fowleri*. A noter que la virulence et la croissance de *N. fowleri* sont affectées par la température. En effet, lorsque la température atteint 30 à 37°C, la production d'amibes est plus importante et la souche plus virulente. (175)

Tableau 11 : Milieu spécifique SCGYEM pour la culture de *N. fowleri*. (175)

Composant	Amt ou concn
Biologique	
Caséine isoélectrique	10,0 g
Glucose	2,5 g
Extrait de levure	5,0 g
Sérum de veau foetal	100,0 ml
Pénicilline-streptomycine	200,0 µg / ml (chacun)
Eau distillée	900,0 ml
Tampon	
Na ₂ HPO ₄	1,325 grammes
KH ₂ PO ₄	0,8 g

Afin de limiter une perte de trophozoïtes et de kystes, les ensemencements directs, sans centrifugation ni filtration, sont recommandés. De plus, l'ensemencement direct des échantillons limite le phénomène de compétition amibienne pouvant survenir lors de la mise en culture. *Naegleria fowleri* étant une amibe thermotolérante, les températures d'incubation oscillent entre 42 et 45°C et la durée d'incubation varie de 2 à 9 jours. (177)

III.2.3. Dénombrement

Le dénombrement des amibes mise en culture peut se faire à l'œil nu ou en faisant une estimation de leur nombre le plus probable (NPP).

Après 48h d'incubation, la multiplication des amibes forme des auréoles ou front amibien dont l'extension s'effectue du centre vers la périphérie. L'observation au microscope à contraste de phase permet de surveiller la croissance de ces auréoles blanches opaques. Chaque auréole est considérée comme étant issue d'une amibe et est comptabilisée comme étant une unité qui forme une colonie. Cette méthode est rapide et simple.

Une autre méthode, celle du comptage par estimation du nombre le plus probable (NPP), s'appuie sur la loi de poisson. En effet, il s'agit d'une méthode d'estimation statistique du nombre d'amibes supposées distribuées dans l'eau de manière aléatoire. Cette estimation de la densité en micro-organismes est obtenue à partir de réponses positives observées pour plusieurs dilutions successives de la suspension initiale, dans des milieux de cultures adaptés. Après dilutions et culture, on compte donc le nombre de boîtes positives présentant un front amibien et on reporte ce nombre sur une table statistique NPP, créée à partir des règles de probabilité. Les résultats sont donnés avec un intervalle de confiance (95%). Cette méthode est peu précise mais très sensible.

Lorsque l'on réalise une filtration, la méthode préconisée est celle du dénombrement par détermination du NPP car le développement des fronts amibiens peut être dissimulé par le dépôt du filtre sur le milieu de culture. (126)

III.2.4. Identification

III.2.4.1. Identification par méthodes d'observation microscopique

Le test de flagellation est un indicateur permettant de démontrer l'appartenance au genre *Naegleria* car la forme flagellée est caractéristique du seul genre *Naegleria*. Il s'agit d'un test simple et rapide qui consiste à découper un morceau de gélose contenant les trophozoïtes (au niveau du front amibien) puis à le laisser incuber dans 0,5 mL d'eau distillée à 37°C, pendant 2 à 4 h. On peut également appliquer du tampon tris (produit synthétique = Tris(tris(hydroxyméthyl)aminométhane) pour laver la surface de la gélose puis récupérer les amibes afin de les laisser incuber entre 1 à 24 h, à 20 et 30°C. Ce test provoque la flagellation des amibes, et un mouvement hélicoïdal permettant d'affirmer la présence de *Naegleria* est alors observable au microscope. (142)

III.2.4.2. Identification par méthodes immunologiques

Les anticorps monoclonaux spécifiques à *N. fowleri* ont été analysés par plusieurs méthodes immunologiques. Notamment, par le test d'immuno-absorption enzymatique ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) et le test d'immunofluorescence.

III.2.4.2.1. Méthode d'immuno-adsorption enzymatique

Le test ELISA est couramment utilisé en immunologie pour détecter, dans un prélèvement, la présence d'anticorps produits par l'organisme afin de se défendre contre une infection. Ce test consiste à observer les réactions qui se produisent entre un antigène et un anticorps, grâce à une réaction colorée produite par un marqueur enzymatique préalablement fixé à l'anticorps. La présence de couleur permet de confirmer la présence de l'anticorps recherché et l'intensité de la couleur nous renseigne sur sa concentration. Il existe quatre types de test ELISA (figure 71) mais le plus utilisé est le test ELISA indirect (figure 72). (178)

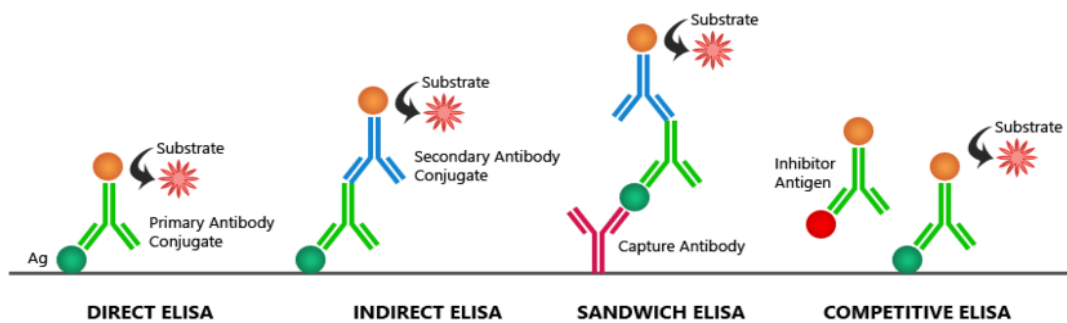


Figure 71: Différents test ELISA. (178)

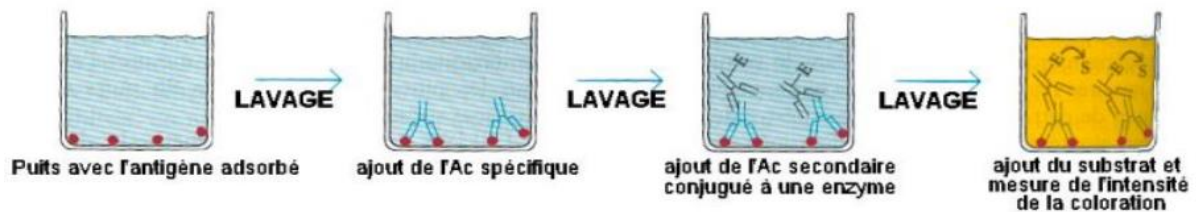


Figure 72: Principe du test ELISA indirect. (179)

La méthode ELISA a permis de mettre en évidence une réactivité des anticorps monoclonaux 3A4 et 5D12 spécifiquement dirigés contre les antigènes membranaires de l'amibe mangeuse de cerveau. Il est réalisé après mise en culture des échantillons sur une gélose non nutritive en présence de bactéries placées à 44°C durant 3 à 6 jours. Il s'agit d'un test très intéressant car il possède deux avantages non négligeables. En effet, d'une part il permet de détecter avec une grande sensibilité (97%) les formes trophozoïtes, flagellées et kystiques de *N. fowleri*. D'autre part, il possède une importante spécificité (98%) puisqu'il ne détecte pas certaines amibes libres comme *Acanthamoeba*, *Hartmannella* ou les formes non pathogènes de *Naegleria*. Il s'agit donc d'une méthode fiable, rapide et considérée comme un outil essentiel à la détection de l'amibe *N. fowleri* dans les échantillons. (180,181)

III.2.4.2.2. Méthode d'immunofluorescence couplé à la cytométrie en phase solide

La méthode traditionnelle d'immunofluorescence est une méthode qui se base sur un processus de marquage. En effet, on utilise un anticorps couplé à un fluorochrome dirigé contre un antigène. Cette technique permet de déterminer si oui ou non une protéine spécifique est présente dans l'échantillon, en fonction de la fluorescence émise (voir figure 73).

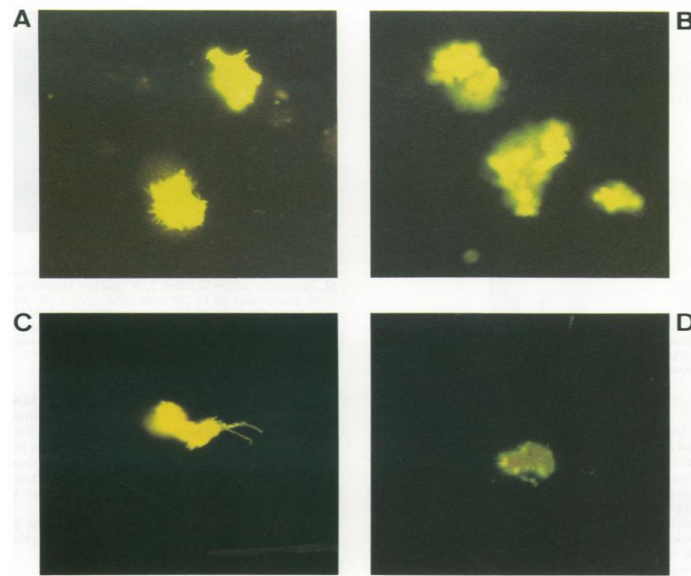


Figure 73 : Observation lors d'un test d'immunofluorescence classique de la présence de trophozoïtes de *N. fowleri* (181) :

(Figure A : avec l'anticorps monoclonal 3A4, figure B : avec l'anticorps monoclonal 5D12), puis observation des formes flagellées de *N. fowleri* (figure C : avec les anticorps monoclonaux 3A4, figure D : avec les anticorps monoclonaux 5D12).

Bien que cette technique soit rapide, fiable et facile d'utilisation, elle possède une faible sensibilité quantitative qui ne permet pas la détection de l'agent pathogène lorsque celui-ci est présent en faible quantité. C'est pour cela qu'une nouvelle méthode basée sur l'immunofluorescence a été combinée à une détection par cytométrie en phase solide. Ce procédé permet alors de détecter de façon rapide, précise et sans mise en culture une petite concentration d'amibes dans l'échantillon. C'est la seule méthode pouvant dénombrer précisément une concentration en amibes extrêmement faible (la présence d'une seule amibe pouvant être détectée).

Le principe repose sur l'utilisation d'un anticorps monoclonal spécifique, le 5D12 couplé à la biotine. *Naegleria fowleri* est détectée grâce à la fixation de la biotine à la streptavidine marquée avec deux fluorochromes (RPE-Cy5 = R-PhycoErythrine et Cyanine). (Voir figure 74) (181,182)

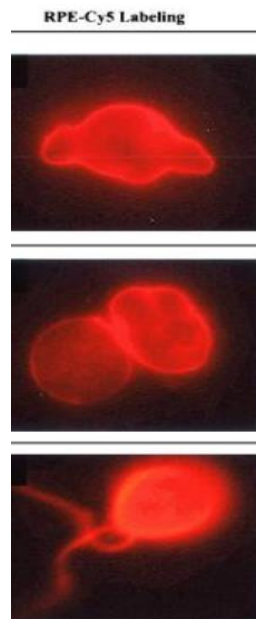


Figure 74 : Observation au microscope épifluorescent de *N. fowleri* à la suite d'une coloration par immunofluorescence couplé à la cytométrie de flux solide avec les fluorochromes RPE-Cy5 (182) : (en haut : forme trophozoïte, au centre : forme kystique, en bas : forme flagellée).

III.2.4.3. Identification par méthodes biochimiques

Toutes les espèces du genre *Naegleria* sont morphologiquement identiques. C'est pourquoi, plusieurs méthodes biochimiques ont été développées afin de réaliser des diagnostics spécifiques de *N. fowleri*. Il s'agit notamment de techniques basées sur la caractérisation d'isoenzymes et la séparation électrophorétique. Ces méthodes nécessitent au préalable une mise en culture des prélèvements ainsi qu'une purification des souches.

Les méthodes biochimiques révèlent le polymorphisme des séquences de certaines protéines. C'est ainsi que l'étude du polymorphisme enzymatique de l'aspartate aminotransférase a permis de faire une distinction entre *N. fowleri* et *N. lovaniensis*. De même, la différenciation entre *N. fowleri* et *N. gruberi* a été effectuée par l'étude du polymorphisme des estérases.

Une autre méthode s'est également révélée particulièrement efficace pour distinguer *N. fowleri*. Il s'agit de la focalisation isoélectrique ou isoélectrofocalisation (IEF = Isoenzyme Electrophoretic Focusing) qui sépare les protéines par électrophorèse en appliquant un gradient de pH. En effet, les protéines sont séparées les unes des autres en fonction de leur point isoélectrique (pH spécifique pour lequel une molécule ne possède aucune charge électrique nette). Certains auteurs ont étudié par IEF les modèles isoenzymatiques de plusieurs souches de *Naegleria*, sur des gels polyacrylamides, pour différentes activités enzymatiques (figure 75). Les résultats ont montré que les trois souches pathogènes de l'amibe mangeuse de cerveau partagent un modèle identique pour l'ensemble des enzymes testées sauf pour la glucose-6-déshydrogénase. En effet, pour les cinq enzymes (LAP, LDH,

PE, GPI et AP), les souches pathogènes de *N. fowleri* ont montré une grande homogénéité, nettement distincte des autres souches thermophiles. (183–185)

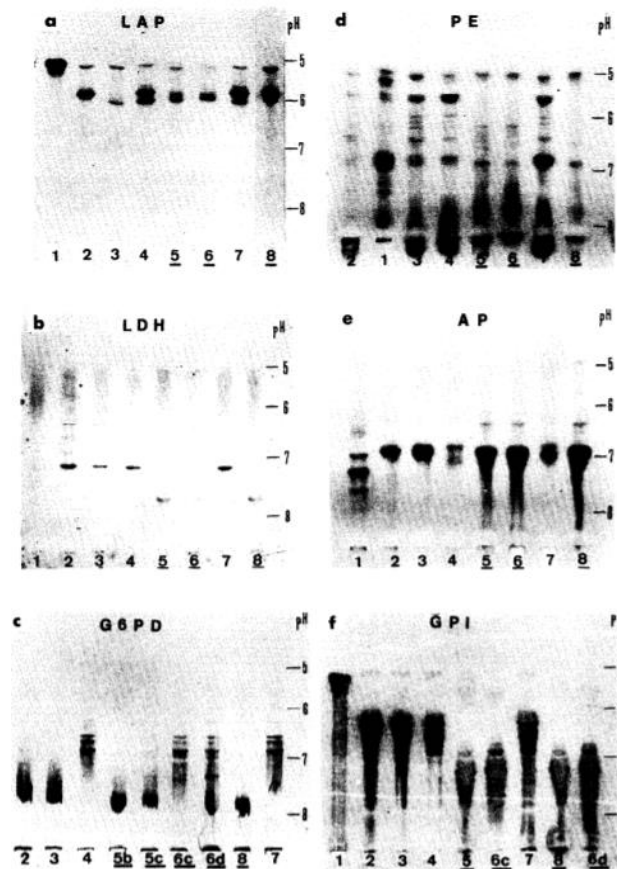


Figure 75 : Modèles isoenzymatiques de différentes souches de *Naegleria* pour plusieurs activités enzymatiques (184) :

(a) leucine amino peptidase LAP), (b) lactate déshydrogénase (LDH), (c) glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD), (d) propionyl estérase (PE), (e) phosphatase acide (AP), (f) glucose phosphate isomérase (GPI). Souches utilisées (voir tableau 12) : (1, 2, 3 et 4) souches de *Naegleria* spp non pathogènes, (5, 6, 8) souches de *N. fowleri* et (7) souche de *N. lovaniensis* non pathogène (les différentes souches de *N. fowleri* sont soulignées).

Tableau 12 : Liste des espèces de *Naegleria* utilisées pour réaliser l'isoélectrofocalisation précédente.
(184)

Reference strains	Species	Origin date of isolation	Pathogenicity	Isolated
MO4-44* N° 5	<i>N. fowleri</i>	Cooling pond of thermal power plant (57 France) 08/08/79	+	3
0359* N° 6	<i>N. fowleri</i>	C.S.F. (Belgium) 04/11/70	+	4
76/23/S4* N° 7	<i>N. lovaniensis</i>	Thermally polluted water (Belgium) 1976	-	1
'Wild' strains				
By 33 N° 1	Thermophilic <i>Naegleria sp.</i>	Outlet canal of a nuclear power plant (01 France) 07/08/79	-	5
An 24 N° 2	Thermophilic <i>Naegleria sp.</i>	Thermally polluted water Metallurgical factory (63 France) 05/12/79	-	5
By 399* N° 3	Thermophilic <i>Naegleria sp.</i>	Outlet canal of a nuclear power plant (01 France) 01/08/80	-	5
C1 10* N° 4	Thermophilic <i>Naegleria sp.</i>	Cooling pond metallurgical factory (42 France)	-	5
Ans 1V N° 8	<i>N. fowleri</i>	Nuclear power plant (59 France) 04/11/80	+	2

III.2.4.3.1. Identification par méthodes moléculaires

III.2.4.3.1.1. Par réaction en chaine par polymérase

La réaction en chaine par polymérase (PCR = Polymerase Chain Reaction), inventée en 1983, est considérée comme une technologie qui a révolutionné le monde de la biologie moléculaire. Il s'agit d'une technique d'amplification enzymatique qui permet d'obtenir un nombre important de copies d'un fragment d'ADN particulier, présent au départ en très petite quantité (voir figure 76). Cette méthode permet, grâce à la réplication in vitro, de générer des milliards d'exemplaires de ce fragment d'ADN. C'est donc une technique permettant l'identification des espèces animales et notamment de *N. fowleri*. (186)

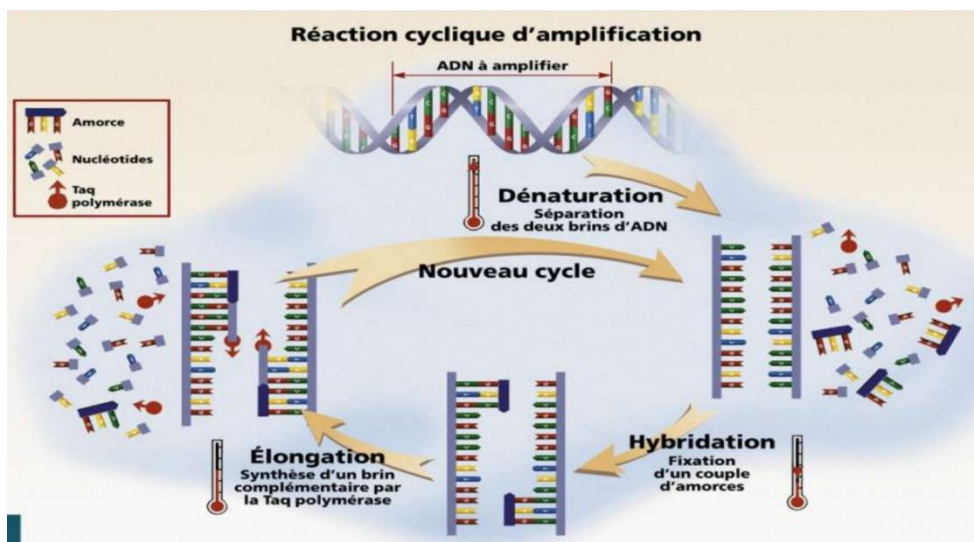


Figure 76 : Amplification par test PCR de l'ADN in vitro. (186)

En ce qui concerne l'identification spécifique de *N. fowleri* par test PCR, de nombreuses tentatives d'amplification de différentes portions d'ADN cibles ont été faites par plusieurs auteurs. Cependant, les régions d'ADN amplifiées par PCR n'affichent pas assez de variations de séquences pour différencier les diverses espèces de *Naegleria*.

Le séquençage de la région comprenant l'espaceur interne transcrit (ITS = International Transcribed Spaceur) trouvé de chaque côté de l'ADN ribosomique 5,8S (ITS1-5,8S-ITS2) a permis néanmoins d'obtenir de façon précise le génotype du genre *Naegleria*. A noter que la séquence d'ITS1 varie aussi en fonction des souches de *N. fowleri* et permet de différencier 8 génotypes dans cette espèce. En effet, ITS1 varie en longueur (42 à 142 paires de bases) selon la souche alors qu'ITS2 ne varie pas (106pb). Ce sont ces variations qui permettent de distinguer 8 types dans l'espèce *N. fowleri*. Plusieurs couples d'amorces peuvent donc être utilisés pour amplifier un fragment d'ADN cible, on parle alors de PCR multiplex. Pour déterminer *N. fowleri*, le couple d'amorce utilisé est l'ITS et plus précisément le NFITS, en positionnant l'amorce au niveau de l'extrémité 3' de l'ITS1 qui est la région spécifique de cette amibe. Ensuite, l'identification de l'espèce peut être réalisée par séquençage de l'ADN amplifié. (tableau 13) (187–189)

Tableau 13 : Identification des différentes espèces de *Naegleria* en fonction de leur séquençage. (Tableau personnel)

Séquençage :	Identification :
5'GAACCTGCGTAGGGATCATT 5'TTTCTTTTCTCCCTTATTA	<i>Naegleria Spp.</i>
5'GTGAAAACCTTTTTTCCATTTACA 5'AAATAAAAGATTGACCATTTGAAA	<i>N. fowleri</i>

Le test PCR permet donc de détecter différents variants de *N. fowleri* et cela grâce à une différence de longueur de l'ITS. Dans l'exemple suivant (figure 77), on parlera du variant ITS long de *N. fowleri* (fow L = 86pb) et du variant ITS court (fow S = 42pb). Suite à la réalisation du test PCR, nous observons alors que le variant long et le variant court de *N. fowleri* ont donné des bandes uniques avec les amorces conservées et avec les amorces spécifiques à l'espèce. Par contre, avec la PCR multiplex, le variant long affiche trois bandes, alors que le variant court affiche 4 bandes. Les PCR et PCR multiplex de *N. lovaniensis* et *N. australiensis* ont donné des bandes uniques. (187)

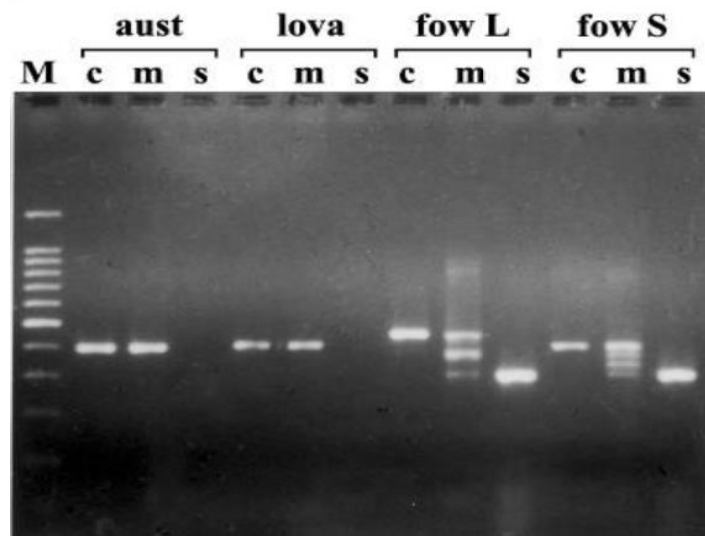


Figure 77 : Résultats de la PCR pour trois espèces de *Naegleria thermophiles* (187) : (*N. australiensis* (aust), *N. lovaniensis* (lova), *N. fowleri* ITS long (fow L), *N. fowleri* ITS court (fow S)), ITS générés à partir de l'ADN de diverses amibes libres en utilisant des amorces conservées (c), des amorces conservées et spécifiques à l'espèce (m) et des amorces spécifiques à l'espèce (s).

III.2.4.3.1.2. Par réaction en chaine par polymérase quantitative

La réaction en chaine par polymérase quantitative (qPCR) aussi appelé PCR en temps réel est une technique qui reprend le principe qualitatif de la PCR classique. Néanmoins, elle utilise des molécules fluorescentes pour parvenir à un résultat quantitatif, et cela en mesurant l'amplification de l'ADN ciblé au cours de la réaction. C'est une méthode fiable, rapide et sensible qui permet de détecter les micro-organismes tels que les amibes libres thermophiles, en estimant leur quantité. L'avantage de cette méthode est qu'une mise en culture n'est pas nécessaire d'où un fort gain de temps.

En pratique, la qPCR repose sur la détection et la quantification d'un émetteur fluorescent, durant le phénomène d'amplification, et l'augmentation du signal fluorescent est

proportionnelle à la quantité d'ADN produite durant la réaction. Ceci permet d'obtenir une cinétique de la réaction (figure 78). (190,191)

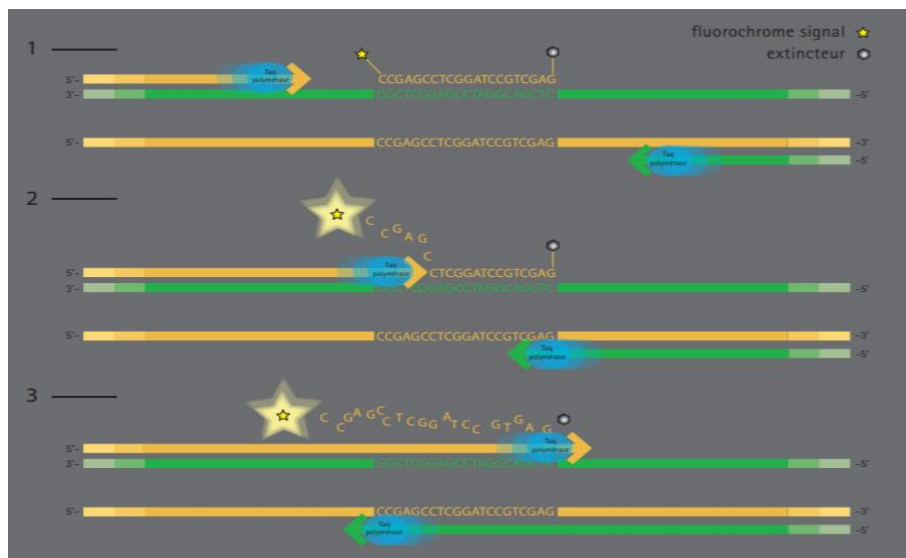


Figure 78 : Principe de la qPCR. (190)

Plusieurs études ont permis de mettre en évidence *N. fowleri* grâce au test de qPCR. L'une d'entre elles utilise la sonde TaqMan et des amorces ciblant la séquence MP2C15 spécifique de l'amibe mangeuse de cerveau. Cette expérience a été réalisée avec des extractions d'ADN provenant de différentes espèces cibles de *N. fowleri* (souches de référence et isolats d'eaux de refroidissement issus de diverses centrales électriques Belges), d'ADN de souches autres que l'amibe mangeuse de cerveau et d'ADN de plusieurs souches eucaryotes. Les résultats ont montré une augmentation significative de la fluorescence pour toutes les espèces cibles étudiées. Par contre, aucune amplification n'a été observée en utilisant l'ADN d'espèces non-cibles ainsi que pour les extraits d'ADN eucaryotes. La qPCR spécifique, ayant pu différencier *N. fowleri* des autres espèces de *Naegleria* thermophiles, notamment *N. lovaniensis* et *N. australiensis* fréquemment présentes dans les eaux de refroidissement industrielles, s'avère donc particulièrement intéressante pour la détection et la quantification de *N. fowleri*. Cette technique présente donc un intérêt majeur dans le diagnostic rapide, à partir du liquide céphalorachidien, de la MEAP. (192)

Une autre étude basée sur un test de PCR multiplex a permis la détection simultanée de trois amibes libres (*Acanthamoeba*, *N. fowleri* et *Balamuthia mandrillaris*). Des amorces et des sondes Taqman ciblant trois régions du gène ribosomique de la petite sous-unité ribosomique 18S (ARNr 18S) ont été utilisées. Elles ont été testées, en utilisant des échantillons contenant différentes concentrations des trois amibes, en parallèle dans un format à cible unique (test de PCR monoplex) et dans un format à cibles multiples (test de PCR multiplex). (Voir figure 79). (193)

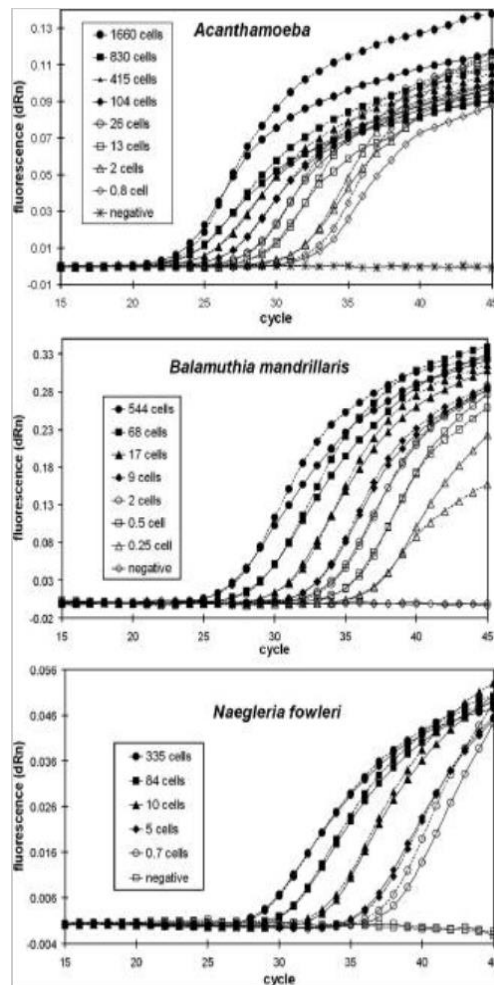


Figure 79 : Courbes d'amplifications obtenues lors d'un test qPCR à cible unique et multiplex pour la détection d'*Acanthamoeba*, *Balamuthia mandrillaris* et *N. fowleri* (193) :
 (Lignes pointillées : échantillon amplifié dans le test à cible unique avec un seul jeu d'amorces et de sonde ; lignes pleines : test triplex contenant des oligonucléotides pour la détection des trois variants d'amibes).

Les résultats de ces expériences prouvent que le test de PCR multiplex est un test très spécifique car il n'existe pas de différence d'efficacité d'amplification entre le test de PCR triplex et le test PCR en temps réel à cible unique. De plus, ils montrent qu'il s'agit d'un test très sensible puisque même les échantillons contenant moins d'une amibe ont été détectés dans les deux types de tests. La détection simultanée d'amibes libres morphologiquement identiques est donc particulièrement intéressante pour la détection des amibes pathogènes pour l'homme et notamment de *N. fowleri*. (193)

La plupart du temps la qPCR est celle utilisée en laboratoire. En effet, sa spécificité, sa sensibilité, sa rapidité mais surtout l'absence de manipulation post amplification permettant d'éviter les contaminations, en font une méthode de référence.

III.3. Désinfection des eaux de baignade

III.3.1. Influence des paramètres physico-chimiques

Naegleria fowleri est une amibe libre pathogène dont les facteurs de développement peuvent être abiotiques ou physico-chimiques (température, pH, salinité...) et biotiques ou biologiques (compétition, prédation...). De nombreuses recherches ont été réalisées afin d'établir des relations entre le développement de ce micro-organisme et les facteurs physico-chimiques mais aussi microbiologiques de l'eau. La température est une des variables clés du développement de *N. fowleri* mais d'autres paramètres sont tout autant utiles.

III.3.1.1. La température

III.3.1.1.1. Tolérance thermique et rôle saisonnier

La zone de tolérance thermique de *N. fowleri* est comprise entre 17 et 45°C, avec une température optimale se situant aux alentours de 40°C. (194)

Des expériences scientifiques *in vitro* ont tentées de déterminer de façon précise les seuils de tolérance de l'amibe mangeuse de cerveau vis-à-vis de la température (tableau 14). En ce qui concerne les trophozoïtes, au-delà de 50°C et jusqu'à 65°C, ils peuvent survivre entre 45 minutes et 30 secondes. Pour des températures inférieures à 10°C, ils survivent quelques heures et seulement quelques minutes lorsque la température descend en dessous de 0°C. Les kystes quant à eux résistent, de 145 minutes à 3 minutes pour des températures comprises entre 50 et 65°C, de 2 à 12 mois pour des températures de 4 à 5°C, de 1 à 4 mois à -10 et -15°C, enfin 1 ou 2 heures entre -10 et -30°C. (63,97)

Tableau 14 : Seuils de résistance des trophozoïtes et des kystes en fonction de la température extérieure.

	-30°C	-10°C	0°C	10°C	50°C	65°C
Trophozoïtes	Pas de résistance	Pas de résistance	Quelques minutes	Quelques heures	45 min	30 s
Kystes	1 h	1 à 4 mois	Plusieurs mois	Plusieurs mois	145 min	3 min

Naegleria fowleri est donc une amibe thermophile présentant une plage de tolérance thermique assez large, comprise entre 17 et 45°C. Néanmoins, sa survie peut s'étendre à des températures beaucoup plus critiques, notamment lorsqu'elle est présente dans

l'environnement sous sa forme de résistance et de dissémination c'est-à-dire sous la forme kystique.

De nombreux auteurs ont montré que la distribution de l'amibe mangeuse de cerveau présentait un caractère saisonnier avec des détections plus importantes durant l'été et le début d'automne. Les amibes, comme le reste de la biodiversité se développant lorsque les conditions environnementales sont optimales, il est donc logique de retrouver majoritairement *N. fowleri* durant les saisons chaudes. Pour étudier ce phénomène, une étude a été menée par John (1995), durant une année, dans des milieux aquatiques de la région de Tulsa (Oklahoma, Etats-Unis). *Naegleria fowleri* a été détectée chaque mois de l'année mais avec un pourcentage plus élevé au printemps et en été, lorsque la température de l'eau était comprise entre 27 et 32°C. De même, Lares-Villa et al. (2010) ont réalisé une enquête, en prélevant mensuellement pendant un an, les eaux situées dans les zones de loisirs de Hornos (Sonora, Mexique). Les résultats ont montré que les concentrations de l'amibe mangeuse de cerveau étaient maximales durant l'été et l'automne, périodes durant lesquelles la température de l'eau était comprise entre 25 et 35°C. (106,195)

Toutefois, il n'est pas rare de retrouver *N. fowleri* toute l'année même lorsque les températures sont basses. Wellings et al. (1977) rapportent la présence de l'amibe dans un prélèvement de sédiments en février, alors que la température de l'eau était de 12°C. De même en décembre, De Jonckheere et al. (1977) ont isolé *N. fowleri* dans les sédiments d'un lac présentant une température de l'eau d'environ 12°C. L'amibe serait donc capable, grâce à sa capacité d'enkystement, de survivre dans les sédiments aux températures hivernales. (126)

Naegleria fowleri est donc une amibe thermophile dont la plage de tolérance thermique se situe entre 17 et 45°C. Elle se développe préférentiellement à des températures supérieures à 25°C et sa distribution est saisonnière, majoritairement en été et début d'automne.

III.3.1.1.2. Rôle de la température

La température est le premier critère à avoir été identifié comme indispensable au développement de *N. fowleri*. En effet, cette amibe libre est retrouvée dans les milieux aquatiques possédant des eaux naturellement ou artificiellement chauffées.

Le rôle joué par la température de l'eau sur la croissance de *N. fowleri* n'est toujours pas réellement établi et fait l'objet de nombreuses controverses. En effet, bien que ces amibes soient retrouvées dans les eaux chaudes, elles ne sont pas systématiquement présentes dans les eaux ayant atteint le seuil de température idéale. En effet, Kyle et Noblet en 1985 ont détecté la présence de l'amibe mangeuse de cerveau dans des eaux dont la température était fraîche, entre 16 et 19°C. De même, les résultats d'une étude réalisée durant l'été 2007, dans le lac Anna (Virginie, Etats-Unis), révèle que certains des prélèvements d'eau et de sédiments effectués en zone non échauffée par les rejets d'une centrale électrique (température entre 28 et 30°C) sont positifs à 53%, alors qu'ils sont de 63% pour ceux des zones artificiellement échauffées (températures entre 27 et 36°C). Cela indique que l'échauffement est favorable à la prolifération de l'amibe libre, mais qu'à *contrario* des eaux échauffées ne sont pas systématiquement infestées par *N. fowleri*. La température s'avère

donc comme un facteur indicateur important de la présence de *N. fowleri*, mais il n'est pas le seul. L'étude menée entre 1987 et 1988, dans le lac Clinton (Illinois, Etats-Unis) artificiellement échauffé par les eaux de refroidissement d'une centrale électrique nouvellement implantée, renforce cette hypothèse. En effet, les données recueillies montrent que *N. fowleri* est détectée dans les eaux échauffées ayant une température supérieure à 25°C. Néanmoins, elle n'est pas retrouvée dans certaines zones non échauffées du lac ayant pourtant des températures exceptionnellement chaudes, supérieures à 30°C (années de grosses chaleurs), alors qu'elles y avaient été détectées avant le début des rejets mais aussi après. Il semblerait donc qu'en plus d'une température optimale à atteindre, le temps d'exposition à cette température soit nécessaire au bon développement de cette amibe libre. (118,195)

Certains auteurs ont montré une corrélation entre la température et la pathogénicité des souches de *N. fowleri*. C'est ainsi qu'en 1999, Gupta et Das ont cultivé des amibes à température ambiante durant 34 mois, 40 mois à 4°C et 15 mois à -15°C. Les résultats ont révélé que les amibes pathogènes ont tendance à perdre leur virulence lorsque la température diminue. Ils ont également prouvé que cette perte de croissance de la virulence était significative entre 25 et -15°C. (196)

Différents chercheurs, notamment Griffin (1983), pensent que l'augmentation de la température n'est pas un facteur crucial de la présence de *N. fowleri* mais plutôt un facteur de risque. Pour eux, des températures élevées permettraient la création d'un milieu exempt d'espèces non thermophiles et une recolonisation plus rapide de ce milieu par la forme flagellée de l'amibe mangeuse de cerveau. La pollution thermique favoriserait donc son abondance en supprimant la ressource concurrentielle causée par la faune thermosensible. La forme flagellée quant à elle présenterait un avantage sélectif par rapport aux compétiteurs thermophiles qui ne possèdent pas ce stade de développement intermédiaire. (63,94)

Comme nous le montre les études mentionnées précédemment, la température élevée d'un milieu aquatique chauffé naturellement ou artificiellement apparaît comme un facteur indispensable à la détection de *N. fowleri*, Le caractère saisonnier de la détection de cette amibe durant l'été et le début d'automne étaye ses observations. Néanmoins, la température n'est pas le seul facteur nécessaire à sa détection.

III.3.1.2. Le pH

Le pH ne semble pas être un facteur limitant pour *Naegleria fowleri*. En effet, de nombreuses études, notamment celle de Carter et al. (1970), ont révélé que les trophozoïtes tolèrent des valeurs allant de 4.6 à 9.5 et les kystes de 2 à 10. De même, lors d'une étude *in vitro* réalisée par Sykora et al (1983), il a été prouvé pour les kystes une survie de 100% pour une gamme de pH allant de 2,1 à 8,15. Des pH supérieurs à 8,7 ont affecté la survie de l'amibe et aucune survie n'a été observée pour un pH de 10. De même en 2001, une étude *in situ* réalisée sur une gamme de pH allant de 4 à 14 a permis d'observer une tolérance de *N. fowleri* à un pH compris entre 5 et 12, avec un optimum à un pH de 6,5. (122)

III.3.1.3. L'hygrométrie

Naegleria fowleri est un micro-organisme hydro-tellurique, c'est-à-dire qu'il vit dans les eaux douces, mais aussi dans la terre humide. L'hygrométrie est donc un paramètre essentiel à sa survie.

Les essais menés en laboratoire par Chang en 1978, ont consisté à réaliser un séchage à l'air à 26°C avec une humidité relative de 22%, sur trois souches de *N. fowleri* provenant de Virginie (TY), d'Australie (A1) et de Floride (GJ) (tableau 15). Les résultats ont montré que les trophozoïtes étaient immédiatement détruits par la dessiccation alors que les kystes résistaient 5 minutes. Cet effet létal du séchage s'explique par le fait que la perte de l'eau cytoplasmique provoque une dénaturation des protéines entraînant la mort des trophozoïtes. Les kystes quant à eux résistent plus longtemps grâce à leurs parois kystiques. (197)

Tableau 15 : Résistance des souches de *N. fowleri* après séchage de 26°C et humidité relative 22%. (197)

Stage of amoeba	Period of drying	No. of tests showing positive cultures for strain:		
		GJ	TY	A1
Trophozoites	0 ^a	0/3	0/3	0/3
	5 min to 24 h	0/3	0/3	0/3
Cysts	0 ^a	3/3	2/3	3/3
	5 min to 24 h	0/3	0/3	0/3

III.3.1.4. La salinité

Naegleria fowleri n'est pas retrouvée dans l'eau salée. En effet, aucun cas de MEAP n'a été reporté suite à une baignade en mer ou en océan. La tolérance au sel ou chlorure de sodium (NaCl) est très faible, allant d'après les études de Griffin (1983) de 0,5 à 1%, et ne dépassant pas 3% selon celles de Tiewcharoen et al. (2001). D'après Carter et al. (1970) les concentrations en NaCl équivalentes à celles de l'eau de mer, c'est à dire 35 g/L soit 3,5%, empêchent le développement de *N. fowleri*. (198,199)

L'eau de mer ne permet donc pas à *N. fowleri* de se multiplier.

III.3.1.5. La conductivité

La conductivité dans les eaux de refroidissement est une mesure de la teneur en sel dans l'eau. Plus la concentration en sel est haute, plus elle conduit l'électricité. Cette mesure se fait à l'aide d'un conductimètre. L'unité est le micro-Siemens par centimètre ($\mu\text{S/cm}$).

On note l'absence de *N. fowleri* dans les eaux de refroidissement industrielles lorsque la conductivité est supérieure ou égale à $614 \mu\text{S/cm}$. (200)

III.3.1.6. Le taux d'oxygène dissous

L'influence du taux d'oxygène dissous dans l'eau sur le développement de *N. fowleri* n'est pas complètement formulée et les différentes données recueillies sont parfois contradictoires. Il semblerait néanmoins que cette amibe tolère une large gamme de concentrations en oxygène dissous dans l'eau.

Pour certains auteurs, notamment Weik et John (1977), cette espèce ne se développe pas en milieu anaérobie, alors que Kyle et al. (1985) ont retrouvé des trophozoïtes dans des sédiments en anaérobie. Par ailleurs, Cerva et al. (1983) ont constaté qu'une teneur importante en oxygène n'étaient ni importante, ni gênante. (174)

Il apparaît donc que la teneur en oxygène dissous de l'eau n'est pas un critère primordial au développement de l'amibe mangeuse de cerveau.

III.3.1.7. Les métaux

Les métaux comme le zinc, l'argent ou le nickel semblent avoir peu d'influence sur la survie de *N. fowleri*. Le cuivre aurait un effet inhibiteur sur le développement de l'amibe pathogène. En effet, certaines études ont montré que *N. fowleri* représente 60% des souches identifiées à partir des systèmes de refroidissement des centrales électriques ayant des condensateurs en acier inoxydable, et n'excède pas 6% pour celle ayant des condensateurs en laiton. Cela s'explique par le fait que le cuivre, présent dans le laiton et libéré dans l'eau suite à la corrosion, possède un effet toxique sur *N. fowleri*. Ce phénomène a été observé à Dampierre (Loiret, France) et Civaux (Vienne, France) lorsque les réacteurs en laiton des centrales électriques ont été remplacés par des réacteurs en acier inoxydable plus résistants à la corrosion et donc plus sécuritaires (moins d'usure) et moins polluants (pas de rejets de métaux lourds tels que le cuivre et le zinc). (201,202)

Dans l'environnement, le fer semble être également un élément important pour la distribution et la prolifération de *N. fowleri*. En effet, des études *in vivo* et *in situ* ont montré que le fer était un paramètre indispensable au développement de *N. fowleri*, dans une échelle de concentrations comprise entre 0,5 et 2,5 mg/L. (203)

Néanmoins au cours de la MEAP, le mécanisme par lequel le fer est obtenu n'est pas complètement élucidé. Une étude réalisée par Martinez-Castillo et al. (2014) a montré que *N. fowleri* était capable de dégrader différentes protéines de liaison au fer telles que l'holo-transferrine, l'holo-lactoferrine et l'hémoglobine mais pas la ferritine (figures 80 et 81). Les résultats de cette analyse ont également révélé que cette dégradation était réalisée par les protéases à cystéine libérées par *N. fowleri*, notamment lors de l'invasion du système nerveux central (figure 82). L'hypothèse que l'amibe mangeuse de cerveau dépend du fer pour survivre et proliférer durant la MEAP a alors été émise. (204)

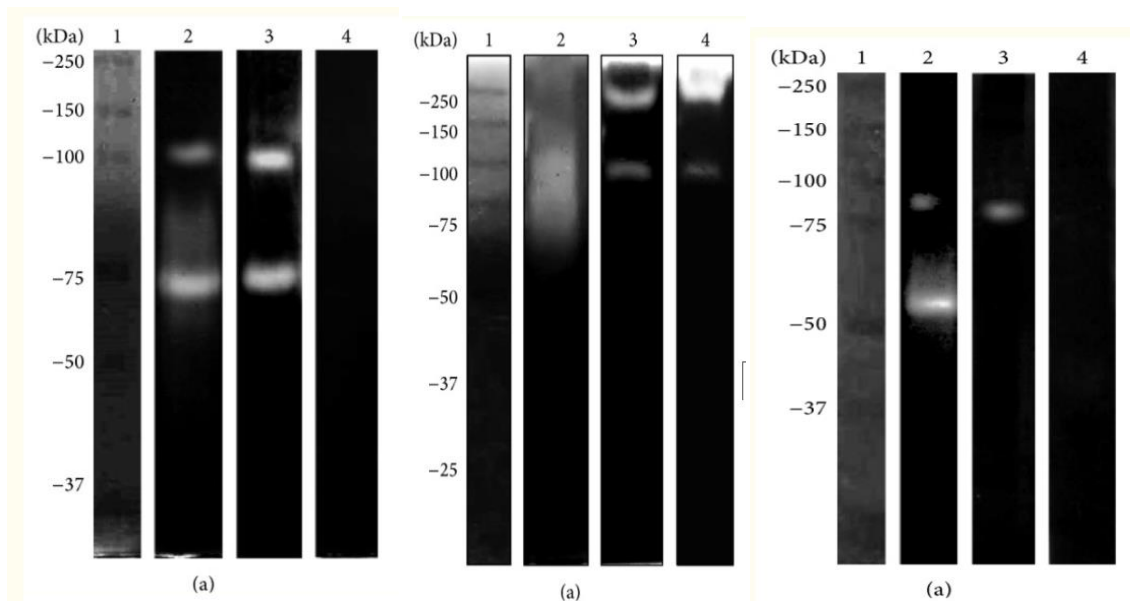


Figure 80 : Dégradation par les protéases de *N. fowleri*, dans un milieu conditionné avec différentes protéines de liaison au fer (204) :

Dans un milieu conditionné avec de l'holo-lactoferrine (figure de gauche), de l'holo-transferrine (figure du milieu), de l'hémoglobine (figure de droite), à 37°C et à différents pH : marqueur de poids moléculaire (voie1), pH 5 (voie 2), pH 7 (voie 3) et pH 9 (voie 4).

L'observation des résultats fournis par la figure 80 montre que les protéases présentes dans *N. fowleri* dégradent l'holo-lactoferrine à pH 5 et 7 mais qu'aucune activité de dégradation n'a été constatée à pH 9. Les protéases dégradent également l'holo-transferrine à tous les niveaux de pH évalués et possèdent sur l'hémoglobine une activité de dégradation à pH 5 et 7 mais aucune à pH 9.

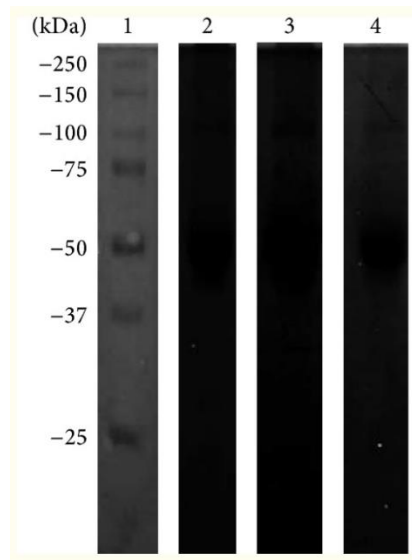


Figure 81 : Effets de la dégradation par les protéases de *N. fowleri*, dans un milieu conditionné avec de la ferritine, à 37°C et à différents pH (204) :

Marqueur de poids moléculaire (voie1), pH 5 (voie 2), pH 7 (voie 3) et pH 9 (voie 4).

Dans les zymogrammes avec la ferritine aucune dégradation n'a été observée. Donc, les protéases de *N. fowleri* ne dégradent pas la ferritine.

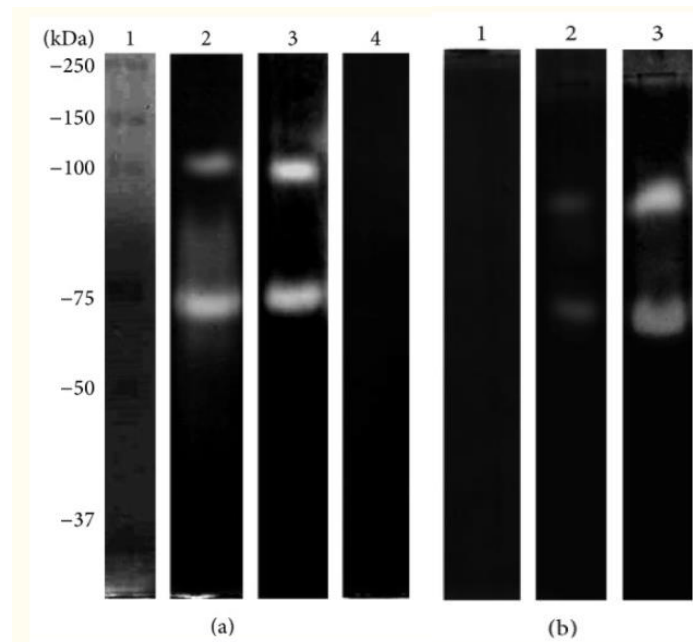


Figure 82 : Dégradation par les protéases de *N. fowleri*, dans un milieu conditionné avec de l'holo-lactoferrine à 37°C et à différents pH (a) et effets des inhibiteurs de protéase dans un milieu conditionné avec de l'holo-lactoferrine à pH 7 et à 37°C (b) (204) :

(a) marqueur de poids moléculaire (voie1), pH 5 (voie 2), pH 7 (voie 3) et pH 9 (voie 4), (b) Effets des inhibiteurs de protéase dans un milieu conditionné avec de l'holo-lactoferrine à pH 7 et à 37°C : inhibiteurs spécifiques de protéases à cystéine (voie 1), inhibiteurs à sérine et partiellement de protéases à cystéine (voie 2) et inhibiteurs à sérine mais inhibiteurs non spécifiques de protéases à cystéine, (voie 3).

Les résultats de la figure 82 montrent que l'activité dégradante du milieu conditionné avec de l'holo-lactoferrine n'a été annulée que par l'inhibiteur spécifique de protéases à cystéine, qu'elle est incomplète avec l'inhibiteur partiel de protéases à cystéine et qu'aucun effet n'a été trouvé avec l'inhibiteur non spécifique. Des résultats similaires ont été obtenus avec l'holo-transferrine et l'hémoglobine. Cette analyse permet donc de dire que les protéases à cystéine de *N. fowleri* sont impliquées dans la dégradation des protéines de liaison au fer de l'hôte.

Naegleria fowleri dépend donc du fer pour survivre et se développer dans les milieux aquatiques, mais cet élément lui est également nécessaire dans les différentes étapes de la MEAP. (204,205)

III.3.1.8. Matières en suspension, matières organiques, sédiments et biofilms.

Dans l'eau, les amibes ont besoin d'un support pour se déplacer, se nourrir et se développer. Les particules en suspension jouent donc un rôle important puisque *N. fowleri* va pouvoir y adhérer.

La matière minérale et organique est également très importante pour le développement de l'amibe mangeuse de cerveau. En effet, elle sert d'une part de nutriments aux bactéries qui à leur tour représentent la ressource nutritive nécessaire à la croissance de *N. fowleri*. D'autre part, elle sert de support à l'amibe qui en a besoin pour se nourrir et se déplacer.

Naegleria fowleri est également présente au sein des biofilms bactériens. En effet, dans les parcs nationaux de Yellowstone et Grand Teton (Wyoming, Etats-Unis), elle a été détectée dans des biofilms présents à la surface des rochers. De même, sa présence a été notée dans des biofilms retrouvés à la surface des tuyaux d'un réseau d'eau potable. Une étude réalisée en laboratoire sur des réacteurs a montré qu'un seuil minimum de 10^4 bactéries par amibe était nécessaire pour pouvoir observer un développement de *N. fowleri* dans les biofilms d'eau de rivières et que la colonisation était nettement plus importante à 42°C qu'à 32°C. Le taux de croissance maximal de *N. fowleri* est compris entre 10^6 à 10^7 bactéries par amibe. Le rapport proies bactériennes/amibe s'avère donc être un paramètre essentiel pour le développement de l'amibe mangeuse de cerveau dans les biofilms. Ces derniers présentent donc, grâce à l'abondance en nutriments, des conditions favorables au développement de l'amibe mangeuse de cerveau mais ils lui confèrent également une protection contre les agents désinfectants. (175,206,207)

De nombreuses études indiquent une corrélation entre les épisodes pluvieux et la présence de *N. fowleri* dans les eaux de surface. En 1985, Kyle et Noblet ont isolé l'amibe dans les eaux de surface, suite à la remise en suspension de sédiments par de fortes pluies. Une étude réalisée en Caroline du Sud a montré que les amibes, notamment *N. fowleri*, pouvaient se retrouver aussi bien à la surface qu'au niveau de la couche détritique où s'accumulent les sédiments riches en débris. Ces amibes se retrouvent donc au niveau de la couche sédimentaire riche en nourriture et leur présence en surface suggère que cette migration est probablement déclenchée par un épuisement en nutriments obligeant *N. fowleri* à se transformer en forme flagellée afin de pouvoir remonter à la surface pour être au contact des matières organiques en suspension.

On comprend donc que la croissance de *N. fowleri* est favorisée par la présence de matières organiques, de sédiments en suspension ou par l'association avec les biofilms lui servant de support pour se déplacer et se nourrir. (208,209)

III.3.2. Influence des paramètres biologiques

Comme nous venons de le voir, la présence et la densité de *N. fowleri* dans les milieux aquatiques sont liées aux caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques de l'eau mais les paramètres biologiques sont également suggérés.

III.3.2.1.1. Présence de bactéries

Le second facteur nécessaire à la croissance de *N. fowleri* est, après la température, la présence des proies. En effet, les amibes peuvent survivre en absorbant des nutriments en

suspension, mais elles ne se multiplient rapidement et de façon notable qu'en présence de bactéries. Les bactéries constituent effectivement la principale source de nourriture de l'amibe mangeuse de cerveau et un seuil de densité bactérienne est nécessaire pour permettre un développement optimal de l'amibe. D'ailleurs en laboratoire, *N. fowleri* est cultivée sur des géloses d'agar non nutritives ou faiblement nutritives, enrobées de bactéries vivantes ou tuées. Les bactéries généralement utilisées sont *Enterobacter spp*, *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* qui sont des bactéries non mucoïdes, c'est-à-dire ne produisant pas de mucus susceptible d'inhiber la phagocytose et donc la prolifération de l'amibe. (119)

La plupart du temps, *N. fowleri* est isolée dans des eaux ayant une concentration élevée en coliformes totaux ou dans des eaux contenant des cyanobactéries filamenteuses. On la retrouve dans les eaux des industries engendrant une pollution thermique favorable au développement des bactéries qui vont ainsi servir de source de nourriture aux amibes thermotolérantes telles que les amibes mangeuses de cerveau. (122)

Bien que les bactéries soient la principale source alimentaire de *N. fowleri*, certaines d'entre elles ont développé des moyens de défense comme notamment la sécrétion d'exotoxines. Par exemple, *Bacillus licheniformis* sécrète une substance amoebicide qui induit la lyse de l'amibe suite à l'altération de la membrane cytoplasmique et au blocage des synthèses d'ARN et d'ADN. (210)

Comme nous l'avons vu précédemment les amibes se nourrissent de bactéries par phagocytose (figure 83), ce qui entraîne habituellement la digestion de celles-ci. Cependant, plusieurs d'entre elles ont acquis la capacité de résister à cette digestion comme *Mycobacterium avium* qui détourne la maturation du phagosome afin de bloquer la production des substances antibactériennes, *Listeria monocytogenes* qui sort du phagosome pour se retrouver dans le cytoplasme, *Yersinia* qui inhibe la phagocytose pour ne pas être internaliser et *L. pneumophila* qui va détourner la phagocytose et transformer le phagosome en une vésicule favorable à sa multiplication, grâce à la sécrétion de protéines (Voir chapitre : I.1.7.3. Interactions des amibes avec les bactéries et II.5. Association avec des bactéries). (2)

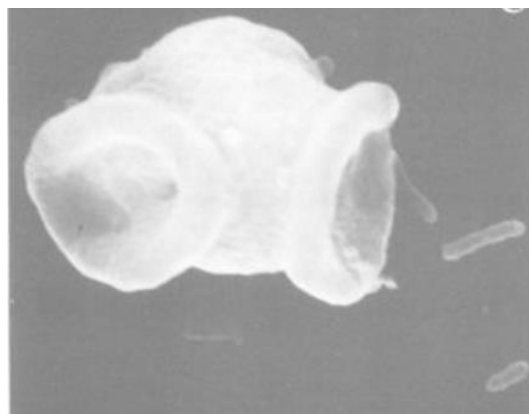


Figure 83 : Phagocytose de bactéries par *N. fowleri*. (63)

La présence de *N. fowleri* est liée à la concentration en bactéries mais ces dernières ne représentent pas uniquement une source de nourriture pour l'amibe. En effet, certaines

bactéries peuvent s'associer à l'amibe comme endosymbionte alors que d'autres peuvent la contaminer en tant que parasite et la détruire. L'amibe mangeuse de cerveau peut donc servir de réservoir dans lequel la bactérie internalisée se multiplie, comme c'est le cas avec *Vibrio cholerae*, ou constituer un vecteur de transmission de maladies graves d'origine bactériennes comme avec *L. pneumophila* (Voir chapitre : I.1.7.3. Interactions des amibes avec les bactéries et II.5. Association avec des bactéries). (211,212)

III.3.2.1.2. Interaction avec d'autres compétiteurs

Plusieurs études effectuées dans divers environnements (lacs, rivières, effluents industriels, circuits de refroidissement) et dans différents pays, ont révélé que certaines espèces d'amibes pouvaient coexister dans un même milieu. La présence de *N. fowleri* n'y est pas systématique. Néanmoins, lorsqu'elle se développe avec d'autres espèces, souvent *N. lovaniensis* et *Acanthamoeba*, l'amibe mangeuse de cerveau prédomine rarement et représente alors 10 à 20 % des amibes libres, et cela même si les conditions sont favorables à son développement. En effet, si l'on examine l'étude réalisée en Thaïlande entre 1988 et 2000 les résultats montrent que 14% des amibes retrouvées sont du genre *Naegleria*, et seulement 10% d'entre elles appartiennent à l'espèce *fowleri*. Dans un écosystème, *N. fowleri* n'est donc pas l'amibe prédominante. Cela pourrait s'expliquer par le fait que, dans un environnement en équilibre, cette amibe présente une faible capacité à s'imposer et une faible vitesse de croissance. En effet, dans une étude menée par Griffin (1983) sur un grand nombre d'échantillons d'eau de rivières, piscines, sédiments, eau du robinet, etc., il a été estimé que la proportion des amibes serait d'une seule amibe libre thermophile pour 10 000 amibes libres isolées. De plus, sur une quarantaine d'échantillons positifs d'amibes thermophiles, seuls deux étaient positifs pour *N. fowleri*. Selon l'auteur, une modification de l'environnement, d'origine humaine (rejets d'engrais, de pesticides, rejets industriels, centrales électriques, etc.) ou naturelle (fortes pluies, formation de bras morts, éruptions volcaniques, sources d'eaux chaudes, etc.), semblerait plus propice au développement de *N. fowleri*. En effet, l'élimination des autres protozoaires provoquerait un vide environnemental ou « niche vide » qui pourrait alors être colonisé par *N. fowleri*, et ceci grâce à la mobilité de sa forme flagellée. (213,214)

Réalisée au Etats-Unis, une étude a été menée afin de vérifier cette hypothèse de « l'habitat vide ». Elle a porté sur l'évaluation de 59 sites aquatiques très variés et l'objectif était d'établir une relation entre les perturbations du milieu environnemental et la proportion d'amibes. Trois indices de perturbation tenant compte des changements d'origine humaine ou naturelle ont alors été attribués à chaque site (indice 1 : absence de perturbation, indice 2 : perturbation de plus de 3 ans avec retour vers un écosystème stable, indice 3 : perturbation de moins de 3 ans sans retour à l'état normal). Les résultats ont montré que la détection de *N. fowleri* était bien corrélée à la perturbation du milieu. En effet, la présence de l'amibe mangeuse de cerveau était significative dans l'environnement présentant un indice 3 c'est-à-dire récemment perturbé. Ces résultats permettent de confirmer l'hypothèse que *N. fowleri* est peu présente dans les milieux où les compétiteurs et les prédateurs sont abondants. *A contrario*, les modifications naturelles ou humaines seraient à l'origine de

l'éviction des compétiteurs de l'amibe libre lui offrant l'opportunité de recoloniser l'environnement. (215)

Ces résultats confirment aussi le fait que *N. fowleri* est une amibe qui se développe dans tous les milieux aquatiques, partout dans le monde, mais dans de faible proportion, d'où le nombre relativement faible de MEAP.

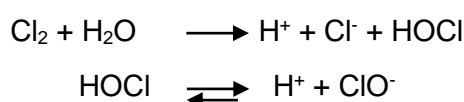
III.3.3. Influence des traitements biocides

L'élimination chimique de *N. fowleri* est la méthode la plus employée et la catégorie de produit la plus utilisée est généralement celle des biocides oxydants. La stratégie consiste à maintenir une concentration résiduelle de désinfectant pour contrôler la reproduction des micro-organismes dans l'eau. Les produits chlorés sont les plus largement utilisés, mais d'autres produits ou procédés sont également efficaces. Les traitements vont chercher soit à supprimer le risque infectieux (éradication des trophozoïtes dans les piscines, baignades artificielles ou baignades en eaux libre), soit à éliminer la persistance de *N. fowleri* dans différents environnements (éradication des kystes dans les rivières, les étangs, etc.). Pour évaluer un traitement, il faut également considérer que l'amibe mangeuse de cerveau est souvent associée aux biofilms bactériens qui peuvent engendrer une protection contre l'action d'agents désinfectants. C'est pourquoi, les études d'efficacité des différents traitements biocides doivent être effectuées en conditions réelles.

III.3.3.1. Le chlore

Le chlore est le désinfectant le plus utilisé, bien que la plupart des pays aient de plus en plus d'engouement pour de nouveaux moyens de désinfection, notamment pour les rayons ultra-violet qui ne confèrent ni odeur ni goût à l'eau traitée. La principale source de désinfectant est le chlore parce qu'il est facilement disponible, durable, bon marché, facile à manipuler et à mesurer. Le chlore est un oxydant très actif, à la fois bactéricide c'est-à-dire qu'il détruit les germes et rémanent c'est-à-dire qu'il permet d'avoir une action désinfectante qui persiste dans l'environnement un certain temps après son introduction. (216,217)

Au contact de l'eau, le chlore va se transformer et donner naissance à l'acide hypochloreux (HOCl), l'ion hypochlorite (ClO⁻) et l'ion chlorure (Cl⁻), selon les réactions d'équilibre. (218)



Pour réaliser la désinfection par le chlore, on peut utiliser le chlore gazeux (Cl₂), l'hypochlorite de sodium (NaClO) ou eau de javel et l'hypochlorite de calcium (Ca(ClO)₂). Par

rapport au chlore gazeux, l'hypochlorite de sodium est la forme la plus simple et la moins dangereuse à manipuler. Au contact de l'eau, il va se transformer et créer. (219,220)

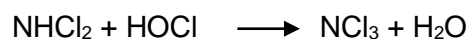
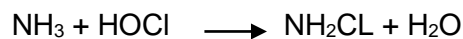
- L'acide hypochloreux (HOCl = chlore actif = agent désinfectant)



- L'ion hypochlorite (ClO^- = chlore potentiel = agent préventif libérant le chlore en fonction du pH : plus le pH est élevé, moins il y a de chlore actif)



- Les chloramines et organochlorés = chlore combiné = résidus du chlore libre = sous-produits du chlore qui se forment en réaction avec les matières organiques (formation d'organochlorés) et/ou avec des composés d'azote et d'ammoniaque (formation de mono, di et tri-chloramines (NH_2Cl , NHCl_2 , NCl_3), irritantes pour les yeux et odeur désagréable). Plus il y a de chloramine moins il y a de chlore actif et donc moins l'action désinfectante du chlore est efficace. Une forte odeur chlorée, due à une forte concentration en chloramine peut être un signe de sous-dosage en chlore.



Il faut savoir que (figure 84) :

- Chlore total = chlore libre + chlore combiné = HOCl + ClO^- + mono, di et tri chloramines = potentiel de désinfection du chlore = quantité de chlore dans l'eau avant transformation
- Chlore libre = chlore actif + chlore potentiel = HOCl + ClO^- = quantité de chlore disponible pour combattre les micro-organismes
- Chlore libre actif = HOCl
- Chlore potentiel = ClO^-
- Chlore combiné = chloramines et organochlorés = chlore total – chlore libre

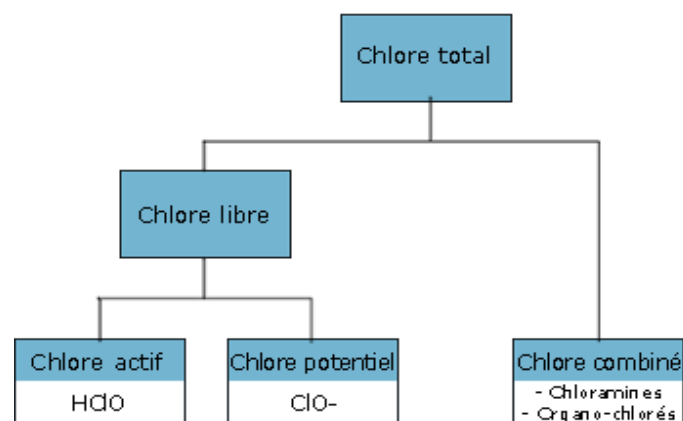


Figure 84 : Différents types de chlore. (218)

L'acide hypochloreux, du fait qu'il ne porte pas de charge électrique, possède l'action bactéricide la plus importante. Il va agir en détruisant les protéines structurales et chromosomiques, entraînant ainsi la dégénérescence de l'amibe. En effet, la membrane cytoplasmique laisse pénétrer l' HOCl en même temps que l'eau car il possède une forme comparable à celle de l'eau et il n'a pas de charge électrique, contrairement au ClO^- qui possède une charge négative et qui reste donc à l'extérieur de la cellule (figure 85). Le chlore tue les micro-organismes en cassant les liaisons chimiques de leurs molécules. En effet, les composés de chlore vont échanger des atomes avec les enzymes présentes dans les cellules. Ceci entraîne une modification de la structure de l'enzyme provoquant sa désactivation et donc la mort du micro-organisme. (221)

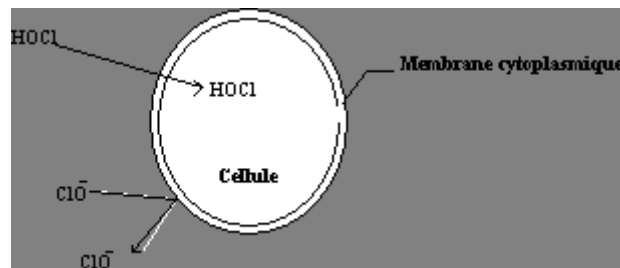


Figure 85 : Acide hypochlorite neutre pénétrant les enveloppes des cellules des micro-organismes pathogènes par rapport à l'ion hypochlorite négativement chargé. (218)

L'efficacité du chlore est dépendante de certains paramètres. En effet, l'activité désinfectante du chlore dépend : (216,221)

- Du pH : la désinfection est optimale lorsque le pH est entre 5.5 et 7.5. L'acide hypochloreux (HOCl) est alors entre 80 et 100% plus efficace que les ions hypochlorites (ClO^-). Le niveau d'acide hypochloreux diminue quand la valeur du pH s'élève. A pH 6, la concentration de l'acide hypochloreux est de 80%, tandis que le niveau des ions hypochlorites est de 20%. A pH 8, ce dernier pourcentage s'inverse. A pH 7,5, les concentrations en acide hypochloreux et en ions hypochlorites sont sensiblement égales. (Figures 86 et 87)

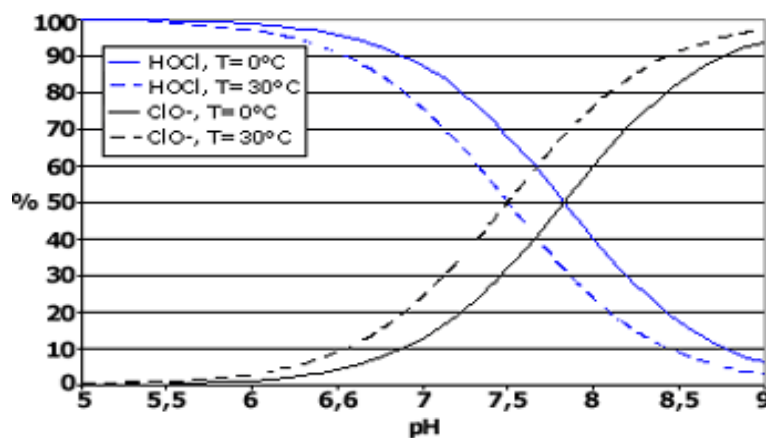


Figure 86 : Proportion d'acide hypochloreux et d'ions hypochlorites en fonction du pH. (218)

- De la température : l'efficacité du chlore est plus importante lorsque la température diminue. En effet, sur la figure 86 on constate qu'à une température de 0°C, le niveau d'acide hypochloreux est supérieur (environ 10%) à celui obtenu à une température de 30°C. A contrario, celui des ions hypochlorites est plus élevé à 30 qu'à 0°C. La figure 87 nous confirme que la proportion d'acide hypochloreux augmente lorsque la température diminue.

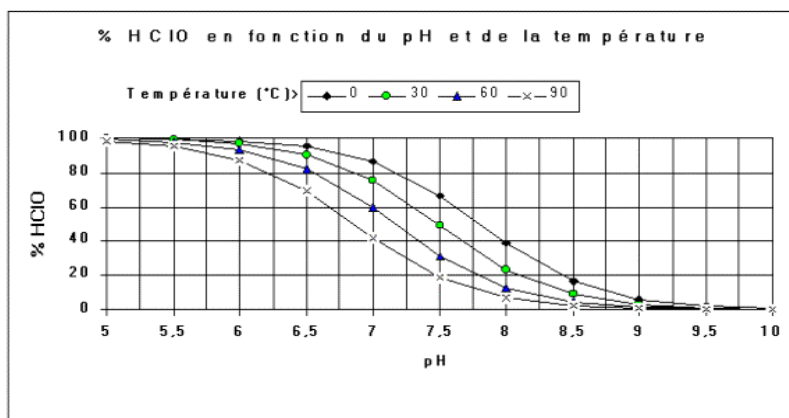


Figure 87 : Evolution de la concentration en acide hypochloreux en fonction du pH et de la température. (218)

- De la présence de matières organiques : la consommation du chlore par réaction avec des molécules organiques entraîne une diminution de la biodisponibilité du désinfectant pour l'action microbicide
- Du micro-organisme : nombre (concentration), type (espèce) et état (en suspension, en amas, adhérent à des biofilms, etc.) : en s'agglomérant sur des matières en suspension ou en s'accumulant dans des biofilms, les micro-organismes sont protégés des désinfectants).
- De la concentration en chlore et du temps de contact : afin d'optimiser l'efficacité du chlore, le temps de contact entre le désinfectant et le micro-organisme ainsi que la concentration en désinfectant sont très importants. Cette efficacité peut être exprimée par le facteur C.T. (216)

$$C.T \text{ (mg.min/L)} = C \text{ (mg/L)} \times T \text{ (min)}$$

C : concentration résiduelle finale d'un désinfectant chimique en mg/L

T : temps de contact minimum du matériel à traiter avec le désinfectant en min

Le C.T peut être utilisé pour établir la sensibilité d'un désinfectant contre un micro-organisme, dans des conditions déterminées (pH, température, etc.). Généralement les

valeurs du C.T sont données pour une désactivation à 99% des micro-organismes, à des conditions spécifiées. (222)

Considérant que leur utilisation n'est pas conforme à la protection des écosystèmes aquatiques naturels, il est considéré que le traitement de désinfection de l'eau au chlore est inadapté aux baignades extérieures et ne peuvent être utilisées qu'en système fermé sans rejet. La réglementation française préconise qu'en aval du traitement, la teneur en chlore résiduel soit comprise entre 0,2 et 0,5 mg/L durant un contact de 15 min. En fonctionnement normal un réseau de distribution devrait avoir une teneur ne dépassant pas les 0,1 mg/L. (223)

Effet du chlore sur les trophozoïtes :

Lors d'une étude réalisée en laboratoire, à pH 7 et à 25°C, il a été observé qu'une concentration de 0,74 mg/L de chlore libre permettait d'inactiver $1,92 \times 10^4$ trophozoïtes de *N. fowleri*, en suspension durant 30 min dans un système tampon phosphate 0,01M. (Tableau 16)

Tableau 16 : Capacité amibicide du chlore. (224)

Species (strain)	pH	Temp (°C)	Concn of amoebae $\times 10^4$ per cm^3 at time 0	Chlorine level (mg·liter ⁻¹) for*			Survivors after 30 min	
				TAC = FAC at time 0	FAC after 30 min	CAC = chlorine demand	No. of amoebae per cm^3	%
<i>N. gruberi</i> (P1200f)	7.0	25	1.92	0.79	0.16	0.630	0	0
				0.675	0.125	0.50	1	0.005
				0.625	0.125	0.50	10	0.052
				0.625	0.125	0.50	15	0.078
				0.55	0.105	0.45	26	0.14
<i>N. fowleri</i> (MsT)	7.0	25	1.92	0.925	0.275	0.650	0	0
				0.750	0.175	0.575	0	0
				0.74	0.19	0.55	0	0
				0.625	0.125	0.50	7	0.036
				0.575	0.125	0.55	18	0.093
<i>A. castellanii</i> (1501)	7.0	25	1.92	1.10	0.25	0.85	0	0
				1.02	0.22	0.80	0	0
				1.0	0.25	0.75	2	0.01
				0.85	0.20	0.65	10	0.052
				0.80	0.175	0.625	17	0.089
<i>A. culbertsoni</i> (A-1)	7.0	25	1.92	1.25	0.25	1.0	0	0
				1.25	0.25	1.0	0	0
				1.09	0.14	0.95	23	0.12
				0.95	0.20	0.75	18	0.093

* TAC, Total available chlorine; CAC, combined available chlorine.

L'observation de ce tableau nous permet de confirmer le fait que la concentration en chlore nécessaire pour inactiver les amibes est différente selon les espèces. En effet, une concentration de 0,74 mg/L de chlore est suffisante pour inactiver 100% des *N. fowleri*, alors qu'il faut 0.79 mg/L pour détruire *N. gruberi*. Une concentration comprise entre 0,5 et 1 mg/L de chlore actif est nécessaire dans les eaux de piscine afin d'éviter les contaminations causées par les amibes du genre *Naegleria*. (224)

Effet du chlore sur les kystes :

Lors d'une étude comparative menée sur différentes souches d'amibes (tableau 17), il a été montré que l'inactivation des amibes libres dépendait de la concentration en chlore initialement introduit et du temps de contact. Le genre *Naegleria* et notamment *N. fowleri* apparaît comme l'espèce la plus sensibles au chlore. En effet, il suffit d'une concentration de 0,5 mg/L pour inactiver les kystes de *N. fowleri* en 1 h de contact alors qu'il faut près de 3 h pour détruire ceux de *N. gruberi*. Pour une concentration de 2 mg/L de chlore, le temps de contact nécessaire à l'inactivation des kystes était de 15 min pour *N. fowleri* et 30 min pour *N. gruberi*. D'autres expériences ont été menées afin d'établir une relation entre l'abattement constaté et le temps de contact à une concentration fixée de chlore libre résiduel. Chang notamment a observé l'efficacité de la décontamination des kystes de trois souches de *Naegleria* par le chlore, à une température de 25°C et à pH 7. Il a alors démontré une relation de linéarité entre la durée d'exposition à une concentration fixée de chlore libre résiduel et l'abattement constaté. Il a alors calculé qu'il fallait 10 min à une concentration de 5 mg/L pour détruire 10⁴ kystes de *N. fowleri*, qu'une exposition de 25 min à une concentration de 2 mg/L était nécessaire et 50 min pour une concentration de 1 mg/L. Cela confirme bien les résultats précédents. (110,225)

Tableau 17 : Destruction des kystes d'amibe en fonction de la teneur en chlore et du temps de contact. (110)

Strain	Chlorine concn ($\mu\text{g}/\text{ml}$)		First negative (h)
	Initial	Residual ^a	
<i>N. fowleri</i> HB-1	0.2	0	24
	0.5	0.3	1
	1.0	0.8	1
	2.0	2.0	0.25
<i>N. gruberi</i> 1518/1e	0.2	0	24
	0.5	0.1	3
	1.0	0.6	1
	2.0	2.0	0.5
<i>A. culbertsoni</i> A-1	2.25	1.0	— ^b
	4.0	1.75	24
	8.0	5.0	24
	16.0	9.0	24
	40.0	40.0	24
<i>Acanthamoeba</i> sp. 4A	2.0	1.0	—
	4.0	3.5	—
	8.0	6.0	24
	16.0	16.0	1

D'une façon générale, les auteurs s'accordent à dire qu'une concentration de 1 mg/L en chlore libre résiduel est suffisante pour inactiver les trophozoïtes, c'est-à-dire la forme infectante, de *N. fowleri*. (226)

III.3.3.2. Le dioxyde de chlore

Le dioxyde de chlore (ClO₂) est un oxydant très puissant. Il s'agit d'un gaz très soluble dans l'eau mais assez instable, c'est pourquoi il doit être utilisé sur place et au dernier moment. Il possède une forte activité bactéricide, avec un large spectre d'action lui permettant d'éliminer de nombreux micro-organismes, et il est doté d'une efficacité démontrée contre les biofilms. Il possède également, un fort pouvoir rémanent et peut rester actif plusieurs heures, voire plusieurs jours. Il semble être l'un des désinfectants les plus efficaces aussi bien sur les trophozoïtes que sur la forme kystique de *N. fowleri*. En effet, lors d'études en laboratoire menées sur la forme trophozoïte de *N. fowleri*, dans un milieu à 25°C et à pH 7, il suffit d'une concentration en dioxyde de chlore de 0,25 mg/L pour passer d'un nombre d'amibes de 1,9 x10⁴ à moins de 20, et cela en 30 min. Plus la concentration en dioxyde de chlore augmente et plus le nombre d'amibes est bas. (Voir tableau 18). (224,227)

Tableau 18 : Capacité amibicide du dioxyde de chlore. (224)

Species (strain)	pH	Temp (°C)	Concn of amoebae × 10 ⁴ per cm ³	ClO ₂ concn (mg·liter ⁻¹)		No. of amoebae after 30 min
				Initial	Final	
<i>N. gruberi</i> (P1200f)	7.0	25	1.92	1.1	0.25	40
				1.1	0.25	30
				1.0	0.25	40
<i>N. fowleri</i> (MsT)	7.0	25	1.92	2.0	0.5	8
				1.6	0.35	15
				1.3	0.25	20

Lors d'une étude de comparaison de l'efficacité de trois désinfectants (chlore, dioxyde de chlore et monochloramine) sur l'inactivation des kystes d'amibe libres, le dioxyde de chlore c'est révélé être le plus efficace. En effet, l'inactivation de *Naegleria* ce fait rapidement et à une concentration beaucoup plus faible que les autres désinfectants (C.T environ 5 mg.min/L) (Voir figure 88). D'autres études parallèles ont montré qu'une concentration en dioxyde de chlore de 1,26 mg/L permettait d'éliminer 99% des kystes en environ 5 min. (228)

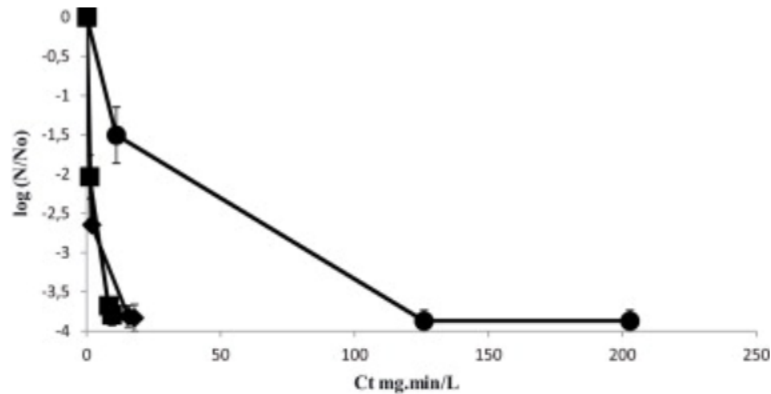


Figure 88 : Inactivation des kystes d'amibe par traitement au dioxyde de chlore (courbe avec ronds : *Acanthamoeba*, courbe avec triangles : *Hartmannella* et courbe avec carrés : *Naegleria*). (228)

L'action bactéricide traduit la réaction du dioxyde de chlore avec les acides aminés et l'ARN des cellules, empêchant ainsi la production des protéines et donc la mort du micro-organisme. (229)

Par rapport au chlore, le dioxyde de chlore possède un effet désinfectant plus puissant, son action est plus rapide (temps de contact 2 à 3 fois inférieur à celui du chlore), il est peu sensible au pH (agit sur une large gamme de pH entre 4 et 10) et détruit durablement les biofilms. De plus, il génère très peu de sous-produits car il ne réagit ni avec les matières organiques (ce qui augmente son efficacité), ni avec l'ammoniaque (absence de goût et d'odeur). Néanmoins son utilisation est plus délicate du fait de son instabilité. De plus, selon les études menées en laboratoire sur des trophozoïtes de *Naegleria*, le dioxyde de chlore semble être le désinfectant le plus efficace. Cependant, dans les conditions naturelles, c'est-à-dire en présence de bactéries et/ou de matières organiques, pour une efficacité comparable, une concentration de dioxyde de chlore supérieure à celle du chlore est nécessaire. Il a été également montré que, selon les conditions environnementales, *N. fowleri* semblait plus résistante au dioxyde de chlore. (227,230)

III.3.3.3. L'ozone et l'acide paracétique

L'ozone (O_3) est un gaz instable qui doit être produit sur place grâce à un générateur d'ozone puis qui se décompose de façon naturelle en dioxygène (O_2). Il s'agit d'un oxydant très puissant, possédant un pouvoir désinfectant supérieur à celui du chlore, mais aucun pouvoir rémanent. Il ne produit pas de sous-produits, son action ne dépend pas du pH, cependant son utilisation est complexe et onéreuse. Dans de bonnes conditions, l'exposition de *N. fowleri* à une concentration de 0,4 mg/L d'ozone inactive 10 trophozoïtes en 4 min, à pH 7 et 25°C. Une autre étude a montré qu'une concentration initiale de 6.75 mg/L d'ozone était efficace sur les trophozoïtes, après une exposition de 30 min, et cela sans avoir besoin de réinjecter d'ozone supplémentaire. (226,227,231)

En ce qui concerne l'acide peracétique ($C_2H_4O_3$), il s'agit d'un oxydant puissant mais très instable et corrosif pour les métaux qui résulte de la réaction chimique entre l'acide acétique ($C_2H_4O_2$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Dans les conditions normales, il se dégrade en sous-produits non toxiques (acide acétique, oxygène et eau). Son efficacité a été testée sur les trophozoïtes ainsi que les kystes de *N. fowleri* pendant 2 à 18 h à pH 6,9 et 8. Les résultats ont montré qu'une concentration de 3 à 8 mg/L d'acide peracétique permettait d'inactiver efficacement les deux formes de l'amibe. Les résultats ont également indiqué que son activité était meilleure à pH acide (tableaux 19 et 20) et qu'elle était fortement réduite en présence de matière organique. (226,232)

Tableau 19: Efficacité de l'acide peracétique sur les trophozoïtes de *N. fowleri* et *A. polyphaga*. (226)

Biocide	Strain	MAC ($mg\ litre^{-1}$)					
		Time (h)					
		2	8	18	2	8	18
pH 6.9			pH 8.0				
Peracetic acid	SHI	15	15	8	15	15	8
	NF-3	8	4	4	8	8	8

Tableau 20 : Efficacité de l'acide peracétique sur les kystes de *N. fowleri* et *A. polyphaga*. (226)

Biocide	Strain	MCC ($mg\ litre^{-1}$)	
		pH 6.9	8.0
Peracetic acid	SHI	150	150
	NF-3	3	8

Lorsque le pH augmente, on observe aussi bien pour la forme trophozoïte que kystique, la nécessité d'augmenter la concentration en acide peracétique, afin d'obtenir une lyse totale de ces formes parasitaires. En effet, à pH 6,9 la concentration en acide peracétique est respectivement de 4 mg/L et de 3 mg/L pour permettre la lyse respectivement de la forme trophozoïte et de la forme kystique ; alors qu'une concentration en acide peracétique de 8 mg/L est nécessaire à pH 8 pour maintenir l'effet amoebicide.

III.3.3.4. Les rayonnements ultraviolets

Le traitement des eaux par rayonnements ultra-violet (UV) est utilisé lors de la production d'eau potable, pour l'eau industrielle, l'eau de baignade, principalement les eaux de piscines privées. L'utilisation des UV pour la désinfection des eaux de piscines publique est interdite.

Les radiations UV sont des ondes électromagnétiques de longueur d'onde comprises entre 200 et 400 nm. Les UVA sont compris entre 315 et 400 nm, les UVB entre 280 et 320 nm et les UVC entre 200 et 280 nm.

Ce sont les UVC qui sont les plus intéressantes dans le traitement des micro-organismes présent dans l'eau à désinfecter. En effet, la plupart des composants de l'eau absorbent ces radiations. Les UV sont connus pour leurs effets biocides. Les UV agissent effectivement sur les micro-organismes mais avec des doses différentes selon leur sensibilité. Lors d'une désinfection, les radiations sont absorbées par les acides nucléiques (ADN et ARN) et modifient le nucléotide appelé thymine qui fait partie d'une des quatre bases azotées des micro-organismes. Les altérations qui en découlent vont entraîner une modification de la réplication et une inhibition de la transcription de l'ADN ; la cellule perdra alors sa faculté à se multiplier. (233)

Il existe deux types de méthodes pour la désinfection de l'eau. Les lampes UV peuvent être installées dans des réacteurs fermés ou dans un chenal ouvert. Dans le réacteur fermé, les lampes sont à vapeur de mercure, basse ou moyenne pression. Ce système est surtout utilisé pour la désinfection des eaux potables et pour les eaux industrielles. Dans le chenal ouvert, la pression est toujours basse et ce procédé est notamment utilisé pour les eaux résiduaires urbaines. La plupart du temps, les traitements sont effectués avec les lampes à vapeur de mercure qui sont germicides (Figure 89). Le spectre de radiation des UVC est émis à 90% à une longueur d'onde de 254 nm (longueur d'onde présentant une importante absorption de l'ADN). Il existe des réacteurs de différentes tailles, de différentes formes, adaptés au type d'installation à traiter. (234)

Les avantages de cette méthode sont nombreux. En effet, les UV ne changent ni le goût ni l'odeur de l'eau, ils ne produisent pas de résidu ni de sous-produits. Il s'agit d'un procédé d'action rapide et extrêmement efficace (99% des micro-organismes éliminés), ne nécessitant pas de manipulation de produits chimiques. Par contre, les particules en suspension diminuent l'efficacité de la désinfection (nécessité d'une transmittance correcte, c'est-à-dire d'une turbidité inférieure à 1 NTU (Nephelometric Turbidity Unit), pas d'effet rémanent et besoin d'électricité pour fonctionner (attention aux coupures). L'investissement du réacteur est important au départ mais les coûts d'exploitation sont limités. (235–237)



Figure 89 : Principe de désinfection UV. (234)

En ce qui concerne l'inactivation de *N. fowleri* par spectre UV, une exposition relativement importante à 130 J/m^2 ($13 \text{ mW}\cdot\text{s/cm}^2$) est nécessaire pour inactiver les trophozoïtes. Les kystes sont particulièrement résistants puisqu'il faut une exposition à 630 J/m^2 (soit $63 \text{ mW}\cdot\text{s/cm}^2$) pour les inactiver. En France, pour respecter les critères microbiologiques de potabilisation des eaux, la dose UV requise est de 400 J/m^2 . (238)

Tableau 21 : Dose d'ultraviolet nécessaire pour inactiver 99% des trophozoïtes et kystes de *N. fowleri*. (238)

Cellular Stage of <i>N. fowleri</i>	Dose Required to Inactivate 99% $\text{mW}\cdot\text{s/cm}^2$
Trophozoite	13
Cyst	63

III.4. Ampleur du risque sanitaire et mesures préventives

III.4.1. Risque pour la santé publique

Depuis l'identification dans les années soixante de *N. fowleri* comme agent responsable de la MEAP, de nombreuses recherches ont été entreprises sur les sites de baignades. Ces études, essentiellement qualitatives, ont été engagées dans les différentes régions du monde où des cas de MEAP ont été décrits comme c'est le cas aux Etats-Unis, en Amérique latine, Europe, Australie, Nouvelle-Zélande ainsi qu'en Guadeloupe.

Les études s'accordent à dire que cette amibe libre est présente dans les eaux douces ayant une température élevée (>25°C) c'est à dire durant la saison chaude, d'où son caractère saisonnier. De plus, elle a été localisée dans l'ensemble des types de baignades : baignades en eaux libre, baignades artificielles, baignades en piscines privées et publiques, baignades alimentées par des eaux de refroidissement industrielles ou par de l'eau d'origine géothermale ainsi que dans les bains thérapeutiques et à remous.

Cependant, il est impossible de quantifier le risque sanitaire lié à la présence de l'amibe mangeuse de cerveau dans les eaux de baignades. En effet, compte tenu du manque de connaissances concernant notamment la dose minimale infectieuse ainsi que les concentrations en *N. fowleri* lors de l'exposition, il n'est pas possible de fixer un seuil au deçà duquel le risque de développer un MEAP est nul ou de proposer une relation dose-effet. De plus, l'échantillonnage et l'analyse de cette amibe libre restant problématique ainsi que le diagnostic de l'infection souvent établi au stade de l'autopsie, il est probable que les cas de MEAP soient sous-publiés.

Certains auteurs ont néanmoins tenté de quantifier le risque de MEAP lié à la présence de *N. fowleri* dans les eaux de baignade. Pour cela, ils ont cherché à développer des modèles permettant de caractériser ce risque.

L'étude de Weillings en 1997, basée sur une approche épidémiologique humaine, comparant le nombre de cas de MEAP par année en Floride avec le nombre de baigneurs en eau douce, estime la probabilité de survenue d'un cas de MEAP pour 2,6 millions de baigneurs par an. Le risque d'être infecté lors d'une baignade est donc de $3,85 \times 10^{-7}$.

Plus récemment en France, Cabanes et son équipe ont développé un modèle permettant de caractériser le risque de développer une MEAP suite à une activité aquatique, en fonction de la concentration en amibes mangeuses de cerveau. Il s'agit d'une étude réalisée chez des souris puis transposée à l'homme. Le risque de développer une MEAP chez l'homme, en fonction de la concentration en *N. fowleri* dans l'eau, est transposé dans la figure 90.(126,239)

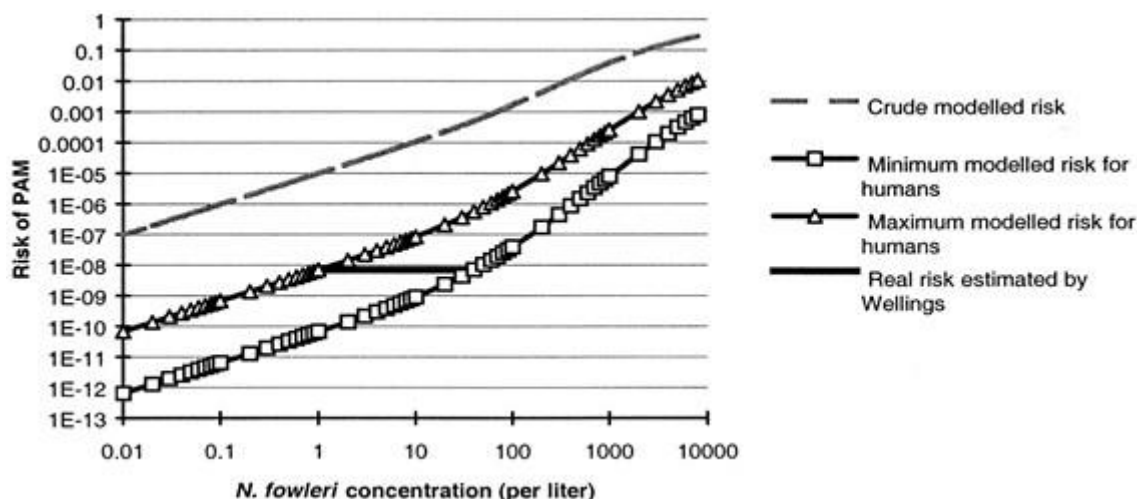


Figure 90 : Risque de MEAP après baignade, en fonction de la concentration en *N. fowleri* dans l'eau. (240)

En choisissant le modèle « maximum », les résultats montrent que le risque de contracter cette infection est de 7×10^{-9} dans une eau contenant 1 Nf/L, de $8,5 \times 10^{-8}$ pour 10 Nf/L, de $2,5 \times 10^{-6}$ pour 100 Nf/L et de 26×10^{-4} pour 1000 Nf/L. C'est sur la base de cette étude que les autorités françaises ont retenu le seuil de 100 Nf/L, à ne pas dépasser pour les eaux de baignades dans lesquelles l'exposition humaine est possible. (240,241)

Bien que la qualification du risque ne soit pas établie avec certitude, globalement, on peut dire que le risque pour la santé publique apparaît comme faible. En effet, en dépit du taux de létalité de l'infection très important (95%), le nombre de cas de MEAP recensés en France (1 cas) et dans le monde (450 cas) reste très faible par rapport à la distribution ubiquitaire de l'amibe mangeuse de cerveau.

Le diagnostic étant difficile et réalisé tardivement, les différents traitements existants conduisant rarement à la guérison de l'infection, la prévention constitue alors la meilleure protection face à la MEAP. Certaines actions de prévention incombent aux baigneurs afin de limiter le contact de la muqueuse nasale avec de l'eau pouvant être contaminée alors que d'autres incombent aux gérants des eaux de baignade présentant une température de l'eau élevée.

III.4.2. Recommandations aux baigneurs

Naegleria fowleri pénétrant dans l'organisme, généralement à l'occasion d'une baignade, par passage à travers les cavités de la muqueuse nasale, il est recommandé d'adopter des pratiques limitant le contact des voies nasales avec de l'eau contaminée ou susceptible de l'être : (242,243)

- Garder la tête hors de l'eau,
- Nager en surface,
- Utiliser un pince-nez ou un masque,

- Ne pas sauter ou plonger,
- Ne pas se pousser ou se faire couler,
- Ne pas s'éclabousser,
- Surveiller et sensibiliser les enfants.

Il est également nécessaire de respecter les règles d'hygiène et d'adopter des pratiques adaptées : (242,243)

- Respecter les zones de déchaussage et le passage par les pédiluves, afin de limiter l'apport de pollution et donc l'introduction d'amibes par l'intermédiaire des sédiments,
- Eviter les activités aquatiques durant les périodes de fortes chaleurs, c'est-à-dire lorsque la température de l'eau est élevée, les niveaux d'eau sont bas et les débits faibles. En effet, les amibes sont principalement retrouvées dans les eaux douces chaudes et à faible débit, dans les sédiments et les biofilms.
- Eviter de creuser ou remuer les sédiments, notamment lorsque les eaux sont peu profondes, afin de ne pas remettre en suspension les amibes susceptibles de s'y nourrir et de s'y développer.
- Respecter les panneaux d'affichage indiquant les risques encourus et les consignes de sécurité à observer.
- Vider, nettoyer et faire sécher, entre chaque utilisation, les patageoires et petites piscines.

III.4.3. Recommandations aux gérants des baignades

Pour éviter la contamination lors des activités de baignade, des mesures de prévention visant à ne pas favoriser la présence de *N. fowleri* dans l'eau, doivent être mises en place par les gestionnaires des baignades dont les eaux ont une température dépassant 25°C et qui sont mal traitées ou qui ne le sont pas : (244)

- Aménager les abords de la baignade en installant des douches et des pédiluves pour améliorer les conditions d'hygiène et limiter l'introduction d'amibes via les sédiments,
- Entretien régulièrement la zone de baignade,
- Vidanger et nettoyer afin d'évacuer tous les sédiments présents dans les bassins,
- Réfectionner les bassins afin d'avoir des surfaces lisses car les amibes ont besoin d'un support pour se développer,
- Effectuer un suivi des amibes, notamment dans les sites présentant des eaux douces ayant une température supérieure à 25°C (voir tableau 22),
- Afficher par l'intermédiaire de panneaux d'information, le risque amibien et les précautions à observer afin de le réduire (voir figures 91 à 93)



Figure 91 : Panneau d'information à Dolé Gourbeyre en Guadeloupe mettant en garde sur la présence d'amibes, notamment *N. fowleri*. (245,246)



Figure 92 : Panneau d'avertissement du danger de la présence de *N. fowleri* au lac Mead, Nevada, USA. (247)



Figure 93 : Panneau de mise en garde sur le risque de méningite amibienne et consignes à suivre, au lac Lanier, Géorgie, USA. (248)

En Guadeloupe, l'Agence Régionale de Santé (ARS) Guadeloupe Saint-Barthélemy et Saint-Martin organise, depuis 2008, un suivi des amibes mangeuses de cerveau dans plusieurs sites de baignade particulièrement fréquentés et présentant des eaux douces chaudes (figure 94). Ce programme de recherche de *N. fowleri* fait suite à la contamination d'un enfant de 9 ans lors d'une baignade dans le bassin de Dolé, et à son décès lié à une MEAP. En effet, quelques jours avant les premiers symptômes de la maladie, le jeune garçon s'était baigné dans un bassin d'eau douce alimenté et renouvelé en continu, par une résurgence géothermale ayant une température supérieure à 30°C. (249)



Figure 94 : Répartition géographique des sites faisant l'objet d'une recherche de *N. fowleri*, en Guadeloupe. (244)

En 2018, l'Agence Nationale de la Sécurité Nationale de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES), en association avec l'Institut Pasteur, a mené une recherche de l'amibe mangeuse de cerveau, sur 11 bassins de baignade en eau chaude. Les résultats obtenus (tableau 22) montrent la présence de l'amibe thermophile dans certains bassins, notamment les bassins dits naturels plus difficiles à nettoyer. En effet, pour les autres bassins, afin de limiter la propagation de cette amibe, les services techniques communaux effectuent régulièrement un nettoyage des parois et du fond. On constate néanmoins que les valeurs relevées sont très faibles mais très variables sur de courtes périodes (2mois). (250)

Tableau 22 : Résultats de la campagne de l'ANSES 2018, sur plusieurs sites de baignade en eaux douces chaudes de Guadeloupe, pour la recherche des amibes thermophiles. (243)

Point de prélèvement	Commune	Date	T° eau (°C)	T° air (°C)	Résultats <i>Naegleria</i> totales (Unité/L)	Résultats <i>Naegleria fowleri</i> (Unité/L)
Bain du curé	Bouillante	10/07/2018	40,1	-	<2	0
2 ^{eme} Chute du carbet	Capesterre-Belle-Eau	03/09/2018	32,2	22,2	18	7
		22/10/2018	27,6	24,3	1	<2
Grosse Corde	Capesterre-Belle-Eau	27/08/2018	28,6	-	25	0
		22/10/2018	37	32,5	3	1
<u>Paradise</u>	Capesterre-Belle-Eau	27/08/2018	22,5	-	14	2
Bain de Dolé	Gourbeyre	21/08/2018	31,6	-	40	0
		22/10/2018	31,4	26,5	<2	<2
Bain des amours	Gourbeyre	21/08/2018	34,1	-	<2	0
		22/10/2018	34	26,5	<2	<2
Bassin Bleu - Palmiste	Gourbeyre	13/08/2018	18	-	<2	0
<u>Morphy</u>	Pointe-Noire	10/07/2018	35	-	<2	0
		22/10/2018	28,8	-	2	<2
Bains chauds de Matouba	Saint-Claude	13/08/2018	60	-	<2	0
Bains jaunes	Saint-Claude	21/08/2018	30,5	-	5	5
		22/10/2018	30,8	22,7	<2	<2
<u>Sofaïa</u>	Sainte-Rose	10/07/2018	30	-	<2	0

En Guadeloupe, depuis 2012, des panneaux d'information et de prévention ont été placés sur différents sites à risque (figure 95).



Figure 95 : Panneaux d'information sur les amibes, réalisés par l'ARS de Guadeloupe. (243,246)

III.4.4. Recommandations en fonction du type de baignade

III.4.4.1. Pour les piscines

Comme vu précédemment, le risque d'infection des piscines privées ou publiques est maîtrisé par un traitement de désinfection assurant une eau de qualité « désinfectée et désinfectante » et par un renouvellement de l'eau. Les traitements biocides ayant prouvé leur efficacité sur l'élimination de l'amibe mangeuse de cerveau, le simple respect des conditions d'utilisation de ces traitements semble suffisant pour empêcher la contamination de l'eau par cette amibe.

Dans son rapport « piscines réglementées » de mai 2010, l'agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail (Afsset) indique qu'afin de contrôler le risque lié à *N. fowleri*, il est recommandé d'observer une maintenance optimale des bassins. Pour cela, il est nécessaire de maintenir une chloration suffisante, de procéder à des techniques de coagulation et filtration de l'eau optimales mais aussi de nettoyer et brosser régulièrement les parois et le fond des installations. (251)

III.4.4.2. Pour les baignades artificielles

Pour ce type de baignade, afin de maîtriser le risque lié à la présence de *N. fowleri*, il est simplement recommandé : (163)

- De contrôler la température de l'eau :
 - Maintenir une température maximale entre 23 et 25°C (température relevée à 30 cm de profondeur),
 - Maîtriser cette température notamment pour des baignades en système fermé situées dans des zones géographiques ayant des conditions favorables (fortes chaleurs, ensoleillement important).

- De maîtriser la gestion hydraulique de la masse d'eau de baignade :
 - Avoir un dispositif permettant de renouveler, en moins de 12 heures, la totalité du volume d'eau de la baignade,
 - Posséder un dispositif de reprise de la couche d'eau superficielle permettant de recycler 50% de cette eau de surface,
 - L'ensemble de la baignade ne doit pas posséder de zone morte ou zone de stagnation.

- De surveiller la fréquentation :

→ Respecter le taux de fréquentation maximale instantané (FMI) en sachant que :

$$\text{FMI} = \text{Vtotal} / 10$$

FMI = fréquentation maximale instantanée

Vtotal = zone de baignade en m³

10 = estimation du volume d'eau par baigneur soit 10 m³

→ Respecter la fréquentation maximale journalière (FMJ) en sachant que :

$$\text{FMJ} = \text{FMI} \times (\text{Vtotal} + \text{Vrecirculé} + \text{Vrenouvelé}) / \text{Vtotal}$$

$$\text{FMJ} = \text{Vtotal} + \text{Vrecirculé} + \text{Vrenouvelé} / 10$$

FMJ = fréquence maximale journalière

FMI = fréquence maximale instantanée

Vtotal = zone de baignade en m³

Vrecirculé = volume d'eau recirculé et traité durant l'ouverture journalière de la baignade, en m³

Vrenouvelé = volume d'eau de remplissage ajouté pour cette même durée, en m³

10 = estimation du volume d'eau par baigneur soit 10 m³

III.4.4.3. Pour les baignades en eau libre

La présence de *N. fowleri* ne fait pas partie des critères pris en compte dans le classement de la qualité des eaux de baignade. Cependant, la directive européenne 2006/7/CE, stipule la possibilité d'établir des profils pour chaque zone de baignade déclarée (figure 96). Le profil de baignade est une obligation réglementaire. Il s'agit d'un document répertoriant toutes les actions à mettre en œuvre afin de préserver la qualité de l'eau. Il comprend l'identification des sources de pollution permanentes, temporaires ou potentielles pouvant avoir des conséquences négatives sur la qualité des eaux, et donc avoir une incidence sur la santé des baigneurs. Il comporte les mesures de gestion à mettre en œuvre afin de prévenir une contamination, il définit les actions à mener afin d'améliorer la qualité des eaux et il doit être régulièrement révisé et actualisé. C'est lors de son actualisation que le risque sanitaire lié à la présence de *N. fowleri* doit être pris en compte, notamment lorsque la nature de la baignade ou lorsque les activités en amont sont susceptibles d'entraîner une augmentation de la température de l'eau. (250,252)

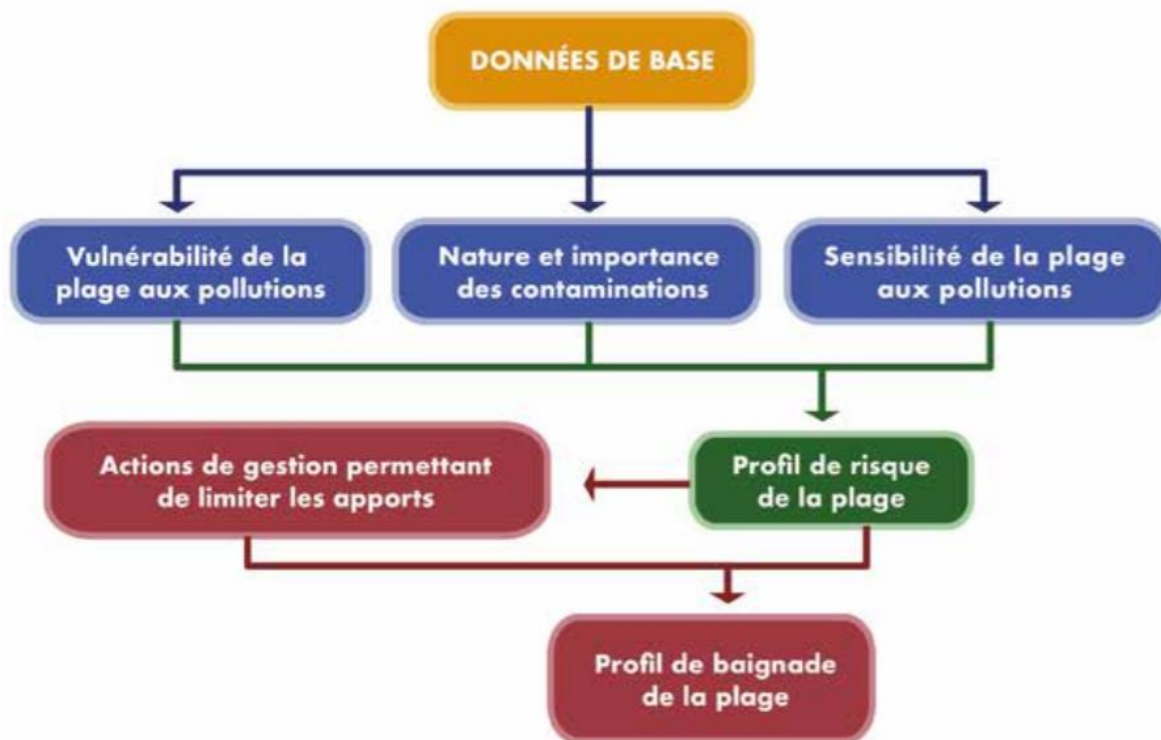


Figure 96 : Logique de définition du profil de baignade. (250)

Les eaux de baignades ayant une température élevée, soit dans le cas des sites dont les eaux de baignade sont chauffées naturellement par le soleil, soit pour les sites dont les eaux sont réchauffées artificiellement par les activités situées en aval (rejet des eaux de refroidissement des centrales thermiques et nucléaires), font parties de ce dispositif réglementaire. En effet, les amibes thermophiles comme *N. fowleri* se développant dans les eaux chaudes, un suivi de ces micro-organismes apparait essentiel pour ces sites. Ainsi, selon les recommandations du CSHPF (Conseil Supérieur d'Hygiène Public de France) un dépassement de la valeur limite de 100 Nf/L doit entraîner une interdiction des baignades. (253)

III.4.4.4. Pour les sites aménagés ou naturels, alimentés par de l'eau chaude

Les sites aménagés ou naturels, alimentés par de l'eau chaude, soulèvent certaines interrogations car ils n'entrent dans aucun cadre réglementaire (voir tableau 10 : textes réglementaires des différents types de baignade).

En effet, d'un point de vue sanitaire, la plupart des baignades situées dans les sites naturels (cascades, résurgences, bassin naturels) ou aménagés (bassin de Dolé en Guadeloupe), et alimentées par des eaux chaudes d'origine géothermales, ne sont pas contrôlées.

De fait, pour ces lieux de baignade très fréquentés et pour lesquels une interdiction n'est pas envisageable, la mise en place d'une affiche décrivant les risques encourus et les consignes à suivre (figures 97 et 98) semble être la solution la plus adaptée.



Figure 97 : Panneau d'avertissement du danger lié à la présence de *N. fowleri*, retrouvé à Rogers Spring, source d'eau chaude située près du Lac Mead, Nevada, USA. (254,255)



Figure 98 : Panneaux de mise en garde de la présence de *N. fowleri*, en Guadeloupe (246,256–258) : (en haut à gauche) panneau retrouvé aux bains chauds de Dolé-Gourbeyre (en haut à droite), aux bains jaunes à Saint-Claudes (en bas à gauche) et aux eaux chaudes de Sofaïa à Sainte-Rose (en bas à droite).

III.4.4.5. Pour tous les types de baignade

Quel que soit le type de baignade, il est primordial de recenser les cas cliniques de méningites purulentes dont le diagnostic étiologique n'a pas permis de mettre en évidence, dans le liquide céphalorachidien, la présence d'entérovirus ou de bactéries pyogènes. En effet, dans ce cas, une recherche systématique de *N. fowleri*, permettant le diagnostic de MEAP, doit être effectuée afin de connaître la prévalence de ce micro-organisme dans les infections des méninges sans diagnostic étiologique. (126)

Conclusion

Parmi les amibes telluriques amphizoïques, *Naegleria fowleri* est une amibe pathogène pour l'homme. Elle est surnommée « amibe mangeuse de cerveau » car elle est responsable d'une infection du SNC qui conduit à la destruction des tissus cérébraux. Appelée MEAP, cette infection est la seule pathologie qui lui est imputable. Il s'agit d'une pathologie à progression rapide qui possède un taux de létalité effroyable de 95%. Même si l'exposition à cette amibe est mondiale, l'étude des différents cas recensés de MEAP (<450 cas) nous indique que l'infection demeure un événement rare.

La présence de *N. fowleri* est détectée dans l'ensemble des types de baignade : baignades en eau libre, baignades artificielles, baignades en piscines privées et publiques, baignades alimentées par des eaux de refroidissement industrielles ou par de l'eau d'origine géothermale ainsi que dans les bains thérapeutiques et à remous. On la retrouve dans les pays tropicaux ou tempérés où sa distribution est saisonnière. Les facteurs microbiologiques et physico-chimiques tels qu'une température de l'eau supérieure à 25°C, un support, une source de nourriture suffisante et des prédateurs en faibles concentrations sont essentiels à son développement.

La contamination a lieu lors des baignades, suite à la pénétration du parasite dans les fosses nasales. Les enfants ou jeunes adultes et les personnes de sexe masculin sont, selon les études épidémiologiques, les personnes les plus à risque. Il est donc important de détecter cette amibe non seulement dans le milieu extérieur mais également lors du diagnostic de la MEAP. Cependant, il n'existe pas de protocole standardisé d'échantillonnage, d'identification et de quantification de l'amibe mangeuse de cerveau dans les eaux de baignades.

De plus, le diagnostic étant difficile et réalisé tardivement, les différents traitements existants conduisent rarement à la guérison de l'infection.

La prévention a donc une très grande importance et constitue la meilleure protection face à cette pathologie. Dans les sources d'eaux chaudes non traitées, il est conseillé d'éviter de sauter, plonger ou immerger la tête. Il est recommandé de porter un pince nez ou un masque. Il incombe aux gérants des eaux de baignades de faire respecter les règles d'hygiène tels que le passage par un pédiluve, d'entretenir les zones de baignades, et d'informer les baigneurs, par un système d'affichage, du risque auxquels ils sont exposés et des dispositifs de prévention à prendre afin d'en limiter le danger.

Il est important de préciser qu'en France, les traitements de désinfections autorisés sont suffisamment efficaces pour empêcher la contamination, par cette amibe mangeuse de cerveau, de l'eau alimentant les piscines.

Nous pouvons donc conclure qu'en raison de la rareté de l'infection rapportée à la distribution ubiquitaire du parasite et malgré le taux de létalité de MEAP très important, le risque pour la santé publique reste faible. Il est cependant nécessaire d'harmoniser les méthodes d'échantillonnage, d'analyse et de quantification de *N. fowleri*. Il faut recenser les sites de baignades pouvant être contaminés. Il est important de poursuivre la recherche sur les traitements à préconiser et d'approfondir les connaissances sur le comportement de cette amibe dans le milieu extérieur. Enfin, se posent les questions sur la responsabilité de *N. fowleri*, dans l'apparition d'une MEAP, en dehors de la baignade et celle de l'homme face aux modifications de l'écologie des milieux aquatiques.

Références bibliographiques

1. Le Monde des Amibes [Internet]. Planète GAÏA. [cité 6 déc 2020]. Disponible sur: <http://planete.gaia.free.fr/animal/proto/amibes.html>
2. Cateau E, Hechard Y, Rodier M-H. Les amibes libres: un danger méconnu. Rev Francoph Lab. 1 mars 2014;2014:41–51.
3. Amoebozoaire [Internet]. Dictionnaires et Encyclopédies sur « Academic ». [cité 8 déc 2020]. Disponible sur: <https://fracademic.com/dic.nsf/frwiki/94089>
4. Botterel-Chartier F, Dardé M-L, Kauffmann-Lacroix C, Roques C, Debourogne A, Delhaes L, et al. Parasitologie et mycologie médicales: guide des analyses et pratiques diagnostiques. Issy-les-Moulineaux: Elsevier Masson; 2018. 497 p.
5. Amoeba (genus) [Internet]. Wikipedia. [cité 8 déc 2020]. Disponible sur: [https://fr.xcv.wiki/wiki/Amoeba_\(genus\)](https://fr.xcv.wiki/wiki/Amoeba_(genus))
6. Rosenhof AIR von. Le premier enregistrement et l'illustration d'une amibe (peut-être *Chaos carolinense*), de Roesel von Rosenhof's *Insecten-Belustigung* [Internet]. Wikimédia Commons. 1755 [cité 8 déc 2020]. Disponible sur: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Der_Kleine_Proteus_from_Roesel.jpg?uselang=fr#/media/File:Der_Kleine_Proteus_from_Roesel.jpg
7. Bourée P. Aide-mémoire de parasitologie et de pathologie tropicale. Paris: Flammarion médecine-sciences; 2008. 447 p.
8. Chelkha N, Hasni I, Louazani AC, Levasseur A, La Scola B, Colson P. *Vermamoeba vermiformis* CDC-19 draft genome sequence reveals considerable gene trafficking including with candidate phyla radiation and giant viruses. Sci Rep. 3 avr 2020;10(1):5928.
9. Parasites - Sappinia - Amebic Encephalitis General Information [Internet]. CDC-Centers for Disease Control and Prevention. 2019 [cité 8 déc 2020]. Disponible sur: <https://www.cdc.gov/parasites/sappinia/general.html>
10. Nozais J-P, Datry A, Danis M, Boudon C. Traité de parasitologie médicale. Paris: Pradel; 1996. 817 p.
11. Moulinier C. Parasitologie et mycologie médicales: éléments de morphologie et de biologie. Cachan, France: Editions médicales internationales; 2003. 796 p.
12. Eukaryota (classification phylogénétique) [Internet]. Wikipédia. 2020 [cité 8 déc 2020]. Disponible sur: [https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Eukaryota_\(classification_phylog%C3%A9n%C3%A9tique\)&oldid=175808605](https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Eukaryota_(classification_phylog%C3%A9n%C3%A9tique)&oldid=175808605)
13. Eukaryota [Internet]. Wikipédia. 2020 [cité 8 déc 2020]. Disponible sur: <https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Eukaryota&oldid=174615703>
14. Les champignons prendraient un coup de vieux ! [Internet]. La Gazette des Plantes. 2017 [cité 8 déc 2020]. Disponible sur: <https://lagazettedesplantes.com/2017/05/14/les-champignons-prendraient-un-coup-de-vieux/>

15. Tice AK, Shadwick LL, Fiore-Donno AM, Geisen S, Kang S, Schuler GA, et al. Expansion of the molecular and morphological diversity of Acanthamoebidae (Centramoebida, Amoebozoa) and identification of a novel life cycle type within the group. Biol Direct [Internet]. 28 déc 2016 [cité 8 déc 2020];11. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5192571/>
16. *Entamoeba histolytica* [Internet]. Wikipédia. 2020 [cité 8 déc 2020]. Disponible sur: https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Entamoeba_histolytica&oldid=174639486
17. *Hartmannella* [Internet]. Wikipedia. 2020 [cité 8 déc 2020]. Disponible sur: <https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Hartmannella&oldid=968607697>
18. *Naegleria* [Internet]. Wikipédia. 2020 [cité 8 déc 2020]. Disponible sur: <https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Naegleria&oldid=174636526>
19. *Sappinia* [Internet]. Wikipedia. 2020 [cité 8 déc 2020]. Disponible sur: <https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Sappinia&oldid=968039723>
20. Echinamoebidae [Internet]. Wikipedia. 2020 [cité 8 déc 2020]. Disponible sur: <https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Echinamoebidae&oldid=985674446>
21. Sciences de la vie Leçon 1 : La cellule [Internet]. edusofad. [cité 8 déc 2020]. Disponible sur: <http://edusofad.com/www/demo/wged-scp/demo/scie1m01a1.php>
22. Organites cellulaires [Internet]. Bio.Web 2.0 cours de biologie en ligne. [cité 8 déc 2020]. Disponible sur: http://www.jpboeret.eu/biologie/index.php?option=com_content&view=article&id=27&Itemid=138
23. Biologie & Chemie [Internet]. [cité 8 déc 2020]. Disponible sur: <http://www.rainer-weiher.de/bio/einzeller.htm>
24. Wéry M. Protozoologie medicale. Bruxelles: De Boeck & Larcier; 1995. 273 p.
25. Deluol AM, Lebras P, Ricq G. Atlas de parasitologie. Atlas of parasitology. Les amibes. Saint-Maur (France): Ed. Varia; 1999. 73 p.
26. Amibe pathogène : Entamoeba histolytica histolytica [Internet]. Espace Techniciens de Laboratoire. [cité 12 déc 2020]. Disponible sur: <http://espacetechniciensdelaboratoire.blogspot.com/2015/03/amibe-pathogene-entamoeba-histolytica.html>
27. Etude cytologique de quelques amibes d'eau douce [Internet]. [cité 8 déc 2020]. Disponible sur: <http://www.svtaclairjj.fr/amibes/cytologie.htm>
28. Cytosquelette : transport viral et alterations viro-induites [Internet]. virologie. [cité 2 déc 2020]. Disponible sur: <http://virologie.free.fr/documents/virologie/02-cytosquelette/cytosquelette.htm>
29. Zottoli R. Guide to Genera of Common Amoeboid Protozoans [Internet]. protozoansintertidal. 2015 [cité 16 déc 2020]. Disponible sur: <https://protozoansintertidal.wordpress.com/guide-to-the-common-genera-of-amoeboid-protozoans-in-the-merrymeeting-bay-watershed/>
30. Carnt N, Stapleton F. Strategies for the prevention of contact lens-related *Acanthamoeba* keratitis: a review. Ophthalmic Physiol Opt. mars 2016;36(2):77-92.

31. Déplacement des Amibes Mouvements amiboïdes [Internet]. [cité 12 déc 2020]. Disponible sur: <http://www.svtaucclairjj.fr/amibes/deplacement.htm>
32. Amoeba Proteus- Chaos Diffluens [Internet]. Taxonomy. [cité 29 juin 2021]. Disponible sur: <http://domainsoflife.yolasite.com/amoeba-proteus.php>
33. Entamoeba histolytica trophozoite [Internet]. Medical Laboratories. [cité 12 déc 2020]. Disponible sur: <http://www.medical-labs.net/entamoeba-histolytica-trophozoite-1366/>
34. Naegleria fowleri - Image - Journal numérique [Internet]. [cité 12 déc 2020]. Disponible sur: <http://www.digitaljournal.com/image/250896>
35. Amibe. [Internet]. Wikipédia. 2020 [cité 12 déc 2020]. Disponible sur: <https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Amibe&oldid=174303509>
36. Gaumont R. Rhizopodes [Internet]. Encyclopædia Universalis. [cité 12 déc 2020]. Disponible sur: <https://www.universalis.fr/encyclopedie/rhizopodes/>
37. Delarue M. Arcella, une amibe à « coquille » [Internet]. [cité 12 déc 2020]. Disponible sur: https://www.canal-u.tv/video/tele2sciences/arcella_une_amibe_a_coquille.9759
38. Delarue M. Centropyxis, un thécamoebien épineux [Internet]. [cité 12 déc 2020]. Disponible sur: https://www.canal-u.tv/video/tele2sciences/centropyxis_un_thecamoebien_epineux.9760
39. Trophozoïte: définition et explications [Internet]. aquaportail. 2018 [cité 12 déc 2020]. Disponible sur: <https://www.aquaportail.com/definition-2165-trophozoite.html>
40. Amoeba (Plant cell) [Internet]. ThingLink. [cité 12 déc 2020]. Disponible sur: <https://www.thinglink.com/scene/718903370114400257>
41. Amoebe Unter Mikroskop - Fotos [Internet]. imago-images. [cité 12 déc 2020]. Disponible sur: <https://www.imago-images.de>
42. Acanthamoeba amoeba, illustration [Internet]. Science Photo Library. [cité 12 déc 2020]. Disponible sur: <https://www.sciencephoto.fr/image/12422863-Acanthamoeba-amoeba-illustration>
43. The Karius Test first detected #Balamuthia #mandrillaris in 2018. B. mandrillaris is a free-living #amoeba found in soil and water that can infect the body through skin wounds or inhalation, and can cause Granulomatous Amoebic #Encephalitis. #PathogenProfile <https://t.co/iUtdGpcOPN> [Internet]. @KariusInc. 2019 [cité 12 déc 2020]. Disponible sur: <https://twitter.com/KariusInc/status/1090694397270867968>
44. Jenni B. Mayorella-like amoebae [Internet]. 2018 [cité 12 déc 2020]. Disponible sur: <https://www.youtube.com/watch?v=TN27kxPo0fY>
45. L'amibe mangeuse de cerveau : qu'est-ce que c'est et comment nous affecte-t-elle ? [Internet]. Nos Pensées. 2019 [cité 12 déc 2020]. Disponible sur: <https://nospensees.fr/lamibe-mangeuse-de-cerveau-quest-ce-quest-et-comment-nous-affecte-t-elle/>
46. Maciver SK, Piñero JE, Lorenzo-Morales J. Is Naegleria fowleri an Emerging Parasite? Trends Parasitol. 1 janv 2020;36(1):19-28.

47. Siddiqui R, Khan NA. *Balamuthia mandrillaris*: Morphology, biology, and virulence. *Trop Parasitol.* 1 janv 2015;5(1):15.
48. Différence entre kyste et trophozoïte [Internet]. Sawakinome. [cité 12 déc 2020]. Disponible sur: <https://fr.sawakinome.com/articles/microbiology/difference-between-cyst-and-trophozoite.html>
49. Entamoeba coli parasite | Medical Laboratories [Internet]. [cité 12 déc 2020]. Disponible sur: <http://www.medical-labs.net/entamoeba-coli-parasite-2543/>
50. Cyst of *Acanthamoeba castellanii* under transmission electron... [Internet]. ResearchGate. [cité 12 déc 2020]. Disponible sur: https://www.researchgate.net/figure/Cyst-of-Acanthamoeba-castellanii-under-transmission-electron-microscopy_fig2_262453761
51. *Naegleria fowleri* – light microscope cytology [Internet]. Lubor Cerva. [cité 12 déc 2020]. Disponible sur: <https://sites.google.com/site/luborcerva30/luborcerva30/5-albums/3-naegleria-fowleri-light-microscope-cytology>
52. Actine-dépendance des mouvements amiboïdes et de la phagocytose Cas des Amibes [Internet]. [cité 29 juin 2021]. Disponible sur: <http://www.svtaclairjj.fr/amibes/actine.htm>
53. Flux de cytoplasme pendant la migration amibienne (ici l'amibe *Amoeba Proteus*) [Internet]. ResearchGate. [cité 12 déc 2020]. Disponible sur: https://www.researchgate.net/figure/Flux-de-cytoplasme-pendant-la-migration-amibienne-ici-lamibe-Amoeba-Proteus-La-partie_fig33_278631791
54. Motilité induite par polymérisation d'actine (schéma repris de [Alberts et al., 2002]). [Internet]. ResearchGate. [cité 12 déc 2020]. Disponible sur: https://www.researchgate.net/figure/Motilite-induite-par-polymerisation-dactine-schema-repris-de-Alberts-et-al-2002_fig5_46119388
55. Davet P. Vie microbienne du sol et production végétale. Paris: Inst. National de la Recherche Agronomique; 1996. 383 p.
56. Phagocytose [Internet]. Futura-santé. [cité 16 déc 2020]. Disponible sur: <https://www.futura-sciences.com/sante/definitions/biologie-phagocytose-223/>
57. Phagocytose [Internet]. Wikipédia. 2020 [cité 16 déc 2020]. Disponible sur: <https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Phagocytose&oldid=170736518>
58. Les Rhizopodes. [Internet]. [cité 16 déc 2020]. Disponible sur: <http://www.cosmovisions.com/rhizopodes.htm>
59. Nutrition des Amibes par phagocytose La phase de digestion [Internet]. [cité 16 déc 2020]. Disponible sur: <http://www.svtaclairjj.fr/amibes/digestion.htm>
60. Rôles de la membrane cytoplasmique: l'exocytose [Internet]. [cité 16 déc 2020]. Disponible sur: <http://www.sio2.be/cours/cell/membrane/13.php>
61. Les Protistes [Internet]. zoologie-uclouvain. [cité 16 déc 2020]. Disponible sur: <https://www.zoologie-uclouvain.be/syllabus-interactif.php?mode=ucl-bir&id=26>
62. Marciano-Cabral F, John DT. Cytopathogenicity of *Naegleria fowleri* for rat neuroblastoma cell cultures: scanning electron microscopy study. *Infect Immun.* juin 1983;40(3):1214-7.

63. Marciano-Cabral F. Biology of Naegleria spp. Microbiol Rev. mars 1988;52(1):114-33.
64. Marciano-Cabral F, Cabral G. Acanthamoeba spp. as Agents of Disease in Humans. Clin Microbiol Rev. 1 avr 2003;16(2):273-307.
65. Pinocytose [Internet]. Shutterstock.com. [cité 16 déc 2020]. Disponible sur: <https://www.shutterstock.com/image-illustration/pinocytosis-cell-drinking-membrane-invaginates-form-1450814204>
66. Légionellose : informations et traitements - Institut Pasteur [Internet]. [cité 16 déc 2020]. Disponible sur: <https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/legionellose>
67. Trafic intracellulaire de Legionella dans l'hôte eucaryote [Internet]. ResearchGate. [cité 16 déc 2020]. Disponible sur: https://www.researchgate.net/figure/Trafic-intracellulaire-de-Legionella-dans-lhote-eucaryote-1-Apres-sa-phagocytose-2_fig1_229159314
68. Les Legionella : de l'environnement à la maladie chez l'homme [Internet]. Académie nationale de médecine. [cité 16 déc 2020]. Disponible sur: <https://www.academie-medecine.fr/les-legionella-de-lenvironnement-a-la-maladie-chez-lhomme/>
69. Guerlotte J. Les amibes libres, un cheval de Troie pour les bactéries pathogènes. Anses Bull Veille Sci. 2016;29:53-7.
70. La membrane plasmique [Internet]. [cité 16 déc 2020]. Disponible sur: <http://www.afblum.be/bioafb/membrane/membrane.htm>
71. Entamoeba histolytica — Wikipédia [Internet]. [cité 16 déc 2020]. Disponible sur: https://fr.wikipedia.org/wiki/Entamoeba_histolytica
72. Morin A. Les protozoaires flagelles [Internet]. [cité 16 déc 2020]. Disponible sur: <http://georges.crozet.free.fr/p4.htm>
73. La reproduction asexuée [Internet]. eBiologie.fr. [cité 12 janv 2021]. Disponible sur: <https://www.ebiologie.fr/cours/s/41/la-reproduction-asexuee>
74. Mitose vs fission binaire [Internet]. fondoperlaterra. [cité 12 déc 2020]. Disponible sur: <https://fr.fondoperlaterra.org/mitosis-vs-binary-fission-118>
75. Courjaud C. Chapitre 1 – Les divisions des cellules eucaryotes [Internet]. TICE SVT. 2019 [cité 12 janv 2021]. Disponible sur: <https://ticesvt.wordpress.com/2019/10/06/1svt-chapitre-1-les-divisions-des-cellules-eucaryotes/>
76. Phases de la mitose [Internet]. 2013 [cité 12 janv 2021]. Disponible sur: <https://jeretiens.net/phases-de-la-mitose/>
77. Amibiase [Internet]. Institut Pasteur. 2015 [cité 12 janv 2021]. Disponible sur: <https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/amibiase>
78. Amoebose [Internet]. UNF3S. [cité 12 déc 2020]. Disponible sur: <http://campus.cerimes.fr/parasitologie/enseignement/amoebiose/site/html/1.html>
79. 2eb89214-8e9b-4ccd-b392-a8eb95eb0940.pdf [Internet]. [cité 12 janv 2021]. Disponible sur: <https://www.insst.es/documentos/94886/354041/Entamoeba+histolytica+2016.pdf/2eb89214-8e9b-4ccd-b392-a8eb95eb0940>

80. Matin A, Siddiqui R, Jayasekera S, Khan NA. Increasing Importance of *Balamuthia mandrillaris*. *Clin Microbiol Rev.* juill 2008;21(3):435-48.
81. Paugam A. Parasitoses et atteinte neurologique. *Rev Francoph Lab.* 2008;38(399):41-53.
82. L'amibe dévoreuse de cerveau qui inquiète les Etats-Unis [Internet]. *Sciences et Avenir.* [cité 12 janv 2021]. Disponible sur: https://www.sciencesetavenir.fr/sante/l-amibe-devoreuse-de-cerveau-qui-inquiete-les-etats-unis_12366
83. CNS section of the patient who survived infection with *Sappinia pedata* encephalitis [Internet]. *ResearchGate.* [cité 12 déc 2020]. Disponible [sur: https://www.researchgate.net/figure/CNS-section-of-the-patient-who-survived-infection-with-Sappinia-pedata-encephalitis-A_fig3_47554562](https://www.researchgate.net/figure/CNS-section-of-the-patient-who-survived-infection-with-Sappinia-pedata-encephalitis-A_fig3_47554562)
84. Amoeba awareness, part 2: *Balamuthia* [Internet]. *Outbreak News Today.* 2015 [cité 12 janv 2021]. Disponible sur: <http://outbreaknewstoday.com/amoeba-awareness-part-2-balamuthia-40796/>
85. *Naegleria* [Internet]. *Wikipédia.* 2020 [cité 6 déc 2020]. Disponible sur: <https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Naegleria&oldid=177535004>
86. *Naegleria fowleri* A: Trophozoïte ; B: Kyste ; C: Flagellé. Microscopie optique à contraste d'interférence différentiel et microscopie à contraste de phase [Internet]. *ResearchGate.* [cité 10 déc 2020]. Disponible sur: https://www.researchgate.net/figure/Naegleria-fowleri-A-Trophozoite-B-Kyste-C-Flagelle-Microscopie-optique-a_fig7_41202833
87. Parasites *Naegleria fowleri* Primary Amebic Meningoencephalitis (PAM) Amebic Encephalitis [Internet]. *CDC-Centers for Disease Control and Prevention.* 2020 [cité 29 juin 2021]. Disponible sur: <https://www.cdc.gov/parasites/naegleria/index.html>
88. Visvesvara GS, Moura H, Schuster FL. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2007;50(1):1-26.
89. Qu'est-ce que l'amibe *Naegleria fowleri* et quelle est son influence sur l'homme ? [Internet]. *Naegleria Fowleri.* [cité 10 déc 2020]. Disponible sur: <http://nath.vacher.free.fr/description.html>
90. Rittenhouse Cope J, Yoder JS, Visvesvara GS. Protozoa: Free-Living Amebae. In: *Infectious Diseases (Fourth Edition).* Issy-les-Moulineaux: Elsevier; 2017. p. 1744-1750.e1.
91. Martínez-Castillo M, Cárdenas-Zúñiga R, Coronado-Velázquez D, Debnath A, Serrano-Luna J, Shibayama M 2016. *Naegleria fowleri* after 50 years: is it a neglected pathogen? *J Med Microbiol.* 65(9):885-96.
92. John DT, Cole TB, Marciano-Cabral FM. Sucker-like structures on the pathogenic amoeba *Naegleria fowleri*. *Appl Environ Microbiol.* 1984;47(1):12-4.
93. Saanen C-V. Etude comparative des kystes de *Naegleria* et d' *Acanthamoeba (Hartmannella)* au microscope électronique à balayage. *Ann Parasitol Hum Comparée.* 1980;55(6):645-57.

94. Marciano-Cabral F, Cabral GA. The immune response to *Naegleria fowleri* amebae and pathogenesis of infection. *FEMS Immunol Med Microbiol.* nov 2007;51(2):243-59.
95. Schuster FL. Ultrastructure of Cysts of *Naegleria* spp: A Comparative Study. *J Protozool.* 1975;22(3):352-9.
96. *Naegleria fowleri*: (a) trophozoite, (b) a flagellate, and (c) a cyst [Internet]. ResearchGate. [cité 10 déc 2020]. Disponible sur: https://www.researchgate.net/figure/Naegleria-fowleri-a-trophozoite-b-a-flagellate-and-c-a-cyst-All-images-at-A_fig9_280883411
97. Schuster FL, Visvesvara GS. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int J Parasitol.* 1 août 2004;34(9):1001-27.
98. Siddiqui R, Ali IKM, Cope JR, Khan NA. Biology and pathogenesis of *Naegleria fowleri*. *Acta Trop.* 1 déc 2016;164:375-94.
99. Willmer EN. Factors Which Influence the Acquisition of Flagella by the Amoeba, *Naegleria Gruberi*. *J Exp Biol.* 1 sept 1956;33(3):583-603.
100. Infections amibiennes libres [Internet]. CDC-Centers for Disease Control and Prevention. [cité 10 déc 2020]. Disponible sur: <https://www.cdc.gov/dpdx/freelivingamebic/index.html>
101. Brain-Eating Amoeba That Killed Texas Boy, 6, Found In City Water [Internet]. Houston, TX Patch. 2020 [cité 10 déc 2020]. Disponible sur: <https://patch.com/texas/houston/brain-eating-amoeba-killed-texas-boy-6-found-city-water>
102. Life Cycle of *Naegleria fowleri* [Internet]. ResearchGate. [cité 10 déc 2020]. Disponible sur: https://www.researchgate.net/figure/Life-Cycle-of-Naegleria-fowleri_fig1_265289396
103. Ávila I, Rodríguez de G M, Infante D, Llovera V, Álvarez O, Briceño M. Amibas de vida libre potencialmente patógenas en aguas del parque "Las Cocuizas", Maracay, Venezuela. *Rev Cubana Med Trop.* avr 2006;58(1):19-24.
104. Gupta S. Isolation of *Naegleria fowleri* from pond water in West Bengal, India. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1 janv 1992;86(1):46.
105. Schoeman CJ, van der Vyver AE, Visvesvara GS. Primary amoebic meningo-encephalitis in Southern Africa. *J Infect.* 1 mars 1993;26(2):211-4.
106. Lares-Villa F, Hernández-Peña C. Concentration of *Naegleria fowleri* in natural waters used for recreational purposes in Sonora, Mexico (November 2007–October 2008). *Exp Parasitol.* 1 sept 2010;126(1):33-6.
107. Magniez M. Méthode de dénombrement des micro-organismes en milieu liquide (Méthode dite du nombre le plus probable). [Internet]. biotechnologie. [cité 3 déc 2020]. Disponible sur: <http://www.technobio.fr/2014/11/methode-de-denombrement-des-micro-organismes-en-milieu-liquide-methode-dite-du-nombre-le-plus-probable.html>
108. Craun * GF, Calderon RL, Craun MF. Outbreaks associated with recreational water in the United States. *Int J Environ Health Res.* 1 août 2005;15(4):243-62.
109. Anderson K, Jamieson A, Jadin JB, Willaert E. Primary amœbic meningoencephalitis. *The Lancet.* 24 mars 1973;301(7804):672.

110. De Jonckheere J, van de Voorde H. Differences in destruction of cysts of pathogenic and nonpathogenic *Naegleria* and *Acanthamoeba* by chlorine. *Appl Environ Microbiol.* févr 1976;31(2):294-7.
111. Kadlec V, Cerva L, Skvarova J. Virulent *Naegleria fowleri* in an indoor swimming pool. *Science.* 15 sept 1978;201(4360):1025-1025.
112. Rivera F, Ramírez P, Vilaclara G, Robles E, Medina F. A survey of pathogenic and free-living amoebae inhabiting swimming pool water in Mexico City. *Environ Res.* 1 oct 1983;32(1):205-11.
113. Kasprzak W, Mazur T, Cerva L. *Naegleria fowleri* in thermally polluted waters). *Folia Parasitol (Praha).* 1982;29(3):211-8.
114. De Jonckheere J, Van Dijck P, Van de Voorde H. The effect of thermal pollution on the distribution of *Naegleria fowleri*. *J Hyg (Lond).* août 1975;75(1):7-13.
115. Dive DG, Leclerc H, De Jonckheere J, Delattre JM. Isolation of *Naegleria fowleri* from the cooling pond of an electric power plant in France. *Ann Microbiol (Paris).* févr 1981;132A(1):97-105.
116. Shapiro MA, Karol MH, Keleti G, Sykora JL, Martinez AJ. The Role of Free-Living Amoebae Occurring in Heated Effluents as Causative Agents of Human Disease. *Water Sci Technol.* 1 oct 1983;15(10):135-47.
117. Tyndall RL, Ironside KS, Metler PL, Tan EL, Hazen TC, Fliermans CB. Effect of thermal additions on the density and distribution of thermophilic amoebae and pathogenic *Naegleria fowleri* in a newly created cooling lake. *Appl Environ Microbiol.* mars 1989;55(3):722-32.
118. Jamerson M, Remmers K, Cabral G, Marciano-Cabral F. Survey for the presence of *Naegleria fowleri* Amebae in lake water used to cool reactors at a nuclear power generating plant. *Parasitol Res.* 1 avr 2009;104(5):969-78.
119. International Meeting on the Biology and Pathogenicity of Free-living Amoebae, éditeur. IXth International meeting on the biology and pathogenicity of free-living amoegae, Paris 8-17 July 2001: proceedings. Montrouge: J. Libbey Eurotext; 2001. 338 p.
120. Agence régionale de santé Nouvelle-Aquitaine | Nouvelle-Aquitaine [Internet]. [cité 1 oct 2020]. Disponible sur: <https://www.nouvelle-aquitaine.ars.sante.fr/>
121. rapport_annuel_environnement_2020.pdf [Internet]. [cité 1 oct 2020]. Disponible sur: https://www.edf.fr/sites/default/files/contrib/groupe-edf/producteur-industriel/carte-des-implantations/centrale-civaux/surete-et-environnement/rapport_annuel_environnement_2020.pdf
122. Sykora JL, Keleti G, Martinez AJ. Occurrence and pathogenicity of *Naegleria fowleri* in artificially heated waters. *Appl Environ Microbiol.* mars 1983;45(3):974-9.
123. Kyle DE, Noblet GP. Seasonal Distribution of Thermotolerant Free-Living Amoebae. II. Lake Issaqueena¹. *J Protozool.* 1987;34(1):10-5.
124. Peters W, Pasvol G. *Médecine tropicale et parasitologie.* Paris: Flammarion Médecine-Sciences; 2004. 1-48 p.

125. Newsome A, Baker R, Miller R, Arnold R. Interactions between *Naegleria fowleri* and *Legionella pneumophila*. *Infect Immun*. 1985;50(2):449-52.
126. Évaluation des risques liés à la présence d'amibes *Naegleria fowleri* dans les eaux de baignade [Internet]. Anses. 2013 [cité 12 déc 2020]. Disponible sur: https://www.anses.fr/fr/system/files/EAUX2011sa0190Ra_1.pdf
127. Clark CG, Cross GA. rRNA genes of *Naegleria gruberi* are carried exclusively on a 14-kilobase-pair plasmid. *Mol Cell Biol*. sept 1987;7(9):3027-31.
128. Zysset-Burri DC, Müller N, Beuret C, Heller M, Schürch N, Gottstein B, et al. Genome-wide identification of pathogenicity factors of the free-living amoeba *Naegleria fowleri*. *BMC Genomics*. 2014;15(1):496.
129. General Information *Naegleria fowleri* [Internet]. CDC-Centers for Disease Control and Prevention. 2020 [cité 10 déc 2020]. Disponible sur: <https://www.cdc.gov/parasites/naegleria/general.html>
130. Caroline du Nord : l'amibe mangeuse de cerveau fait une nouvelle victime [Internet]. Le Journal de Montréal. 2019 [cité 3 déc 2020]. Disponible sur: <https://www.journaldemontreal.com/2019/07/26/caroline-du-nord-lamibe-mangeuse-de-cerveau-fait-une-nouvelle-victime>
131. Une enfant de 10 ans succombe à une amibe «mangeuse de cerveau» [Internet]. La Presse. 2019 [cité 3 déc 2020]. Disponible sur: <https://www.lapresse.ca/international/etats-unis/2019-09-16/une-enfant-de-10-ans-succombe-a-une-amibe-mangeuse-de-cerveau>
132. Une amibe « mangeuse de cerveau » tue un enfant de 6 ans au Texas [Internet]. Allo docteurs. 2020 [cité 4 déc 2020]. Disponible sur: https://www.allodocteurs.fr/maladies/maladies-infectieuses-et-tropicales/meningite/une-amibe-mangeuse-de-cerveau-tue-un-enfant-de-6-ans-au-texas_30008.html
133. *Naegleria fowleri* dans les eaux de baignade : des infections graves mais rares [Internet]. Anses. [cité 22 sept 2020]. Disponible sur: <https://www.anses.fr/fr/content/naegleria-fowleri-dans-les-eaux-de-baignade-des-infections-graves-mais-rares>
134. Sources of Infection & Risk Factors [Internet]. CDC-Centers for Disease Control and Prevention. 2020 [cité 11 nov 2020]. Disponible sur: <https://www.cdc.gov/parasites/naegleria/infection-sources.html>
135. Pathogène et environnement [Internet]. CDC-Centers for Disease Control and Prevention. 2019 [cité 11 nov 2020]. Disponible sur: <https://www.cdc.gov/parasites/naegleria/pathogen.html>
136. Pour quelles raisons l'amibe « mangeuse de cerveau » est-elle si meurtrière ? [Internet]. Trust My Science. 2019 [cité 4 déc 2020]. Disponible sur: <https://trustmyscience.com/pourquoi-amibe-mangeuse-cerveau-est-elle-si-meurtriere/>
137. Grace E, Asbill S, Virga K. *Naegleria fowleri*: Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment Options. *Antimicrob Agents Chemother*. 1 nov 2015;59(11):6677-81.

138. Capewell LG, Harris AM, Yoder JS, Cope JR, Eddy BA, Roy SL, et al. Diagnosis, Clinical Course, and Treatment of Primary Amoebic Meningoencephalitis in the United States, 1937–2013. *J Pediatr Infect Dis Soc.* 1 déc 2015;4(4):e68-75.
139. Stubhaug TT, Reiakvam OM, Stensvold CR, Hermansen NO, Holberg-Petersen M, Antal E-A, et al. Fatal primary amoebic meningoencephalitis in a Norwegian tourist returning from Thailand. *JMM Case Rep.* 28 juin 2016;3(3):1-5.
140. Cerebrospinal fluid smear containing trophozoites of brain-eating amoeba *Naegleria fowleri* and neutrophils [Internet]. iStock. [cité 4 déc 2020]. Disponible sur: <https://www.istockphoto.com/fr/photo/le-liquide-c%C3%A9phalorachidien-frottis-contenant-des-neutrophiles-et-des-mangeurs-de-gm1063275458-284261135>
141. Hannisch W, Hallagan LF. Primary amebic meningoencephalitis: A review of the clinical literature. *Wilderness Environ Med.* 1 nov 1997;8(4):211-3.
142. Behets J, Seghi F, Declerck P, Verelst L, Duvivier L, Van Damme A, et al. Detection of *Naegleria* spp. and *Naegleria fowleri*: a comparison of flagellation tests, ELISA and PCR. *Water Sci Technol J Int Assoc Water Pollut Res.* 2003;47(3):117-22.
143. Patterson M, Woodworth TW, Marciano-Cabral F, Bradley SG. Ultrastructure of *Naegleria fowleri* enflagellation. *J Bacteriol.* 1981;147(1):217-26.
144. Parija SC, Jayakeerthee SR. *Naegleria fowleri*: a free living amoeba of emerging medical importance. *J Commun Dis.* sept 1999;31(3):153-9.
145. Hara T, Fukuma T. Diagnosis of the primary amoebic meningoencephalitis due to *Naegleria fowleri*. *Parasitol Int.* 1 déc 2005;54(4):219-21.
146. Nicolas M, De Jonckheere JF, Pernin P, Bataille H, Le Bris V, Herrmann-Storck C. Diagnostic moléculaire d'une méningoencéphalite amibienne primitive à l'occasion d'un cas fatal en Guadeloupe. *Bull Société Pathol Exot.* 2010;103(1):14-8.
147. AMBISOME 50 mg pdre p susp de lipos p perf [Internet]. VIDAL. [cité 3 déc 2020]. Disponible sur: <https://www.vidal.fr/>
148. FUNGIZONE 50 mg pdre p sol inj [Internet]. VIDAL. [cité 3 déc 2020]. Disponible sur: <https://www.vidal.fr/>
149. Goswick SM, Brenner GM. Activities of Azithromycin and Amphotericin B against *Naegleria fowleri* In Vitro and in a Mouse Model of Primary Amebic Meningoencephalitis. *Antimicrob Agents Chemother.* févr 2003;47(2):524-8.
150. Kim J-H, Jung S-Y, Lee Y-J, Song K-J, Kwon D, Kim K, et al. Effect of Therapeutic Chemical Agents In Vitro and on Experimental Meningoencephalitis Due to *Naegleria fowleri*. *Antimicrob Agents Chemother.* nov 2008;52(11):4010-6.
151. IMPAVIDO 50 mg gél [ATUn] [Internet]. VIDAL. [cité 3 déc 2020]. Disponible sur: <https://www.vidal.fr/>
152. Bellini NK, Santos TM, da Silva MTA, Thiemann OH. The therapeutic strategies against *Naegleria fowleri*. *Exp Parasitol.* avr 2018;187:1-11.
153. TRIFLUCAN [Internet]. VIDAL. [cité 3 déc 2020]. Disponible sur: <https://www.vidal.fr/>

154. ZITHROMAX 500 mg, poudre pour solution pour perfusion - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé [Internet]. [cité 3 déc 2020]. Disponible sur: <https://www.ansm.sante.fr/Activites/Autorisations-temporaires-d-utilisation-ATU/Referentiel-des-ATU-nominatives/Referentiel-des-ATU-nominatives/ZITHROMAX-500-mg-poudre-pour-solution-pour-perfusion>
155. ROXITHROMYCINE TEVA [Internet]. VIDAL. [cité 3 déc 2020]. Disponible sur: <https://www.vidal.fr/>
156. Hygromycine B. In: Wikipédia [Internet]. 2020 [cité 3 déc 2020]. Disponible sur: https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Hygromycine_B&oldid=168988404
157. CLARITHROMYCINE EG [Internet]. VIDAL. [cité 3 déc 2020]. Disponible sur: <https://www.vidal.fr/>
158. Néomycine : substance active à effet thérapeutique [Internet]. VIDAL. [cité 3 déc 2020]. Disponible sur: <https://www.vidal.fr/>
159. Rokitamycine [Internet]. bookwiki. [cité 3 déc 2020]. Disponible sur: <https://boowiki.info/art/macrolides/rokitamycine.html>
160. ERYTHROCINE 0,5 g lyoph p us parentér IV [Internet]. VIDAL. [cité 3 déc 2020]. Disponible sur: <https://www.vidal.fr/>
161. Zéocine. In: Wikipédia [Internet]. 2019 [cité 3 déc 2020]. Disponible sur: <https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Z%C3%A9ocine&oldid=163847194>
162. Cardenas J. L'amibe mangeuse de cerveaux attaque à nouveau aux Etats-Unis [Internet]. Doctissimo. [cité 23 sept 2020]. Disponible sur: <https://www.doctissimo.fr/sante/news/l-amibe-mangeuse-de-cerveaux-attaque-a-nouveau-aux-etats-unis>
163. Risques sanitaires liés aux baignades artificielles : évaluation des risques sanitaires [Internet]. Anses. 2009 [cité 12 nov 2020]. Disponible sur: <https://www.anses.fr/fr/system/files/EAUX2006et0011Ra.pdf>
164. afsset. AVIS et rapport de l'Afsset relatifs à : l'évaluation des risques sanitaires liés aux baignades artificielles | Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail [Internet]. [cité 12 nov 2020]. Disponible sur: <https://www.anses.fr/fr/content/avis-et-rapport-de-lafsset-relatifs-%C3%A0-l%2E2%80%99%C3%A9valuation-des-risques-sanitaires-li%C3%A9s-aux-baignad-0>
165. De nouvelles règles sanitaires pour les baignades artificielles [Internet]. Banque des Territoires. 2019 [cité 10 déc 2020]. Disponible sur: <https://www.banquedesterritoires.fr/de-nouvelles-regles-sanitaires-pour-les-baignades-artificielles>
166. Pourquoi et comment est contrôlée la qualité des eaux de baignades ? Réglementation en vigueur [Internet]. Ministère chargé de la santé. [cité 12 nov 2020]. Disponible sur: <https://baignades.sante.gouv.fr/baignades/editorial/fr/controle/reglementation.html>
167. Article R322-18 - Code du sport - Légifrance [Internet]. [cité 3 déc 2020]. Disponible sur: https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000006548236/

168. Philippe E, Buzyn A, Maracineanu R. Décret n° 2019-299 du 10 avril 2019 relatif à la sécurité sanitaire des baignades artificielles [Internet]. Légifrance. 2019 [cité 11 nov 2020]. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/loda/id/JORFTEXT000038365112/>
169. Arrêté du 22 octobre 2013 relatif aux analyses de contrôle sanitaire et de surveillance des eaux conditionnées et des eaux minérales naturelles utilisées à des fins thérapeutiques dans un établissement thermal ou distribuées en buvette publique - Légifrance [Internet]. [cité 3 déc 2020]. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/id/JORFTEXT000028220863/>
170. Les piscines privatives à usage collectif : règles sanitaires [Internet]. ARS Normandie. [cité 3 déc 2020]. Disponible sur: <https://www.normandie.ars.sante.fr/sites/default/files/2017-01/Livret%20-%20les%20r%C3%A8gles%20sanitaires%20dans%20les%20piscines%20privatives%20-%20A0%20usage%20collectif%20.pdf>
171. Réglementation relative aux baignades et piscines [Internet]. Préfet du Jura. 2013 [cité 12 nov 2020]. Disponible sur: http://www.jura.gouv.fr/content/download/9035/76345/file/02_Memento_baignades_piscines_2015.pdf
172. Molet B, Derr-Harf C, Schreiberet J-E, Kremer M. Étude des Amibes libres dans les eaux de Strasbourg: Résultats préliminaires. Ann Parasitol Hum Comparée. 1976;51(4):401-6.
173. Ménard-Szczebara F, Berthelot N, Cavereau D, Sandrine O, Hechard Y, Sarroca V, et al. Occurrence des amibes libres en réseaux d'eau intérieurs. Eur J Water Qual. 1 janv 2008;39:65-75.
174. Haight JB, John DT. Growth of *Naegleria fowleri* in several axenic media. Folia Parasitol (Praha). 1980;27(3):207-12.
175. Schuster FL. Cultivation of Pathogenic and Opportunistic Free-Living Amebas. Clin Microbiol Rev. juill 2002;15(3):342-54.
176. Hu WN, Kopachik W, Band RN. Cloning and characterization of transcripts showing virulence-related gene expression in *Naegleria fowleri*. Infect Immun. juin 1992;60(6):2418-24.
177. Pernin P, De Jonckheere JF. Isolement et identification de deux nouvelles souches pathogènes de *Naegleria a us traliensis*. Ann Parasitol Hum Comparée. 1984;59(2):133-42.
178. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [Internet]. Microbe Notes. 2021 [cité 15 avr 2021]. Disponible sur: <https://microbenotes.com/enzyme-linked-immunosorbent-assay-elisa/>
179. Méthode ELISA [Internet]. TPE S - Maladie de Lyme. 2018 [cité 23 févr 2021]. Disponible sur: <https://tpepchlyme.wordpress.com/methode-elisa/>
180. Reveiller FL, Varenne M-P, Pougard C, Cabanes P-A, Pringuez E, Pourima B, et al. An Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) for the Identification of *Naegleria fowleri* in Environmental Water Samples. J Eukaryot Microbiol. 2003;50(2):109-13.

181. Sparagano O, Drouet E, Brebant R, Manet E, Denoyel GA, Pernin P. Use of monoclonal antibodies to distinguish pathogenic *Naegleria fowleri* (cysts, trophozoites, or flagellate forms) from other *Naegleria* species. *J Clin Microbiol.* oct 1993;31(10):2758-63.
182. Pougnaud C, Catala P, Drocourt J-L, Legastelois S, Pernin P, Pringuez E, et al. Rapid Detection and Enumeration of *Naegleria fowleri* in Surface Waters by Solid-Phase Cytometry. *Appl Environ Microbiol.* juin 2002;68(6):3102-7.
183. Kilvington S. Identification of *Naegleria fowleri* and other *Naegleria* spp. (free-living amoebae) using cellulose acetate membrane electrophoresis of glucose phosphate isomerase. *FEMS Microbiol Lett.* 15 nov 1995;133(3):219-23.
184. Pernin P. Isoenzyme patterns of pathogenic and nonpathogenic thermophilic *Naegleria* strains by isoelectric focusing. *Int J Parasitol.* 1 oct 1984;14(5):459-65.
185. Visvesvara GS, Peralta MJ, Brandt FH, Wilson M, Aloisio C, Franko E. Production of monoclonal antibodies to *Naegleria fowleri*, agent of primary amebic meningoencephalitis. *J Clin Microbiol.* sept 1987;25(9):1629-34.
186. Deluzarche C. PCR [Internet]. Futura. [cité 2 mars 2021]. Disponible sur: <https://www.futura-sciences.com/sante/definitions/genetique-pcr-91/>
187. Pélandakis M, Pernin P. Use of Multiplex PCR and PCR Restriction Enzyme Analysis for Detection and Exploration of the Variability in the Free-Living Amoeba *Naegleria* in the Environment. *Appl Environ Microbiol.* avr 2002;68(4):2061-5.
188. De Jonckheere JF, Brown S. The Identification of Vahlkampfiid Amoebae by ITS Sequencing. *Protist.* 156:89-96.
189. Kilvington S, Beeching J. Development of a PCR for identification of *Naegleria fowleri* from the environment. *Appl Environ Microbiol.* oct 1995;61(10):3764-7.
190. La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) : principe et applications [Internet]. Ecole de l'ADN. [cité 2 mars 2021]. Disponible sur: <http://ecole-adn.id-alizes.net/uploads/2011/10/cours-PCR-C-SIATKA-COMPLET.pdf>
191. Poitras E, Houde A. La PCR en temps réel : principes et applications. *Rev Biol Biotechnol.* 2002;2(2):2-11.
192. Behets J, Declerck P, Delaedt Y, Verelst L, Ollevier F. A duplex real-time PCR assay for the quantitative detection of *Naegleria fowleri* in water samples. *Water Res.* 1 janv 2007;41(1):118-26.
193. Qvarnstrom Y, Visvesvara GS, Sriram R, da Silva AJ. Multiplex Real-Time PCR Assay for Simultaneous Detection of *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, and *Naegleria fowleri*. *J Clin Microbiol.* oct 2006;44(10):3589-95.
194. Fiche Technique Santé-Sécurité : Agents Pathogènes – *Naegleria fowleri* [Internet]. Agence de la santé publique du Canada. 2011 [cité 14 nov 2020]. Disponible sur: <https://www.canada.ca/fr/sante-publique/services/biosecurite-biosurete-laboratoire/fiches-techniques-sante-securite-agents-pathogenes-evaluation-risques/naegleria-fowleri.html>
195. John DT, Howard MJ. Seasonal distribution of pathogenic free-living amebae in Oklahoma waters. *Parasitol Res.* 1995;81(3):193-201.

196. Gupta S, Das SR. Stock Cultures of Free-Living Amebas: Effect of Temperature on Viability and Pathogenicity. *J Parasitol.* 1999;85(1):137-9.
197. Chang SL. Resistance of pathogenic *Naegleria* to some common physical and chemical agents. *Appl Environ Microbiol.* févr 1978;35(2):368-75.
198. Cerva L. Some further characteristics of the growth of *Naegleria fowleri* and *N. gruberi* in axenic culture. *Folia Parasitol (Praha).* 1978;25(1):1-8.
199. Laborde JL, Trevin S, Hita A. Procédé d'élimination des protozoaires, notamment des amibes d'un flux aqueux colonisé, procédé de traitement d'un milieu aqueux par ultrasons et application pour détruire des protozoaires [Internet]. FR2801580A1, 2001 [cité 6 avr 2021]. Disponible sur: <https://patents.google.com/patent/FR2801580A1/fr>
200. Cerva L, Simanov L. *Naegleria fowleri* in cooling circuits of industrial and power plants in North Moravia. *Folia Parasitol (Praha).* 1983;30(2):97-101.
201. Civaux : ça baigne parfois dans l'huile (turbine) mais ça ne baigne plus dans l'eau [Internet]. *Infonucléaire.* [cité 7 avr 2021]. Disponible sur: <https://www.dissident-media.org/infonucléaire/condensateur.html>
202. *Gazette Nucléaire* [Internet]. [cité 7 avr 2021]. Disponible sur: https://gazettenucleaire.org/1998/167_Civaux1.html
203. Study of pathogenic free-living amebas in fresh-water lakes in Virginia [Internet]. EPA United States Environmental Protection Agency. [cité 7 avr 2021]. Disponible sur: https://cfpub.epa.gov/si/si_public_record_Report.cfm?Lab=ORD&dirEntryID=30449
204. Martínez-Castillo M, Ramírez-Rico G, Serrano-Luna J, Shibayama M. Iron-Binding Protein Degradation by Cysteine Proteases of *Naegleria fowleri*. *BioMed Res Int.* 2015;2015:1-8.
205. Newsome AL, Wilhelm WE. Inhibition of *Naegleria fowleri* by microbial iron-chelating agents: ecological implications. *Appl Environ Microbiol.* févr 1983;45(2):665-8.
206. Goudot S, Herbelin P, Mathieu L, Soreau S, Banas S, Jorand F. Growth dynamic of *Naegleria fowleri* in a microbial freshwater biofilm. *Water Res.* 1 sept 2012;46(13):3958-66.
207. Sheehan KB, Fagg JA, Ferris MJ, Henson JM. PCR Detection and Analysis of the Free-Living Amoeba *Naegleria* in Hot Springs in Yellowstone and Grand Teton National Parks. *Appl Environ Microbiol.* oct 2003;69(10):5914-8.
208. Rodríguez-Zaragoza S. Ecology of free-living amoebae. *Crit Rev Microbiol.* 1994;20(3):225-41.
209. Kyle DE, Noblet GP. Seasonal distribution of thermotolerant free-living amoebae. I. Willard's Pond. *J Protozool.* août 1986;33(3):422-34.
210. Gálvez A, Maqueda M, Cordovilla P, Martínez-Bueno M, Lebbadi M, Valdivia E. Characterization and biological activity against *Naegleria fowleri* of amoebicins produced by *Bacillus licheniformis* D-13. *Antimicrob Agents Chemother.* juin 1994;38(6):1314-9.

211. Richards AM, Von Dwingelo JE, Price CT, Abu Kwaik Y. Cellular microbiology and molecular ecology of Legionella–amoeba interaction. *Virulence*. 15 mai 2013;4(4):307-14.
212. Rowbotham TJ. Preliminary report on the pathogenicity of Legionella pneumophila for freshwater and soil amoebae. *J Clin Pathol*. déc 1980;33(12):1179-83.
213. Tiewcharoen S, Junnu V. Distribution of pathogenic Naegleria spp in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2001;32 Suppl 2:172-8.
214. Griffin JL. The Pathogenic Amoeboflagellate Naegleria fowleri: Environmental Isolations, Competitors, Ecologic Interactions, and the Flagellate-Empty Habitat Hypothesis¹. *J Protozool*. 1983;30(2):403-9.
215. Detterline JL, Wilhelm WE. Survey of Pathogenic Naegleria fowleri and Thermotolerant Amebas in Federal Recreational Waters. *Trans Am Microsc Soc*. 1991;110(3):244-61.
216. Traitement en eau potable : la désinfection [Internet]. Suez waterhandbook. [cité 7 avr 2021]. Disponible sur: <https://www.suezwaterhandbook.fr/procedes-et-technologies/traitement-des-eaux-potables/filieres-de-traitement-des-eaux-de-surface/la-desinfection>
217. Traitement et désinfection de l'eau de piscines [Internet]. [cité 7 avr 2021]. Disponible sur: https://www.ozonex.fr/traitement.html#texte_chlore
218. Paramètres physico-chimiques influençant l'efficacité de la désinfection par chloration : généralités sur l'action biocide du chlore [Internet]. INP-ENSEEIH. [cité 7 avr 2021]. Disponible sur: <http://hmf.enseeiht.fr/travaux/CD0304/optsee/bei/5/binome5/genechlo.htm>
219. Home Piscine, matériel et accessoires de piscine et SPA [Internet]. Homepiscine. [cité 7 avr 2021]. Disponible sur: <https://www.homepiscine.com/>
220. Chlore et désinfection des eaux de piscine [Internet]. [cité 7 avr 2021]. Disponible sur: <http://piscine.loisirs.free.fr/chlore.htm>
221. Désinfectants: le chlore [Internet]. [cité 7 avr 2021]. Disponible sur: <https://www.lenntech.fr/desinfection/desinfectants-chlore.htm>
222. Facteurs qui ont une influence sur la désinfection de l'eau [Internet]. [cité 7 avr 2021]. Disponible sur: <https://www.lenntech.fr/desinfection/facteurs-desinfection-eau.htm>
223. Administrator. Matériel de Chloration traitement de l'eau [Internet]. [cité 7 avr 2021]. Disponible sur: <http://www.cifec.fr/chloration/produit/desinfection/chlore-gazeux-chloration>
224. Cursons RT, Brown TJ, Keys EA. Effect of disinfectants on pathogenic free-living amoebae: in axenic conditions. *Appl Environ Microbiol*. 1980;40(1):62-6.
225. Loret J-F, Greub G. Free-living amoebae: Biological by-passes in water treatment. *Int J Hyg Environ Health*. 1 juin 2010;213(3):167-75.
226. Kilvington S. Activity of water biocide chemicals and contact lens disinfectants on pathogenic free-living amoebae. *Int Biodeterior*. 1 janv 1990;26(2):127-38.

227. Juery C. Définition des caractéristiques techniques de fonctionnement et domaine d'emploi des appareils de désinfection [Internet]. FNDAE. 2005 [cité 7 avr 2021]. Disponible sur: http://www.fndae.fr/archive/numero_2.html
228. Dupuy M, Berne F, Herbelin P, Binet M, Berthelot N, Rodier M-H, et al. Sensitivity of free-living amoeba trophozoites and cysts to water disinfectants. *Int J Hyg Environ Health*. 1 mars 2014;217(2):335-9.
229. Désinfection au chlore [Internet]. [cité 8 avr 2021]. Disponible sur: <https://www.lennotech.fr/procedes/desinfection/chimique/desinfection/desinfectants-dioxyde-de-chlore.htm>
230. Dawson MW, Brown TJ. The effect of chlorine and chlorine dioxide on pathogenic free-living amoebae (PFLA) in simulated natural conditions: The presence of bacteria and organic matter. *N Z J Mar Freshw Res*. 1 mars 1987;21(1):117-23.
231. Langlais B, Perrine D. Action of Ozone on Trophozoites and Free Amoeba cysts, Whether Pathogenic or Not. *Ozone Sci Eng*. 1 juin 1986;8(3):187-98.
232. Acide peracétique : activités et usages en établissements de santé [Internet]. cpias réseau national de prévention des infections associées aux soins [cité 8 avr 2021]. Disponible sur: http://www.cpias.fr/nosobase/recommandations/cclin_arlin/cclinSudEst/2004_desinfection_sterilisation_CCLIN.pdf
233. Désinfecteur UV : Quoi ? Pourquoi ? Comment ? Pour qui ? [Internet]. Piscine Info Service. 2013 [cité 11 mars 2021]. Disponible sur: <https://piscineinfoservice.com/equipement/desinfecteur-uv-ultraviolets-fonctionnement>
234. Quel est le principe de désinfection UV? Qu'est ce que la lumière UV? [Internet]. [cité 11 mars 2021]. Disponible sur: <https://www.1h2o3.com/apprendre/purification-eau/systemes-purification-eau-par-uv/desinfection-uv-eau/>
235. Avantages et inconvénient de la désinfection UV | 1H2O3 [Internet]. [cité 11 mars 2021]. Disponible sur: <https://www.1h2o3.com/apprendre/purification-eau/systemes-purification-eau-par-uv/avantages-inconvenient-desinfection-uv/>
236. Le traitement de l'eau par UV, une méthode efficace pour éliminer les micro-organismes [Internet]. Le Journal des Fluides. 2011 [cité 11 mars 2021]. Disponible sur: <http://www.lejournaldesfluides.com/actualite/le-traitement-de-leau-par-uv-une-methode-efficace-pour-eliminer-les-micro-organismes/>
237. Traitement de l'eau potable par lampe UV [Internet]. Waterlogic. [cité 11 mars 2021]. Disponible sur: <https://www.waterlogic.fr/blog/a-quoi-sert-une-lampe-uv-dans-le-traitement-de-l-eau-potable/>
238. Sarkar P, Gerba CP. Inactivation of *Naegleria fowleri* by chlorine and ultraviolet light. *J - Am Water Works Assoc*. 2012;104(3):51-2.
239. Wellings FM, Amuso PT, Chang SL, Lewis AL. Isolation and identification of pathogenic *Naegleria* from Florida lakes. *Appl Environ Microbiol*. déc 1977;34(6):661-7.
240. Cabanes P-A, Wallet F, Pringuez E, Pernin P. Assessing the Risk of Primary Amoebic Meningoencephalitis from Swimming in the Presence of Environmental *Naegleria fowleri*. *Appl Environ Microbiol*. juill 2001;67(7):2927-31.

241. Cabanes P-A. Les approches méthodologiques utilisées pour l'étude des effets des faibles doses dans le domaine de la microbiologie [Internet]. SFRP société française de radioprotection. [cité 12 janv 2021]. Disponible sur: <https://sfrp.asso.fr › documents › 6-PA-Cabanes>
242. NCDHHS: Rare Brain Infection, Death Linked to Swim in a Cumberland County Lake [Internet]. [cité 15 mars 2021]. Disponible sur: <https://www.ncdhhs.gov/news/press-releases/rare-brain-infection-death-linked-swim-cumberland-county-lake>
243. Prévention AMIBES - eaux de baignade [Internet]. [cité 15 mars 2021]. Disponible sur: <https://www.guadeloupe.ars.sante.fr/prevention-amibes-eaux-de-baignade>
244. Bulletin de veille sanitaire Antilles-Guyane. n°2 [Internet]. Santé Publique France. 2010 [cité 16 mars 2021]. Disponible sur: <https://www.santepubliquefrance.fr/regions/antilles/documents/bulletin-regional/2010/bulletin-de-veille-sanitaire-antilles-guyane.-n-2-fevrier-2010>
245. Bains chauds : gare aux amibes - Santé en Guadeloupe [Internet]. France-Antilles Guadeloupe. [cité 16 mars 2021]. Disponible sur: <http://www.guadeloupe.franceantilles.fr/actualite/sante/bains-chauds-gare-aux-amibes-237034.php>
246. Trail du petit et du grand Palmiste - Dé doudous en Gwada [Internet]. 2012 [cité 16 mars 2021]. Disponible sur: <http://dedoudou.canalblog.com/archives/2012/03/11/24032415.html>
247. How 'brain-eating' amoebas kill [Internet]. Science News for Students. 2015 [cité 16 mars 2021]. Disponible sur: <https://www.sciencenewsforstudents.org/article/how-brain-eating-amoebas-kill>
248. Patel K. Themes of Parasitology [Internet]. [cité 16 mars 2021]. Disponible sur: <http://bio390parasitology.blogspot.com/2011/02/naegleria-fowleri-road-to-losing-your.html>
249. Attention aux amibes : l'ARS lance un appel à la prudence [Internet]. Guadeloupe la 1ère. [cité 16 mars 2021]. Disponible sur: <https://la1ere.francetvinfo.fr/guadeloupe/2013/10/09/attention-aux-amibes-l-ars-lance-un-appel-la-prudence-76113.html>
250. Eau et assainissement les chiffres clés [Internet]. eau d'excellence. [cité 16 mars 2021]. Disponible sur: <https://eaudexcellence.fr/wp-content/uploads/2019/12/les-chiffres-cles-2019-de-leau-et-lassainissement-en-guadeloupe.pdf>
251. Évaluation des risques sanitaires liés aux piscines Partie I : piscines réglementées [Internet]. Anses. [cité 17 mars 2021]. Disponible sur: <https://www.anses.fr/fr/system/files/EAUX2007sa0409Ra.pdf>
252. Les profils de baignade : un outil pour prévenir les risques sanitaires et améliorer la qualité [Internet]. ARS Hauts-de-France. [cité 18 mars 2021]. Disponible sur: <https://www.hauts-de-france.ars.sante.fr/system/files/2020-06/ANNEXE%20PROFIL%20DE%20BAIGNADE.pdf>
253. Note d'information DGS/EA4/ n° 2014/166 du 23 mai 2014 relative aux modalités de recensement, d'exercice du contrôle sanitaire et de classement des eaux de baignade pour chaque saison balnéaire à compter de l'année 2014 [Internet]. Ministère des

solidarités et de la santé. [cité 18 mars 2021]. Disponible sur: https://solidarites-sante.gouv.fr/fichiers/bo/2014/14-07/ste_20140007_0000_0083.pdf

254. Cox C. Nevada Desert Adventure NANFA Convention 2010 [Internet]. Casper's Wanders. [cité 18 mars 2021]. Disponible sur: <http://casperswanders.blogspot.com/>
255. Hillier B. Rogers Spring Near Lake Mead [Internet]. Southwest Explorers. 2019 [cité 18 mars 2021]. Disponible sur: <https://southwestexplorers.com/rogers-spring-near-lake-mead/>
256. 5 sources d'eau chaude à découvrir en Guadeloupe [Internet]. [cité 18 mars 2021]. Disponible sur: <https://www.rentiles.fr/blog-voyage/5-sources-eau-chaude.html>
257. DOLE, source avec plusieurs bassins d'eau tiède en forêt. [Internet]. Guadeloupe-Karukeravisit. [cité 18 mars 2021]. Disponible sur: <http://www.guadeloupe-karukeravisit.fr/la-basse-terre/region-sud/dole/>
258. Guadeloupe : J5 Basse Terre La Soufrière [Internet]. Véro, Maya, Marius et Rafaël en Provence. [cité 18 mars 2021]. Disponible sur: <http://mariusrafael.canalblog.com/archives/2016/04/04/33631846.html>

Serment De Galien

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté 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, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les 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.

Les amibes mangeuses de cerveau

Naegleria fowleri, surnommée l'amibe mangeuse de cerveau, est un protozoaire eucaryote unicellulaire hétérotrophe se déplaçant par projections cytoplasmiques. Elle fait partie des amibes telluriques amphizoïques. La méningo-encéphalite amibienne primitive (MEAP) est la seule pathologie qui lui est imputable. Il s'agit d'une infection grave du système nerveux central, mortelle dans 95% des cas en seulement quelques jours. Son diagnostic étant difficile et réalisé tardivement, les traitements existants conduisent rarement à la guérison de l'infection. Le but de notre étude a été de déterminer l'ampleur du risque sanitaire lié à la présence de *N. fowleri* dans les eaux de baignade et les mesures à prendre pour en limiter le risque. L'étude des caractéristiques écologiques a montré que cette amibe ubiquitaire est principalement détectée dans les eaux douces ayant une température supérieure à 25°C et possédant une source de nourriture suffisante. L'analyse des critères épidémiologiques a révélé qu'elle se développe généralement chez des sujets jeunes, préférentiellement de sexe masculin, immunocompétents et en bonne santé. La contamination s'effectue lors de baignade, suite à la pénétration du parasite dans les fosses nasales. Depuis 1965, moins de 450 cas de MEAP ont été rapportés dans le monde dont un seul en France. Notre travail a montré que la prévention constitue la meilleure protection face à cette pathologie. Certaines actions de prévention incombent aux gérants des eaux de baignade alors que d'autres incombent aux baigneurs afin de limiter le contact de la muqueuse nasale avec de l'eau pouvant être contaminée.

Mots-clés : *Naegleria fowleri*, amibe mangeuse de cerveau, MEAP, mortelle, caractéristiques écologiques, critères épidémiologiques, traitements, prévention.

Brain-eating amoebae

Naegleria fowleri, called the brain-eating amoeba, is a eukaryotic heterotrophic single-celled protozoa that moves by cytoplasmic projections. It is one of the amphizoic telluric amoebae. The only disease that can be attributed to it is primary amoebic meningoencephalitis (PAM). It is a serious infection of the central nervous system, fatal in 95% of cases in just a few days. Its diagnosis being difficult and late, the existing treatments rarely lead to a cure of the infection. The aim of our study was to determine the extent of the health risk linked to the presence of *N. fowleri* in bathing waters and the measures to be taken to limit the risk. The study of ecological characteristics showed that this ubiquitous amoeba is mainly detected in fresh waters with a temperature above 25°C and with a sufficient food source. Analysis of epidemiological criteria revealed that it generally develops in young subjects, preferably male, immunocompetent and in good health. The infection occurs during bathing, following the penetration of the parasite in the nasal cavities. Since 1965, less than 450 cases of PAM have been reported worldwide, including only one in France. Our work has shown that prevention is the best protection against this disease. Certain preventive actions are incumbent on the managers of bathing waters, while others are incumbent on bathers to limit contact of the nasal mucus with potentially contaminated water.

Keywords : *Naegleria fowleri*, brain-eating amoeba, PAM, fatal, ecological characteristics, epidemiological criteria, treatments, prevention.

