

UNIVERSITE DES ANTILLES

Faculté des Sciences Exactes et Naturelles

École Doctorale pluridisciplinaire

Thèse de Doctorat

En Physiologie-biologie des organismes-populations-interactions

Mirna MOUSSA

Les amibes libres pathogènes des eaux chaudes de la Guadeloupe, étude écologique, caractérisation moléculaire et prophylaxie des zones de baignade

Sous la direction de :

Jérôme GUERLOTTÉ, Professeur, Université des Antilles

Antoine TALARMIN, Docteur, Institut Pasteur de la Guadeloupe

Soutenue le 25 Septembre 2015 à l'Institut Pasteur de Guadeloupe

N:

Jury:

GROS Olivier, Pr.	Université des Antilles	Président
HÉCHARD Yann, Pr.	Université de Poitiers	Rapporteur
YERA Hélène, MCU-PH	Institut Cochin, Paris	Rapporteur
ALBINA Emmanuel, Dr.	CIRAD Antilles	Examineur
DESBOIS Nicole, Dr.	CHU de Fort-de-France	Examineur
GUERLOTTÉ Jérôme, Pr.	Université des Antilles	Examineur

A ma famille et mes amis pour leur Amour et leur soutien au quotidien. Vous avez toujours su trouver les mots pour m'encourager dans les moments les plus difficiles. Je ne vous remercierai jamais assez pour tout ce que vous avez fait.

Je pense à ma grand-mère en Syrie qui m'a appris la joie de vivre malgré les difficultés.

Remerciements

Je souhaite tout d'abord exprimer ma profonde gratitude au Docteur Antoine Talarmin qui m'a permis de réaliser cette thèse au sein de l'Institut Pasteur de la Guadeloupe ainsi qu'au Professeur Jérôme Guerlotté qui m'a fait l'honneur d'être mon Directeur de thèse durant ces trois années. Je leur suis extrêmement reconnaissante de m'avoir fait confiance et de m'avoir donné des opportunités pour réussir dans ce domaine. Je les remercie pour leur patience, leurs conseils, leur soutien et leur disponibilité.

Je voudrais vivement remercier le Professeur Johan De Jonckheere (Université De Duve, Belgique) sans qui ce travail n'aurait jamais pu voir le jour et Madame Alexandra Bastaraud, Directrice du Laboratoire Hygiène et Environnement (LHE) de l'Institut Pasteur de Madagascar d'avoir contribué à la réalisation de cette thèse.

Je tiens à remercier toutes les personnes que j'ai pu croiser à l'Institut Pasteur qui m'ont apporté le soutien nécessaire à l'aboutissement de ce travail. Je les remercie de leur amitié et de leur disponibilité.

Je remercie chaleureusement le Dr. Thierry Zozio pour ses précieux conseils qui m'ont beaucoup aidée, Véronique Hill qui m'a donné l'impulsion pour oser me lancer dans cette aventure, David Couvin, Daniella Goindin, Christelle Dollin, Syndia Sadikalay et Elisabeth Streit pour leur joie, leur bonne humeur et leur soutien sans faille au quotidien.

A Tatiana Basileu qui a toujours cru en moi, pour son enthousiasme, ses encouragements pour me pousser à toujours aller plus loin. Merci pour ton amitié si rare qui me fait grandir chaque jour.

Je n'oublie pas, Frédéric Prudenté, Mylène Berchel, Michel Pioche et tous les membres de l'équipe du LHE, de l'Unité des mycobactéries, de l'Administration de l'Institut Pasteur d'avoir toujours été présents pour moi.

A ma famille, mon père, mes frères Georges et Alexandre qui m'ont toujours soutenue et notamment à ma chère petite maman qui m'a tant aidée à surmonter les épreuves. Merci pour ta compassion et ton amour que j'ai ressenti à chaque instant. A ma Grand-mère, qui m'a appris la joie de vivre malgré les difficultés. A Benjamin, pour son amour et son soutien indéfectibles.

Merci à Dieu pour toutes les merveilles qu'Il a réalisées dans ma vie...

RÉSUMÉ

Les amibes sont des organismes unicellulaires eucaryotes, de 10 à 300 µm, pouvant vivre sous forme parasite ou évoluer librement dans les sols et les milieux aquatiques ou encore adopter l'une ou l'autre forme en fonction de l'environnement. Certaines amibes libres sont hautement pathogènes pour les animaux et l'homme, en particulier *Naegleria fowleri* qui se développe dans les eaux naturellement chaudes à des températures comprises entre 27 et 45°C.

Cette espèce est responsable d'une encéphalite généralement mortelle, la méningo-encéphalite amibienne primitive (MEAP), dont un cas a été recensé en Guadeloupe en 2008. Un enfant de 9 ans ayant contracté la maladie est décédé quelques jours après un bain dans les eaux chaudes de Dolé, sur la commune de Gourbeyre. Notre travail de Thèse à l'Institut Pasteur, en collaboration avec l'ARS, a permis d'initier un programme de recherche sur ces amibes pathogènes très peu connues sur notre territoire, afin de mieux évaluer le risque lié aux baignades dans les sources géothermales de la Guadeloupe. Nous avons développé et mis au point une méthode de détection et de dénombrement des amibes faisant appel à la biologie moléculaire qui est aujourd'hui appliquée en routine au sein de notre laboratoire.

Depuis Janvier 2011, un suivi mensuel a révélé la présence des amibes thermophiles et de l'amibe pathogène dans presque tous les sites analysés (Ravine Chaude, Bains de La Lise et Bain du Curé à Pigeon, Bains Jaunes, Bain de Dolé, Bain de Capes, Bain des Amours, Bain de la rivière Grosse-Corde, Chute du Carbet, Bain de Morphy et Bain chaud de Matouba), à l'exception des eaux chaudes soufrées et/ou salées de Sofaïa et de l'Anse Thomas à Bouillante. Le séquençage des produits de PCR obtenus et déposés dans Genbank nous a permis de confirmer l'appartenance de cette souche de *N. fowleri*, au type 3 Euro-américain, identique à celui détecté lors de l'accident de 2008 (Moussa *et al.* 2013). Le nombre d'amibes pathogènes retrouvées varie de 2 à 30 amibes/litre selon les bains, sans dépasser la limite de 100 amibes/litre recommandée par les autorités sanitaires. En dépit de ces faibles concentrations, une surveillance régulière des bassins est nécessaire. Sur l'ensemble de l'année 2011-2012, l'espèce pathogène *N. fowleri* a été la plus fréquemment rencontrée par rapport aux espèces non pathogènes *N. lovaniensis* et *Hartmanella* sp. Ces données de surveillance ont amené l'ARS et les communes concernées à organiser une campagne de sensibilisation à destination des populations locales et touristiques, reposant sur l'installation de panneaux de prévention à proximité des principaux sites où *N. fowleri* a été retrouvée.

La présence régulière de *N. fowleri* tout au long de l'année dans la plupart des bains chauds et notamment dans les bains les plus fréquentés, a orienté notre travail sur la recherche de l'origine de leur contamination. Nous avons découvert que les sources géothermales ne sont pas contaminées à leur émergence, mais que les amibes proviennent de la terre en amont des bassins. Ce résultat qui montre que le sol est le réservoir naturel des amibes, nous a permis de proposer aux collectivités un moyen de lutte efficace en canalisant l'eau depuis l'émergence jusqu'au bassin, sans passer par le sol (Moussa *et al.* 2014).

Dans le but d'optimiser la détection des amibes qui sont en faible concentration dans les eaux chaudes de Guadeloupe, nous avons mis au point une méthode simplifiée de l'estimation du nombre le plus probable (NPP), nous avons adapté la technique de PCR quantitative (qPCR) pour atteindre la sensibilité de 2 amibes/litre et nous avons mis en place l'analyse en spectrométrie de masse (MALDI-TOF) pour discriminer les amibes d'après leur signature protéique.

Enfin, nos observations préliminaires en microscopie photonique, couplées à la vidéo, suggèrent des comportements sociaux de ces amibes, tandis que la microscopie électronique à balayage (MEB) a révélé un phénomène de libération de vésicules à partir de la membrane plasmique "*blebbing*", pouvant participer à l'enkystement des amibes. Cette étude sur les amibes libres de Guadeloupe ouvre de nouvelles perspectives de recherche en métagénomique et sur les mécanismes de leur pathogénicité afin d'en améliorer la prévention.

Mots clefs : Amibes libres thermophiles, Bain géothermal, Guadeloupe, *Naegleria fowleri*, Pathogénicité, Méningo-encéphalite amibienne primitive (MEAP), *Naegleria lovaniensis*, *Hartmanella*, Suivi, Détection, Filtration, NPP, PCR, qPCR, MALDI-TOF, MEB.

ABSTRACT

Amoebas are eukaryotic unicellular organisms, measuring from 10 to 300 μm , being able to live under a parasite form or to evolve freely in soils and aquatic media. They can even adopt either form depending of the environment. Some free living amoebas are highly pathogenic for animals and humans, especially *Naegleria fowleri* which develops in naturally hot waters at temperatures between 27 and 45°C.

This species is responsible for an encephalitis generally lethal, the primary amoebic meningoencephalitis (PAM), a case of which occurred in Guadeloupe in 2008. A 9-year-old child having contracted the disease, died a few days after a bath in the hot waters of Dolé, in Gourbeyre.

Our Thesis at the Institut Pasteur of Guadeloupe, in association with the ARS, initiated a research program on these pathogenic amoebas poorly known in our territory, to better estimate the risk to contract the disease while bathing in geothermal recreational waters of Guadeloupe. We developed and worked out a method of detection and enumeration of amoebas using the molecular biology, which is currently applied in routine in our laboratory.

Since January, 2011, a monthly monitoring of the baths revealed the presence of thermophilic free living amoebas and pathogenic amoeba in almost all the analyzed sites (Ravine Chaude, La Lise, Bain du Curé à Pigeon, Bains Jaunes, Bain de Dolé, Bain de Capès, Bain des Amours, Bain de la rivière Grosse-Corde, Chutes du Carbet, Morphy and the hot bath of Matouba), with the exception of sulphurated and/or salty hot waters of Sofaïa and the Anse-Thomas in Bouillante. The sequencing of the PCR products obtained were deposited in Genbank and confirmed that the Guadeloupean *N. fowleri* belonged to the Type-3 Euro-American, identical to that detected in the patient in 2008 (Moussa *et al.* 2013).

The number of pathogenic amoebas varied from 2 to 30 amoebas / liter according to the baths, without exceeding the limit of 100 amoebas / liter recommended by the health authorities.

In spite of this rather low concentration the baths require a regular surveillance. On the full year 2011-2012, the pathogenic species *N. fowleri* was the most frequently encountered species followed by *N. lovaniensis* and *Hartmanella* sp. These data of the surveillance led the ARS and the municipalities concerned to organize an awareness campaign destined to the local and tourist population, based on the installation of prevention panels near the main sites where *N. fowleri* was found.

The regular presence of *N. fowleri* during the year in most of the hot baths, especially the most frequented ones, leads us to look for the origin of their contamination. We discovered that geothermal springs are not contaminated at their emergence, but that amoebas come from the soil upstream the baths. This result which shows that soil is the natural reservoir of amoebas, allowed us to propose to the authorities effective means of prevention by installing pipes to carry the water from the emergence to the bath, without touching the soil (Moussa *et al.* 2014).

With the aim of optimizing the detection of amoebas which are at low concentration in hot waters of Guadeloupe, we worked out a simplified method for the estimation of the most probable number (MPN), we adapted the quantitative PCR technique to reach the sensibility of 2 amoebas/liter and we initiated the analysis in mass spectrometry (MALDI-TOF) to discriminate between amoebas according to their protein signature.

Finally, our preliminary observations in light microscopy, coupled with the video, suggest social behavior of these amoebas, whereas the scanning electronic microscopy (SEM) revealed a phenomenon of liberation of vesicles from the plasmic membrane "*blebbing*", which could participate in the encystment of amoebas.

This study on free living amoebas of Guadeloupe opens new perspectives of research in metagenomics and the pathogenicity mechanisms to improve the prevention.

Keywords: Thermophilic free living amoeba, Thermal baths, Guadeloupe, *Naegleria fowleri*, Pathogenicity, Primary amoebic meningoencephalitis, *Naegleria lovaniensis*, *Hartmanella*, Monitoring, Detection, Filtration, MPN, PCR, qPCR, MALDI-TOF, SEM.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique

AFNOR : association française de normalisation

ARN : acide ribonucléique

ARS : agence régionale de santé

BET : bromure d'éthidium

BRGM : bureau de recherches géologiques et minières

BSA : *bovine serum albumin*

Bst : *Bacillus stearothermophilus*

Ct : *cycle threshold* ou cycle seuil

CDC : *center for disease control*

CFU : *colony forming units*

CHCA : *alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid*

COFRAC : comité français d'accréditation

DMSO : diméthylsulfoxyde

EAG : encéphalite amibienne granulomateuse

EDF : électricité de France

EDTA : *ethylene diamine tetraacetic acid*

ELISA : *enzyme-linked immunosorbent assay*

HEX : hexachlorofluoresceine

ISO : *international organization for standardization*

ITS : *internal transcribed spacer*

LAMP : *loop-mediated isothermal amplification*

LCR : liquide céphalorachidien

MEA : méningo-encéphalite amibienne

MEAP : méningo-encéphalite amibienne primitive

MALDI-TOF-MS : *matrix-assisted laser desorption-ionization time of flight mass spectrometry*

MEB : microscopie électronique à balayage

MET : microscopie électronique à transmission

N.f : *Naegleria fowleri*

N.l : *Naegleria lovaniensis*

NNA : *non nutrient agar*

NPP : nombre le plus probable

PAM : *primary amoebic meningoencephalitis*

PAS : *Page's amoebae saline solution*

PCR : *polymerase chain reaction*

PSM : poste de sécurité microbiologique

qPCR : *quantitative polymerase chain reaction*

RFLP : *restriction-fragment-length polymorphism*

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Extraits de "Histoire naturelle des Zoophytes infusoires" (Dujardin 1841).	31
Figure 2. Première représentation des amibes avec le petit <i>Proteus</i> de Roesel (1755).....	32
Figure 3. Classification des amibes avant la création des Heterolobosea en 1985 et avant le regroupement en 2003 des genres <i>Balamuthia</i> et <i>Acanthamoeba</i> (Martinez & Visvesvara 1997).....	35
Figure 4. Classification des Eucaryotes basée sur des données génétiques	37
Figure 5. Arbre phylogénétique des Eucaryotes, selon Adl <i>et al.</i> 2012.....	39
Figure 6. <i>Acanthamoeba Castellani</i>	42
Figure 7. <i>Balamuthia mandrillaris</i>	44
Figure 8. <i>Sappinia pedata</i>	44
Figure 9. Les trois stades chez <i>Naegleria gruberi</i>	45
Figure 10. Arbre phylogénétique des espèces du genre <i>Naegleria</i> classées en différents clusters (1, 2, 4, 5, 6, 7 et 8) basé sur la comparaison des séquences d'ADNr 5,8S.....	48
Figure 11. <i>Naegleria fowleri</i>	50
Figure 12. Trophozoïtes de <i>N. fowleri</i> formant des amœbostomes d'après John et Cabral 1983	51
Figure 13. <i>Naegleria fowleri</i> : pathogénèse et cycle de vie	60
Figure 14. Distribution des cas de MEAP survenus dans le monde depuis 1968 jusqu'en 2010	67
Figure 15. Distribution des types de <i>N. fowleri</i> et les voies possibles de dispersion d'après De Jonckheere 2011.	69
Figure 16. Volcan de la Soufrière en Guadeloupe	77

Figure 17. Modèle interprétatif des activités sismiques et volcaniques liées à la subduction sous les Petites Antilles d'après Corsini 2008.	78
Figure 18. Schéma conceptuel de fonctionnement du gisement thermominéral de Bouillante	78
Figure 19. Photos d'archives du site de Dolé créé en 1842	80
Figure 20. L'Etablissement thermal de Ravine Chaude créé en 1937	80
Figure 21. Carte représentant les principaux bains de la Guadeloupe datant de 1930.....	80
Figure 22. Carte de la Basse-Terre de Guadeloupe avec les différents sites de prélèvement. .	83
Figure 23. Bains aménagés, entretenus et très fréquentés.....	85
Figure 24. Bains bétonnés mais peu utilisés	85
Figure 25. Bains naturels non aménagés, mais très fréquentés	85
Figure 26. (A) Bains Chauds de Matouba au niveau du captage en altitude; (B) tuyau d'alimentation à travers la forêt de (C) la clinique des Eaux-Vives.	87
Figure 27. Les deux bassins principaux de Dolé.....	89
Figure 28. Cinétique d'une réaction de PCR en temps réel (Tse & Capeau 2003).....	96
Figure 29. Courbes de fusion de souches de références.....	97
Figure 30. Schéma du parcours d'un échantillon depuis sa fixation par la matrice jusqu'à sa détection attestée par les spectres selon le MALDI-TOF.....	101
Figure 31. Modèle théorique de création d'un Super-spectre	103
Figure 32. Electrophorèse sur gel d'agarose (1%) en présence de BET, des produits de PCR obtenus après filtration et mise en culture des prélèvements d'eau du Bain de Dolé-escalier (3A, 3B) et du Bain du Curé à Anse-à-Sable (10) avec les différents couples de primers Naeg-1, NFITS, ITS et JITS.	105
Figure 33. Electrophorèse sur gel d'agarose (1%) en présence de BET, des produits de PCR obtenus après filtration et mise en culture des prélèvements d'eau du Bain de Dolé (1a) et du	

Bain de Capès (6f), des sédiments (7a) et de l'eau des Bains Jaunes (7f) et du Bain du Curé à Anse-à-Sable (8SA, 8SB) avec les différents couples de primers Naeg-1, NFITS, ITS et JITS.	107
Figure 34. Electrophorèse sur gel d'agarose (1%) en présence de BET des produits PCR obtenus avec les primers NFITS et ITS à partir de l'ADN de souches d'amibes thermophiles, isolées en culture à 44°C, à partir des prélèvements d'eaux chaudes de Guadeloupe. <i>N. fowleri</i> (<i>N.f</i>), <i>N. lovaniensis</i> (<i>N.l</i>), <i>Hartmanella</i> sp. (<i>Hart.</i>).....	110
Figure 35. Séquence de la région ITS1 d'une souche de <i>N. fowleri</i> isolée du Bain de Dolé obtenue avec les primers ITSFW et ITSRV.....	112
Figure 36. Evolution du nombre de <i>N. fowleri</i> par litre d'eau dans les bains chauds entretenus, sur des prélèvements mensuels (n=1) entre juin 2011 et juin 2012.	116
Figure 37. Panneau de prévention installé par l'ARS sur le site de Dolé (A), nettoyage du bassin de Dolé au chlore et (B) avec de l'eau sous haute pression.	117
Figure 38. Evolution de la concentration en <i>N. fowleri</i> dans les bains chauds entretenus, sur des prélèvements mensuels (n=1) de juin 2011 à décembre 2012.	119
Figure 39. Baisse significative de la contamination par <i>N. fowleri</i> à Dolé entre 2011 et 2013	122
Figure 40 . Proportions d'amibes libres thermophiles (A) non pathogènes et (B) de <i>N. fowleri</i> détectées dans les eaux chaudes de Guadeloupe entre 2011 et 2012, selon le type de bassin (Moussa <i>et al.</i> 2013).....	123
Figure 41. Proportion d'amibes libres thermophiles, selon la température dans les eaux chaudes de Guadeloupe en 2011-2012.....	124
Figure 42. Configuration de l'alimentation en eau des bains chauds les plus fréquentés.....	129

Figure 43. Comparaison des nombres (A) d'amibes thermophiles totales et (B) de <i>N. fowleri</i> par litre d'eau du Bain de Dolé (moy + SD, n = 3) à trois dates successives, obtenus par la méthode de comptage des CFU et par l'estimation du NPP	132
Figure 44. Moyennes (n= 8 + SD) du nombre d'amibes thermophiles par litre obtenues après transport à 4°C et 30°C pendant 1h30, 2h, 4h, 8h et 24h, après filtration et mise en culture à 44°C.....	135
Figure 45. Courbes de fluorescence obtenues en fonction du nombre de cycles pour <i>N. fowleri</i> , #0359 (3,7 ng/µl), pour <i>N. lovaniensis</i> (1,5 ng/µl) et pour le témoin négatif (eau ultrapure) avec les primers ITS.	137
Figure 46. Courbes de fusion obtenues avec l'ADN de <i>N. fowleri</i> (#0359) et celui de <i>N. lovaniensis</i> exprimées en dérivée de la fluorescence en fonction de la température.	137
Figure 47. Expérience de qPCR à partir d'eau ultrapure dopée avec une gamme de concentrations de <i>N. fowleri</i> allant de 2 à 100 amibes.	139
Figure 48. Expérience de qPCR à partir d'eau de Dolé dopée avec une gamme de concentrations de <i>N. fowleri</i> allant de 2 à 100 amibes.	141
Figure 49. (A) Courbes de fluorescence et (B) courbes de fusion d'une expérience de qPCR réalisée à partir des ADN extraits de prélèvements d'eau de Dolé contenant des sédiments et dopée par une gamme de concentrations allant de 2 à 100 <i>N. fowleri</i>	142
Figure 50. Profils des spectres de masse sur charge m/z (Da) obtenus en MALDI-TOF-MS à partir des extraits protéiques (0,5mg à 1mg).....	144
Figure 51. Comparaison des profils spectraux d'extraits protéiques (0,5mg à 1mg) en fonction de la température et de la souche bactérienne mise en présence, à partir du MALDI-TOF-MS	145
Figure 52. Super-spectres créés par analyse bioinformatique à partir des profils de référence obtenus avec différentes souches et dans différentes conditions.	146

Figure 53. <i>N. fowleri</i> observée au microscope inversé.	149
Figure 54. <i>N. fowleri</i> , séparation et fusion d'un trophozoïte observées au microscope inversé en fond clair entre 15h 07'12'' et 15h 14'56'' (A à H).....	149
Figure 55. <i>N. lovaniensis</i> observées au microscope inversé en fond clair.	150
Figure 56. <i>N. lovaniensis</i> , séparation et fusion d'un trophozoïte observées au microscope inversé en fond clair entre 15h 03'51'' et 15h 04' 56'' (A à H).....	150
Figure 57. Trophozoïtes et prékystes de <i>N. fowleri</i>	152
Figure 58. Observation des kystes et prékystes de <i>N. fowleri</i>	153
Figure 59. Trophozoïtes de <i>N. lovaniensis</i>	154
Figure 60. Observation des kystes de <i>N. lovaniensis</i>	155
Figure 61. Bain de Matouba après son aménagement en douches suite aux conseils de l'Institut Pasteur de Guadeloupe.	161

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Classification des Eucaryotes selon Adl <i>et al.</i> 2005	38
Tableau 2. Classification des Eucaryotes, selon Adl <i>et al.</i> 2012	39
Tableau 3. Principales espèces de <i>Naegleria</i> classées en fonction de leur température de développement et de la longueur de leurs séquences ITS1 et ITS2 en nombre de paires de bases	48
Tableau 4. Classification des espèces du genre <i>Naegleria</i> selon leur pathogénicité et leur caractère thermophile d'après De Jonckheere, 2002.....	49
Tableau 5. Distribution de <i>N. fowleri</i> dans les différents milieux et références bibliographiques	53
Tableau 6. Epidémiologie de la MEAP dans le monde et références bibliographiques (adapté du rapport ANSES 2013, le nombre de cas d'après De Jonckheere 2011).....	66
Tableau 7. Nombre de répétitions dans l'ITS des 8 types de <i>N. fowleri</i> et de <i>N. lovaniensis</i> (De Jonckheere 2011).....	68
Tableau 8. Distribution des génotypes de <i>N. fowleri</i> (De Jonckheere 2011).....	68
Tableau 9. Séquences des primers utilisés en PCR pour distinguer les différentes espèces (d'après De Jonckheere, 2011).....	73
Tableau 10. Recherches de <i>N. fowleri</i> par la méthode de qPCR.....	75
Tableau 11. Caractéristiques des principaux bains chauds étudiés de la Guadeloupe	84
Tableau 12. Suivi des amibes libres, détectées par PCR, dans l'eau, les sédiments et les biofilms des principaux bains chauds de la Guadeloupe fréquentés par la population au début 2011, entre janvier et avril.....	108
Tableau 13. Numéros d'accèsion, séquences de l'ITS1, origine et dénomination des trois souches identifiées dans les bains chauds de Guadeloupe déposées dans GenBank.	111

Tableau 14. Suivi de la détection des amibes thermophiles au cours du second semestre 2011 dans les bains chauds de Guadeloupe les plus fréquentés du public et proposés par l'ARS.	114
Tableau 15. Suivi de la détection des amibes thermophiles au cours du premier semestre 2012 dans les bains chauds de Guadeloupe les plus fréquentés du public et proposés par l'ARS.	115
Tableau 16. Suivi de la détection des amibes thermophiles au cours du second semestre 2012 dans les bains chauds de Guadeloupe les plus fréquentés du public demandés par l'ARS. ..	118
Tableau 17. Suivi de la détection des amibes thermophiles de janvier à décembre 2013 dans les bains chauds de Guadeloupe les plus fréquentés du public demandés par l'ARS.....	121
Tableau 18. Nombre de <i>N. fowleri</i> isolées des bains les plus fréquentés de la Guadeloupe..	125
Tableau 19. Nombre de <i>N. fowleri</i> isolées des bains les plus fréquentés de Guadeloupe en fonction des caractéristiques physico-chimiques de l'eau (Moussa <i>et al.</i> 2013).	126
Tableau 20. Distribution des souches isolées et séquencées dans les différents bains de Guadeloupe en 2011 et 2012 (Moussa <i>et al.</i> 2013).....	127
Tableaux 21. (A) Nombre de <i>N. fowleri</i> par litre (<i>Nf/L</i>) déterminé par la méthode NPP, à l'émergence et à l'arrivée des eaux chaudes des Bain de Dolé, Bains Jaunes, Bain des Amours et de la Clinique des Eaux-Vives.	131
Tableau 22. Comparaison du nombre d'amibes thermophiles totales et de <i>N. fowleri</i> obtenues par la méthode NPP classique et par la méthode NPP simplifiée..	134

LISTE DES VIDEOS

Vidéo 1. Trophozoïtes et prékystes de <i>N. fowleri</i>	151
Vidéo 2. <i>N. lovaniensis</i> : Trophozoïtes tournant autour des kystes	151
Vidéo 3. Trophozoïtes et flagellé de <i>N. lovaniensis</i> en mouvement	151

AVANT-PROPOS

Les amibes sont des protozoaires libres ou parasites que l'on retrouve dans l'environnement. La plupart des espèces sont inoffensives pour l'homme, mais certaines sont hautement virulentes et provoquent des pathologies graves, voir mortelles, expliquant l'intérêt grandissant dont elles font l'objet ces dernières années. Nous nous sommes intéressés à l'amibe libre *Naegleria fowleri*, responsable d'une méningo-encéphalite amibienne primitive (MEAP), en raison du premier cas clinique français survenu en 2008 en Guadeloupe chez un enfant de neuf ans. Cette maladie s'est déclarée une semaine après une baignade dans un bassin d'eau thermale naturelle très populaire, le Bain de Dolé (Nicolas *et al.* 2010). En effet, *Naegleria fowleri* est une espèce thermophile qui vit dans les eaux naturellement ou artificiellement chaudes, à des températures allant jusqu'à 44°C. En Guadeloupe, les sources et rivières d'eaux chaudes favorables au développement de ce microorganisme sont nombreuses du fait d'une activité magmatique et sismique très importante dans cette région volcanique. Les pathologies dues aux amibes libres sont très rares, mais peuvent apparaître si les conditions favorables au développement du pathogène sont réunies et si des mesures adaptées ne sont pas mises en place. Les amibes libres sont de plus en plus étudiées car chaque année de nouveaux cas surviennent dans le monde, malgré l'amélioration des connaissances sur ce pathogène et son évolution dans l'environnement. Après l'accident de 2008, l'Agence Régionale de Santé (ARS) de la Guadeloupe a réalisé un suivi des bains les plus fréquentés en effectuant des prélèvements mensuels afin de mieux gérer le risque que représente la présence de ces amibes pathogènes dans notre environnement et en particulier dans les bassins très prisés par les populations locales et touristiques. De plus, depuis 2010, un programme de recherche a également été initié sur cette problématique par l'Institut Pasteur de la Guadeloupe, avec l'aide du Dr. Johan De Jonckheere, spécialiste international de la question, conduisant au présent mémoire de Thèse. Le premier chapitre est consacré à une synthèse bibliographique des connaissances acquises sur les amibes libres. Le second chapitre décrit le matériel et les méthodes utilisés dans notre étude. Et enfin le troisième chapitre présente les résultats expérimentaux obtenus et la discussion qui ont permis de ressortir les perspectives de cette recherche.

TABLE DES MATIERES

PARTIE I : INTRODUCTION	27
1. Généralités sur les amibes	27
1.1. Définition	27
1.2. Morphologie.....	27
1.3. Locomotion	29
1.4. Nutrition et symbiose	29
1.5. Reproduction.....	30
1.6. Historique.....	31
1.7. Classification.....	34
1.8. Les amibes libres telluriques.....	40
1.9. Les amibes parasites strictes	41
2. Les amibes libres amphizoïques	41
2.1. <i>Acanthamoeba</i> spp. (Castellani 1930 ; Volkonsky 1931).....	42
2.2. <i>Balamuthia mandrillaris</i> (Visvesvara <i>et al.</i> 1990)	44
2.3. <i>Sappinia pedata</i> (Gelman <i>et al.</i> 2003)	44
2.4. <i>Naegleria</i> spp. (Alexeieff 1912)	45
2.4.1. Le génome des <i>Naegleria</i>	46
2.4.2. Les différentes espèces du genre <i>Naegleria</i>	47
2.4.3. Pathogénicité et thermosensibilité des espèces du genre <i>Naegleria</i>	49
3. <i>Naegleria fowleri</i> (Carter 1970)	49
3.1. Morphologie.....	50
3.2. Ecologie	52
3.3. Alimentation	53
3.4. Association de <i>N. fowleri</i> avec des bactéries	54
3.5. Interactions avec d'autres amibes	55

3.6.	Influence des paramètres physico-chimiques	56
3.6.1.	La température	56
3.6.2.	Hygrométrie, pH, salinité, conductivité, taux d'oxygène et de fer dissous	56
3.6.3.	Influence des traitements biocides.....	57
3.7.	Pathologie : la méningo-encéphalite amibienne primitive (MEAP).....	58
3.7.1.	Physiopathologie	58
3.7.2.	Diagnostic	61
3.7.3.	Pathogénicité	61
3.7.4.	Thérapies et prévention	62
3.7.5.	Réactions immunitaires	63
3.7.6.	Epidémiologie.....	64
3.7.7.	Caractérisation et distribution géographique des différents types de <i>Naegleria fowleri</i>	67
4.	Méthodes de détection.....	69
4.1.	Méthodes de prélèvements.....	69
4.2.	Mise en culture.....	70
4.3.	Test de flagellation.....	71
4.4.	Test de pathogénicité	71
4.5.	Méthodes biochimiques	71
4.6.	Méthodes immunologiques	72
4.7.	Méthodes moléculaires	72
4.7.1.	PCR.....	72
4.7.2.	PCR quantitative.....	73
4.7.3.	Amplification de l'ADN par la technique LAMP	75
4.7.4.	Spectrométrie de masse : technique MALDI-TOF-MS	76
5.	<i>N. fowleri</i> en Guadeloupe.....	76
5.1.	La géothermie en Guadeloupe	77

5.2. Le premier cas de MEAP en Guadeloupe (Nicolas <i>et al.</i> 2010).....	81
6. Objectifs de la thèse.....	81
PARTIE II : Matériels et Méthodes	83
1. Prélèvements	83
1.1. Lieux de prélèvement.....	83
1.2. Description des bains chauds étudiés.....	84
1.3. Prélèvements	89
1.3.1. Les différentes méthodes de prélèvement de l'eau dans un bassin :	89
1.3.2. Prélèvements de sédiments et de terre	90
1.4. Transport.....	90
1.5. Mesure des paramètres physico-chimiques de l'eau.....	90
1.5.1. La turbidité	90
1.5.2. L'alcalinité.....	90
1.5.3. La dureté	90
1.5.4. La concentration en minéraux	91
1.5.5. Carbone organique.....	91
1.5.6. Indice de permanganate	91
2. Filtration	91
3. Centrifugation.....	91
4. Mise en culture	92
5. Identification et comptage des amibes.....	92
5.1. Méthodes de Comptage.....	93
5.1.1. Comptage des fronts ou « Unité Formant Colonie » (UFC ou CFU).....	93
5.1.2. Comptage par estimation du nombre le plus probable (NPP)	93
5.1.3. Comptage par estimation simplifiée du NPP.....	93
6. Extraction de l'ADN.....	93
7. Dosage de l'ADN.....	94

8. Caractérisation	94
8.1. Amplification de l'ADN par PCR.....	94
8.2. Séquençage	95
8.3. PCR quantitative en temps réel (qPCR) :.....	95
8.3.1. Principe de la qPCR.....	95
8.3.2. Protocole de qPCR.....	97
9. Dopage de l'eau et comptage sur cellule de Malassez	97
10. Analyses statistiques	98
10.1. Etude de l'effet des paramètres physico-chimiques des bains sur la présence des amibes	98
10.2. Comparaison des températures et temps de transport	98
11. Microscopie	98
11.1. Microscope photonique inversé en fond clair à contraste de phase	99
11.2. Microscope électronique à balayage (MEB)	99
12. Spectrométrie de masse	100
12.1. Principe.....	100
12.2. Conditions de culture	101
12.3. Extraction protéique	101
12.4. Création des super-spectres	102
13. Conservation des souches	103
13.1. Congélation	103
13.2. Décongélation.....	103
PARTIE III : Résultats et discussion	104
1. Résultats	104
1.1. Mise au point d'un protocole de détection et d'identification des amibes pathogènes en Guadeloupe.....	104
1.2. Recherche des amibes libres dans les différents bains chauds de Guadeloupe (début 2011).	106

1.3.	Caractérisation des souches isolées par PCR et séquençage de l'ITS	110
1.4.	Conservation des souches	112
1.5.	Suivi des différents bains chauds entre 2011 et 2013	112
1.6.	Suivi du second semestre 2011	113
1.7.	Suivi du premier semestre 2012.....	114
1.8.	Bilan des comptages obtenus sur une année entière, entre juin 2011 et juillet 2012.	115
1.9.	Suivi du second semestre 2012	118
1.10.	Suivi de l'année 2013	120
1.11.	Développement de <i>N. fowleri</i> selon les caractéristiques des bassins	122
1.11.1.	Effet de la nature du site	122
1.11.2.	Effet de la température et du pH	123
1.11.3.	Effet des autres paramètres physico-chimiques	125
1.12.	Distribution des espèces	126
1.13.	Détermination de l'origine de contamination des eaux par <i>Naegleria fowleri</i>	127
1.13.1.	Configuration des bains étudiés	128
1.13.2.	Mise en évidence de <i>N. fowleri</i> dans l'eau, à la source, à l'arrivée des bassins et dans les sols	130
1.14.	Validation des méthodes de dénombrement des amibes	131
1.14.1.	Comparaison des méthodes de comptage des amibes, méthodes CFU et NPP	131
1.14.2.	Simplification de la méthode d'estimation du nombre le plus probable... ..	133
1.14.3.	Effet de la température et de la durée du transport sur le développement des amibes.	135
1.14.4.	La PCR quantitative en temps réel.....	136
1.14.4.1.	Caractérisation de <i>N. fowleri</i> et de <i>N. lovaniensis</i> par qPCR.....	136
1.14.4.2.	Recherche du seuil de détection de la méthode de qPCR.....	138
1.14.5.	MALDI-TOF-MS	142

1.14.5.1. Profils protéiques de <i>Naegleria fowleri</i> et de <i>Naegleria lovaniensis</i>	143
1.14.5.2. Création de super-spectres spécifiques de <i>N. fowleri</i> et de <i>N. lovaniensis</i>	146
1.15. Etude morphologique de <i>N. fowleri</i> et de <i>N. lovaniensis</i> en microscopie.....	147
1.15.1. Observation au microscope inversé	147
1.15.2. Observation au microscope électronique à balayage (MEB).....	151
2. Discussion	157
PARTIE IV : Conclusion et perspectives	168
PARTIE V : Références Bibliographiques	171
Annexes	202
Publications	207

PARTIE I : INTRODUCTION

1. Généralités sur les amibes

1.1. Définition

Les amibes sont des organismes unicellulaires eucaryotes, de taille comprise entre 10 et 300 μ m, et vivant sous forme libre ou parasite. Ces microorganismes généralement aérobies et non photosynthétiques, rangés historiquement parmi les protozoaires infusoires, sont très répandus dans les différents compartiments de l'environnement et sur toute la planète. Les amibes sont retrouvées en milieu humide, riche en matières organiques, dans les sols, les milieux aquatiques naturels et artificiels ainsi que dans l'air (Rivera *et al.* 1987). Le mot amibe dérive du grec amoibè ($\alpha\mu\sigma\beta$) qui signifie "changer" car les amibes changent de forme constamment par émission et rétraction de pseudopodes. De plus, selon les espèces, certaines amibes peuvent passer transitoirement par un stade flagellé ou s'enkyster en fonction des conditions environnementales (Bory de Saint-Vincent 1822). Les pseudopodes des amibes caractérisent la forme dite "trophozoïte" et leur permet à la fois de ramper sur le support et de capturer des proies microscopiques, la forme flagellée autorise des déplacements rapides dans les milieux liquides, tandis que la forme kystique, de résistance à la dessiccation sur de longues durées, quand les conditions deviennent défavorables, permet la dissémination des amibes par la vapeur d'eau, l'air, le vent ou les animaux. Les amibes se nourrissent généralement de bactéries ou autres microorganismes absorbés par phagocytose mais peuvent également être parasites de l'homme ou des animaux.

1.2. Morphologie

Les Trophozoïtes

La forme trophozoïte correspond au stade végétatif des amibes et présente une activité métabolique classique permettant la multiplication, la nutrition et la locomotion. La taille d'un trophozoïte varie de 10 à 300 μ m. Ce n'est généralement que sous cette forme que l'amibe est capable de division (Goode 1975). La structure d'un trophozoïte est assez proche de celle d'une autre cellule eucaryote avec toutefois quelques particularités. On trouve généralement un noyau avec un ou plusieurs nucléoles assez volumineux, quelquefois deux noyaux accolés, un réticulum endoplasmique rugueux ou lisse, un appareil de Golgi typique ou non, des

mitochondries avec plusieurs types de crêtes, des ribosomes et un cytosquelette de microfilaments d'actine et de myosine accompagnés, ou non, de microtubules et de centrioles.

Des vacuoles sécrétoires et contractiles sont également présentes ayant pour rôle de réguler le volume cellulaire (Bowers & Korn 1968). La composition et la nature de la membrane des amibes changent en fonction de l'espèce (Schuster & Visvesvara 2004).

Les flagellés :

Certaines amibes sont capables de se transformer en flagellés dans les milieux liquides. La forme flagellée, de taille variant de 10 à 16 μm , possède généralement un noyau avec un grand nucléole et 2 à 4 flagelles, mais parfois il peut y avoir plusieurs noyaux (Bowers & Korn 1968) et plus de 4 flagelles (jusqu'à 10) (Darbyshire *et al.* 1976 ; De Jonckheere *et al.* 2011a). Pour certaines, cette forme est non répliquative et ne permet pas la nutrition mais pour d'autres, elle peut se diviser (De Jonckheere & Brown 1995 ; 1999) et se nourrir en conduisant les particules, par les mouvements d'eau provoqués par les flagelles vers le cytostome, une invagination membranaire comparable à une bouche (Park & Simpson 2011). Le passage au stade flagellé induit un changement de la forme de la cellule par la mise en place d'un cytosquelette microtubulaire (Fulton 1977). Chez certaines espèces, il y a diminution du nombre de vacuoles dans le cytoplasme au cours du processus de flagellation, qui dure au moins 2h et formation de corpuscules basaux, de racines ciliaires et de flagelles. Chez d'autres espèces, l'appareil flagellaire est partiellement développé avant que ne se produise tout changement de forme (Patterson *et al.* 1981).

Les kystes :

La forme kystique est le stade de résistance présentant une activité métabolique réduite qui engendre un état de latence permettant à l'amibe de survivre pendant des années dans un environnement peu adapté. Les trophozoïtes sont beaucoup moins résistants que les kystes aux antibiotiques, aux produits biocides et à la chloration (Bouyer *et al.* 2007). L'amibe se transforme en kyste lorsque les conditions du milieu deviennent défavorables. Ces changements de l'environnement sont essentiellement la dessiccation, le stress osmotique, le pH, la température, et l'absence de nutriments (Cordingley *et al.* 1996). C'est sous cette forme que s'opère une dissémination aquatique et aérienne par transport par le vent expliquant la présence des amibes dans des lieux où elles n'ont pas l'habitude d'être retrouvées. Le kyste mesure 5 à 20 μm en fonction des espèces et peut résister à des températures extrêmes allant de -20 °C à +56 °C (Marciano-Cabral & Cabral 2003). Cependant, l'autoclavage est efficace

contre les kystes (Meisler *et al.* 1985). Le kyste est entouré par une paroi composée de deux ou trois couches : une couche externe appelée ectokyste et une couche interne dite endokyste (Bowers & Korn 1968). Pour certaines espèces, une couche intermédiaire existe, c'est le mésokyste comme on le verra pour *Balamuthia mandrillaris*. Les kystes possèdent des structures sous forme de pores, les ostioles qui permettent la sortie du trophozoïte lors du désenkystement, pendant ce processus l'ostiole perd ce que l'on appelle son opercule. Le cytoplasme d'un kyste est très déshydraté et lorsque les conditions environnementales redeviennent favorables, l'eau rentre dans le kyste par osmose et réhydrate le cytoplasme permettant une réactivation du métabolisme.

1.3. Locomotion

Les trophozoïtes des amibes se déplacent par des mouvements amiboïdes créés par adhérence à un substrat et par émission de pseudopodes résultant de projections cytoplasmiques et de déformations de la membrane plasmique par l'interaction actine/myosine. Le mouvement s'effectue grâce à l'ectoplasme contenant de la myosine et des microfilaments d'actine de l'endoplasme granulaire. Un mouvement endoplasmique va des pseudopodes en rétraction, engendrée par une dépolymérisation de l'actine, vers les pseudopodes en extension, accompagnée d'une gélification due à la polymérisation de l'actine (Puytorac *et al.* 1987). Les amibes peuvent également se déplacer sous leur forme flagellée permettant des mouvements beaucoup plus rapides que ceux de la forme trophozoïte dans les milieux liquides.

1.4. Nutrition et symbiose

Les amibes se nourrissent de bactéries, d'algues et de champignons présents dans l'environnement ou des cellules de l'hôte, animal ou homme, quand il s'agit d'une espèce parasite. Pour se nourrir, elles ont principalement recours à la phagocytose, qui consiste en l'ingestion de particules, en émettant des pseudopodes qui va les entourer et former un phagosome correspondant à une vacuole entourée d'une membrane dans le cytoplasme. Ce phagosome fusionne avec un lysosome contenant des enzymes lytiques afin de dégrader les éléments ingérés. On rencontre également des formes de trogocytose ou grignotement des cellules qu'elles trouvent sur leur passage. Elles utilisent également la pinocytose qui est un moyen d'assimiler des liquides organiques tout en ayant la capacité de phagocyter. Les amibes présentent parfois de spectaculaires amebostomes dénommés "*food cups*", des

expansions cytoplasmiques de la surface cellulaire en forme de ventouses aidant à la phagocytose (Marciano-Cabral & John 1983 ; John *et al.* 1984 ; Lattyak *et al.* 1985 ; Sohn *et al.* 2010).

Les amibes peuvent également héberger des bactéries comme cela a été suggéré pour la première fois en 1956 par Drozanski en décrivant des microorganismes intracellulaires qui lysent des amibes. L'hypothèse du rôle de réservoir de bactéries éventuellement pathogènes chez les amibes fut évoquée à nouveau en 1978. Il a été également montré que les bactéries peuvent développer des mécanismes de défense pour échapper à la prédation et acquérir une résistance aux amibes ce qui augmente leur virulence du fait de cette cohabitation (Greub & Raoult 2004). Elles résistent à la digestion intracellulaire et se multiplient de façon importante dans les trophozoïtes. Elles évoluent à l'intérieur de l'amibe, développent les mêmes mécanismes de défense que ceux utilisés pour la résistance aux macrophages. Elles s'adaptent donc de cette façon à la survie comme dans un macrophage, au cours de leur évolution à l'intérieur de l'amibe et peuvent ainsi devenir potentiellement pathogènes pour l'homme et les animaux. Parmi environ 500 espèces de bactéries pathogènes pour les organismes supérieurs, environ 19% sont capables de résister aux amibes (Thomas *et al.* 2009). On distingue les bactéries qui prolifèrent dans les amibes entraînant leur lyse (*Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*), les bactéries résistantes, qui se multiplient dans les amibes sans les lyser (*Vibrio cholerae*, *Helicobacter pylori*) et celles qui se contentent de survivre en symbiose à l'intérieur de l'amibe en lui servant de protection contre les traitements chimiques, ce phénomène a été observé chez *Mycobacterium leprae* et *M. avium*. Ces interactions amibes-bactéries représentent un véritable problème de santé publique car elles peuvent être responsables de maladies nosocomiales et peuvent avoir un impact dans l'industrie agro-alimentaire. Des interactions avec des champignons, des protozoaires et des virus ont également été démontrées.

1.5. Reproduction

La reproduction des amibes est asexuée s'effectuant généralement par division binaire. Toutefois, il a été montré que l'ensemble des gènes spécifiques de la méiose était déjà présent à un stade très précoce de l'évolution des eucaryotes (Ramesh *et al.* 2005 ; Fritz-Laylin *et al.* 2010). Plus récemment, les gènes suivants impliqués dans la méiose (*Spo 11*, *Mre11*, *Rad50*, *Rad51*, *Rad52*, *Mnd1*, *Dmc1*, *Msh* et *Mlh*) ont également été retrouvés chez *Acanthamoeba* suggérant qu'il pourrait y avoir un mode de reproduction sexuée chez les amibes libres (Khan & Siddiqui 2015). Bien que le mode clonal soit le mode de reproduction le plus fréquent chez

ces espèces, il est possible que la reproduction sexuée puisse se produire de manière occasionnelle.

1.6. Historique

Les amibes ont été identifiées très tôt, à l'aube de la découverte du monde unicellulaire, dès l'avènement des premiers microscopes. On peut reconnaître trois périodes, au cours desquelles les amibes ont été étudiées comme l'attestent les extraits de l'ouvrage "Histoire naturelle des zoophytes infusoires" de F. Dujardin, publiée en 1841 (Fig. 1). La première période, celle des pères de la microscopie, était basée essentiellement sur l'observation et la description (Leeuwenhoek 1675-1875 ; Rosenhof 1755), la seconde période a tenté d'en proposer une classification (Linné 1758 ; Müller 1773) tandis que la troisième, plus précise, s'est orientée à la fois sur la classification et sur l'organisation des Infusoires (Bory de St-Vincent 1822 ; Lamouroux 1824 ; Ehrenberg 1830 ; Dujardin 1841).

"Un tonneau qui avait contenu du vin rouge, et se trouvait encore tout enduit de tartre, fut disposé pour recevoir l'eau de pluie amenée par les gouttières, cette eau se putréfia bientôt et devint une infusion fort riche en Infusoires ; j'y observai notamment plusieurs sortes d'Amibes, des Monades, des Vibrions, des Glaucomes verts, des Kérones, et des Oxytriques" (F. Dujardin, 1841, p. 179).

"Les Infusoires les plus simples, comme les Amibes et les Monades, se composent uniquement, au moins en apparence, d'une substance charnue glutineuse homogène, sans organes visibles, mais cependant organisée, puisqu'elle se meut en se contractant en divers sens, qu'elle émet divers prolongements, et qu'en un mot elle a la vie. (F. Dujardin, 1841, p. 26).

AMIBIENS : An. formés d'une substance glutineuse, sans tégument sans organisation appréciable ; changeant de forme à chaque instant par la protension ou la rétraction d'une partie de leur corps, d'où résultent des expansions variables — Mouvement lent

Les Amibes ou Protées se rencontrent dans presque toutes les vieilles infusions non putrides, aussi bien que parmi les débris vaseux recouvrant les corps submergés dans l'eau douce ou dans la mer (F. Dujardin, 1841, p. 226).

Quand on soumet au microscope une goutte de liquide contenant des Amibes , on aperçoit d'abord de petites masses arrondies, demi-transparentes ou nébuleuses, immobiles ; bientôt du contour de ces masses on voit sortir une expansion ou un lobe arrondi d'une transparence parfaite ; cette expansion glisse insensiblement comme une goutte d'huile sur la plaque de verre qui sert de porte-objet ; puis, prenant un point d'appui en se fixant sur le verre, elle attire lentement à elle toute la masse. Ainsi se manifeste la vitalité des Amibes qui, suivant leurs dimensions ou leur degré de développement, peuvent émettre successivement de la même manière un nombre plus ou moins grand de lobes ou d'expansions variables qui ne sont jamais les mêmes, mais qui rentrent et se confondent successivement dans la masse (F. Dujardin, 1841, p. 227).

Figure 1. Extraits de "Histoire naturelle des Zoophytes infusoires" (Dujardin 1841).

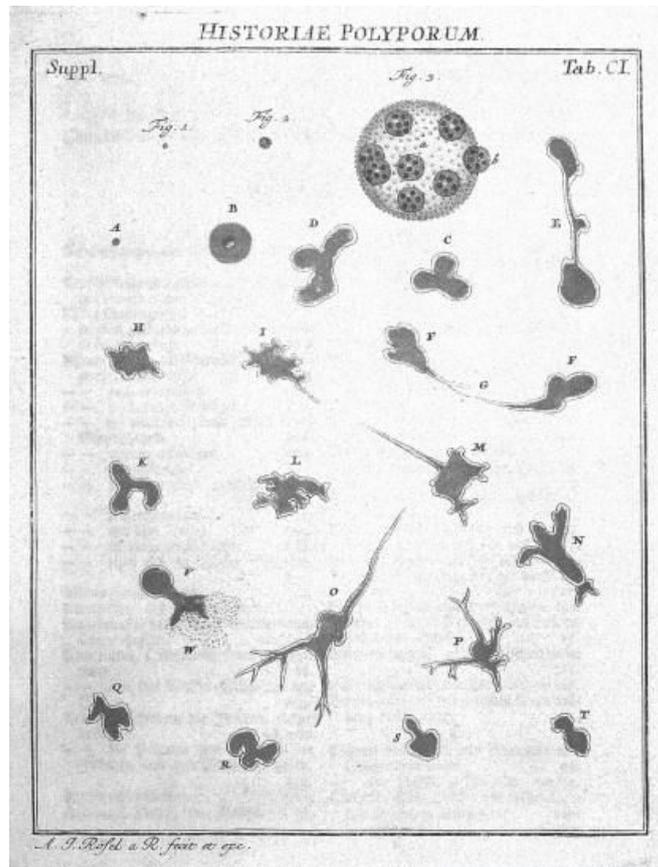


Figure 2. Première représentation des amibes avec le petit *Proteus* de Roesel (1755).
<http://wellcomeimages.org/indexplus/image/L0000319>

La toute première description d'amibes a été publiée par Roesel von Rosenhof dans son ouvrage *Insecten-Belustigung* (1755) dans lequel il observa le mouvement du protoplasme et l'émission de pseudopodes. Il parle alors de "petit *Proteus*" (*Der Klein Proteus*) et accompagne sa description de planches de couleur de grande qualité (Fig. 2) (Dujardin 1841 ; Leidy 1878). Linné se réfère à l'animal de Roesel en l'appelant successivement *Volvox chaos* puis *Volvox proteus* (Linné 1758). Il est dénommé ensuite simultanément par Pallas sous le vocable de *Volvox proteus* et par Müller sous le terme de *Volvox sphaerula* qui le décrit finalement comme *Proteus diffluens* (Pallas 1766 ; Müller 1786). Le nom de genre "Proteus" étant déjà attribué à la salamandre d'Adelsberg, Bory de St-Vincent lui substitua finalement le terme "d'Amibe" dans son Dictionnaire classique d'histoire naturelle publié en 1822, nom de genre qu'il introduit, en premier, en dénommant ces différentes espèces *Amiba divergens*, *A. röseli* et *A. mülleri*.

Différents auteurs se sont intéressés aux amibes. En 1835, Félix Dujardin, montra l'absence "d'estomac" chez les amibes, mais l'existence de "vacuoles digestives". Il définit, le premier, le nom de *sarcode* pour désigner le protoplasme des amibes et après son important

travail de caractérisation des amibes "Limax" en 1841, de nombreux autres travaux ont décrit des espèces nouvelles et proposé des classifications de ces êtres unicellulaires présents sur tous les continents (Jadin 1974). En 1879, J. Leidy réalise le premier rapport régional sur la diversité des amibes dans un ouvrage intitulé “ *Freshwater rhizopods of North America*”.

L’existence d’amibes parasites pour l’homme et l’animal est suggérée dès 1875 par Lösch à St. Petersburg quand il découvre des trophozoïtes mobiles dans les selles d’un malade touché par une dysenterie chronique et qu’il parvient à reproduire la maladie par inoculation des selles du malade chez le chien (Lösch 1875). Councilman et Lafleur découvriront peu après que cette amibe est une espèce réellement parasite et qu’elle est responsable de la maladie, car ils l’observent également dans des abcès hépatiques ; ils l’appelleront en 1891, *Entamoeba dysenteriae* (Councilman & Lafleur 1891). Le terme d’*Entamoeba histolytica* fut donné plus tard, par Schaudinn en 1903 suite à une description de l’amibe pathogène intestinale, pour la distinguer de l’amibe commensale *Entamoeba coli* (Grassi 1879). Penard décrit ensuite une amibe saprophyte de type limace qu’il appelle *Hartmannella limax* (Penard 1890).

A la même époque, la pathogénicité des amibes libres non parasites, celles qui vivent de façon autonome dans l’environnement, est également suspectée par Schardinger qui isole et identifie une espèce capable de se transformer en flagellé (Schardinger 1899). Il introduit d’ailleurs le terme d’ameboflagellé et la nomme *Amoeba gruberi*. D’autres auteurs font les mêmes observations (Lesage 1905 ; Noc 1909 ; Musgrave 1906 ; Walker 1908). Vahlkampf publie également en 1905 une étude très documentée sur *Amoeba limax* (Vahlkampf 1905).

Toutefois, Naegler en 1909 décrit précisément *Amoeba gruberi* et la définit comme une amibe libre, mais non pathogène (Naegler 1909) tandis qu’Hartmann en 1910 décrit en détail *Entamoeba histolytica*. La même année, Alexeieff propose le genre *Naegleria* (Alexeieff 1912) tandis que Chatton et Lalung-Bonnaire décrivent le genre *Vahlkampfia* (Chatton & Lalung-Bonnaire 1912). C’est un peu plus tard, en 1930 que Castellani et Volkonsky décrivent le genre *Acanthamoeba* (Castellani 1930 ; Volkonsky 1931). Tous ces auteurs concluent que l’intestin et ses annexes peuvent abriter des amibes libres, mais en tant que simples contaminants non pathogènes (Jadin 1974).

Ce n’est qu’en 1957, que la pathogénicité des amibes libres est réellement démontrée. Dans un premier temps, des “plaques” observées dans des cultures cellulaires de rein de singe préparées pour l’obtention d’un vaccin antipoliomyélitique sont observées par Jahnes et Fullmer et l’inoculation de souris et de singes par le liquide de ces cultures, suspectées associées à un virus, entraîne leur décès rapidement (Jahnes & Fullmer 1957). C’est alors

qu'en isolant de ces cultures cellulaires des kystes et des trophozoïtes d'*Acanthamoeba*, Culbertson fait le lien entre ces "plaques" et les amibes libres et démontre pour la première fois la pathogénicité de cette espèce, en provoquant par inoculation de trophozoïtes, la mort des souris, avec les symptômes typiques d'une méningo-encéphalite. Il suggère également que les amibes libres pourraient aussi infecter l'homme (Culbertson *et al.* 1958).

Un peu plus tard, en 1965, Fowler et Carter étudient le cas de quatre sujets australiens pour lesquels il arrive à faire le lien entre leur décès et la présence d'amibes dans leur cerveau, identifiées initialement comme *Acanthamoeba* (Fowler & Carter 1965). En 1966 trois nouveaux cas similaires sont recensés en Floride contribuant à la première description de la méningo-encéphalite amibienne primitive (MEAP) dont l'agent pathogène fut nommé *Naegleria fowleri* en l'honneur de Malcolm Fowler qui l'avait identifiée en premier (Butt 1966). Depuis cette date et jusqu'à présent, plus d'une centaine de cas de MEAP ont été recensés aux Etats-Unis et plus de 350 cas ont été enregistrés dans le monde. Comme nous l'avons mentionné dans l'avant-propos, c'est cette espèce pathogène, *N. fowleri*, qui fait l'objet de la présente étude.

1.7. Classification

Initialement, les Protozoaires étaient répartis en quatre grands groupes, les Sarcodinés (amiboïdes), les Sporozoaires (parasites), les Mastigophores (flagellés) et les Infusoires (ciliés) (Bütschli 1880-1889). Cette classification a rapidement été abandonnée par les protistologues et, en particulier pour les amibes, de nombreuses autres classifications plus développées ont été proposées dans la littérature en tenant compte de critères variés.

Critères morphologiques

Historiquement toutes les amibes à pseudopodes ont été regroupées avec d'autres amiboïdes dans le sous-phylum des Sarcodinés et la superclasse des Rhizopodes qui englobe les organismes possédant des pseudopodes en forme de racine. On peut distinguer les divers types d'amibes en se basant sur leur morphologie, les amibes radiaires ou à rameaux (*Amoeba proteus*) possèdent plusieurs pseudopodes dirigés dans les différentes directions, tandis que le type limax (*Naegleria gruberi*) présente généralement un seul pseudopode et une progression polarisée. Ces différents organismes peuvent aussi passer par l'un et l'autre de ces stades. En 1926, Schaeffer établit également une taxonomie selon la morphologie en décrivant 39 espèces. Toutefois, bien que le changement de forme fut le premier caractère pris en compte

pour la description des amibes, cette considération s'est avérée présenter des limites en raison de l'instabilité de la structure cellulaire engendrée par les mouvements amiboïdes qui sont fonction du milieu dans lequel les amibes évoluent.

En 1953, Chatton tente une classification selon le critère de la division cellulaire, c'est la première approche taxonomique fondée sur un élément non morphologique (Chatton 1953).

Puis en 1965, Jahn et Bovee prennent en compte le mouvement du cytoplasme. Mais ces deux tentatives basées sur ces deux éléments intracellulaires n'ont pas donné lieu à une classification.

Les critères essentiellement morphologiques utilisés jusqu'à la fin des années 1980 aboutissaient au schéma de classification taxonomique des Eucaryotes ci-dessous (Fig. 3) dans lequel les amibes étaient positionnées dans le règne des Protistes, le sous-règne des Protozoaires, le phylum des Sarcomastigophores, le sous-phylum des Sarcodina, la superclasse des Rhizopodea dont la classe des Lobosea, donne la sous-classe des Gymnamoebia (amibes nues) regroupant dans l'ordre des Amoebida la plupart des amibes des genres *Entamoeba*, *Hartmannella* et *Acanthamoeba* et dans l'ordre des Schizopyrenida les genres *Vahlkampfia* et *Naegleria* (Harf & Monteil 1988 ; Page 1988 ; Martinez & Visvesvara 1997). Le genre *Balamuthia* initialement considéré comme faisant partie des Leptomyxidae a été intégré ultérieurement à la famille des *Acanthamoebidae* (Booton *et al.* 2003).

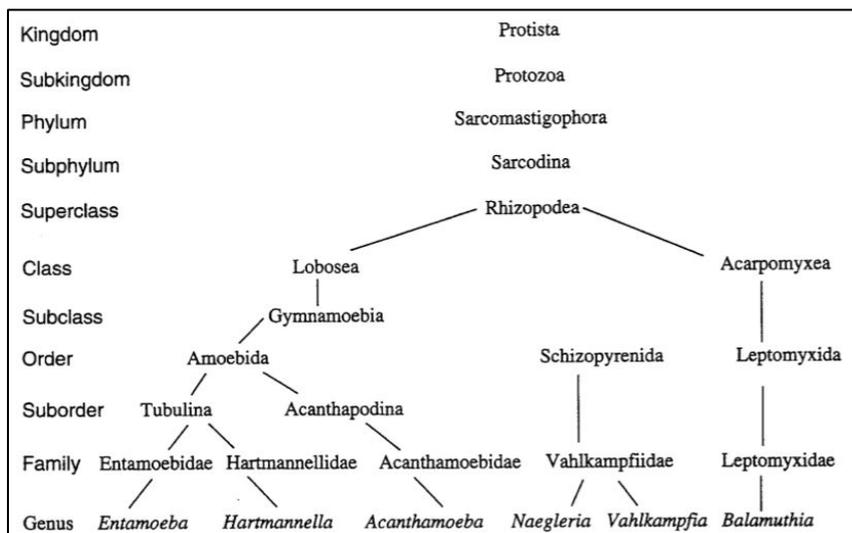


Figure 3. Classification des amibes avant la création des Heterolobosea en 1985 et avant le regroupement en 2003 des genres *Balamuthia* et *Acanthamoeba* (Martinez & Visvesvara 1997).

Critères ultrastructuraux

L'avènement de la microscopie électronique dans les années 80, a permis d'identifier des caractères ultrastructuraux spécifiques de certaines amibes, de redécrire ces organismes et de définir de nouvelles espèces. La superclasse des Rhizopodes a ainsi pu être reconsidérée en distinguant la classe des Lobosea d'une part, qui regroupe les amibes aux pseudopodes filiformes, sub-pseudopodes ou lobopodes et la classe des Heterolobosea (percolozoaires) d'autre part, créée par Page et Blanton en 1985, caractérisée par des pseudopodes éruptifs digitiformes. En effet, compte tenu de leur ressemblance avec les amibes nues (*Gymnamoebia*) lobosées, de l'ordre des Amoebidés, les amibes Heterolobosea avaient toujours été intégrées aux Rhizopodes (Fig. 3) (Levine *et al.* 1980). Les Heterolobosea représentent donc une nouvelle classe d'amibes amoeboflagellées et flagellées d'environ 140 espèces qui a été formée en rassemblant les Schizopyrénéidés (amibes de type limace présentant souvent un stade flagellé) avec les Acrasidés (amibes s'agrégeant en corps multicellulaires). Les deux groupes sont caractérisés par des lobopodes éruptifs, se divisent par orthomitose intranucléaire, et présentent un stade flagellé transitoire. Les Heterolobosea sont caractérisées également en ultrastructure, par des crêtes mitochondriales en forme de disques aplatis et un appareil de Golgi atypique non organisé en piles de citernes (Pánek *et al.* 2012). Le taxon le plus étudié des Heterolobosea est assurément le genre *Naegleria* dont l'espèce pathogène *N. fowleri* est un parasite mortel de l'homme (Visvesvara *et al.* 2007) et l'espèce non pathogène, *N. gruberi* un organisme modèle pour la recherche (Lee 2010).

Critères écologiques

On peut également distinguer les amibes selon leurs modes de vie respectifs. Le premier groupe correspond aux amibes libres (ou telluriques) qui comprennent la plupart des espèces capables de mener une existence autonome dans les sols et les milieux aquatiques, telle *Amoeba proteus* (Pallas 1766), où elles cohabitent avec d'autres organismes.

Le second groupe est constitué d'amibes parasites strictes qui peuvent survivre dans l'environnement, mais se développent préférentiellement au sein d'un organisme supérieur, notamment dans le tube digestif de diverses espèces animales (y compris l'homme) en particulier dans les pays tropicaux et tempérés, telle *Entamoeba histolytica* (Schaudinn 1903).

Le troisième groupe enfin concerne les espèces dites amphizoïques qui peuvent adopter alternativement l'une ou l'autre forme, libre ou parasite, selon les contraintes de l'environnement, telle l'amibe pathogène que nous allons étudier, *Naegleria fowleri* (Carter 1970).

Critères moléculaires

A partir des années 2000, les critères de classification ont évolué suite aux bouleversements introduits par les études de phylogénie moléculaire reposant sur l'analyse des séquences d'ADN ribosomique (ADNr), d'ADN mitochondrial (ADNmt) et des gènes codant pour des protéines spécifiques telles que la neuraminidase et l'actine. Ainsi, plusieurs classifications différentes ont été proposées, dont celles de Bolivar *et al.* 2001, Milyutina *et al.* 2001, Cavalier-Smith 2002a, Fahrni *et al.* 2003 et Smirnov *et al.* 2005.

La biologie moléculaire a permis de confirmer certaines différences morphologiques mais également de préciser l'origine polyphylétique des amibes (Clark & Cross 1988) en créant le super-groupe des Amoebozoa issu des Unikontes (un seul flagelle à l'origine) qui comprend les Archamoebae, avec le genre *Acanthamoeba* et le super-groupe des Excavata, issu des Bicontes (eucaryotes possédant deux flagelles à l'origine) qui comprend les Heterolobosea où l'on retrouve le genre *Naegleria* qui nous intéresse (Cavalier-Smith 2002b).

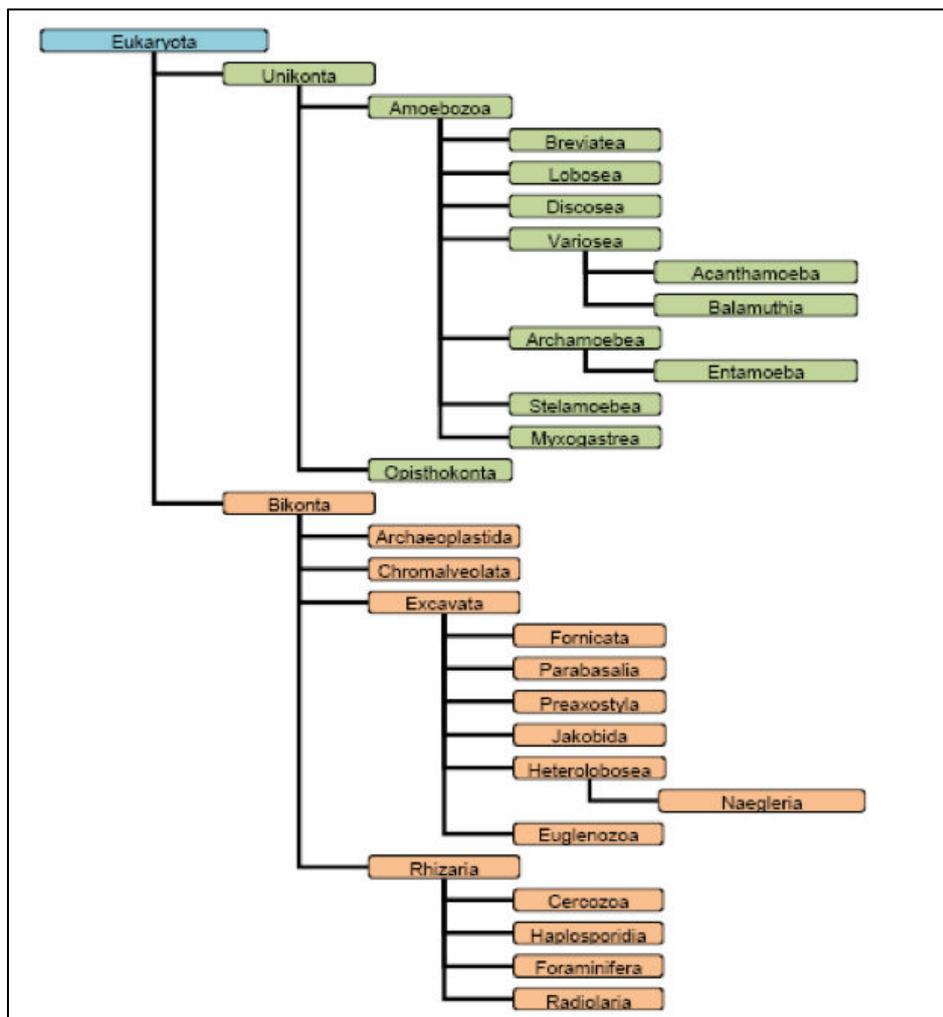


Figure 4. Classification des Eucaryotes basée sur des données génétiques (Thèse Coulon 2011).

En 2005 le comité international des protistologues a tenté de stabiliser la classification des Eucaryotes, à partir des approches de phylogénie moléculaire, en intégrant les données morphologiques aux données biochimiques et génétiques. L'ancienne terminologie (règne, phylum, classe, sous-classe...) a été abandonnée et les Eucaryotes ont été répartis en six super-groupes monophylétiques dans lesquels les amibes, qui forment un groupe polyphylétique, sont dispersées entre plusieurs taxons : (1) les Amoebozoaires, regroupent les amibes traditionnelles ainsi que les protistes parasites et comprennent les genres *Acanthamoeba* et *Balamuthia* dans les Acanthamoebidae de même que *Sappinia* dans les Flabellinea ; (2) les Opisthokontes, incluent les champignons et les animaux ; (3) les Rhizaires, comportent les Cercozoaires, les Foraminifères et les Radiolaires ; (4) les Archéplastides regroupent les plantes et les algues ; (5) les Chromalvéolés intègrent les Alvéolés (ciliés, dinoflagellés, Apicomplexa) et (6) le super-groupe des Excavés rassemble d'autres amibes dont les Heterolobosea avec le genre *Naegleria* dans le sous-groupe des Vahlkampfiidae (Adl *et al.* 2005) (Tableau 1).

Tableau 1. Classification des Eucaryotes selon Adl *et al.* 2005

Super-groups	First rank	Second rank, examples	
Amoebozoa	Tubulinea	Leptomyxida, Testacealobosia, Tubulinida	
	Flabellinea	<i>Cochliopodium</i> , Dactylopodia, Thecamoebida, Vanellida	
	Stereomyxida		
	Acanthamoebidae		
	Entamoebida		
	Mastigamoebidae		
	<i>Pelomyxa</i> Eumycetozoa	Dictyostelia, Myxogastria, Protostelia	
Opisthokonta	Fungi	Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycetes, Glomeromycota, Microsporidia, Urediniomycetes, Ustilaginomycetes, Zygomycota	
	Mesomycetozoa	Aphelidea, <i>Capsaspora</i> , <i>Corallochytrium</i> , Ichthyosporaea, <i>Ministeria</i> , Nucleariida	
	Choanomonada	Acanthoecidae, Monosigidae, Salpingoecidae	
	Metazoa*	Porifera, <i>Trichoplax</i> , Mesozoa, Animalia	
Rhizaria	Cercozoa	Cercomonadida, Chlorarachniophyta, Nucleohelea, Phaeodarea, Phytomyxea, Silicofilosea	
	Haplosporidia		
	Foraminifera	Subdivisions uncertain	
	<i>Gromia</i> Radiolaria	Acantharia, Polycystinea, <i>Sticholonche</i>	
Archaeplastida	Glaucophyta		
	Rhodophyceae	Subdivisions uncertain	
	Chloroplastida	Charophyta*, Chlorodendrales, Chlorophyta, <i>Mesostigma</i> , Prasinophytae	
Chromalveolata	Cryptophyceae	Cryptomonadales, Goniomonadales	
	Haptophyta	Pavlovophyceae, Prymnesiophyceae	
	Stramenopiles	Actinophryidae, Bacillariophyta, <i>Bolidomonas</i> , Bicosoecida, Chrysophyceae, Dictyochophyceae, Eustigmatales, Hypochytriales, Labyrinthulomycetes, Opalinata, Pelagophyceae, Peronosporomycetes, Phaeophyceae*, Phaeothamniophyceae, Pinguiochrysidales, Raphidiophyceae, <i>Schizocladia</i> , Synurales, Xanthophyceae	
	Alveolata	Apicomplexa, Ciliophora, Dinozoa	
	Excavata	Fornicata	<i>Carpediemonas</i> , Eopharyngia
		<i>Malawimonas</i>	
		Parabasalia	Cristamonadida, Spirotrichonymphida, Trichomonadida, Trichonymphida
Preaxostyla		Oxymonadida, <i>Trimastix</i>	
Jakobida		Histioniidae, <i>Jakoba</i>	
Heterolobosea		Acrasidae, Gruberellidae, Vahlkampfiidae	
Euglenozoa	Euglenida, Diplonemea, Kinetoplastea		

Plus récemment, une nouvelle révision de la taxonomie des Eucaryotes, basée sur des relations phylogénétiques plus robustes, a encore été apportée pour consolider cette classification (Adl *et al.* 2012). Les super-groupes définis précédemment en 2005 ont été en partie conservés, bien que certains aient été rassemblés dans deux groupes d'ordre supérieur, (1) les Amorphea et (2) les Diaphoretickes et les Chromalvéolés, probablement polyphylétiques, ont été répartis selon d'autres liens phylogénétiques (Tableau 2 et Fig. 5).

Tableau 2. Classification des Eucaryotes, selon Adl *et al.* 2012

	Super-groups	Examples		
Eukaryota	Amorphea	Amoebozoa	Tubulinea Mycetozoa	
		Opisthokonta	Fungi	Choanomonada Metazoa
			Apusomonada	Breviata
			Excavata	Metamonada Malawimonas Discoba
			Diaphoretickes	Cryptophyceae Centrohelida Telonemia Haptophyta
	Sar	Cercozoa	Foraminifera "Radiolaria" Alveolata Stramenopiles	
		Archaeplastida	Glaucophyta Rhodophyceae Chloroplastida	
		Incertae sedis Eukaryota	Incertae sedis, and table 3	

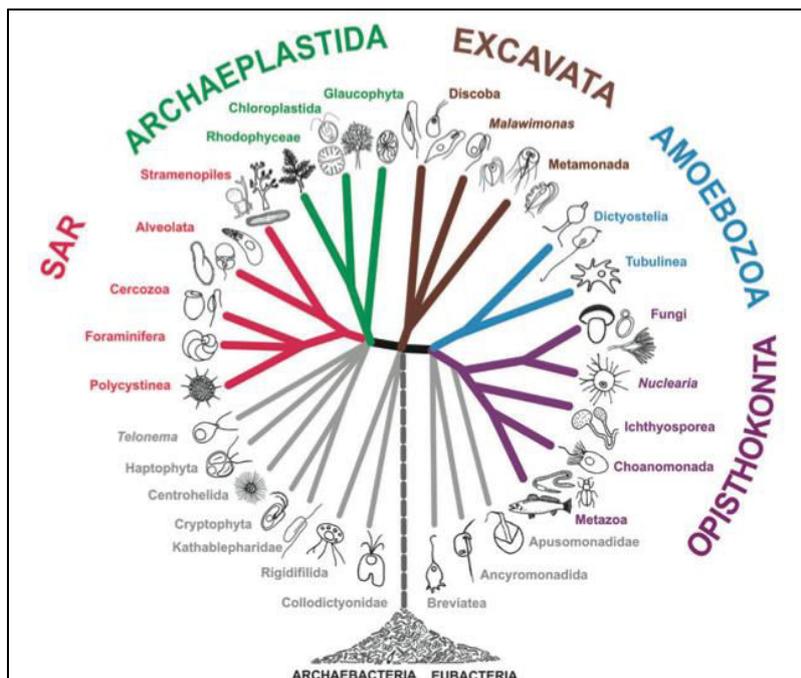


Figure 5. Arbre phylogénétique des Eucaryotes, selon Adl *et al.* 2012

Dans cette récente classification (Adl *et al.* 2012), le groupe polyphylétique des amibes se retrouve toujours réparti dans deux super-groupes et les différents genres sont dispersés dans plusieurs sous-groupes selon l'arborescence suivante :

AMOEBOZOA (Lühe 1913)

- Tubulinea (Smirnov *et al.* 2005)
- Discosea (Cavalier-Smith *et al.* 2004)
- Longamoebia (Cavalier-Smith & Smirnov in Smirnov *et al.* 2011)
- Centramoebida (Rogerson & Patterson 2002) avec *Acanthamoeba* et *Balamuthia*.

- Archamoebae (Cavalier-Smith 1983)
- Entamoebidae (Chatton 1925 ; emend. Cavalier-Smith 1993) avec le genre *Entamoeba*.

EXCAVATA (Cavalier-Smith 2002)

- Discoba (Hampl *et al.* 2009 ; Simpson in Hampl *et al.* 2009)
- Discicristata (Cavalier-Smith 1998)
- Heterolobosea (Page & Blanton 1985)
- Tetramitida (Cavalier-Smith 1993 [Vahlkampfiidae Jollos 1917]) dans lequel on trouve les genres *Acrasis*, *Heteramoeba*, *Percolomonas*, *Pocheina*, *Psalteriomonas*, *Stephanopogon*, *Tetramitus*, *Vahlkampfia* et *Naegleria*.

1.8. Les amibes libres telluriques

La classification des amibes que nous avons vue précédemment, basée sur leur mode de vie (amibes libres / amibes parasites / amibes amphizoïques) est encore utilisée en routine.

Les amibes libres telluriques sont les espèces qui se développent dans l'environnement de façon indépendante de l'homme ou des animaux. Elles se multiplient dans la terre, les sols humides ou les eaux riches en matières organiques telles que l'eau des marais ou les eaux stagnantes ou polluées, certaines ne tolèrent pas les milieux hyper salins comme la mer. Elles peuvent atteindre des tailles importantes telle *Amoeba proteus* (Pallas 1766a), (anciennement *Chaos diffluens*), ou amibe Protée qui est une forme d'eau douce de grande taille (jusqu'à 800 µm de long), vivant à la surface de la vase ou des terres humides.

1.9. Les amibes parasites strictes

Les amibes parasites strictes nécessitent en permanence la présence d'un hôte pour se développer. Ces protozoaires vivent dans des milieux humides et sont caractérisés par une motilité cellulaire qui ne passe pas par le stade flagellé. Les trophozoïtes peuvent toutefois s'enkyster quand les conditions ne sont plus favorables et leur forme kystique peut être disséminée dans l'environnement et pénétrer dans l'organisme par l'eau de boisson ou l'ingestion d'aliments souillés ou contaminés. De multiples animaux domestiques et sauvages sont porteurs de ces parasites (canidés, félidés, gorilles...) et susceptibles de constituer un réservoir. Dans le genre *Entamoeba*, se distinguent plusieurs espèces inoffensives pour l'homme (*E. dispar*, *E. coli*, *E. hartmanni*, *E. gingivalis*), tandis qu'une seule espèce est pathogène, *E. histolytica* responsable d'une parasitose grave, la dysenterie amibienne (amibiase). En général, chez l'homme, ces amibes parasitent le tube digestif, mais peuvent également migrer vers le foie ou les poumons. L'ingestion des kystes permet le développement de la forme végétative (trophozoïte) dans la paroi de l'intestin et du colon où certaines d'entre elles pourront acquérir un pouvoir pathogène hématophage, provoquer des ulcères et migrer dans la circulation. Ces amibes sont cosmopolites, mais la prévalence de ces parasites chez l'homme varie considérablement dans les différents groupes de population et est généralement étroitement liée aux conditions socio-économiques. En Europe occidentale, leur prévalence est de l'ordre de 2%, alors que dans certaines régions tropicales et subtropicales, elle dépasse 60% en particulier dans les régions dépourvues d'eau potable et d'installations sanitaires (Coulon 2011). D'après l'organisation mondiale de la santé, en 1997, l'amibiase aurait touché environ 500 millions d'individus et entraîné plusieurs dizaines de milliers de décès par an, particulièrement dans les régions sous-développées, où les conditions d'hygiène sont insuffisantes en raison de l'absence de systèmes d'épuration des eaux usées favorisant la circulation et la transmission de l'amibe.

2. Les amibes libres amphizoïques

Comme nous l'avons mentionné précédemment, certaines amibes sont douées d'amphizoïdie, c'est à dire qu'elles sont capables d'évoluer de façon autonome, sous forme d'amibes libres dans l'environnement, mais également sous forme parasite d'eucaryotes supérieurs, en étant pathogène ou non. Sur la centaine d'espèces d'amibes libres que l'on connaît, plusieurs espèces du genre *Acanthamoeba*, et une seule espèce des genres *Balamuthia*, *Sappinia* et *Naegleria* sont amphizoïques et de plus, responsables de pathologies

humaines souvent graves (cérébrale, oculaire, cutanée, auditive, sinusienne...). Les infections du système nerveux central sont assez rares mais d'issue généralement fatale chez l'animal et l'homme (Page 1974 ; Schuster & Visvesvara 2004). Dans ce cas et contrairement aux amibes parasites strictes, elles ne sont jamais pathogènes par ingestion, mais plutôt par effraction à l'occasion d'une blessure, ou par inhalation par le nez ou les poumons (Coulon 2011).

2.1. *Acanthamoeba* spp. (Castellani 1930 ; Volkonsky 1931)

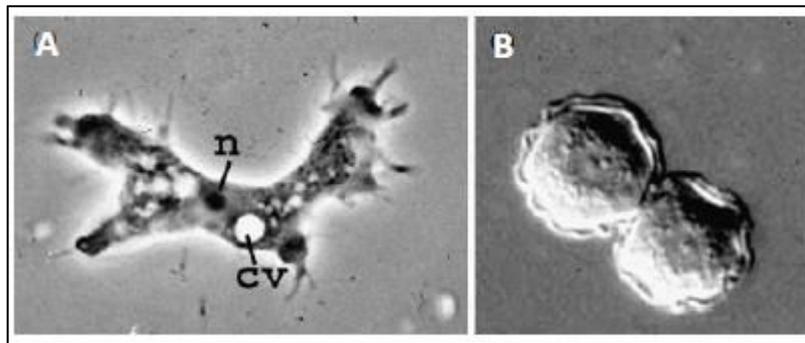


Figure 6. *Acanthamoeba Castellanii*. (A) trophozoïte ; (B) kystes ; (n) noyau ; (cv) vacuole contractile (x1000) (Vivesvara *et al.* 2007)

Une amibe du genre *Acanthamoeba* a été isolée pour la première fois par Puschkarew en 1913 à partir de la poussière et nommée *Amoeba polyphagus* (Puschkarew 1913), puis redécouverte par Castellani en 1930 en tant que contaminant dans une plaque de culture de levure. Volkonsky ayant créé le genre *Acanthamoeba* en 1931, l'amibe a été dénommée ultérieurement *Acanthamoeba castellanii* (Page 1967). Cette amibe fut désignée plus tard *Acanthamoeba culbertsoni* suite aux travaux de Culbertson *et al.* en 1958 qui ont démontré sa pathogénicité (voir Historique). Le genre *Acanthamoeba* comprend une vingtaine d'espèces différenciées sur des bases morphologiques et une quinzaine de génotypes basés sur le séquençage de l'ADNr 18S. Parmi ces espèces, un certain nombre d'entre elles sont responsables de kératites (*A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. hatchetti*, *A. culbertsoni*, *A. rhyodes*, *A. griffini*, *A. quina*, et *A. lugdunensis*) (Marciano-Cabral & Cabral 2003).

Acanthamoeba est une amibe libre de l'environnement, elle est cosmopolite et se retrouve dans des habitats extrêmement variés incluant la poussière, les sols, l'eau douce et saumâtre, les boues d'épuration, les déchets industriels, les réseaux sanitaires, les systèmes de chauffage, climatiseurs, aquariums, piscines ainsi que dans les cultures bactériennes, fongiques, de cellules de mammifères ou associée au matériel médical, ophtalmologique et

dentaire de même qu'à l'état de parasite des tissus de la plupart des vertébrés y compris l'homme (Visvesvara & Schuster 2008). Ces microorganismes ne passent pas par le stade flagellé et se présentent sous deux formes au cours de leur cycle : le trophozoïte actif, qui se déplace, se nourrit, se divise et le kyste qui représente la forme dormante, de résistance.

Les trophozoïtes du genre *Acanthamoeba* ont une forme ronde d'un diamètre de 14 à 40 µm, ornée de pseudopodes épineux (*acanthopodia*) et présentent un noyau pourvu d'un volumineux nucléole et une vacuole contractile. Les kystes à double paroi, de forme ronde à polygonale, ponctuée de pores (ostioles) peuvent survivre plusieurs années. Les *Acanthamoebae* sont d'autant plus redoutables qu'elles sont capables également d'héberger de nombreuses bactéries pathogènes pour l'homme telles que *Legionella*, *Mycobacterium*, *Vibrio cholerae*, *Listeria*, *Chlamydia*, ou encore *Helicobacter pylori* (Greub & Raoult 2004).

Les amibes du genre *Acanthamoeba* sont des microorganismes opportunistes qui peuvent être responsables de plusieurs pathologies chez des patients affaiblis ou immunodéprimés, les deux plus fréquentes étant la kératite amibienne chez les porteurs de lentilles de contact et l'encéphalite amibienne granulomateuse (EAG), ainsi que quelques cas d'amibiases cutanées. Le premier cas de méningo-encéphalite dû à *Acanthamoeba* a été décrit en 1972, on a d'abord cru à *Hartmanella* comme agent responsable de la maladie, puis une étude a démontré que le pathogène incriminé était *Acanthamoeba culbertsoni* (Willaert *et al.* 1978). Environ 150 cas ont été recensés dans le monde (Schuster & Visvesvara 2004). Cette pathologie fut appelée encéphalite amibienne granulomateuse (EAG) afin de la distinguer de la méningo-encéphalite amibienne primitive (MEAP) due à l'espèce *Naegleria fowleri*.

L' EAG est une infection rare, mais dont l'issue est presque toujours fatale. L'entrée du parasite se fait par des lésions de la peau ou par inhalation de kystes en suspension dans l'air. Les amibes utilisent ensuite la circulation sanguine pour rejoindre le système nerveux central entraînant des nécroses hémorragiques accompagnées des symptômes classiques de méningite bactérienne tels que maux de tête, fièvre, rigidité de la nuque et convulsions conduisant rapidement au décès. Concernant la kératite amibienne à *Acanthamoeba*, il s'agit d'une inflammation sévère de la cornée due aux sécrétions protéolytiques des trophozoïtes qui adhèrent aux cellules épithéliales. Le premier cas a été décrit en 1973 (Jones *et al.* 1975) suite à un traumatisme de l'œil, cependant, depuis 1985 le nombre de cas n'a pas cessé d'augmenter en corrélation avec l'accroissement du nombre de porteurs de lentilles de contact qui offrent aux amibes un milieu de développement idéal.

2.2. *Balamuthia mandrillaris* (Visvesvara *et al.* 1990)



Figure 7. *Balamuthia mandrillaris*. (A) trophozoïte ; (B) kystes (x 850)

On a découvert en 1986 qu'une amibe différente d'*Acanthamoeba*, isolée du cerveau post-mortem d'un singe Mandrill (*Mandrillus sphinx*) était responsable de l'encéphalite qui lui avait été fatale. Il s'agissait à nouveau d'une encéphalite amibienne granulomateuse mortelle pour les animaux et l'homme et ressemblant à celle provoquée par *Acanthamoeba*, bien qu'elle puisse toucher également les patients immunocompétents. Cette nouvelle amibe libre amphizoïque est également capable de provoquer des pathologies variées au niveau de la peau, des poumons, des sinus, des reins ou de l'utérus (Visvesvara 1990 ; 2008 ; 2010).

Initialement décrite comme une leptomyxide, cette espèce fut reconnue en 1993 comme la première d'un genre nouveau et baptisée *Balamuthia mandrillaris*. Les données moléculaires basées sur l'analyse de l'ARN mitochondrial 16S ont révélé sa proximité phylogénétique avec *Acanthamoeba* et ont permis de transférer le genre *Balamuthia*, de la famille des Leptomyxidae vers celle des Acanthamoebidae (Boon 2003). Comme *Acanthamoeba*, *B. mandrillaris* ne présente que deux stades au cours de son cycle de développement, des trophozoïtes plus grands que ceux d'*Acanthamoeba* (12-60 μ m) et des kystes plus ou moins sphériques à trois parois (Visvesvara 1990).

2.3. *Sappinia pedata* (Gelman *et al.* 2003)

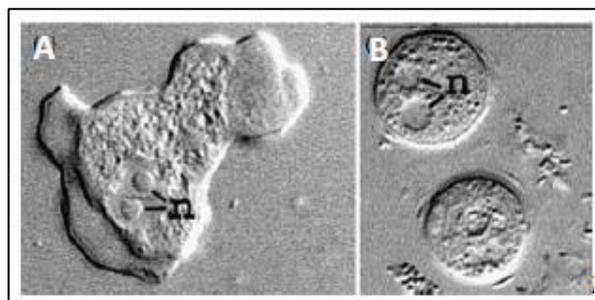


Figure 8. *Sappinia pedata*. (A) trophozoïte ; (B) kyste ; (n) noyaux étroitement appésés

Sappinia pedata, initialement décrite comme *S. diploidea*, en raison de la présence de deux noyaux, est également une amibe libre pathogène. Elle a causé un seul cas d'encéphalite chez un homme immunocompétent (Gelman *et al.* 2003 ; Qvarnstrom *et al.* 2009). Les trophozoïtes qui avaient déjà été retrouvés chez l'homme et l'animal sont de grande taille (> 40µm) et caractérisés, de même que leurs kystes, par la présence de deux noyaux accolés.

2.4. *Naegleria* spp. (Alexeieff 1912) :

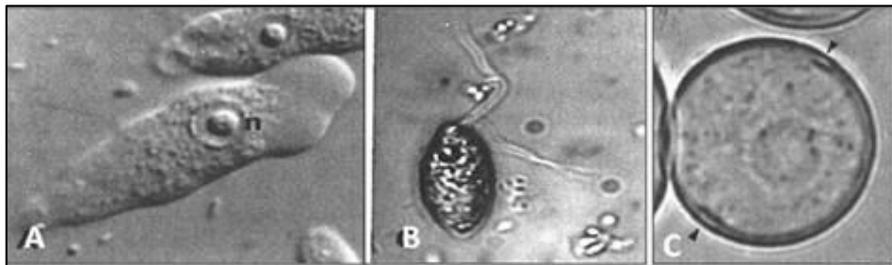


Figure 9. Les trois stades chez *Naegleria gruberi*. (A) trophozoïte ; (B) flagellé ; (C) kyste (Page 1988)

Comme nous l'avons mentionné précédemment dans l'historique, *Amoeba limax* a été décrite très tôt par Dujardin (Dujardin 1841) tandis que Schardinger décrit pour la première fois un trophozoïte d'*Amoeba lobosa* capable de se transformer en flagellé de façon transitoire, il introduisit d'ailleurs le terme "ameboflagellé" et baptisa cette espèce *Amoeba gruberi*. Cependant, c'est Vahlkampf qui a décelé le premier l'une des caractéristiques essentielles de cette amibe en 1905 : la division du noyau s'effectue à l'intérieur de l'enveloppe nucléaire, c'est une promitose (cryptomitose, méromitose, métamitose, orthomitose) (Vahlkampf 1905 ; Jadin 1972).

Le nom de genre *Naegleria* fut suggéré plus tard par Alexeieff (1912) en hommage aux travaux remarquables de Naegler qui décrit cette espèce en détail (Naegler 1909).

Jusque dans les années 1970, le genre *Naegleria* était étudié principalement comme modèle de la transformation d'un trophozoïte en flagellé (Willmer 1956 ; Chang 1958 ; Fulton & Dingle 1967), mais ces ameboflagellés acquièrent rapidement une renommée internationale dans le milieu médical et le monde de la recherche quand l'espèce *Naegleria fowleri* fut reconnue comme l'agent responsable de la méningo-encéphalite amibienne primitive (MEAP), aiguë, fulminante et mortelle pour l'homme (Butt 1966 ; De Jonckheere 2002).

Depuis cette date, les amibes *Naegleria* ont été recherchées sur tous les continents, dans le biotope naturel, anthropisé, les sols et le milieu aquatique et actuellement, une cinquantaine d'espèces sont identifiées et caractérisées (De Jonckheere 2014).

Aujourd'hui, nous pouvons dire que les amibes libres du genre *Naegleria* sont des amoeboflagellés ubiquistes, largement distribués dans l'eau et les sols et caractérisés par l'existence de trois stades morphologiquement distincts, le trophozoïte qui est la forme active mobile qui se divise par promitose, le stade flagellé transitoire, très mobile en milieu liquide mais qui ne se divise généralement pas et le kyste qui est la forme de résistance et de dissémination susceptible de redonner la forme trophozoïte. Les trois stades se retrouvent dans des milieux humides et le passage de l'un à l'autre des stades dépend des conditions favorables ou non de l'environnement (Marciano-Cabral *et al.* 2000 ; Chávez-Munguía *et al.* 2009).

Toutefois, selon les espèces ou les souches, il existe aussi quelques amibes du genre *Naegleria* qui ne forment pas de flagelle, d'autres dont le stade flagellé est capable de se diviser et d'autres enfin qui ne donnent pas de kyste, probablement en raison de la présence intracellulaire d'une bactérie parasite (De Jonckheere 2002).

2.4.1. Le génome des *Naegleria*

La division spécifique par promitose intranucléaire des *Naegleria* respecte le schéma classique de séparation des chromosomes. Toutefois, le nombre de chromosomes est difficile à obtenir par les techniques classiques (Fulton 1970) mais peut-être estimé par électrophorèse en champ pulsé. Les résultats obtenus chez *N. gruberi* montrent que cette espèce compte environ 23 chromosomes, allant de 400 à 2000 kbases (Clark 1990).

Le séquençage récent du génome complet de *Naegleria gruberi* compte plus de 40 Mb et a permis de mieux comprendre son organisation particulière (Fritz-Laylin *et al.* 2010).

D'après cette étude, le génome comporte l'ADN nucléaire porté par les chromosomes, un ADN plasmidique circulaire, nucléaire également mais extra-chromosomique de 14 kb et un ADN mitochondrial circulaire d'environ 50kb. L'ADN plasmidique est présent à raison de 3000 à 5000 copies par cellule, il représente 17% de l'ADN total, est doué d'autoréplication et porte les gènes des ARN ribosomiques (18S, 28S et 5,8S). La présence d'ADN ribosomique sur un élément extra-chromosomique n'avait jamais encore été observée, mis à part chez *Entamoeba histolytica* et *Giardia lamblia*. *Naegleria* est le troisième genre chez les Eucaryotes chez qui un ADN plasmidique nucléaire a été retrouvé (Clark & Cross 1987). L'ADN

mitochondrial représente environ 15% de l'ADN total de *Naegleria*. La plupart des souches examinées sont diploïdes, mais chez certaines souches comme *N. gruberi*, c'est la tétraploïdie qui est observée suggérant l'existence d'une duplication du génome chez les *Naegleria*.

2.4.2. Les différentes espèces du genre *Naegleria*

Selon la récente classification des Eucaryotes que nous avons vue, le genre *Naegleria* fait partie du super-groupe des *Excavata* et des sous-groupes successifs suivants, Discoba, Discicristata, Heterolobosea et Tetramitina (Adl *et al.* 2012). Ce dernier taxon correspond à la famille des Vahlkampfiidae (Jollos 1917) dont le terme n'est plus utilisé désormais, car il correspond à un ensemble paraphylétique, caractérisé par des amibes de type limace dont le nucléole persiste pendant la mitose (Panek 2012). Jusqu'à la description de l'espèce pathogène *N. fowleri* en 1970, tous les améboflagellés du genre *Naegleria* étaient considérés comme appartenant à l'espèce *N. gruberi*. Puis progressivement, la distinction des espèces du genre *Naegleria* s'est faite sur la morphologie des kystes, la température de développement (Tableau 3), les critères immunologiques, la pathogénicité et les profils enzymatiques (Griffin 1972).

A partir des années 1980, la classification du genre *Naegleria* a été réalisée, comme nous le verrons plus loin, à partir des différences de séquences des gènes précurseurs des ARNr et en particulier, des espaceurs internes transcrits, ITS1 et ITS2 (De Jonckheere 1998) (Fig. 10). La séquence de la région ITS1/5.8S/ITS2 comprend des différences qui ont permis de distinguer 47 espèces de *Naegleria* (Fig. 10) de même que la séquence de l'ITS2 qui varie en longueur entre ces différentes espèces (Tableau 3). De plus, comme nous le verrons plus loin chez *N. fowleri*, la séquence ITS1 varie également entre les différentes souches et permet de différencier 8 génotypes.

Tableau 3. Principales espèces de *Naegleria* classées en fonction de leur température de développement et de la longueur de leurs séquences ITS1 et ITS2 en nombre de paires de bases (pb).

44°C	ITS1	ITS2
<i>N.fowleri</i>	Variable	106 pb
<i>N.lovaniensis</i>	41 pb	103 pb
<i>N.Carteri</i>	34 pb	100 pb
<i>N.morganensis</i>	34 pb	226 pb
<i>N.niuginensis</i>	46 pb	117 pb
<i>N.sturti</i>	35 pb	118 pb
<i>N.martinezi</i>	36 pb	102 pb
<i>N.johanseni</i>	36 pb	103 pb
42°C		
<i>N.australiensis</i>	33 pb	100 pb
<i>N.italica</i>	33 pb	162 pb
<i>N.jamiesoni</i>	34 pb	99 pb
<i>N.thiangensis</i>	33 pb	102 pb
<i>N.byersi</i>	33 pb	115 pb

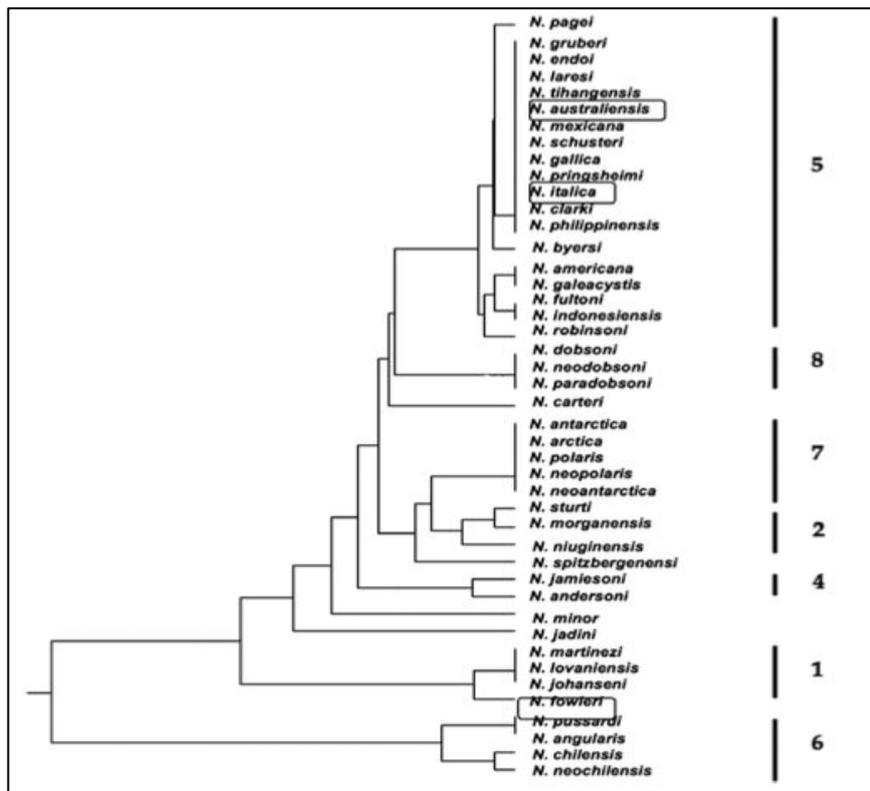


Figure 10. Arbre phylogénétique des espèces du genre *Naegleria* classées en différents clusters (1, 2, 4, 5, 6, 7 et 8) basé sur la comparaison des séquences d'ADNr 5,8S. Les espèces pathogènes sont encadrées, d'après De Jonckheere 2011.

2.4.3. Pathogénicité et thermosensibilité des espèces du genre *Naegleria*

Le genre *Naegleria* comprend des espèces pathogènes et des espèces non pathogènes. Si toutes les espèces pathogènes sont thermophiles, l'inverse n'est pas vrai, toutes les espèces thermophiles ne sont pas pathogènes (De Jonckheere 2002). En effet, la plupart des espèces du genre *Naegleria* isolées dans l'environnement ne sont pas pathogènes et se développent généralement à des températures inférieures à 37°C. D'autres espèces, non pathogènes également, sont par contre des amibes thermophiles qui se développent préférentiellement à des températures supérieures à 37°C et proches de 42-45°C (Tableau 4) (Griffin 1972). Certaines, enfin, sont à la fois des espèces essentiellement thermophiles et hautement pathogènes pour l'homme et/ou l'animal (Tableau 4).

Tableau 4. Classification des espèces du genre *Naegleria* selon leur pathogénicité et leur caractère thermophile d'après De Jonckheere, 2002.

Non pathogènes, non thermophiles	Non pathogènes, thermophiles	Pathogènes et thermophiles
<i>N. gruberi</i>	<i>N. lovaniensis</i>	<i>N. fowleri</i>
<i>N. pringsheimi</i>	<i>N. andersoni</i>	<i>N. australiensis</i>
<i>N. pagei</i>	<i>N. jamiesoni</i>	<i>N. italica</i>
<i>N. jadini</i>	<i>N. pussardi</i>	<i>N. philippinensis</i>
<i>N. clarki</i>	<i>N. carteri</i>	

3. *Naegleria fowleri* (Carter 1970)

Bien que la pathogénicité des différentes amibes libres thermophiles du genre *Naegleria* (*N. australiensis*, *N. philippinensis*, *N. italica*) ait été démontrée sur des animaux de laboratoire (De Jonckheere *et al.* 1983 ; Simeon *et al.* 1990 ; Robinson *et al.* 2004), seule l'espèce *N. fowleri* est pathogène pour l'homme (Robinson *et al.* 2006 ; Robinson *et al.* 2004 ; De Jonckheere 2002 ; Schuster 2002). Quelquefois dénommée *N. aerobia* (Singh & Das 1970; Das 1974) ou *N. invades* (Chang 1974), *N. fowleri* est l'amibe libre amphizoïque responsable de la méningo-encéphalite amibienne primitive (MEAP) que nous allons voir, une pathologie aiguë et le plus souvent mortelle avec atteinte du système nerveux central, généralement observée chez l'enfant ou l'adulte jeune immunocompétent qui a été en contact avec une eau contaminée.

3.1. Morphologie

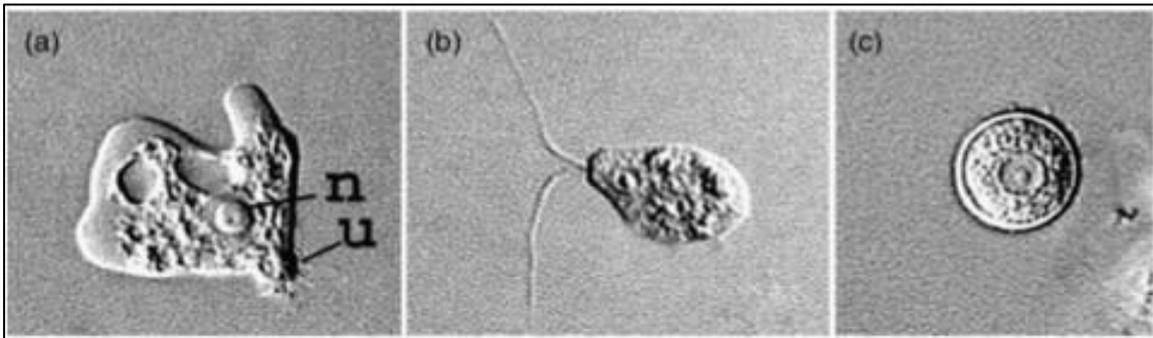


Figure 11. *Naegleria fowleri*. (a) trophozoïte ; (b) flagellé ; (c) kyste (Vivesvara *et al.* 2007).

Le trophozoïte :

De forme variable et d'une taille plus petite que les autres amibes libres pathogènes (10 à 20 μm), les trophozoïtes de *N. fowleri* sont soit inactifs et contractés, soit mobiles. Ils se déplacent sur le substrat par un mouvement sinusoïdal rapide en produisant vers l'avant un renflement de cytoplasme hémisphérique correspondant au lobopode (Fig. 11) (Visvesvara *et al.* 2007). Ils se polarisent en ne formant que quelques pseudopodes dont l'un devient proéminent et s'étale à l'avant (forme limax), tandis qu'à l'extrémité postérieure (opposée à la direction du déplacement) se différencie un collopode papillaire, uroïde ou uropode, orné de filaments (Fig. 11a) sur lesquels peuvent adhérer les bactéries. On distingue facilement les deux aspects du cytoplasme, l'ectoplasme, riche en myosine et en microfilaments d'actine présente la texture d'un gel alors que l'endoplasme est assez richement pourvu en enclaves variées, certaines de nature cristalline, corps réfringents, vacuoles aqueuses, lipides, bactéries symbiotiques. On distingue clairement le noyau avec un volumineux nucléole central. Le trophozoïte de *N. fowleri* se reproduit par fission binaire au cours d'une promitose intranucléaire qui se déroule selon les quatre stades majeurs d'une mitose classique et aboutit à deux cellules filles. Toutefois, cette cryptomitose comme nous l'avons vu, est caractérisée par le maintien de l'enveloppe nucléaire pendant la division, l'absence de centrioles, la présence de deux masses polaires émanant du nucléole et l'apparition d'un corps intermédiaire au cours de l'anaphase (Fulton & Dingle 1971 ; Fulton 1977 ; González-Robles *et al.* 2009). L'ultrastructure du cytoplasme de *N. fowleri* permet de distinguer de nombreuses mitochondries, un réticulum endoplasmique rugueux et lisse, une ou plusieurs vacuoles contractiles et des vacuoles digestives. En effet, les trophozoïtes se nourrissent de bactéries gram-négatives et de débris microscopiques qu'ils capturent par phagocytose ou de cellules

d'un hôte infecté. Certains présentent des expansions cytoplasmiques particulières de la surface cellulaire "amoebostomes ou cytostome" (*food cups*) (Fig. 12) variant en taille et en nombre en fonction de la souche. Leur fonction est dans un premier temps de permettre l'ingestion des bactéries, levures et débris cellulaires et dans un deuxième temps de servir de points d'accrochage aux organites (Marciano-Cabral & John 1983).

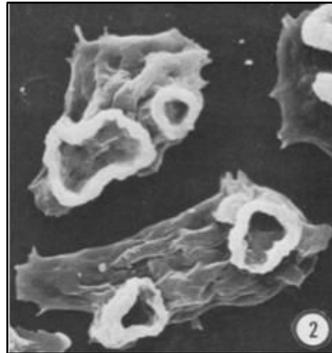


Figure 12. Trophozoïtes de *N. fowleri* formant des amoebostomes d'après John et Cabral 1983.

Le flagellé :

L'amibe libre *Naegleria fowleri* est considérée comme un amoeboflagellé car elle possède un stade flagellé transitoire. Le flagellé mesure de 10 à 16µm, est ovalaire ou piriforme et dépourvu de cytostome, ne se nourrit pas et ne se divise pas (Visvesvara 2008).

Très mobile, il se déplace généralement à l'aide de deux flagelles bien que trois ou quatre puissent être observés. Il possède un noyau avec un nucléole central (Fig. 11b). Les flagellés de *N. fowleri*, apparaissent en culture par manque de nourriture comme pour les différentes espèces de *Naegleria* (Willmer 1956) et selon les conditions ioniques (Parija & Jayakeerthee 1999). On peut les obtenir facilement, en une heure ou plus, en augmentant la pression hydrostatique par ajout d'eau distillée dans le milieu (test de flagellation). Le stade flagellé de *N. fowleri* permet à cette espèce de se disséminer facilement dans le milieu et de conquérir de nouvelles niches, ce stade réversible lui permettant de redonner rapidement un trophozoïte à l'origine d'une nouvelle colonie (Chang 1958). La différenciation en flagellé nécessite un changement de forme de la cellule avec modification des organites intracellulaires, diminution du nombre de vacuoles et synthèse d'un appareil flagellaire classique répondant au motif 9+2 de l'axonème, avec un corpuscule basal axé sur 9 triplets de microtubules (Marciano-Cabral 1988).

Le kyste :

Des conditions défavorables entraînent l'enkystement des trophozoïtes de *N. fowleri* pour maintenir l'organisme en vie dans le sol sur de longues périodes. On observe la formation des kystes chez cette espèce, comme chez les autres amibes, en cas de privation de nourriture, de surpopulation, de dessiccation, de pollution, de manque d'oxygène, de changement de pH ou d'augmentation de la force ionique (Marciano-Cabral 1988). Les kystes des *Naegleria* sont sphériques, d'un diamètre moyen de 7 à 15µm, ils possèdent une double paroi, séparant un endokyste volumineux avec le noyau central et les organites et un ectokyste beaucoup plus fin accolé au précédent (Visvesvara 2008). L'enkystement nécessite la formation de la paroi, l'expulsion d'eau par les vacuoles contractiles et la réorganisation du cytoplasme. Les kystes des *Naegleria* présentent un ou plusieurs pores (ostioles) par lesquels l'amibe peut sortir et repasser au stade trophozoïte quand les conditions s'améliorent (Page 1988 ; Visvesvara *et al.* 2007). Selon les auteurs, le nombre de pores pourrait permettre de distinguer les différentes espèces de *Naegleria* (Michel *et al.* 1987 ; Page 1975 ; Pussard 1979) mais d'autres auteurs ont montré qu'il peut aussi varier selon les conditions de culture (De Jonckheere & Brown 2005). Un bouchon muqueux, ou opercule faisant quelques fois saillie sur l'extérieur, permet d'obturer les ostioles (Dyková *et al.* 2001 ; Marciano-Cabral 1988 ; Rondanelli *et al.* 1987 ; Schuster 1975).

3.2. Ecologie

N. fowleri peut être rencontrée dans différents environnements aquatiques ainsi que dans les sols sur tous les continents (Rodríguez-Zaragoza 1994) (Tableau 5). Sa préférence pour les températures élevées fait qu'elle a été principalement isolée en été, dans les eaux douces chauffées naturellement des rivières, étangs, canaux et lacs aux USA, en Australie, en Europe, en Amérique du sud ou en Asie (Tableau 5). Cette amibe pathogène a également été retrouvée dans des sources géothermales ainsi que dans des réserves ou des conduites d'alimentation en eau domestique plus ou moins chlorées, de même que dans des eaux réchauffées en aval des centrales électriques ou polluées par des effluents industriels, ainsi que dans des piscines et autres bassins de loisirs. Elle a également été retrouvée dans l'air ou sur les téguments d'amphibiens, ainsi que dans les intestins ou les branchies de poissons (Références, Tableau 5).

Tableau 5. Distribution de *N. fowleri* dans les différents milieux et références bibliographiques

Rivières étangs et lacs	Butt 1966 ; Callicott <i>et al.</i> 1968 ; Patras & Andujar 1966 ; Carter 1968, 1969 ; Mandal <i>et al.</i> 1970 ; Chang 1971 ; Duma <i>et al.</i> 1971, Duma 1981 ; Kasprzak & Mazur 1972 ; Van den Driessche <i>et al.</i> 1973 ; Jadin 1974 ; Wellings <i>et al.</i> 1979 ; Duma 1980 ; Griffin 1983 ; John & De Jonckheere 1985 ; Kyle & Noblet 1985 ; Salazar <i>et al.</i> 1986 ; Detterline & Wilhelm 1991 ; Ávila <i>et al.</i> 2006 ; Leiva <i>et al.</i> 2008 ; Lares-Villa & Hernández-Peña 2010
Sources géothermales	Hecht <i>et al.</i> 1972 ; Jamieson & Anderson 1973 ; Jamieson 1973 ; Brown <i>et al.</i> 1983 ; Wang <i>et al.</i> 1993 ; Nicolas <i>et al.</i> 2010
Réserves et conduites d'eau domestique	Anderson & Jamieson 1972 ; Anderson <i>et al.</i> 1973 ; Carter 1972 ; Cooter 2002 ; Dorsch <i>et al.</i> 1983 ; Marciano-Cabral <i>et al.</i> 2003
Effluents industriels	Vandepitte <i>et al.</i> 1974 ; De Jonckheere & van de Voorde 1977 ; De Jonckheere <i>et al.</i> 1975 ; Delattre & Oger 1981 ; Dive <i>et al.</i> 1981 ; Kasprzak <i>et al.</i> 1982 ; Cerva <i>et al.</i> 1980 ; 1982 ; Cerva & Simanov 1983 ; Griffin 1983 ; John & De Jonckheere 1985 ; Tyndall <i>et al.</i> 1989 ; Rodríguez-Zaragoza 1994 ; Jamerson <i>et al.</i> 2009 ; Behets <i>et al.</i> 2007a
Piscines et bassins de loisir	Cerva 1971 ; Dive <i>et al.</i> 1978 ; Cursons <i>et al.</i> 1976 ; 1979 ; De Jonckheere 1979 ; Kadlec 1981 ; Cain <i>et al.</i> 1981 ; Rivera <i>et al.</i> 1983 ; Gogate & Deodhar 1985 ; Górník & Kuźna-Grygiel 2004
Air	Kingston & Warhurst 1969 ; Abraham & Lawande 1982 ; Lawande 1983
Animaux	Franke & Mackiewicz 1982 ; Taylor 1977

La présence et la densité de *N. fowleri* dans l'eau sont liées, comme nous allons le voir, à la température, mais également à d'autres critères physico-chimiques (pH, conductivité, matières en suspension, présence de fer ou de produits biocides), ainsi qu'à différents paramètres biologiques tels que la présence de bactéries (symbiotiques, parasites) ou l'existence d'autres protozoaires potentiellement compétiteurs.

3.3. Alimentation

Les bactéries sont la source principale de nourriture de *N. fowleri*, un seuil de densité bactérienne doit donc être atteint pour permettre le développement optimal des trophozoïtes (Danso & Alexander 1975). Les eaux avec des concentrations en coliformes totaux élevées

pourraient donc favoriser la prolifération de *N. fowleri* (Sykora *et al.* 1983) de même qu'une couche détritique, riche en bactéries issues d'efflorescences algales (Kyle & Noblet 1987). En laboratoire, les cultures de *N. fowleri* s'effectuent d'ailleurs sur gélose non nutritive tapissée de *E. coli*, d'*Enterobacter aerogenes* ou *Klebsiella pneumoniae* pour permettre leur croissance (Schuster & Vivesvara 2004). Cette nécessité pour l'amibe de vivre en présence de bactéries explique que *N. fowleri* ait été détectée dans des biofilms de réseaux d'eau potable (Puzon *et al.* 2009). Il a été montré en laboratoire, que *N. fowleri* pouvait être retrouvée cinq mois après son introduction dans des biofilms de canalisations (Biyela 2010 ; 2012). Une autre étude menée sur des réacteurs en laboratoire montre qu'il faut un minimum de 10,4 bactéries par amibe pour observer une croissance de *N. fowleri* dans les biofilms d'eau de rivière (Goudot *et al.* 2012). Par ailleurs, *N. fowleri* a été retrouvée de façon préférentielle dans la couche particulaire d'une colonne d'eau constituée de matières organiques en suspension (Kyle & Noblet 1985 ; 1987). Enfin, il existerait un rapport entre les événements pluvieux et la présence de *N. fowleri* dans l'eau, due à la suspension des sédiments par la pluie d'une part, et par le ruissellement et lessivage des sols d'autre part (Brown *et al.* 1983 ; Kyle *et al.* 1985 ; John & Howard 1995). En conclusion, on peut dire que le développement de *N. fowleri* est favorisé par la présence de biofilms, de sédiments et de matières organiques en suspension lui servant de support pour se nourrir et se déplacer.

3.4. Association de *N. fowleri* avec des bactéries

Les bactéries ne constituent pas seulement une source de nourriture pour les amibes. Comme nous l'avons vu précédemment pour la plupart des espèces, elles peuvent également s'associer aux amibes en tant que symbionte ou les infecter comme parasite et les détruire (Taylor *et al.* 2012). Concernant *N. fowleri*, cette espèce est d'autant plus redoutable pour l'homme qu'elle est retrouvée en même temps que *Legionella pneumophila* dans l'environnement, suggérant une interaction entre les deux (Declerck *et al.* 2007 ; Hsu *et al.* 2009 ; 2011 ; Huang & Hsu 2010). En laboratoire, il a été démontré que la température (entre 24 et 41°C) a une influence sur la prolifération de *L. pneumophila* dans *N. fowleri* (Buse & Ashbolt 2011). De plus, le comportement de *N. fowleri* vis-à-vis de *L. pneumophila* change en fonction du milieu de culture. *N. fowleri* est détruite par *L. pneumophila* lorsqu'elle est cultivée sur une solution saline de type Page (PAS) alors qu'elle n'est pas affectée par la bactérie sur un milieu de culture classique de type Chang SCGYEM (Newsome *et al.* 1985). Par ailleurs, la multiplication de *L. pneumophila* est plus importante chez *N. fowleri* que chez

Acanthamoeba polyphaga (Buse & Ashbolt 2012). Il a également été montré que *N. fowleri* s'enkystait en présence de *Pseudomonas* sp. (Marciano-Cabral & Cline 1987).

3.5. Interactions avec d'autres amibes

De nombreuses études menées dans différents pays à partir de l'eau de rivières, de lacs, de circuits de refroidissement ou d'effluents industriels ont montré que différentes espèces d'amibes peuvent cohabiter dans un même environnement. La présence de *N. fowleri* n'est alors pas systématique (Sawyer 1989 ; Gianinazzi *et al.* 2009 ; Huang & Hsu 2011 ; Ithoi *et al.* 2011 ; Niyyati *et al.* 2012 ; Wang *et al.* 2014). Quand elle se développe avec d'autres espèces, *N. fowleri* est souvent associée à *N. australiensis* ou *Acanthamoeba* (Behets *et al.* 2007a ; John et Howard 1995), mais dans ce cas, même si les conditions sont favorables, elle est rarement prédominante et représente plutôt 10 à 20% des *Naegleria* spp. (Tiewcharoen & Junnu 2001 ; Lares-Villa & Hernandez-Pena 2010) ou des amibes libres de façon plus générale (Nacapunchai *et al.* 1999). En effet, d'après une étude de Griffin (1983), effectuée dans différents environnements (rivières, étangs, piscines, boue, eau de robinet), la proportion des amibes serait d'une amibe thermophile pour 10 000 amibes libres. L'espèce pathogène *N. fowleri* se retrouverait de manière aléatoire et en très faible concentration dans l'environnement, du fait de sa faible capacité à s'imposer dans un milieu microbiologiquement en équilibre (Griffin 1983).

De plus, dans les eaux chauffées de manière constante, ou dont la température est supérieure à 40°C, l'espèce *N. fowleri* est en compétition avec les autres amibes thermophiles dont les *Naegleria* non pathogènes telles que *N. lovaniensis* qui sont en nombre plus important (Stevens *et al.* 1980 ; Sykora *et al.* 1983). Il a d'ailleurs été observé en laboratoire qu'en milieu favorable au développement de *N. fowleri*, sur biofilms à température élevée, *N. fowleri* après une période de croissance est rapidement remplacée par d'autres amibes thermophiles (Goudot *et al.* 2012). Cependant, un certain nombre d'études montrent que dans les milieux récemment perturbés, la présence de *N. fowleri* est significative. Les travaux de Griffin ont permis d'émettre l'hypothèse selon laquelle, une perturbation de cet environnement entraîne l'élimination des autres protozoaires créant une " niche vide" qui est alors occupée par *N. fowleri* grâce à sa capacité à flageller.

3.6. Influence des paramètres physico-chimiques

Comme on peut le lire dans le dernier rapport de l'ANSES sur l'évaluation des risques liés à la présence de l'amibe *N. fowleri* dans les eaux de baignade, l'influence des paramètres physico-chimiques sur le développement du parasite a été largement étudiée par de nombreux auteurs (ANSES 2013).

3.6.1. La température

Un lien évident existe entre la température et la présence de cette espèce thermophile dans l'environnement. La température de détection de *N. fowleri* est généralement comprise entre 27 et 35°C (Sykora *et al.* 1983), mais la température optimale de développement des trophozoïtes est d'environ 42-44°C (Robinson 1996). Toutefois, *N. fowleri* a aussi été retrouvée dans des lacs où la température était plus froide, aux alentours de 16-20°C (Kyle & Noblet 1985). La gamme de tolérance thermique de *Naegleria fowleri* est donc assez large et comprise entre 18° et 45°C. Des études menées *in vitro* ont permis de déterminer précisément les seuils de tolérance de *N. fowleri* vis à vis de la température. Au delà de 45°C et jusqu'à 65°C les trophozoïtes peuvent survivre 45 min et les kystes 145 min. A des températures inférieures à +10°C les trophozoïtes survivent quelques heures, voire quelques minutes si l'on descend en dessous de zéro. Les kystes peuvent toutefois résister une heure ou deux entre -10°C et -30°C et quelques mois à +4°C (Carter 1970 ; Chang 1978 ; Welling *et al.* 1977 ; De Jonckheere 1977 ; John & John 1996a ; Warhurst 1980 ; Biddick *et al.* 1984 ; Gupta & Das 1999).

D'autres études ont montré que *N. fowleri* n'était pas systématiquement détectée dans des eaux dont la température est comprise entre 27° et 36°C (Jamerson *et al.* 2009). Il semblerait qu'en plus d'une température optimale à atteindre, le temps d'exposition à cette température soit nécessaire au développement de *N. fowleri*. De plus, si la température est un facteur important, il a été démontré en laboratoire que la multiplication de *N. fowleri* dépendait aussi du nombre de bactéries disponibles (Goudot *et al.* 2012). Le caractère saisonnier de la présence de *N. fowleri* appuie ces observations avec les détections les plus importantes en été et en début d'automne (Welling *et al.* 1977 ; De jonckheere 1977).

3.6.2. Hygrométrie, pH, salinité, conductivité, taux d'oxygène et de fer dissous

La température n'étant pas le seul élément à prendre en compte pour la survie de *N. fowleri*, les autres paramètres physico-chimiques ont également été étudiés par différents

auteurs. L'hygrométrie est essentielle car les trophozoïtes sont instantanément affectés par la dessiccation, bien que les kystes puissent résister plus longtemps grâce à la présence de leurs parois (Chang 1978). En ce qui concerne le pH, les trophozoïtes de *N. fowleri* tolèrent des valeurs assez larges allant de 4.6 à 12 et les kystes de 2 à 10 (Carter 1970 ; Tiewcharoen *et al.* 2001). Par ailleurs la salinité de l'eau est importante car la concentration de NaCl supportée par *N. fowleri* est relativement faible, allant de 0.5% à 1% (Griffin 1983) et ne dépasse pas 3,5% (Carter 1970 ; Tiewcharoen *et al.* 2001) ce qui explique qu'on ne la retrouve pas dans l'eau de mer. Concernant la conductivité, *N. fowleri* n'est pas détectée pour des conductivités supérieures à 614 μ S/cm (Cerva *et al.* 1983 ; Behets *et al.* 2007). Contrairement à ces différents éléments bien caractérisés, l'influence du taux d'oxygène dissous dans l'eau sur *N. fowleri* n'est pas clairement établie et varie selon les auteurs. Pour certains, cette espèce ne se développe pas en anaérobie (Weik & John 1977), pour d'autres, les trophozoïtes ont été retrouvés en conditions d'anoxie dans des couches particulières en suspension (Kyle *et al.* 1985), par ailleurs, une concentration importante en oxygène n'est pas nécessaire (Cerva 1978), ni gênante (Cerva *et al.* 1983), car l'amibe a été retrouvée dans des effluents de circuits de refroidissement où la concentration en oxygène dissous était relativement importante (supérieure à 7.4 mg/L). Enfin, plusieurs études *in vivo* et *in vitro* ont montré que le fer semblait être un élément indispensable au développement de *N. fowleri* dans une gamme de concentrations allant de 0,5 à 2,5 mg/ litre (Duma 1980 ; Newsome & Wilhelm 1981 ; 1983 ; Kyle *et al.* 1985). Par ailleurs, une étude a montré que *N. fowleri*, après avoir envahi les tissus d'un hôte, est capable d'obtenir le fer dont elle a besoin en utilisant ses protéases à cystéines pour dégrader les protéines liant le fer de l'hôte. Cette stratégie leur permettrait de survivre dans le système nerveux central (Martínez-Castillo *et al.* 2014).

3.6.3. Influence des traitements biocides

Le traitement des eaux de piscines ou de l'eau de distribution contre le développement des algues et des parasites repose principalement sur des produits de désinfection chlorés.

Toutefois, le chlore actif (acide hypochloreux HClO) qui possède à pH 7, l'activité microbicide la plus élevée sur *N. fowleri*, réagit également avec les molécules organiques présentes dans l'eau ce qui diminue notablement son efficacité (Dorsch 1982). Ainsi, la dose de chlore actif mentionnée dans la littérature et qui permet d'inactiver les trophozoïtes de *N. fowleri* à 25°C varie selon les auteurs de 0,5 à 2 mg/L. Cet effet dépend de la durée du traitement (10 min à 1h) du milieu utilisé (eau distillée, tampon), du pH (7 à 9) et de la

présence ou non de matières organiques en suspension (Derreumaux *et al.* 1974 ; De Jonckheere & Van De Voorde 1976 ; Chang 1978 ; Cursons *et al.* 1980 ; Tiewchaloren & Junnu 1999 ; Sarkar 2008 ; Sarkar et Gerba 2012). Finalement, à l'issue de ces différentes études, la valeur seuil utilisable de 1 mg/L de chlore libre a été validée pour limiter la multiplication des *Naegleria* dans l'eau.

D'autres études ont été menées pour tester l'efficacité de différents traitements biocides sur *N. fowleri*. Le dioxyde de chlore (ClO₂) est plus actif que le chlore dans un milieu car il suffit de 0,25 mg/L pendant 30 min à pH 7 et à 25°C (Cursons *et al.* 1980). L'iode à raison de 5 à 7mg/L peut également inactiver efficacement les trophozoïtes et les kystes (Chang 1978), de même que l'ozone à une concentration de 0,4 mg/L (Langlais *et al.* 1986) ou l'acide péracétique de 3 à 8 mg/L (Kilvington 1990). En revanche, les ions Cu/Ag utilisés également comme désinfectant des piscines ou de l'eau de boisson, ne sont pas efficaces sur *N. fowleri* (Cassells *et al.* 1995), de même que les ultra-violets pour lesquels il faut une exposition importante de 126 J/m² pour inactiver les trophozoïtes et 630 J/m² pour les kystes (Sarkar 2008 ; Sarkar & Gerba 2012).

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

3.7.1. Physiopathologie

Comme nous l'avons vu précédemment, les amibes libres telles que *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris* et *Acanthamoeba* spp. sont responsables de méningo-encéphalites amibiennes (AME) (Callicott 1968). Si les *Acanthamoeba* spp. et *B. mandrillaris* sont généralement des pathogènes opportunistes, qui profitent de l'état immunodéprimé du patient, *N. fowleri* est un pathogène non opportuniste qui infecte généralement de jeunes adultes en pleine santé, immunocompétents ayant été récemment exposés au cours d'une activité aquatique dans des eaux douces chaudes. L'infection par cette amibe libre provoque une méningo-encéphalite amibienne primitive aiguë (MEAP) à progression rapide et dont les dommages cérébraux importants conduisent généralement au décès du patient en quelques jours (Marciano-Cabral 1988 ; Marshall *et al.* 1997 ; Trnková & Madarová 2008 ; Trabelsi 2012).

Les trophozoïtes pénètrent l'organisme par le nez, adhèrent à la muqueuse nasale et traversent la lame criblée de l'éthmoïde, plus poreuse chez les jeunes, en longeant les nerfs olfactifs pour atteindre l'espace subarachnoïden où circule le liquide céphalorachidien (LCR).

Les amibes traversent l'épithélium olfactif pour rejoindre le parenchyme cérébral et migrent vers le cerveau en établissant des contacts avec la matrice extracellulaire (Jarolim *et al.* 2000). Après l'inoculation, la période d'incubation est de 1 à 14 jours (Hannisch & Hallagan 1997).

Dès les premières 24h, les amibes sont présentes dans le plexus nerveux sous-muqueux, les nerfs olfactifs, le bulbe olfactif (Jarolim *et al.* 2000 ; Rojas-Hernández *et al.* 2004) et le lobe frontal où elles entraînent des dommages importants (Visvesvara 2010 ; Visvesvara 2013). Après 96h, les trophozoïtes se trouvent dans le tissu conjonctif qui entoure les vaisseaux sanguins et dans les sinusoides entre les plaques osseuses du crâne. Les autopsies ont révélé des hémisphères cérébraux gonflés et œdémateux. Les bulbes olfactifs et les cortex orbito-frontaux sont caractérisés par une nécrose hémorragique et sont entourés d'exsudats purulents contenant des leucocytes polynucléaires, quelques éosinophiles, des macrophages et de nombreux lymphocytes résultant d'une réponse inflammatoire aiguë devant ce parasite (Dos Santos 1970 ; Carter 1972 ; Martinez 1985 ; Martinez & Vivesvara 1997 ; Baig 2015). Un lien a été mis en évidence entre le nombre de *N. fowleri* inoculées et le risque d'infection à la MEAP (Cabanès *et al.* 2001). Bien qu'il ait été montré que chez la souris que 10^4 *N. fowleri* injectées par voie nasale pouvaient entraîner la mort des animaux en quelques jours (Kim *et al.* 2013), ces expérimentations ne permettent pas de conclure de façon précise sur la dose infectante chez l'homme.

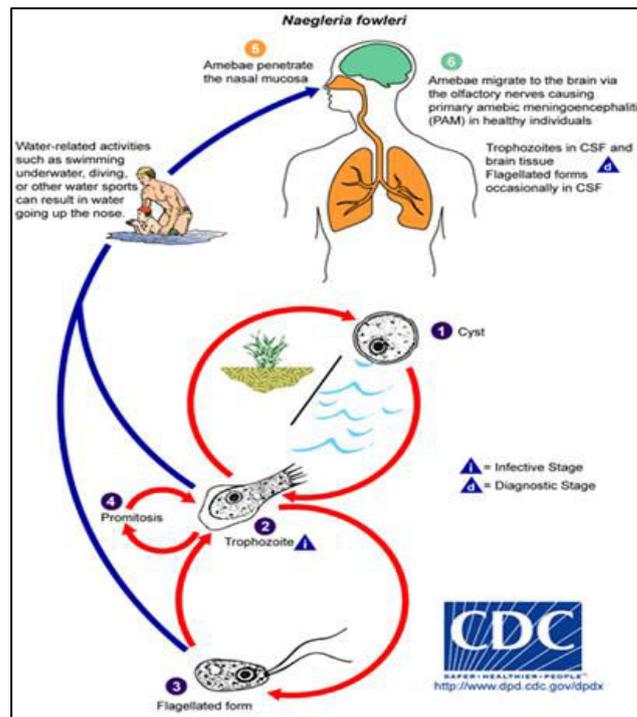


Figure 13. *Naegleria fowleri* : pathogénèse et cycle de vie. *N. fowleri* présente trois stades dans son cycle de vie: le kyste (1), le trophozoïte (2), et la forme flagellée (3). Le trophozoïte se reproduit par promitose dont l'enveloppe nucléaire reste intacte (4). Les trophozoïtes infectent les humains ou les animaux en pénétrant la muqueuse nasale (5) et migrent vers le cerveau (6) via les nerfs olfactifs en causant la méningo-encéphalite amibienne primaire (MEAP). (d'après le "Centers for Disease Control and Prevention" (CDC), <http://www.cdc.gov/parasites/Naegleria/>.)

Les premiers symptômes de la MEAP sont une apparition soudaine de maux de tête, une forte fièvre, une raideur de la nuque, des nausées, des vomissements, de l'irritabilité, une agitation motrice et des troubles du comportement. Plus tard, se manifestent une augmentation de la pression intracrânienne, une photophobie, des troubles du goût et de l'odorat, une léthargie, de la confusion, des convulsions jusqu'à aboutir au coma. Le décès survient au bout de 5 à 10 jours. Les signes cliniques de la MEAP peuvent être confondus avec ceux d'une méningite bactérienne. De plus l'évolution de la maladie étant extrêmement rapide, le diagnostic dans les temps demeure difficile.

3.7.2. Diagnostic

L'examen direct, au microscope à contraste de phase, du liquide céphalorachidien (LCR) conservé à température ambiante est le moyen de diagnostic pratiqué le plus souvent dans l'urgence. Les trophozoïtes et leurs pseudopodes peuvent être observés. Un test de flagellation peut aussi être appliqué, par incubation de LCR dilué dans de l'eau stérile à 37 °C pendant quelques heures pour provoquer la flagellation des amibes (Hannisch & Hallagan 1997). Ce test permet de confirmer la présence de *N. fowleri*. L'observation des amibes peut également être réalisée par les colorations de Giemsa ou de trichome. La culture de *N. fowleri* se fait en présence de bactéries. La sérologie n'est pas pratiquée car l'évolution de la maladie est tellement rapide, que l'organisme n'a pas le temps de développer les anticorps nécessaires pour se défendre (Ma *et al.* 1990). Les techniques de biologie moléculaire se développent de plus en plus telles que la PCR en temps réel qui permet un diagnostic plus rapide comme on le verra plus loin (Pélandakis & Pernin 2002 ; Visvesvara *et al.* 2007 ; Qvarnstrom *et al.* 2006 ; Behets 2006; Robinson 2006 ; Puzon 2009 ; Kao 2013 ; Mull 2013 ; Painter 2013 ; Kao 2014; Streby 2015).

3.7.3. Pathogénicité

Les connaissances sur les facteurs de virulence de *N. fowleri* sont encore limitées. Les trophozoïtes adhèrent aux cellules et les détruisent par phagocytose et par l'action cytolytique de nombreuses enzymes (John *et al.* 1984). Les glycoconjugués de la surface de *N. fowleri* sont impliqués dans son adhérence aux cellules épithéliales et dans leur destruction (Cervantes-Sandoval *et al.* 2008). Les enzymes participant au processus de phagocytose et de digestion intracellulaire chez *N. fowleri*, sont la lactate déshydrogénase, la pyruvate kinase, la catalase (Wong *et al.* 1977) et la phosphatase acide (De Jonckheere & Dierickx 1982). Un niveau élevé en hydrolases a également été détecté chez *N. fowleri* (Olomu *et al.* 1986), ainsi que des enzymes phospholipolytiques dégradant la sphingomyéline (Hysmith & Franson 1982). Les appendices en forme de ventouse (amoebostomes) que met en place *N. fowleri* grignotent les cellules grâce à l'activité des phospholipases A et B et des facteurs cytolytiques causant la destruction des membranes. D'ailleurs, il a été montré que *N. fowleri* produisait plus de phospholipases A et de lysophospholipases que les *Naegleria* spp. non pathogènes (Cursons *et al.* 1976 ; Hysmith & Franson 1982). La neuraminidase ou l'élastase facilitent la détérioration des tissus et la présence de certaines protéines déclenche l'apoptose des cellules de tissus sensibles (Marciano-Cabral 1988 ; Vivesvara 2004). D'autres protéines sont

associées à la cytotoxicité, l'actine (Sohn *et al.* 2010), les Naegleriapores A et B (Herbst *et al.* 2002 et 2004) ainsi que les protéases à cystéine de type cathepsine B qui peuvent dégrader les protéines liant le fer. Par ailleurs, les protéines de la matrice extracellulaire (collagène, fibronectine) et les immunoglobulines (IgA, IgG, IgM) de l'hôte sont impliquées dans les mécanismes invasifs et dans l'échappement du système immunitaire (Lee *et al.* 2014; Martínez-Castillo *et al.* 2014). Des molécules sécrétées par les amibes pourraient également provoquer la mort des cellules, sans qu'il y ait d'adhérence sur ces dernières (Song *et al.* 2011), suggérant que de nouveaux facteurs mal connus restent encore à identifier et à caractériser.

En effet, la présence d'une oxyde-nitrique synthase (NOS) spécifique a également été mise en évidence chez *N. fowleri* et la production d'oxyde nitrique (NO) qui résulte de son activité pourrait participer au mécanisme d'invasion, comme c'est le cas chez d'autres parasites tels *Entamoeba histolytica* ou *Plasmodium falciparum* (Rojas-Hernández *et al.* 2007).

3.7.4. Thérapies et prévention

La MEAP étant une infection aiguë fulminante, très peu de patients survivent. Un traitement à base d'Amphotéricine B par voie intraveineuse et intrathécale et de Rifampicine par voie orale (Seidel *et al.* 1982) a été administré à une jeune californienne qui a survécu à la maladie. Cependant, l'amphotéricine B étant soluble dans l'eau et présentant une toxicité rénale, d'autres traitements ont fait l'objet de recherche afin de trouver d'autres médicaments moins toxiques. Des études *in vitro* ont montré des effets inhibiteurs sur *Naegleria fowleri* des composants de la phénothiazine (Chlorpromazine et Trifluopérazine) (Schuster & Visvesvara 2004). L'Azithromycine, un macrolide antimicrobien s'est révélé être efficace contre *N. fowleri* aussi bien *in vitro* que *in vivo* (Goswick & Brenner 2003). Il a également été démontré *in vitro* que *N. fowleri* était sensible au Triazole composé de Voriconazole à des concentrations faibles ($\leq 10\mu\text{g/ml}$) alors qu'à des concentrations supérieures à $10\mu\text{g/ml}$, ce médicament est amibicide (Schuster *et al.* 2006). Le séquençage du génome entier de *N. fowleri* devrait sûrement permettre d'élucider les mécanismes impliqués dans la pathogénicité et de trouver de nouvelles molécules cibles. En attendant de pouvoir utiliser un traitement efficace, la prévention reste de rigueur et *N. fowleri* étant sensible au chlore, le mode de prévention préconisé le plus efficace pour éviter les contaminations, reste la désinfection au chlore des bains fréquentés.

3.7.5. Réactions immunitaires

La taille relativement petite des trophozoïtes de *N. fowleri* (2-20µm) par rapport à celle des macrophages et polynucléaires humains, pourrait être le facteur qui stimule leur phagocytose par ces leucocytes, en déclenchant une réaction inflammatoire aiguë, similaire à celle que l'on observe lors d'une méningo-encéphalite bactérienne (Baig 2015). Cette réponse du système immunitaire contre *N. fowleri* est caractérisée par un développement important des macrophages de la région olfactive et par un recrutement en masse de neutrophiles circulants, conduisant à une forte production d'interleukine-1 (IL-1), de facteur de nécrose tumoral (TNF-β) et des cytokines inflammatoires telles que la prostacycline (PGI₂), ou l'histamine, responsable de la vasodilatation et de l'augmentation de la perméabilité vasculaire (Kumar *et al.* 2010). Après la rupture de la barrière hémato-encéphalique, l'infiltration du tissu cérébral par les phagocytes du système immunitaire de l'hôte et la libération de cytokines inflammatoires, de protéases et de collagénases, en plus de la cytotoxicité des trophozoïtes, seraient en partie responsables des lésions du tissu cérébral que l'on observe à l'autopsie après une infection par *N. fowleri* (Marciano-Cabral & Cabral 2003 ; Baig 2015).

Cependant, des cas de portage sain (Ugonabo *et al.* 1989), de même que la présence chez l'homme d'anticorps dirigés contre des protéines de *N. fowleri* (Rivera *et al.* 2001) ont été décrits dans la littérature, suggérant que l'infection peut être jugulée naturellement par l'organisme ou exister de façon asymptomatique (Cerva *et al.* 1989 ; Dubray *et al.* 1987 ; Marciano-Cabral *et al.* 2007 ; Cursons *et al.* 1980). En effet, des travaux ont montré que les cellules astrogliales et microgliales du cerveau peuvent aussi réagir à *N. fowleri* en libérant elles-mêmes des cytokines pro-inflammatoires (Kim 2012 ; Oh *et al.* 2005). D'autres études ont mis en évidence l'agglutination des amibes par le sérum humain ou leur destruction par les neutrophiles et les protéines du complément (Reilly *et al.* 1983 a ; b). Enfin, l'interaction d'IgA sécrétoires humaines avec les trophozoïtes inhibe leur adhérence au collagène de type I (Shibayama 2003). Toutefois, ces différents moyens de défense de l'organisme contre l'amibe restent limités en raison de la progression rapide de la maladie.

De plus, *N. fowleri* a mis en œuvre des stratégies adaptatives pour échapper au système immunitaire (Marciano-Cabral 2007). En effet, l'étude précédente de Shibayama a montré, par exemple, que les trophozoïtes étaient capables d'éliminer les complexes antigène-IgA fixés à leur surface (Shibayama *et al.* 2003). Il a été montré également comme nous l'avons mentionné plus haut une activité lytique des cathepsines B de *N. fowleri* sur les anticorps circulants (Lee *et al.* 2014). De plus, une glycoprotéine inhibitrice du complexe d'attaque (MAC) C5b-C9 du complément, a été mise en évidence sur la membrane de *N.*

fowleri et pourrait lui permettre de résister à l'action lytique de ces protéases (Fritzinger *et al.* 2006).

Par ailleurs, plusieurs tentatives d'immunisation contre *N. fowleri* ont été réalisées chez la souris par administration intra-nasale de lysats amibiens additionnés de différents adjuvants bactériens. Ces travaux qui ont obtenu des résultats encourageants avec une protection de 100%, selon les protocoles utilisés, montrent que les systèmes inné et adaptatif sont impliqués dans la réponse. L'immunisation entraîne une augmentation de la libération des cytokines inflammatoires IL-4, IL-6, IL-10 et de l'IFN-gamma et stimule la voie des lymphocytes TH2 en induisant la réponse humorale avec production d'anticorps circulants (Saul Rojas-Hernández *et al.* 2004 ; Jarillo-Luna *et al.* 2008 ; Carrasco-Yepez *et al.* 2010 ; 2014).

Enfin, l'utilisation d'anticorps dirigés contre la protéine NFA-1 de *N. fowleri*, ou le blocage de l'expression de son gène, réduisent très significativement la cytotoxicité des trophozoïtes sur des cellules de mammifère *in vitro*. NFA-1 est une petite protéine de 13,1 kDa, localisée dans les pseudopodes et les *food cups* et impliquée dans les mécanismes d'adhérence cellulaire (Shin *et al.* 2001 ; Cho *et al.* 2003 ; Lee *et al.* 2007 ; 2011 ; 2015) ; Jung *et al.* 2008 ; 2009). Ces travaux, poursuivis par l'immunisation de souris avec la protéine NFA-1, ont permis d'obtenir une très bonne protection avec une réponse TH1 et TH2 et production d'anticorps (Kim 2013). La protéine NFA-1 apparaît aujourd'hui comme un candidat vaccinal très prometteur contre l'infection par *N. fowleri*.

3.7.6. Epidémiologie

Les épidémies attribuées à *Naegleria* ont été principalement associées à la baignade dans les eaux douces, superficielles, non traitées dont les températures avoisinent 30°C. Il s'agit principalement des rivières, étangs, canaux et lacs en été, de même que les bassins de loisirs, les piscines et les sources géothermales, ainsi que les eaux réchauffées artificiellement par des rejets industriels. Les sujets les plus couramment infectés sont des enfants et des jeunes adultes de sexe masculin, pratiquant des activités aquatiques dynamiques avec plongeon. Ils représentent 75 % des personnes infectées et leur âge tourne autour de 12 ans. Même si cette pathologie est rare, il s'agit d'un réel problème de santé publique, en particulier pour les jeunes.

Les premiers cas de MEAP dus à *N. fowleri* ont été mis en évidence chez l'homme, au sud de l'Australie (Fowler & Carter 1965). Peu de temps après cette première description, des cas semblables ont été identifiés un peu partout dans le monde et aujourd'hui la MEAP a été

enregistrée sur tous les continents avec plus de 300 cas recensés depuis 50 ans, comme on peut le voir sur la carte et le tableau ci-dessous (Tableau 6 et Fig. 14). Généralement les cas de MEAP sont enregistrés dans les pays tempérés et tropicaux du fait des températures plus élevées dans ces zones. Cependant il semble que le réchauffement climatique offre des conditions de plus en plus favorables au développement de *N. fowleri* dans l'hémisphère Nord, avec près de huit cas décrits chaque année en moyenne aux USA (Yoder *et al.* 2010).

Par ailleurs, plusieurs cas de MEAP ont été décrits en Afrique (Lawande *et al.* 1980), au Pakistan (Shakoor 2011) ou en Louisiane (Yoder *et al.* 2012) sur des adultes de tous âges qui n'avaient pas pratiqué d'activité nautique, mais à la suite d'ablutions rituelles et d'irrigations nasales effectuées avec de l'eau de distribution insuffisamment traitée et contaminée par *N. fowleri*. Ce nouveau mode d'exposition à l'amibe pathogène doit être très sérieusement pris en compte dans les pays concernés. Il est intéressant de remarquer que plusieurs cas de transplantation d'organes ont été réalisés aux USA à partir de sujets décédés de MEAP sans complications infectieuses post-transplantatoires ce qui confirme que le passage par la muqueuse nasale est la principale porte d'entrée de l'amibe pathogène (Bennett *et al.* 2008 ; Kramer *et al.* 1997 ; De Jonckheere 2011).

Tableau 6. Epidémiologie de la MEAP dans le monde et références bibliographiques (adapté du rapport ANSES 2013, le nombre de cas d'après De Jonckheere 2011)

Pays	Cas	Références
Angleterre	1	Apley <i>et al.</i> 1970 ; Cain <i>et al.</i> 1981
Australie	19	Carter 1970 ; 1972 ; Anderson & Jamieson 1972 ; Dorsch <i>et al.</i> 1983 ; Norton <i>et al.</i> 2010
Belgique	4	Hecht <i>et al.</i> 1972 ; Hermanne 1973 ; Van den Driessche <i>et al.</i> 1973 ; Vandepitte 1974
Brésil	5	Salazar <i>et al.</i> 1986
Cuba	1	Cubero-Menendez & Cubero-Rego 2004
Etats-Unis	111	Butt 1966 ; Callicott 1968 ; Wagner <i>et al.</i> 1969 ; Dumas 1970, 1971 ; Mac Croan & Patterson 1970 ; Hetcht 1971 ; McCool <i>et al.</i> 1983 ; Brown 1991 ; Fiodalisi 1992 ; Barnett <i>et al.</i> 1996 ; De Napoli 1996 ; Grate 2006 ; Blair <i>et al.</i> 2008 ; Tuppeny 2011 ; Lopez <i>et al.</i> 2012 ; Kemble <i>et al.</i> 2012
Guadeloupe	1	Nicolas 2010
Hong Kong	1	Wang <i>et al.</i> 1993
Inde	11	Pan & Ghosh 1971 ; Bedi <i>et al.</i> 1972 ; Malhotra <i>et al.</i> 1978 ; Shenoy <i>et al.</i> 2002 ; Hebbar <i>et al.</i> 2005 ; Kaushal <i>et al.</i> 2008 ; Rai <i>et al.</i> 2008 ; Gupta <i>et al.</i> 2009 ; Jain & Tilak 2011 ; Gautam <i>et al.</i> 2012
Italie	1	Cogo <i>et al.</i> 2004
Japon	2	Sugita <i>et al.</i> 1999 ; Hara & Fukuma 2005
Madagascar	1	Jaffar-Bandjee <i>et al.</i> 2005
Mexique	9	Valenzuela <i>et al.</i> 1984 ; López-Corella <i>et al.</i> 1989 ; Lares-Villa <i>et al.</i> 1993 ; Vargas-Zepeda <i>et al.</i> 2005
Namibie	1	Schoeman <i>et al.</i> 1993
Nigeria	4	Lawande <i>et al.</i> 1979 ; 1980
Nouvelle Zélande	9	Nicoll 1973 ; Cursons <i>et al.</i> 1979 ; 2003
Pakistan	17	Jamil <i>et al.</i> 2008 ; Saleem <i>et al.</i> 2009 ; Shakoore <i>et al.</i> 2011
République Tchèque	16	Cerva & Novak 1968 ; Cerva <i>et al.</i> 1969
Thaïlande	12	Somboonyosdej & Pinkaew 1987 ; Charoenlarp <i>et al.</i> 1988 ; Sirinavin <i>et al.</i> 1989 ; Pongvarin & Jariya 1991 ; Chotmongkol <i>et al.</i> 1993 ; Wattanaweeradej <i>et al.</i> 1996 ; Viriyavejakul <i>et al.</i> 1997 ; Wiwanitkit 2004
Venezuela	7	Brass 1972 ; Cermeño <i>et al.</i> 2006 ; Petit <i>et al.</i> 2006 ; Caruzo & Cardozo 2008

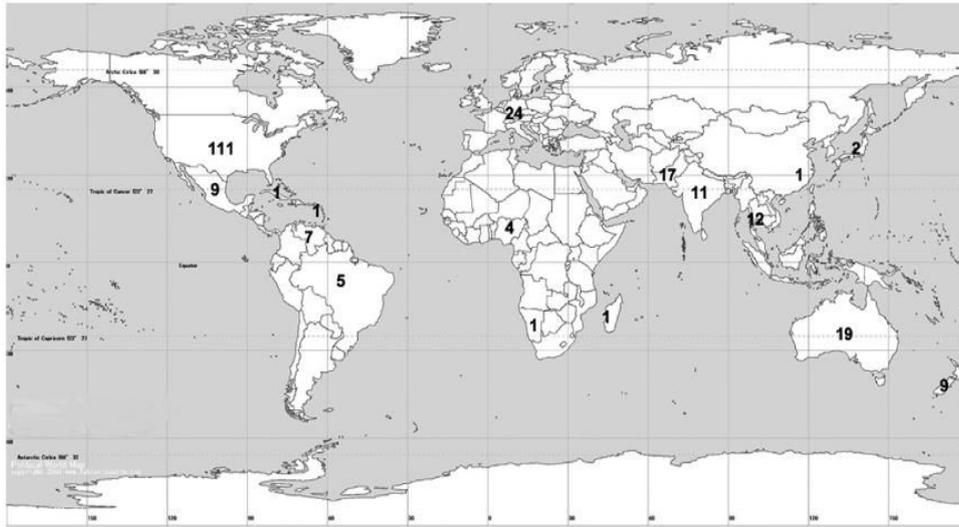


Figure 14. Distribution des cas de MEAP survenus dans le monde depuis 1968 jusqu'en 2010 (235 cas) d'après De Jonckheere 2011

3.7.7. Caractérisation et distribution géographique des différents types de *Naegleria fowleri*

Au départ, l'espèce *N. fowleri* était identifiée par les tests de pathogénicité chez la souris (Carter 1970 ; De Jonckheere 1977 ; Sykora *et al.* 1983) et séparée des autres amibes par une température de culture plus élevée (44°C). L'utilisation d'anticorps et de techniques isoenzymatiques permettait de confirmer l'identification de l'espèce pathogène (voir plus loin). Toutefois, le développement de la biologie moléculaire a permis d'aller plus loin et de découvrir l'existence de différents types dans l'espèce *N. fowleri* (De Jonckheere 2002 ; 2011).

Dans un premier temps, la méthode RFLP (De Jonckheere 1987 ; De Jonckheere 1988) et le caryotypage par électrophorèse en champ pulsé (De Jonckheere 1989) ont permis de différencier les souches de *N. fowleri* provenant d'Europe de celles des USA, d'Australie et de Nouvelle Zélande (De Jonckheere 1988) et de voir leurs migrations (Pernin & De Jonckheere 1992).

Cependant, c'est le séquençage de l'ADN ribosomique et en particulier la région incluant les espaces transcrits internes (ITS) de part et d'autre de l'ADNr 5,8S (région : ITS1-5,8S - ITS2) qui a permis d'obtenir un génotypage précis des amibes du genre *Naegleria* et des autres membres de la famille Vahlkampfiidae (De Jonckheere 1989 ; De Jonckheere 1994a ; De Jonckheere & Brown 2005). En effet, l'amplification de la région ITS par PCR, en

utilisant différents couples d'amorces spécifiques, a permis de mettre en évidence un polymorphisme important de l'ITS1 qui varie en longueur de 42 à 142 paires de bases selon les souches, alors que la longueur de l'ITS2 est constante (106 pb). Ces variations de longueur, dues à une répétition (ou non selon les souches), de motifs M1, M2 et R1, R2 dans la séquence de l'ITS1, ainsi que le changement de base (C/T) en position 31 de la séquence de l'ADNr 5,8S, ont permis de distinguer 8 types dans l'espèce *N. fowleri* (Tableau 7) et d'analyser leur répartition dans les différentes régions du monde (Tableau 8).

Par ailleurs, il a été montré que la séquence du gène de l'ARNr mitochondrial 16S, de la petite sous-unité des ribosomes (mtSSU-rDNA), pouvait également être utilisée pour caractériser la diversité génétique de *N. fowleri* comme cela été montré pour les souches des USA (Zhou *et al.* 2003).

Tableau 7. Nombre de répétitions dans l'ITS des 8 types de *N. fowleri* et de *N. lovaniensis* (De Jonckheere 2011).

<i>N. fowleri</i> type	R2	R1	M2	M1	Total bp	5.8S ^a
1	0	0		1	42	C
2	0	0	1	1	42	T
3	1	1	1	1	86	T
4	1	1	1	1	86	C
5	1	1 ^b	1	1	84	C
6	2	1	1	1	114	T
7	3	1	1	1	142	T
8	2	2	1	1	130	T
<i>N. lovaniensis</i>	0	0	1	1 ^c	41	C

M1 and M2: main sequences.
R1 and R2: repeat sequences.
R2: ATGGTAAAAAAGGTGAAAACCTTTTTT (28 bp).
R1: ATGGTAAAAAAGGTGT (16 bp).
M2: ATGGTAAAAAAGGTGAAAACCTTTTTT (27 bp).
M1: CCATTTACAAAAAAT (15 bp).
^a Nt at position 31 in the 5.8S rDNA.
^b 2 bp deletion.
^c 1 bp deletion and 4 transitions.

Tableau 8. Distribution des génotypes de *N. fowleri* (De Jonckheere 2011)

Location	Genotype	ITS1	5.8S	ITS2	Strain	EBI	Reference
USA & Mexico	1	42	C	106	7853	AY376149	3
	2	42	T	106	AR12	X96564	1
	3	86	T	106	LEE	X96562	1
Europe	2	42	T	106	G1-3-e3a	AJ132019	2
	5	84	C	106	Na 420c	AJ132028	2
	4	86	C	106	Ch2-1-f2	AJ132030	2
	3	86	T	106	KUL	X96561	1
	6	114	T	106	J2B2	FR875287	5
	8	130	T	106	C0504	FR875288	5
	7	142	T	106	M4E	X96563	1
Oceania & Japan	5	84	C	106	Norhtcott	X96565	1
Asia (mainland)	2	42	T	106	NG894	AJ132018	2
	3	86	T	106	Siriraj	NA	4

N. fowleri a été détectée sur tous les continents sauf en Antarctique et l'analyse fine des séquences de la région ITS a permis de retracer l'évolution et la migration des différentes souches de *N. fowleri* dans le monde (Fig. 15) (De Jonckheere 2011). Le type 1 a été spécifiquement isolé aux USA et à Mexico, les types 2 et 3 sont très dispersés, on les a retrouvés aux USA, en Europe et en Asie, alors que les type 4, 6, 7 et 8 n'ont été retrouvés qu'en Europe. Par ailleurs, le type 5 existe à la fois en Europe, en Océanie et au Japon (De Jonckheere 2011). Les types de *N. fowleri* rencontrés en Afrique et en Amérique du Sud ne sont pas encore identifiés.

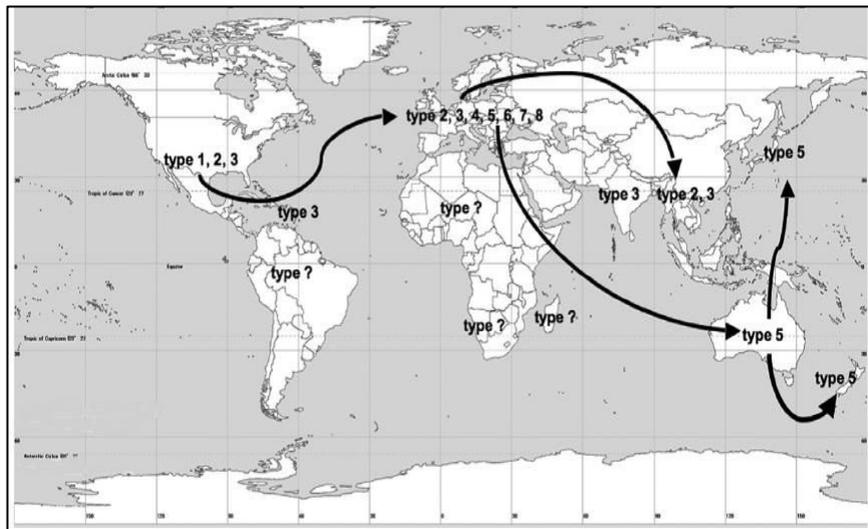


Figure 15. Distribution des types de *N. fowleri* et les voies possibles de dispersion d'après De Jonckheere 2011.

4. Méthodes de détection

4.1. Méthodes de prélèvements

Différentes méthodes de prélèvement de l'eau, de biofilms ou de sédiments ont été décrites dans la littérature. Les échantillons d'eau sont généralement prélevés en surface (Huizinga & McLaughlin 1990a), en profondeur ou à moins d'un mètre de la surface (Jamerson *et al.* 2009) dans des bouteilles stériles en verre (De Jonckheere 1977) ou en polypropylène (Kyle & Noblet 1985). La température et le pH sont mesurés au moment du prélèvement (De Jonckheere 1977). Les sédiments sont collectés à l'aide de bennes spéciales (Huizinga & McLaughlin 1990) ou dans des tubes stériles et les biofilms sont récoltés sur des écouvillons par grattage des surfaces et des parois (John et Howard 1995; Eddyani *et al.* 2008). Les prélèvements sont transportés à température ambiante ou sur glace et la mise en culture

doit être assez rapide après le prélèvement (Behets *et al.* 2003 ; Pougard *et al.* 2002). Il est conseillé de traiter l'échantillon le jour même (De Jonckheere 1977) ou en respectant un délai de 2 à 4h entre le prélèvement et la mise en culture (Behets *et al.* 2007). Du fait de la compétition entre *N. fowleri* et *N. lovaniensis* pouvant empêcher une détection optimale de *N. fowleri*, un traitement de l'échantillon immédiat après le prélèvement est préconisé (Kilvington & White 1986). Avant mise en culture les échantillons d'eau sont filtrés ou centrifugés.

4.2. Mise en culture

Contrairement aux espèces non pathogènes comme *N. gruberi* qui ont besoin d'un milieu de culture enrichi pour se développer convenablement (peptone, extrait de levure, extrait concentré de foie, sérum de veau supplémenté de divers éléments, les espèces pathogènes et en particulier *N. fowleri* nécessitent peu de ressources nutritives. Elles peuvent être maintenues en culture monoxénique, en utilisant une souche bactérienne comme sources de nourriture (Page 1988), ou se développer dans un milieu nutritif axénique (sans autre type cellulaire), dépourvu de bactéries par la présence d'antibiotiques (De Jonckheere 1977; Schuster 2002).

N. fowleri peut aussi être cultivée à 44°C sur un milieu solide, constitué d'une gélose d'agar non nutritive (NNA), ou faiblement (0,05% de peptone, extrait de levure 0,05%, glucose 0,1%) sur laquelle on dépose, avant de mettre les amibes, un tapis de bactéries non mucoïdes, vivantes ou tuées, surtout des *Entérobactéries* (Schuster 2002). On peut également cultiver *N. fowleri* dans un milieu liquide spécifique de type SCGYEM (*calf serum-casein-glucose-yeast extract medium*) à base de sérum de veau fœtal, additionné de caséine, glucose, extrait de levure dans lequel on rajoute les antibiotiques pénicilline et streptomycine (De Jonckheere 1977) supplémenté, ou non, de sang de mouton et d'extrait de foie (Chang 1971).

Le dénombrement des amibes en culture est réalisé soit en comptant directement et individuellement les clones qui ont poussé dans la boîte, soit en faisant une estimation de leur nombre le plus probable (NPP). Celui-ci est obtenu, selon la loi de Poisson, par la méthode dérivée des travaux de McGrady (Postgate 1969) et de tables statistiques qui donnent le nombre d'amibes distribuées de façon aléatoire dans un échantillon (Champsaur 1996). Pour appliquer cette méthode, on teste plusieurs répétitions de l'échantillon d'eau filtrée ou centrifugée (10 x 10 ml et 10 x 100 ml) et, après culture, le nombre de boîtes positives (qui

possèdent un front amibien) est reporté sur des tables NPP, établies à partir des règles de probabilités (Annexe II) indiquant le nombre d'amibes par litre d'eau de l'échantillon initial.

4.3. Test de flagellation

Le test de flagellation est une méthode simple et efficace à mettre en œuvre pour savoir si les trophozoïtes qui se développent en culture appartiennent, ou non, au genre *Naegleria*. Il suffit de laver la surface de la gélose avec du tampon Tris (100µl à 20ml) pour récupérer les amibes et les faire incuber dans le tampon entre 1h et 24h à +30°C (De Jonckheere *et al.* 2001) ou de prélever un morceau de gélose au niveau d'un front amibien et le mettre à incuber dans 0,5 ml d'eau distillée à 37°C pendant 2 à 4h (Behets *et al.* 2003 ; Reveiller *et al.* 2003 ; Pougard *et al.* 2002 ; Sykora *et al.* 1983 ; Cable *et al.* 1986).

L'observation d'un mouvement hélicoïdal des amibes permet de révéler la présence de flagelles, indicateur de l'appartenance au genre *Naegleria*. Toutes les *N. fowleri* isolées de l'environnement se sont révélées positives au test de flagellation (Behets *et al.* 2007), cependant, des souches de *Naegleria* spp. ont été identifiées comme non flagellées (Behets *et al.* 2003 ; De Jonckheere *et al.* 2001).

4.4. Test de pathogénicité

Des tests ont longtemps été réalisés sur la souris pour vérifier la pathogénicité des souches et caractériser les espèces prélevées dans l'environnement. L'inoculation est effectuée par voie nasale (Carter 1970 ; De Jonckheere 1977). Toutefois, cette méthode n'est pas toujours fiable et présente des limites car certaines espèces du genre *Naegleria* sont pathogènes uniquement chez la souris et non chez l'homme (*N. australiensis*, *N. italica*).

4.5. Méthodes biochimiques

Plusieurs méthodes biochimiques basées sur la séparation électrophorétique et la caractérisation d'un certain nombre d'isoenzymes ont été développées pour distinguer les différentes espèces du genre *Naegleria*. Les extraits protéiques sont généralement obtenus par un détergent doux (0.25% Triton X-100) à partir d'un culot amibien de centrifugation et les protéines sont analysées par électrophorèse sur agarose (De Jonckheere 1982a) ou acétate de cellulose (Robinson *et al.* 1992 ; Kilvington 1995) avant de révéler les activités enzymatiques. Toutefois, cette approche ne permet pas de discriminer les souches et les types d'une même espèce qui présentent des profils enzymatiques identiques (Nerad & Daggett 1979). Les

espèces *N. fowleri* et *N. gruberi* peuvent être différenciées grâce au polymorphisme enzymatique des estérases (Visvesvara & Healy 1980). La distinction entre *N. fowleri* et les autres *Naegleria* spp. a été réalisée par l'étude des profils enzymatiques de l'aspartate aminotransférase (Kilvington *et al.* 1984) et de la glucose-6-phosphate isomérase (Kilvington 1995). La focalisation isoélectrique (*Isoelectric focusing*, IEF) par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, de différentes enzymes (lactate déshydrogénase, L-thréonine déshydrogénase, superoxyde dismutase, phosphatase acide, enzyme malique, leucine aminopeptidase) s'est révélée également très efficace pour distinguer *N. fowleri*, *N. australiensis* et l'espèce non pathogène *N. lovaniensis* (Pernin 1984 ; Pernin *et al.* 1985).

4.6. Méthodes immunologiques

Un test ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) a pu également être utilisé pour détecter l'amibe pathogène dans l'environnement (Reveiller *et al.* 2003). Il a été développé à partir d'un anticorps monoclonal spécifiquement dirigé contre des protéines membranaires de *N. fowleri* (Sparagano *et al.* 1993 ; Réveiller *et al.* 2000). Il permet de détecter avec une grande sensibilité (97,4%) la présence des trois formes de l'amibe pathogène (trophozoïtes, flagellés et kystes) dans les échantillons d'eau de l'environnement, après mise en culture sur une gélose non nutritive recouverte d'*E. coli* incubée à 44°C pendant 3 à 5 jours. La spécificité de ce test ELISA est très importante également (98%) car il ne détecte pas les autres amibes libres, telles que *Hartmannella*, *Acanthamoeba* ou les autres espèces thermophiles non pathogènes de *Naegleria*.

A la même époque, les mêmes auteurs ont également utilisé cet anticorps monoclonal, couplé à des fluorochromes, pour détecter et compter les amibes par cytométrie en phase solide, couplée à un microscope à épifluorescence. Cette méthode ne passe pas par la mise en culture et offre un comptage direct et spécifique des *N. fowleri* quelques heures seulement après la filtration de l'échantillon d'eau, en revanche, la faible capacité de filtration du système ne permet pas de traiter les eaux de l'environnement faiblement concentrées en amibes (Pougnard *et al.* 2002).

4.7. Méthodes moléculaires

4.7.1. PCR

Après plusieurs essais d'amplification par PCR (*polymerase chain reaction*) de différents ADN cibles (McLaughlin *et al.* 1991 ; Sparagano *et al.* 1993 ; 1994 ; Kilvington &

Beeching 1995) , *N. fowleri* a pu être différenciée de l'espèce non pathogène *N. lovaniensis* par ribotypage (*riboprinting*) des gènes d'ARNr (De Jonckheere 1994c), celui de la petite sous-unité (18S-SSU) et celui de la grande sous-unité (28S-LSU). Toutefois, les empreintes RFLP de ces ADNr amplifiés par PCR ne présentent pas suffisamment de variations de séquences pour discriminer les différentes espèces du genre *Naegleria*.

Comme nous l'avons vu précédemment, l'avancée majeure dans le génotypage des *Naegleria* spp. a été obtenue en choisissant la région ITS complète, beaucoup plus polymorphe, incluant le 5,8S, pour dessiner des amorces de PCR susceptibles de distinguer les différentes amibes libres thermophiles (Tableau 9) (De Jonckheere 1994a ; De Jonckheere & Brown 2005). Le couple de primers JITS permet d'identifier d'une façon assez large toutes les amibes de la famille Vahlkampfiidae même celles qui ne sont pas du genre *Naegleria*, tandis que le couple d'amorces ITS amplifie un fragment spécifique des *Naegleria* spp. Enfin, le couple de primers NFITS a pu être dessiné pour distinguer l'amibe pathogène *N. fowleri* des autres espèces, en positionnant l'amorce-sens à l'extrémité 3' de l'ITS1 qui est une région tout à fait spécifique de *N. fowleri*. L'identification précise de l'espèce ou du type peut ensuite être obtenue par séquençage des produits de PCR amplifiés (Tableau 9).

Tableau 9. Séquences des primers utilisés en PCR pour distinguer les différentes espèces (d'après De Jonckheere 2011).

Primer name	Sequence	Identification of
NFITSFW NFITSRV	TGAAAACCTTTTTCCATTACA AATAAAAGATTGACCATTGAAA	<i>N. fowleri</i>
ITSFW ITSRV	AACCTGCGTAGGGATCATT TTCCTCCCCTTATTAATAT	<i>Naegleria</i> spp.
JITSFW JITSRV	GTCTTCGTAGGTGAACCTGC CCGCTTACTGATATGCTTAA	Vahlkampfiidae

4.7.2. PCR quantitative

La PCR quantitative (qPCR), ou PCR en temps réel, est une méthode sensible et fiable qui permet une détection rapide des amibes libres thermophiles et une estimation de leur quantité, sans passer par la mise en culture sélective à 44°C. La qPCR utilise le principe d'amplification de la PCR classique, qualitative, tout en utilisant des molécules fluorescentes qui permettent en plus d'obtenir des résultats quantitatifs, en mesurant l'amplification de l'ADN ciblé tout au long de la réaction.

La présence d'amibes libres, et en particulier de *N. fowleri*, a été recherchée par différentes équipes en utilisant la qPCR à partir de souches cultivées ou d'échantillons issus de l'environnement, de réservoirs d'eau potable ou provenant de la clinique (références Tableau 10). Les primers ont été choisis dans la région ITS ou dessinés à partir de l'ADNr de la petite sous-unité ribosomique 18S et les qPCR obtenues en utilisant plusieurs molécules fluorescentes (Tableau 10). Dans ces différentes études, les courbes de température de fusion obtenues pour chaque espèce d'amibe offrent une très bonne spécificité et une sensibilité de détection atteignant 0,01 cellule, selon l'étude et selon l'espèce considérée, montrant que cette technique est très intéressante bien que la présence d'inhibiteurs dans les eaux issues de l'environnement, reste un facteur limitant de la réaction de qPCR (Hill *et al.* 2010 ; Mull *et al.* 2013).

Le dénombrement des amibes présentes dans l'échantillon initial est facilement obtenu par la technique de qPCR car le nombre de cycles nécessaires pour que la fluorescence dépasse le bruit de fond que l'on appelle le nombre de cycles seuil (Ct), est inversement corrélé au nombre de molécules cibles à l'origine. Ainsi, il existe une relation linéaire entre la quantité de molécules cibles à l'origine et le Ct obtenu pour cet échantillon. Cette relation qui constitue la base de la quantification permet de tracer une droite qui exprime le nombre de Ct en fonction du Log de la concentration en ADN présent dans des échantillons standards et dans les échantillons à tester.

Tableau 10. Recherches de *N. fowleri* par la méthode de qPCR

	Behets 2006	Robinson 2006	Qvarnstrom 2006	Puzon 2009	Kao 2013	Mull 2013	Painter 2013	Kao 2014	Streby 2015
Echantillons									
Souches cultivées	X	X	X	X		X			X
Echantillons cliniques			X						
Réseau potable (eau et biofilms)				X				X	
Environnement, rivières, bains chauds					X	X	X		
Primers									
ITS De Jonckheere, 1998		X							X
ITS Pélandakis, 2000, 2002	X			X					X
ITS Sheehan, 2003								X	
ARNr 18S			X		X	X			X
Agent fluorescent									
SYBR Green	X				X				
SYTO9		X		X					X
HEX - TaqMan			X					X	

4.7.3. Amplification de l'ADN par la technique LAMP

L'amplification d'ADN par la technique LAMP (*Loop-mediated isothermal amplification*) (Notomi 2000) est une méthode réalisée en conditions isothermes qui permet d'amplifier rapidement (90 min) et spécifiquement une séquence d'ADN cible avec une grande sensibilité. Il s'agit d'une PCR alternative utilisant le bleu d'hydroxynaphtol, permettant une détection directe des produits d'amplification LAMP qui ont été générés. Des amorces spéciales, internes, externes et "loop" sont utilisées afin de réaliser une forme d'amplification cyclique grâce à une ADN polymérase Bst. C'est une technique très peu coûteuse par rapport à la PCR classique et tout aussi efficace. Elle était déjà appliquée pour

d'autres microorganismes, mais ce n'est que récemment qu'elle a été développée pour la détection de *N. fowleri* à partir d'échantillons d'eau de l'environnement (Mahittikorn *et al.* 2015).

4.7.4. Spectrométrie de masse : technique MALDI-TOF-MS

Ces dix dernières années, les méthodes basées sur la spectrométrie de masse ont connu un essor considérable pour la caractérisation de différents microorganismes notamment les bactéries, les virus et les champignons (Moura *et al.* 2003 ; 2008 ; Pierce *et al.* 2007) mais elles sont très peu utilisées pour la caractérisation des amibes (Vivesvara *et al.* 2007). Le MALDI-TOF-MS (*Matrix-Associated Laser Desorption Ionisation/Time Of Flight-Mass Spectrometer*) est une technique d'ionisation utilisée en spectrométrie de masse qui permet l'analyse des protéines ou autres molécules d'un échantillon. Des spectres protéiques sont générés par le MALDI-TOF-MS, permettant de fournir une signature protéique (biomarqueurs) caractéristique de chaque espèce (Amiri-Eliasi & Fenselau 2001 ; Croxatto *et al.* 2012 ; Glassmeyer *et al.* 2007 ; Moura *et al.* 2003 ; Villegas *et al.* 2006 ; Wunschel *et al.* 2005). C'est une méthode considérée comme révolutionnaire par les microbiologistes car elle permet une identification rapide et efficace des microorganismes. Récemment, le MALDI-TOF a été développé à partir de différentes espèces de *Naegleria* spp. et à partir de trois génotypes différents de *N. fowleri*, issus de liquide céphalorachidien de patients, de biopsie cérébrales et d'échantillons d'eau de l'environnement (Moura *et al.* 2015). Cette étude a permis dans un premier temps la caractérisation de biomarqueurs communs à l'ensemble des *Naegleria*. De plus, son analyse spectrale reposant sur une observation statistique des masses (pics) aidée par des algorithmes de distances, a permis la discrimination entre les espèces du genre *Naegleria* et les sous-types I à III de *Naegleria fowleri*.

5. *N. fowleri* en Guadeloupe

Il existe de nombreuses sources chaudes naturelles sur à peu près tous les continents qui offrent un environnement idéal au développement des amibes thermophiles pathogènes. Comme nous l'avons vu dans le paragraphe concernant l'écologie de *N. fowleri*, ce parasite a effectivement été détecté dans des sources géothermales en Californie (Hecht *et al.* 1972), en Australie (Jamieson 1973), en Nouvelle -Zélande (Cursons 1978), en Islande (Brown 1983), en Chine (Wang *et al.* 1993) et plus récemment dans les parc nationaux du Yellowstone et du Grand Teton aux USA (Sheehan *et al.* 2003), ainsi qu'en Guadeloupe (Nicolas *et al.* 2010), comme nous allons l'aborder maintenant.

5.1. La géothermie en Guadeloupe

La Guadeloupe est un archipel situé au milieu de l'Arc des Petites Antilles, entre la mer des Caraïbes et l'Océan Atlantique. Elle est composée de deux îles principales, la Grande-Terre qui est un plateau calcaire aride et la Basse-Terre qui est au contraire un massif montagneux au climat humide, recouvert d'une forêt tropicale où abondent de nombreuses rivières et où culmine un volcan encore en activité, la Soufrière (Fig. 16). L'émergence de l'arc Antillais résulte du plongement par subduction de la plaque Amérique sous la plaque Caraïbe (Fig. 17) et s'accompagne de séismes réguliers provoquant une fracturation intense des sols avec l'apparition de failles qui en augmentent la porosité permettant ainsi l'infiltration des eaux de mer et pluviales (Fig. 18). Ainsi, les eaux de ruissellement se réchauffent en profondeur à proximité des chambres magmatiques puis remontent à la surface pour former des résurgences géothermales de températures allant généralement de 30 à 75°C à différents endroits de la Basse-Terre. Jusqu'à présent, 35 sources chaudes ont été recensées par le BRGM en Guadeloupe (Bézègues-Courtade & Bes-De-Berc 2007), principalement concentrées autour du dôme de la Soufrière et de la commune de Bouillante où a d'ailleurs été installée une centrale géothermique.



Figure 16. Volcan de la Soufrière en Guadeloupe

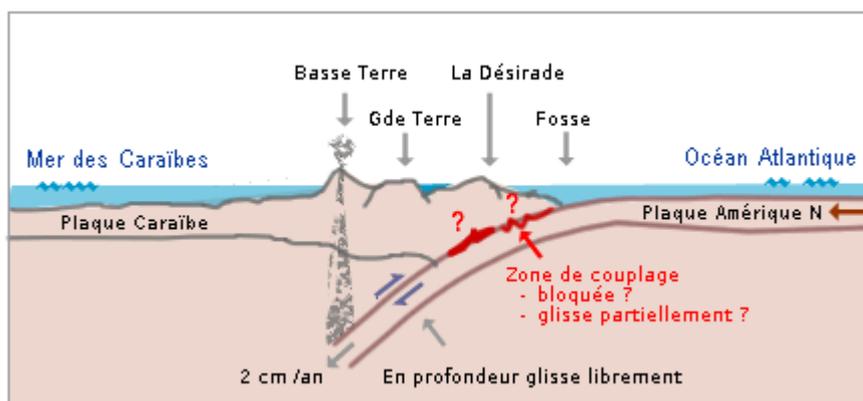


Figure 17. Modèle interprétatif des activités sismiques et volcaniques liées à la subduction sous les Petites Antilles d'après Corsini 2008.

<https://e-cours.univ-paris1.fr/modules/uved/risques-naturels/html/1/11/111.html>

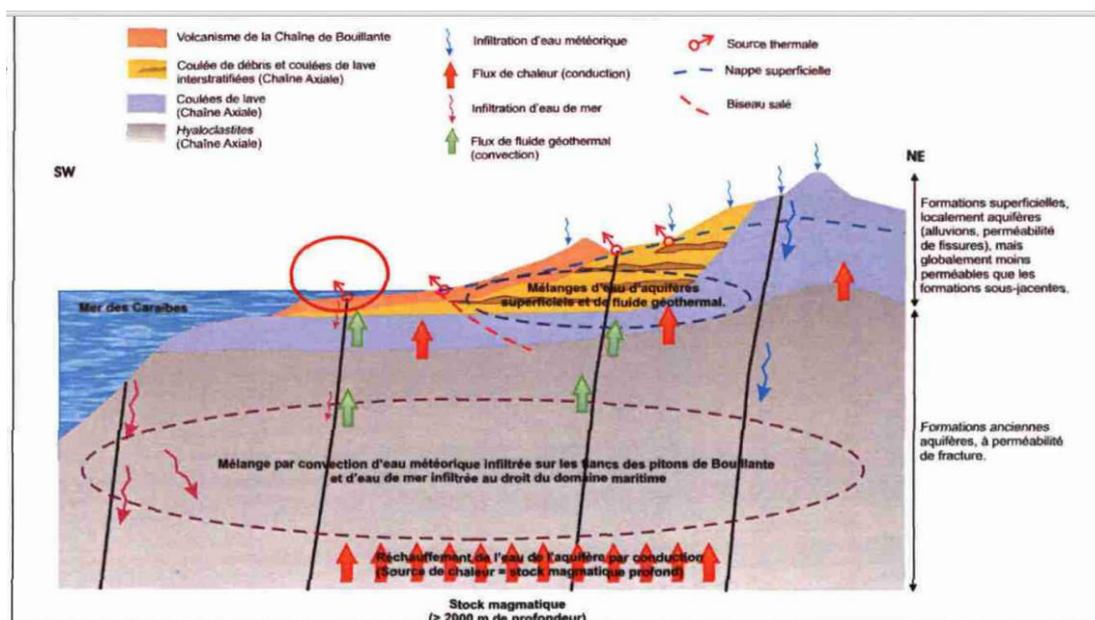


Figure 18. Schéma conceptuel de fonctionnement du gisement thermominéral de Bouillante (Bézègues-Courtade & Bes-De-Berc 2007).

Parmi ces différentes sources chaudes qui peuvent être plus ou moins aménagées ou en pleine nature, certaines considérées comme des eaux thermales aux propriétés curatives sont très fréquentées par les populations locales et touristiques depuis très longtemps. En effet, dès 1647, le Révérend Père Breton les mentionnait déjà dans ses rapports à ses supérieurs (Sautet 1968). Par la suite, trois stations thermales à visée thérapeutique ont été installées, celle de Dolé au Sud, créée en 1842 (Fig. 19), celle de Ravine Chaude au centre de la Basse-Terre en 1937 (Fig. 20) et plus récemment en 1974, à proximité du volcan, le Centre thermal Harry

Hamoussin de St-Claude. Aujourd'hui, elles ne fonctionnent plus en tant que stations thermales, mais leur eau de source est toujours utilisée. Les principaux bassins d'eau chaude étaient bien connus en 1930 comme le montre aussi cette carte de l'époque (Fig. 21). On les trouve à Sainte-Rose et au Lamentin au Nord, à Bouillante en Côte sous le vent à l'Ouest, et au Sud de la Basse-Terre, au pied de la Soufrière sur les communes de Capesterre, Saint-Claude et Gourbeyre. Au XIX^{ème} et XX^{ème} siècles, la Basse-Terre de Guadeloupe, déjà connue pour sa diversité et sa richesse en sources chaudes, en cascades et rivières était donc également très réputée pour son thermalisme.

D'après le témoignage de Claudie Lacascade, petite fille des propriétaires du site de Dolé: Pitat dans la presse thermique et climatique 1992 et Magazine destination Guadeloupe n°39 : Dolé-les-Bains à la recherche du temps passé)

« L'appellation de Capès Dolé vient du nom de deux personnages de l'histoire de la Guadeloupe, le commandant Capès, responsable de la construction de la route coloniale qui a vanté les vertus de cette eau, et Pierre Dolé, le fermier de l'ordre des Carmes qui s'y était installé en fondant l'habitation de Dolé. En 1789, cette habitation est devenue domaniale et en 1877, un arrêté fixait les conditions de la fréquentation des différents bassins. Le 24 avril 1920, la Société fermière des établissements balnéaires et thermaux de la Guadeloupe, présidée par le docteur Pichon, inaugure un confortable hôtel nommé « Dolé-les-Bains » qui devait attirer toute la haute bourgeoisie de l'île. A l'époque, Gourbeyre était le lieu de villégiature par excellence lors des fortes chaleurs, et de convalescence de bon nombre de personnes souffrant de rhumatismes. Les activités thermales du site se sont arrêtées au début des années 60. La Société anonyme des Eaux de Capès-Dolé a repris l'exploitation du site en 1969 avec la production d'eau en bouteille, tandis que l'hôtel de Dolé a été repris par ma famille. J'y ai passé toute mon enfance et me suis baignée dans les eaux de Dolé qui m'ont donné cette peau si douce, paraît-il. »

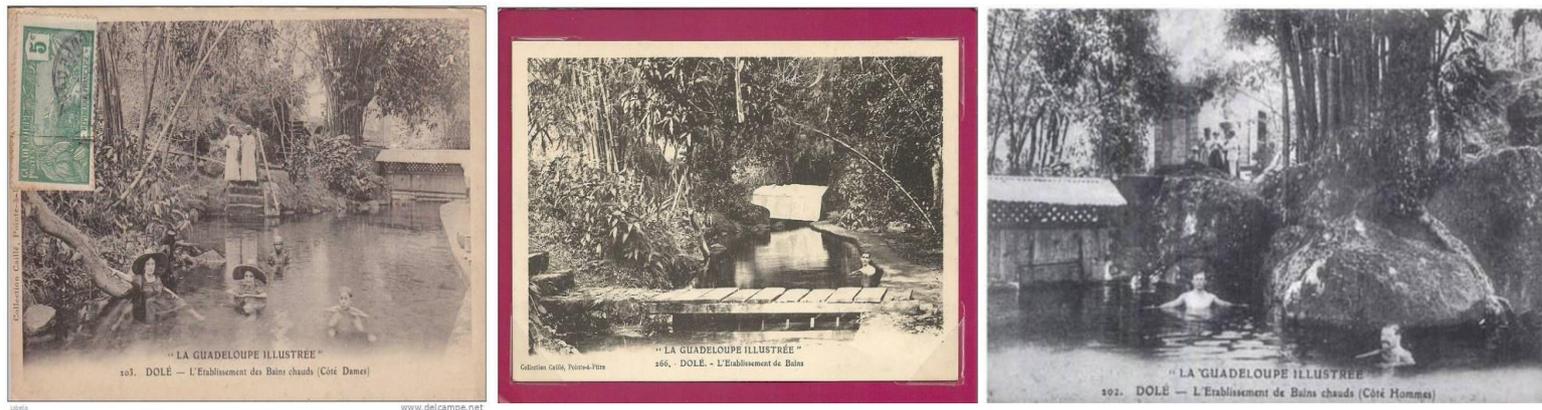


Figure 19. Photos d'archives du site de Dolé créé en 1842



Figure 20. L'Établissement thermal de Ravine Chaude créé en 1937

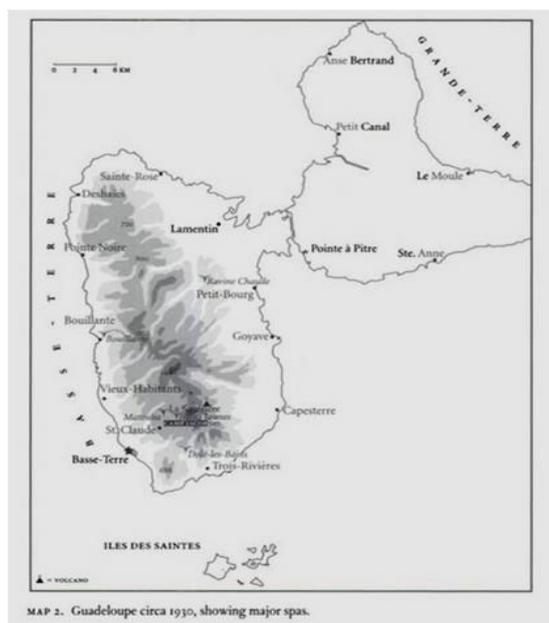


Figure 21. Carte représentant les principaux bains de la Guadeloupe datant de 1930

5.2. Le premier cas de MEAP en Guadeloupe (Nicolas *et al.* 2010)

Un garçon de neuf ans s'est présenté aux urgences du CHU de Pointe-a-Pitre le 23 avril 2008 avec un syndrome fébrile accompagné de céphalées. Son examen n'ayant révélé aucune infection bactérienne ni virale, il est retourné à son domicile. Son état s'est aggravé deux jours plus tard, avec une forte fièvre et un état comateux alternant avec des phases d'agitation psychomotrice et un syndrome confusionnel. Il s'est alors fait hospitaliser dans le service de pédiatrie. Une antibiothérapie a été mise en place mais l'évolution de la maladie a été rapidement fatale 12h après la seconde hospitalisation. (Nicolas *et al.* 2010)

L'examen biologique a mis en évidence une hyperleucocytose sanguine avec 82 % de polynucléaires neutrophiles ainsi qu'un liquide céphalo-rachidien trouble présentant une leucocytose élevée, une hyperprotéinorachie, et une hypoglycorachie, autant de signes évocateurs d'une méningite bactérienne qui n'ont malheureusement pas été confirmés par les recherches d'antigènes solubles. Cependant, l'histologie du LCR a révélé la présence d'éléments suspects, des cellules polymorphes, de 15 à 20µm, caractérisées par un cytoplasme très vacuolisé et un nucléole au centre du noyau qui ont permis d'orienter le diagnostic vers une contamination par des amibes pathogènes et une MEAP.

En effet, une enquête plus poussée a révélé que l'enfant s'était baigné dans le Bain de Dolé, où la température de l'eau est supérieure à 29°C. Plus tard, la présence de *N. fowleri* dans le LCR a bien été confirmée par biologie moléculaire par le Docteur Johan De Jonckheere à Bruxelles et elle a permis de montrer la présence du type 3 (Euro-américain), responsable du premier cas de MEAP en France et plus précisément en Guadeloupe.

6. Objectifs de la thèse

Dans un premier temps, il était urgent de rechercher la présence des amibes libres thermophiles du genre *Naegleria* dans la majorité des bains chauds de Guadeloupe fréquentés par le public et d'identifier la ou les sources chaudes susceptibles d'héberger l'espèce pathogène *N. fowleri*. Pour atteindre cet objectif, nous avons mis en place, en collaboration avec l'ARS de Guadeloupe, un suivi régulier des bains les plus importants, de Janvier 2011 à Décembre 2013 et développé sur place, à l'Institut Pasteur, les outils de biologie moléculaire spécifiques des amibes libres. Nous avons ensuite tenté d'analyser le mode de dissémination des amibes pathogènes en mesurant certains paramètres physico-chimiques pouvant influencer sur leur présence et recherché l'origine de la contamination des bains les plus importants.

Enfin, compte tenu du risque important que représente la présence de ces amibes dans les nombreux bains chauds de la Guadeloupe, il était important pour nous d'optimiser les méthodes de détection et de dénombrement classiquement utilisées et d'essayer de trouver une nouvelle technique efficace, rapide et fiable, adaptée à la situation locale.

Le but principal de ces recherches étant de réaliser un état des lieux des connaissances sur les amibes libres de Guadeloupe, jamais initié auparavant, d'évaluer le risque et de mettre en place un moyen de lutte efficace en vue d'une amélioration de la prévention.

PARTIE II : Matériels et Méthodes

1. Prélèvements

1.1. Lieux de prélèvement

Les lieux de prélèvement ont été choisis en fonction de la température de l'eau. Les amibes recherchées étant thermophiles, nous avons listé les principaux bains chauds de la Guadeloupe où la température de l'eau varie entre 27 et 45 °C. Les logiciels Map Info et QGIS ont été utilisés comme systèmes d'informations géographiques (SIG) pour positionner précisément à l'aide des points GPS les sites de prélèvements répertoriés pour l'investigation (Fig. 22). Les différentes sources chaudes que nous avons analysées sont situées sur la Basse-Terre de Guadeloupe selon la répartition suivante :

- ❖ **Au Nord** : les douches de Sofaïa, commune de Sainte-Rose.
- ❖ **Au centre** : la source de Ravine Chaude, commune du Lamentin
- ❖ **Au centre Ouest** : le Bain de Morphy à Pointe-Noire, les Bains de la Lise et le Bain du Curé à Anse-à-Sable, section Pigeon, le canal de la centrale géothermique de Bouillante, le Bain de l'Anse Thomas.
- ❖ **Au Sud** : Le Bain des Amours, le Bain de Capès, le bassin principal de Dolé à Gourbeyre, le bassin secondaire que nous appellerons Dolé-escalier, les bains des Chutes du Carbet et le Bain Paradise de la rivière Grosse-Corde à Capesterre, les Bains Jaunes et le Bain de Matouba ainsi que le bassin de la Clinique des Eaux-vives de Matouba à Saint-Claude.



Figure 22. Carte de la Basse-Terre de Guadeloupe avec les différents sites de prélèvement.

1.2. Description des bains chauds étudiés

La température de l'eau, selon les sources, varie de 28 à 44°C et les bassins sont plus ou moins aménagés en fonction de leur popularité et de leur accessibilité. Les caractéristiques de chaque bain sont décrites dans le tableau 11.

Tableau 11. Caractéristiques des principaux bains chauds étudiés de la Guadeloupe

Bains	Lieu-dit	Points GPS	T°C	pH	Caractéristiques	Fréquentation
Sofaïa	Sainte-Rose	N16°17'30.81'' W61°43'38.66''	30,6	7	Douche sur boiserie	Importante
Ravine Chaude	Lamentin	N16°13'38.83'' W61°40'8.31''	34	7	Bétonné et rénové	Nulle
Bain du Curé	Bouillante	N16°08'52.30'' W61°46'8.32.91''	40,8	7,5	Carrelé mais pas nettoyé	Moyenne
La Lise	Bouillante	N16°09'34.52'' W 61°46'19.72''	34,4	7	Bétonné et désaffecté	Nulle
Anse-Thomas	Bouillante	N16°06'41.79'' W61°46'28.32''	44	7	Naturel en bord de mer	Importante
Centrale Géothermique	Bouillante	N16°07'38.00'' W61°46'09.00''	32	7,5	Canal (arrêté)	Nulle
Morphy	Pointe-Noire	N 16°07'39.86'' W61°46'12.68''	28	6,9	Bétonné et présence de mousses	Moyenne
Carbet	Capesterre (St-Sauveur)	N 16°02'37.70'' W61°38'49.90''	42	6,9	Naturel avec sédiments	Nulle
Grosse Corde	Capesterre (St-Sauveur)	N16°02'19.28'' W61°38'4.32''	35	7	Naturel avec sédiments	Moyenne
Bain des Amours	Gourbeyre	N15° 59' 29.80'' W61° 40' 20.90''	34,5	7	Carrelé et nettoyé	Importante
Bain de Capès	Gourbeyre	N15° 59' 28.98'' W61° 40' 19.56''	29	6,9	Naturel avec sédiments et mousses	Importante
Dolé résurgence	Gourbeyre	N15° 59' 29.00'' W61° 40' 08.00''			Aménagé	Nulle
Dolé Amont	Gourbeyre	N15° 59' 27.10'' W61° 40' 05.30''	31	7	Naturel avec sédiments	Importante
Bain de Dolé	Gourbeyre	N15° 59' 27.10'' W61° 40' 05.30''	31	8	Bétonné et nettoyé	Importante
Dolé escalier	Gourbeyre	N15° 59' 26.90'' W61° 40' 02.80''	32	7	Bétonné avec sédiments	Moyenne
Bains Jaunes	Saint-Claude	N16° 02' 05.20'' W61° 40' 11.70''	31	6	Bétonné avec sédiments	Importante
Matouba	Saint-Claude		36,6	6,5	Aménagement vétuste	Nulle
Eaux-Vives	Saint-Claude	N 16° 02' 42.00'' W 61° 41' 13.4''	34	6	Bassin de la clinique	Importante

Les principaux bains que nous avons étudiés sont présentés ci-dessous (Fig. 23, 24 et 25) et classés ici en trois catégories, les bains aménagés et régulièrement entretenus (Fig. 23A, B, C, D), les bains aménagés plus vétustes non entretenus (Fig. 24A, B, C, D) et les bassins naturels (Fig. 25A, B, C, D) dans un environnement plus sauvage. Le cas de la Clinique des Eaux-Vives est traité un peu à part (Fig. 26).



Figure 23. Bains aménagés, entretenus et très fréquentés : (A) Douches de Sofaïa au Nord, (B) Bain des Amours ; (C) Bain de Dolé à Gourbeyre ; (D) Bains Jaunes dans la forêt au pied du volcan.



Figure 24. Bains bétonnés mais peu utilisés : (A) Captage de Ravine chaude à Lamentin, (B) Bain de Morphy au nord de Pointe-Noire ; (C) Bain du Curé à Anse-à-Sable ; (D) Bain de La Lise à Pigeon.



Figure 25. Bains naturels non aménagés, mais très fréquentés : (A) Bassin de l'Anse-Thomas, en bordure de mer, au sud de Bouillante ; (B) Bassin des chutes du Carbet ; (C) Bassin de la rivière Grosse-Corde; au pied du volcan sur Capesterre Belle-Eau ; (D) Bain de Capès à Gourbeyre.

La source de Sofaïa, isolée au Nord de la Basse-Terre sur la commune de Sainte-Rose, serait apparue à la suite du tremblement de terre de 1843. Captée tout d'abord dans deux bassins publics, elle est maintenant distribuée sous forme d'une rampe de douches installée sur boiseries. L'eau chaude, sulfatée-calciqque et faiblement minéralisée aurait des vertus dermatologiques (Fig. 23A).

La source de Ravine Chaude, au centre de la Basse-Terre, sur la commune du Lamentin, est très peu minéralisée et présente un faciès bicarbonaté-sodique (Bézèlques-Courtade 2007). La résurgence qui s'accumulait autrefois dans un petit bassin naturel a été captée dans les années 1960 pour installer une première station thermale, rénovée ensuite dans les années 1990 pour donner le Centre de thermalisme et de balnéothérapie René Toribio, lequel a été fermé en 2005 et est actuellement en cours de réaménagement. Aujourd'hui, l'eau de la source est captée dans un grand bassin bétonné d'environ 15m de diamètre, 1m de profondeur et très bien entretenu (Fig. 24A).

En rejoignant la Côte sous le Vent, à Morphy au nord de Pointe Noire, se trouve une source hypothermale ($< 35^{\circ}\text{C}$) captée dans un bassin bétonné mal entretenu d'environ 40m^2 sur 1m de profondeur (Fig. 24B), avec un important dépôt de végétaux au fond et qui n'a pas été répertoriée dans le rapport du BRGM (Bézèlques-Courtade & Bes-De-Berc 2007).

Toutefois, cet environnement tout à fait propice au développement des amibes et facile d'accès pour la population avec une aire de pique-nique a fait partie des surveillances de l'ARS et de nos investigations.

Parmi les 21 sources associées au gisement thermo-minéral de Bouillante, répertoriées dans le rapport du BRGM (Bézèlques-Courtade 2007), seules les plus accessibles ont fait partie de notre étude. Nous avons effectué des prélèvements dans les baignoires de la Lise et dans le Bain du Curé à Anse-à-Sable, au nord, au faciès bicarbonaté-sodique, et dans le canal de la centrale ainsi que dans le bassin de l'Anse Thomas, en bordure de mer au Sud, au faciès marin plutôt chloruro-sodique.

Parmi eux, les trois petits bassins bétonnés (environ 5m^3 chacun) de l'ancienne Habitation sucrière de La Lise à Pigeon, autrefois très fréquentés du public sont aujourd'hui abandonnés, malgré une eau douce et limpide (Fig. 24D), tandis que le bain du Curé (2m^3), carrelé et abrité de la pluie (Fig. 24C) reçoit encore de nombreuses visites et est utilisé quotidiennement pour se rincer après un bain de mer et pour s'approvisionner en eau de consommation.

L'eau du canal de décharge de la centrale géothermique, au centre ville de Bouillante, arrive à une température élevée, proche de 50°C et se jette dans la mer (non illustré),

réchauffant ainsi tout le littoral de la ville, tandis que l'eau de l'Anse-Thomas plus au sud, émerge de la roche à haute température ($>70^{\circ}\text{C}$) à plusieurs endroits d'un bassin d'environ 10m^2 , aménagé dans les rochers en bord de mer, dans lequel les vagues et l'eau douce se mélangent pour atteindre une température de $30\text{-}45^{\circ}$ (Fig. 25A).

Parmi les 12 sources associées au gisement thermo-minéral du massif de la Soufrière, au sud de la Basse-Terre, inventoriées par le BRGM (Bézègues-Courtade 2007), nous n'avons étudié que les plus fréquentées par le public ; d'une part, les sources de montagne, au faciès sulfatées-calciques des Bains-Jaunes et de Matouba Eaux-Vives, ainsi que celles de la Rivière Grosse-Corde et des Chutes du Carbet, davantage enrichies en chlorure de sodium et, d'autre part, sur Gourbeyre, les sources bicarbonatées-calciques, enrichies en sodium et en hydrogénocarbonates de Capès, du Bain des Amours et du Bain de Dolé.

L'émergence des Bains Jaunes (981m d'altitude) sur le flanc ouest de la Soufrière est constituée de plusieurs griffons dont l'un sort dans un grand bassin (60m^2 sur 1m de profondeur), aménagé en pierre de taille depuis fort longtemps et qui est encore très utilisé aujourd'hui par les randonneurs (Fig. 23D).

La source chaude hyperthermale de Matouba ($50\text{-}60^{\circ}\text{C}$) située à environ 1160 m du dôme de la Soufrière, sur son versant Ouest (1055m d'altitude), émerge en plusieurs griffons dont l'un a été capté dans les années 1960 pour construire le Bain chaud de Matouba d'environ 10m^3 (Fig. 26A) et alimenter la station thermale des Eaux-Vives, située à 3 km (600m d'altitude) à l'ouest de l'émergence et spécialisée en rhumatologie, dermatologie et ORL (Fig. 26C).

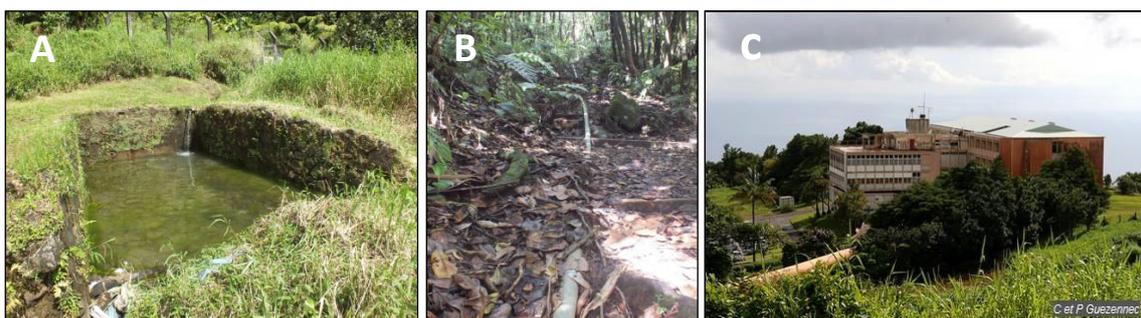


Figure 26. (A) Bains Chauds de Matouba au niveau du captage en altitude ; (B) tuyau d'alimentation à travers la forêt de (C) la clinique des Eaux-Vives.

La source du Carbet (605m d'altitude) sur le flanc Est de la Soufrière, émerge dans les rochers à côté de la deuxième chute du Carbet pour former de petits bassins naturels (Carbet 1 et 2) (Fig. 25B), fréquemment utilisés par les promeneurs avant les glissements de terrains provoqués par le séisme de 2004 et d'accès aujourd'hui interdit au public. Le Bassin de Grosse-Corde, un peu plus bas (560m d'altitude), largement plébiscité par les promeneurs est situé sur une source artésienne au niveau de la rivière Grosse-Corde en pleine forêt tropicale (Fig. 25C).

Enfin, les bassins les plus fréquentés de la Guadeloupe par les touristes et la population locale sont très certainement les bains de Capès et de Dolé (220m d'altitude), commune de Gourbeyre.

La source de Capès est constituée de sept griffons étagés en balcon (20m de dénivelé sur 200m de long), en contrebas de la Route Départementale 7, au lieu dit Dolé. Les émergences les plus au sud sont connues sous le nom de Bains des Amours et de Bain de Capès. Le Bain des amours est un bassin carrelé d'environ 10m³ récemment aménagé pour le public et très bien entretenu (Fig. 23B) tandis que le Bain de Capès, alimenté par une résurgence différente située à quelques dizaines de mètres, reste un petit bassin naturel non aménagé dans la roche et sous la végétation (Fig. 25D).

La source de Dolé qui a permis la création du premier établissement thermal en 1842 et dont les activités ont cessé après la seconde guerre mondiale, est constituée de trois griffons au dessus de la Route Départementale 7, au même lieu-dit Dolé. Les deux griffons situés les plus au nord de l'émergence sont captés de longue date pour alimenter un premier grand bassin en béton (60m³) près de la source, actuellement très mal entretenu et enfoui sous la végétation (Fig. 27A) et un second bassin d'environ 15m³ en contrebas, près de la route départementale, le plus populaire et nettoyé plusieurs fois par semaine (Fig. 27B). Le troisième griffon alimente plusieurs bassins naturels sous la végétation et un autre bassin beaucoup plus petit (1m³) et plus discret (Dolé-escalier), situé quelques dizaines de mètres plus loin (non illustré). Par ailleurs, environ 15% du débit naturel sont également captés par l'usine d'embouteillage installées sur le site depuis 1968.



Figure 27. (A) Les deux bassins principaux de Dolé, le plus grand très utilisé par les curistes autrefois (Introduction, Fig. 19) est aujourd'hui abandonné tandis que (B) le second est utilisé tous les jours.

1.3. Prélèvements

Les prélèvements ont été réalisés chaque mois. Nous avons utilisé pour chaque prélèvement une fiche de relevés fournie par l'Agence Régionale de Santé (ARS) (Annexe I) dans laquelle ont été notés systématiquement, le lieu, l'heure, la date, la température, le pH de l'eau (Thermomètre et pHmètre Sevengo), l'état du bassin, la profondeur approximative et la fréquentation.

1.3.1. Les différentes méthodes de prélèvement de l'eau dans un bassin :

1/ - La première méthode d'échantillonnage que nous avons utilisée consiste à effectuer, pour chaque bassin étudié, un seul prélèvement de 500ml d'eau en surface (Huizinga *et al.* 1990) et un seul prélèvement de 500ml d'eau en profondeur, dans des bouteilles stériles en verre (De Jonckheere 1977) ou en polypropylène (Kyle et Noblet 1985).

2/ - La seconde méthode consiste à mélanger, dans une bouteille de polypropylène, 1L d'eau et de sédiments prélevés à différents niveaux de la zone concernée et de la hauteur d'eau.

3/ - La troisième méthode consiste à prélever, dans des bidons stériles en polypropylène, 10L d'eau à la source, 10L d'eau à l'arrivée des bassins et 10L d'eau entre ces deux points.

4/ - La quatrième méthode permet un échantillonnage plus large en prélevant successivement 5 à 10 fois 1L d'eau avec des sédiments, à différents niveaux du bassin répartis dans des bouteilles de polypropylène d'1L.

1.3.2. Prélèvements de sédiments et de terre

1/ - Les sédiments (100 mg) ont été récupérés au fond des bassins dans des tubes stériles de 15ml et les biofilms des parois ont été récoltés sur des écouvillons (John et Howard, 1995 ; Eddyani *et al.* 2008).

2/ - Des échantillons de terre (10g) ont été prélevés à sec dans des tubes de 50ml stériles, à trois points différents situés en amont des bassins.

1.4. Transport

Le transport des échantillons d'eau, de sédiments et de terre a été réalisé en voiture à température ambiante (30°C) ou à +4°C jusqu'au laboratoire sans dépasser 2 à 3h après le prélèvement (Behets *et al.* 2007).

1.5. Mesure des paramètres physico-chimiques de l'eau

Les analyses ont été réalisées au Laboratoire de l'Hygiène et de l'Environnement possédant l'accréditation COFRAC pour le dosage de ces paramètres.

1.5.1. La turbidité

La mesure de la turbidité a été réalisée par un turbidimètre (2100AN IS Turbidimeter) en comparant la lumière diffusée et la lumière transmise dans l'échantillon d'eau avec les valeurs d'une gamme étalon selon la norme AFNOR de 2000, NF EN ISO 7027 (AFNOR 2000).

1.5.2. L'alcalinité

La teneur de l'eau en hydroxydes libres et en carbonates a été déterminée en neutralisant un volume d'eau par un acide dilué. Elle est mesurée en titre alcalimétrique (TA) et exprimée en degré F°. Elle a été déterminée en laboratoire par un titrimètre (Radiometer analytical SAC 80) selon la norme AFNOR de 1996 NF EN ISO 9963 (AFNOR 1996b).

1.5.3. La dureté

Les teneurs en calcium (Ca) et en magnésium (Mg) ont été déterminées par la méthode titrimétrique à l'EDTA décrite dans la norme AFNOR 1984, NF T90-003 (Radiometer analytical TIM 900 Titration).

1.5.4. La concentration en minéraux

Les concentrations en Ca, K, Mg et Na ont été déterminées par chromatographie ionique (Metrohm 761 Compact IC) selon la norme AFNOR 1999, NF EN ISO 14911 ainsi que les concentrations de SO₄ et Cl par cette même méthode mais suivant la norme AFNOR 2009, NF EN ISO 10304-1. La Silice, SiO₂ a été mesurée par spectrométrie d'absorption moléculaire (SHIMADZU UV-1700 Pharmapec) par la norme AFNOR 2001, NF T90-007. NH₄ et NO₃ ont été déduits par la méthode par analyse en flux (Flow Solution IV O-I-Analytical) selon respectivement les normes AFNOR 2005 (NF EN ISO 11732) et 1996 (NF EN ISO 13395). La concentration de HCO₃ a été calculée en suivant la méthode de Legrand et Poirier (Legrand *et al.* 1981) (Calcul manuel).

1.5.5. Carbone organique

Le dosage du carbone organique total a été obtenu par combustion et spectrométrie IR (TOC analyzer OI Aurora 1030, Bioritech) selon la norme AFNOR 1997 (NF EN 1484).

1.5.6. Indice de permanganate

L'indice de permanganate a été déterminé selon la norme AFNOR 1995 (NF EN ISO 8467), par la méthode manuelle de descente de burette.

2. Filtration

La filtration des différents prélèvements d'eau ramenés au laboratoire (10x10ml ; 100ml ; 10x100ml ; 500ml ; 1L ; 10x1L) a été réalisée sur des filtres de nitrate de cellulose de 1,22µm de porosité et de 47mm de diamètre (Millipore Fisher Scientific) en utilisant une rampe de filtration sous vide (Pernin *et al.*1998). Après filtration, chaque filtre a été découpé en 2 (ou 10) pièces égales réparties dans des boîtes de pétri (2 ou 5 morceaux par boîte) en mettant en contact la surface du filtre ayant retenu les amibes avec le milieu NNA tapissé d'*E. coli*.

3. Centrifugation

La centrifugation des prélèvements d'eau ramenés au laboratoire (10x10ml ; 10x100ml ; 500ml) a été réalisée à 1500g pendant 10 min dans des tubes de 50ml (Sigma Fisher 3-18k,

Bioblock Scientific). Après avoir écarté le surnageant, le culot contenant les amibes a été homogénéisé et étalé directement sur le milieu de culture.

4. Mise en culture

La mise en culture initiale a été effectuée après filtration ou centrifugation des prélèvements d'eau. Le filtre, le culot de centrifugation, les sédiments ou les écouvillons ont été déposés sous hotte stérile (HERA safe) dans des boîtes de pétri contenant un milieu gélosé non nutritif NNA (*Non Nutrient Agar*) préparé dans une solution PAS (*Page's Amoebae Saline Solution*) composée de 24 mg/ml NaCl, 0.8 mg/ml MgSO₄ 7H₂O, 1.2 mg/ml CaCl₂ 6H₂O, 28.4 mg/ml Na₂HPO₄, 27.2 mg/ml KH₂PO₄ et 15 mg/ml d'agar (*Bacteriological Agar*, Oxoid L11), préalablement recouverte d'une couche d'*E. coli* (Page 1988 ; Puzon *et al.* 2009 ; Robinson *et al.* 2006 ; Pournard *et al.* 2002 ; Pélandakis *et al.* 2002 ; Behets 2003 ; Pernin 1998). Les boîtes de culture refermées, puis scellées au parafilm ont été incubées à 44°C (Etuve Bioconcept firelabo) en position retournée pendant au moins 48h (De Jonckheere 2011). Un repiquage a été effectué après plusieurs jours de culture en découpant un petit carré de gélose à l'aide d'une cœse stérile au niveau des amibes, déposé sur une nouvelle boîte de milieu NNAensemencée d'*E. coli*, de manière à mettre en contact les amibes avec le milieu. Les boîtes ont été à nouveau mises à incuber à 44°C pendant plusieurs jours.

5. Identification et comptage des amibes

Après 24 à 48h de culture, les amibes se multiplient et forment des auréoles sur les bords des filtres (culture initiale) ou progressent du centre vers la périphérie de la boîte (sous-culture) en laissant apparaître un «front amibien » visible à l'œil nu et formant une auréole blanche opaque à la lumière. L'observation des amibes a été réalisée sans coloration particulière en déposant directement la boîte de culture sur la platine d'un microscope inversé à contraste de phase (Will-Wetzlar “ Wilovert” ou Leica).

5.1. Méthodes de Comptage

5.1.1. Comptage des fronts ou « Unité Formant Colonie » (UFC ou CFU)

Chaque auréole d'amibes qui émerge des différentes pièces de filtres dans les boîtes de culture est considérée comme étant issue du développement d'au moins une amibe et comptabilisée comme une unité formant une colonie (CFU). Le comptage des CFU est donc un comptage à l'œil nu, simple, direct et rapide.

5.1.2. Comptage par estimation du nombre le plus probable (NPP)

Cette méthode, dérivée des travaux de McGrady (Postgate 1969), permet d'estimer statistiquement, selon la loi de Poisson, le nombre d'amibes distribuées de façon aléatoire dans un échantillon (Champsaur 1996). Nous avons testé plusieurs répétitions de nos échantillons d'eau filtrée (10x10ml et 10x100ml) et, après culture, on compte le nombre de boîtes présentant un front amibien. Ce nombre de boîtes, considérées comme positives, a été reporté sur des tables statistiques NPP, établies à partir des règles de probabilités (Annexe II) et nous a donné le nombre d'amibes par litre d'eau de l'échantillon initial avec un intervalle de confiance.

5.1.3. Comptage par estimation simplifiée du NPP

Cette technique a été développée dans notre laboratoire en combinant les méthodes CFU et NPP décrites ci-dessus. Le filtre ayant servi à la filtration de 1L d'eau et celui de 100ml sont découpés chacun en 10 parts égales correspondant respectivement à 10x100ml et 10x10ml. Le nombre de filtres positifs a alors été compté pour chacun des volumes puis le résultat reporté sur la table NPP (Annexe II) afin de déterminer le nombre d'amibes par litre d'eau.

6. Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN a été réalisée à partir des sous-cultures issues des clones provenant de l'échantillon initial. Deux méthodes d'extraction ont été réalisées :

Dans la première, les amibes étaient récupérées en grattant chaque boîte dans 1ml d'eau distillée et la suspension cellulaire était centrifugée (Eppendorf centrifuge 54324), puis l'ADN extrait, à partir du culot, en suivant le protocole du kit Macherey-Nagel (*Nucleospin tissue*).

Avec la seconde méthode, les amibes ont été suspendues dans 1ml de tampon UNSET (8M urée, 2% SDS, 0.15M NaCl, 0.001M EDTA, 0.1M Tris pH 7,5) (Hugo *et al.* 1992) et l'ADN a été extrait selon le kit QIAmp DNA Mini Kit Qiagen, puis stocké à -20°C.

7. Dosage de l'ADN

L'ADN extrait a été dosé à l'aide d'un NanoDrop (Genova, Life Science). Le dosage a été effectué par spectrophotométrie dans l'ultra-violet successivement à 260 et 280nm. Le rapport a été vérifié pour mesurer la pureté de l'ADN. La concentration d'ADN a été exprimée en µg/ml.

8. Caractérisation

8.1. Amplification de l'ADN par PCR

La caractérisation moléculaire des amibes thermophiles identifiées dans nos cultures a été effectuée en routine par la technique de PCR (*Polymerase chain reaction*). La région ITS (*internal transcribed spacer*) du gène codant le précurseur des ARN ribosomiques et contenant les deux espaceurs internes transcrits encadrant l'ARNr 5,8S (ITS1, 5.8S, ITS2) a été amplifiée avec les couples d'amorces suivants :

NFITS : amplifie spécifiquement l'ITS de *Naegleria fowleri* (De Jonckheere 2011)

- ❖ primer sens : NFITSFW 5'-TGAAAACCTTTTTTCCATTTACA-3'
- ❖ primer anti-sens : NFITSRV 5'-AATAAAAGATTGACCATTTGAAA-3'

ITS : amplifie spécifiquement l'ITS des *Naegleria* (De Jonckheere 2011)

- ❖ primer sens : ITSFW 5'-AACCTGCGTAGGGATCATTT-3'
- ❖ primer anti-sens : ITSRV 5'-TTTCCTCCCCTTATTAATAT-3'

JITS : amplifie spécifiquement l'ITS des amibes de la famille Vahlkampfiidae (De Jonckheere 2011)

- ❖ primer sens : JITSFW 5'-GTCTTCGTAGGTGAACCTGC-3'
- ❖ primer anti-sens : JITSRV 5'-CCGCTTACTGATATGCTTAA-3'

Le mélange réactionnel de la PCR est composé de 2.5mM MgCl₂, 0.25mM de chaque dNTP, 1µM de chaque primer, 1.25U de Taq DNA polymérase, 50-100ng d'ADN pour un

volume final de 50µl (Kit Qiagen, Promega ou Eurobio). Le programme du thermocycleur (Biorad ou ESCO) comprend après une étape de dénaturation initiale de 6 min à 94°C : 30 à 40 cycles incluant 1 min à 94°C, 1.5 min à 55°C, 2 min à 72°C, puis une dernière étape d'élongation de 10 min à 72°C. A l'issue de la PCR, 2µl de tampon de charge (10mM EDTA, 10% glycérol, 0.015% bleu de bromophénol, 0.17% SDS) ont été ajoutés à 10µl de chaque produit de PCR et soumis à une électrophorèse de 80V pendant 1 heure sur gel d'agarose 1% dans du tampon TBE (89mM Tris, 89mM acide borique, 2mM EDTA, pH 8.3). Les bandes ont été visualisées sous UV après un bain de bromure d'éthidium (BET, à 0.5mg/L) avec des standards de poids moléculaire (100-bp DNA ladder, Invitrogen). Les contrôles négatifs ont été réalisés avec l'eau distillée à la place de l'ADN et les contrôles positifs avec de l'ADN souche de *Naegleria fowleri* (#0359).

8.2. Séquençage

Les produits de PCR amplifiés par les primers du couple ITS, ont d'abord été purifiés avec le kit *QIAmp PCR purification* (Qiagen), puis séquencés par la Plateforme de Biologie Moléculaire du CHU de Pointe à Pitre-Abymes en utilisant les primers ITSFW et ITSrv à l'aide du kit BigDye Terminator sequencing v3.1 et l'analyseur génétique ABI 310™ (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). La recherche d'homologies a été réalisée avec le logiciel BLAST du National Center for Biotechnology Information (NCBI), et les alignements des séquences des espèces identifiées ont été effectués avec ClustalW, (<http://www.nig.ac.jp>). Les séquences de nos produits de PCR spécifiques ont été déposées dans GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

8.3. PCR quantitative en temps réel (qPCR) :

La détection des espèces du genre *Naegleria* a également été réalisée par PCR quantitative en temps réel (qPCR) avec la chimie du SYBR Green, selon le protocole de Behets *et al.* 2006.

8.3.1. Principe de la qPCR

Le SYBR Green est une molécule qui émet de la fluorescence en se fixant dans le petit sillon de l'ADN double brin. Ainsi, durant la réaction PCR, l'augmentation de la fluorescence mesurée pendant l'étape de polymérisation et reportée graphiquement sur une courbe, est proportionnelle au nombre de produits amplifiés formés (Fig. 28). La phase d'initiation dont

l'intensité de fluorescence est faible définit la ligne de base, correspondant au bruit de fond de la réaction, normalisé par rapport à un fluorochrome de référence et sert à corriger les variations de fluorescence non spécifiques. La seconde phase de la cinétique de polymérisation est exponentielle, avec un doublement du nombre de copies d'ADN à chaque cycle de PCR, et permet de déterminer le nombre de cycles seuil, *Ct* (*cycle threshold*) correspondant au point d'intersection entre la phase exponentielle et la ligne de base, à partir duquel l'amplification est spécifique. Le nombre de cycles permettant d'atteindre le *Ct* dépend de la quantité d'ADN initialement présente dans l'échantillon amplifié. Le *Ct* est inversement proportionnel au logarithme décimal du nombre de copies initiales. On détermine ainsi le nombre de cycles à partir duquel le produit PCR est détectable. La dernière phase est la phase plateau où l'accumulation est ralentie et la quantité de produits formés tend vers une limite. Il y a donc une baisse de l'efficacité car les constituants de la PCR deviennent limitant.

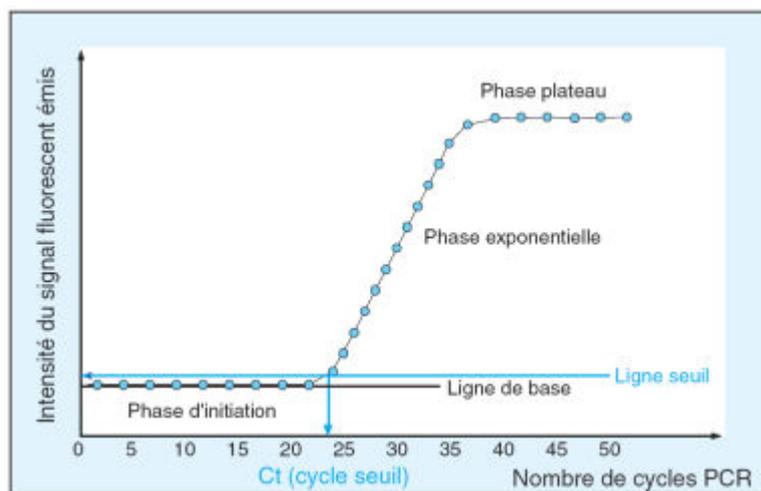


Figure 28. Cinétique d'une réaction de PCR en temps réel (Tse & Capeau 2003)

Cette technologie ne nécessite pas de sonde. Les amplicons sont soumis à des températures allant de 55°C à 95°C par paliers de 0,5°C et l'intensité de la fluorescence est mesurée en continu. La détection se fait à chaque élongation et les résultats sont représentés par des courbes de fusion (Fig. 29) qui représentent la variation de la fluorescence en fonction de la température. Le signal de fluorescence diminue lors de la dénaturation. Les amorces sont spécifiques ainsi que les températures de fusion des amplicons (*T_m*, *melting temperature*). Ainsi, les produits de PCR ont un unique et même *T_m* pour un même couple d'amorces, il est indiqué par un pic qui dépend de la composition en bases de l'amplicon.

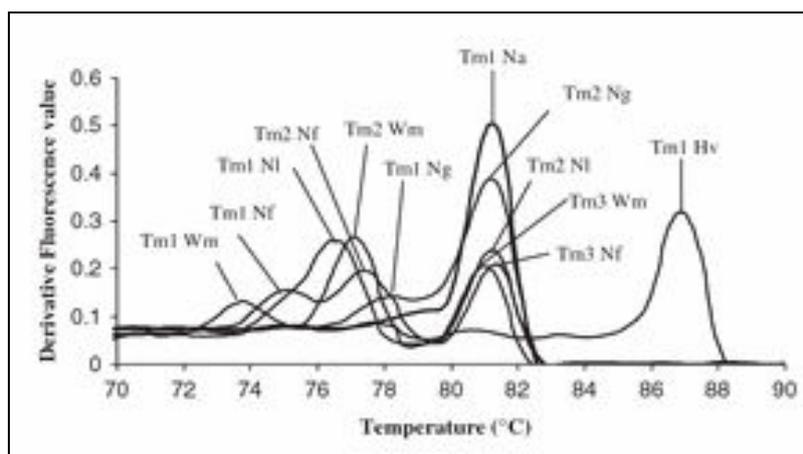


Figure 29. Courbes de fusion de souches de références. (Na) *N. australiensis* ; (Nf) *N. fowleri* ; (Ni) *N. lovaniensis* ; (Ng) *N. gruberi* ; (Hv) *W. magna* (Behets *et al.* 2006).

8.3.2. Protocole de qPCR

La détection par qPCR de la région ITS1/5,8S/ITS2 spécifique à chaque espèce de *Naegleria* présente dans nos échantillons a été réalisée sur un thermocycleur de l'Institut Pasteur (ABI PRISM 7500 de Applied Biosystem) en utilisant les amorces ITSFW et ITSRV spécifiques du genre *Naegleria* décrites plus haut.

Le kit *SYBR Green Core reagents* (Applied Biosystem) utilisé, permet de préparer un mélange réactionnel de PCR dans un volume de 30µl composé de : tampon SYBR Green 1X, 0.25µM de chaque primer, 0.125mM des quatre dNTP, 0.25U d'AmpliTaq *Gold DNA polymerase*, 0.25U AmpErase UNG, 2mM MgCl₂ et 5µl d'ADN (1ng). Le kit SYBR Green PCR Master mix a également été utilisé, il est composé de tampon master mix 1X contenant 0.25µM de chaque primer et 5µL d'ADN (1ng).

L'amplification par qPCR est réalisée selon le programme suivant :

2 min à 50°C et 10 min à 95°C suivis de 50 cycles de 30s à 95°C, 1 min à 57°C et 1 min à 60°C. Une dernière étape consiste en une augmentation de la température de 60 à 95°C par paliers de 0,4°C afin d'obtenir les courbes de fusion.

9. Dopage de l'eau et comptage sur cellule de Malassez

La comparaison des différentes méthodes de détection nous a amené à doper de l'eau distillée ou de l'eau de l'environnement avec un nombre connu d'amibes. Le dopage a été réalisé à partir d'une souche identifiée de *N. fowleri* en culture. Les amibes ont été récupérées sur la gélose en grattant les souches dans 1ml d'eau stérile. Six µl de cette solution est

déposée sur une cellule de Malassez pour compter le nombre d'amibes par μl . Le volume nécessaire est ensuite introduit dans 1 litre d'eau pour obtenir un nombre d'amibes initial prédéfini, puis des dilutions successives sont réalisées en cascade pour avoir le nombre d'amibes nécessaire dans l'expérimentation.

10. Analyses statistiques

10.1. Etude de l'effet des paramètres physico-chimiques des bains sur la présence des amibes

Les données obtenues ont été analysées avec le logiciel R et les résultats exprimés en médiane et moyenne. Le test de Fisher a été utilisé pour l'étude des variables qualitatives et les tests de Kruskal-Wallis et de Spearman pour les variables non-paramétriques. Du fait du manque de précision autour de 20 amibes par litre, les données ont été traitées par catégorie (absence, $<10/l$, ≥ 10 et $<20/l$, $\geq 20/l$). Les valeurs sont considérées comme statistiquement significatives lorsque $p < 0,05$.

10.2. Comparaison des températures et temps de transport

Pour cette expérience, les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel STATA 12.0 (StataCorp, College Station, TX). La comparaison des moyennes du nombre de colonies obtenues entre la méthode NPP classique et le NPP améliorée a été effectuée grâce au test non paramétrique Wilcoxon pour séries appariées. La moyenne du nombre de colonies obtenues après transport des échantillons à 4°C a été comparée à celle obtenue à 30°C par ce même test. Les moyennes des différentes durées de transport ont été comparées avec le test non-paramétrique de Kruskal-Wallis. Pour toutes les comparaisons, les valeurs $p < 0,05$ sont considérées comme statistiquement significatives.

11. Microscopie

Des souches de *N. fowleri* et *N. lovaniensis* identifiées préalablement par PCR ont été mises en culture sur milieu NNA-*E. coli* pendant au moins 2 jours afin d'obtenir des trophozoïtes, des kystes et éventuellement des flagellés pouvant être observés *in situ* sur la gélose.

11.1. Microscope photonique inversé en fond clair à contraste de phase

Les amibes ont été observées vivantes, directement sur la gélose à travers la boîte de pétri déposée sur la platine du microscope (Optech, optical technology) et les vidéos ont été réalisées à l'aide d'une caméra (Motic 3.30 MP) installée sur le microscope et reliée à un ordinateur. La visualisation a été effectuée avec le logiciel Motic plus. Les photos ont été prises toutes les 5s, et 1 seconde de film comprend 6 à 10 photos.

11.2. Microscope électronique à balayage (MEB)

La préparation des échantillons et l'observation au MEB ont été réalisées au Service de Microscopie du Centre commun de Caractérisation des Matériaux des Antilles et de la Guyane (C3MAG).

Fixation aux vapeurs d'osmium (OsO₄)

Un rectangle de gélose tapissé d'amibes est d'abord repéré au microscope à contraste de phase et découpé avec un scalpel, puis déposé à l'envers sur un tube de 1.5µl ouvert contenant de l'osmium (2%, H₂O) de façon à ce que les amibes soient au contact direct des vapeurs pendant 10 à 30 min sous hotte à température ambiante.

Fixation au glutaraldéhyde

Un volume d'environ 10ml de fixateur (2.5% glutaraldéhyde, 1% sucrose) dans du tampon phosphate Sørensen (Na₂PO₄ 0.1M et KH₂PO₄ 0.1M, pH 7.4) à 4°C, ou à température ambiante, ou préchauffé à l'étuve à +44°C, a été déposé directement sur la gélose. La fixation a été poursuivie dans la boîte de culture scellée au parafilm pendant 20 min à 1h à température ambiante sous hotte ou dans l'étuve pendant 1h à 44°C.

Post-fixation à l'Osmium

Une post-fixation des échantillons préalablement fixés au glutaraldéhyde ou aux vapeurs d'osmium a été réalisée par immersion du fragment de gélose contenant les amibes directement dans l'OsO₄ 2% pendant 30 min.

Déshydratation et métallisation

Après fixation, les fragments de gélose ont été déshydratés dans une série de bains d'acétone de concentrations croissantes (30-50-70-90 et 100 %) (3x10 min chaque) puis stockés à +4°C. Ils ont ensuite été desséchés par la méthode du point critique (CO₂) dans un

appareil Bio-Rad (*Polaron critical point dryer*), puis métallisés à l'or avant observation au microscope électronique à balayage (MEB) Hitachi-S-2500 sous une tension d'accélération de 10 à 20 kV.

12. Spectrométrie de masse

12.1. Principe

La désorption/ionisation sous laser assistée par matrice (*Matrix Assisted Laser Desorption-Ionisation Time Of Flight Mass Spectrometry* ou MALDI-TOF-MS) est une technique d'ionisation douce utilisée en spectrométrie de masse, permettant d'analyser les protéines ou autres molécules d'un échantillon. La technique consiste à irradier par les photons d'un laser, un échantillon liquide ou solide fixé à une plaque par une matrice chimique. Des ions sont formés par transfert de protons et d'électrons et traversent un analyseur par un champ électrostatique pour arriver jusqu'au détecteur (Fig. 30). Cette technique génère des spectres permettant de déterminer la masse de toute molécule ionisable, résultant de la désorption de l'échantillon à partir du rapport m/z donnant la masse (m) sur le nombre de charge (z).

Le métabolisme des organismes diffère d'une espèce à l'autre mais également selon le milieu, c'est la raison pour laquelle l'activité protéique qui en résulte varie selon les paramètres de l'environnement. L'utilisation d'extraits protéiques de différentes souches d'amibes et cultivées dans différentes conditions, est alors nécessaire pour obtenir différents profils de spectres protéiques qui seront utilisés pour la création de super-spectres, spécifiques d'une espèce donnée. Il faut statiquement au minimum 12 spectres de référence pour créer un super-spectre. Celui-ci est obtenu par différents calculs mathématiques en tenant compte du nombre et de l'intensité des pics du spectre de référence pour une espèce donnée.

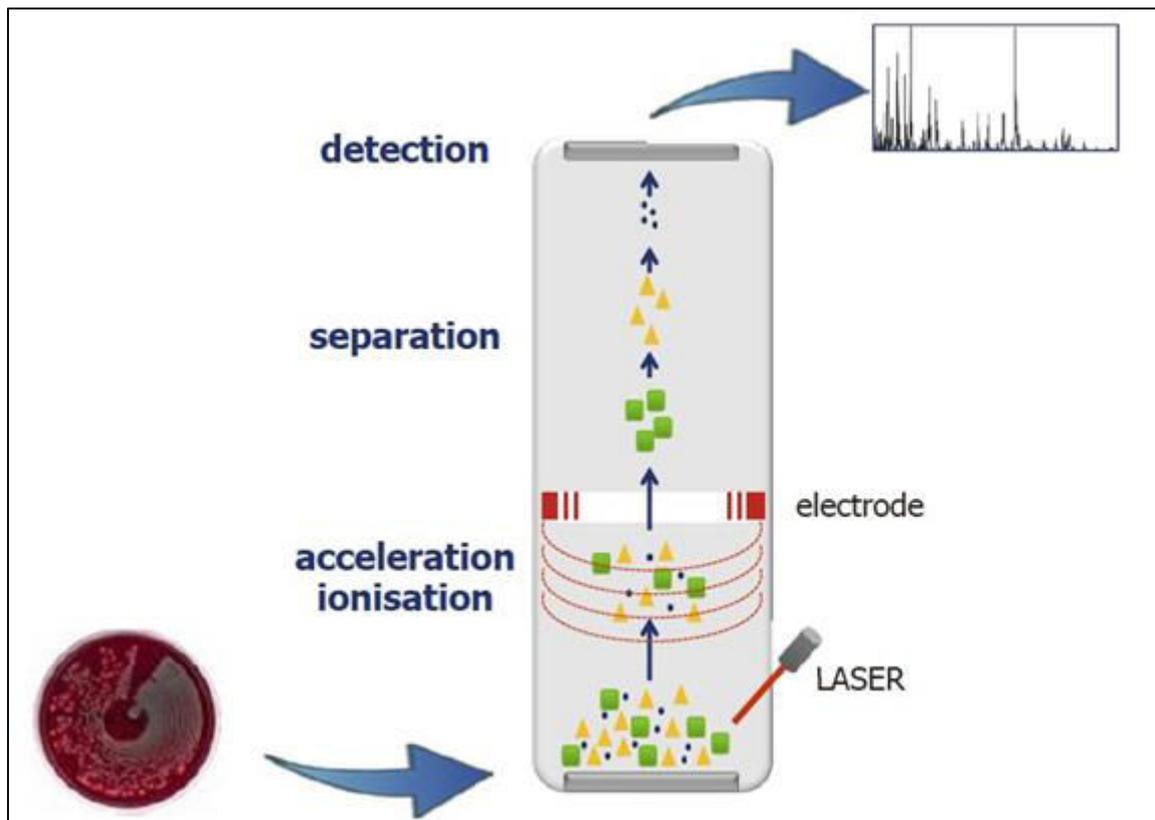


Figure 30. Schéma du parcours d'un échantillon depuis sa fixation par la matrice jusqu'à sa détection attestée par les spectres selon le MALDI-TOF.

12.2. Conditions de culture

L'analyse en spectrométrie de masse a été réalisée sur plusieurs souches de *N. fowleri* et de *N. lovaniensis* provenant de différents bains chauds de la Guadeloupe et préalablement caractérisées par PCR sur la base de leur profil ITS et NFITS. Chaque souche a été cultivée successivement en présence de 3 espèces de bactéries (*E. coli* ; *K. pneumoniae* ; *E. cloacae*) et sous deux conditions de température, 37°C et 44°C.

12.3. Extraction protéique

Pour des soucis de sécurité, nous n'avons pas utilisé de pathogènes de classe III, tels que *N. fowleri*, dans le spectromètre de masse. Nous avons donc travaillé à partir d'extraits protéiques qui fournissent généralement de meilleurs résultats spectraux que les souches fraîches.

L'extraction des protéines a été réalisée comme suit : après récupération des amibes sur les boîtes de géloses, la suspension obtenue est mise sous agitation forte dans 30µl d'eau

ultrapure durant 1 min. Puis, 90µl d'éthanol pur sont ajoutés à la suspension d'amibes. Les échantillons sont centrifugés à 13000 rpm pendant 2 min. Cette étape est réalisée 2 fois pour éliminer complètement l'éthanol. Le culot est repris dans 50µl d'acide formique à 70% et mis sous agitation pendant 10 min puis 50µl d'acétonitrile (100%) sont ajoutés au mélange, agité à nouveau vigoureusement pendant 10 min. Une centrifugation à 13000 rpm pendant 2 min est réalisée puis 70µl de surnageant sont transférés dans 30µl d'eau ultrapure. Un mélange de 2µl de l'extrait protéique et 1µl de matrice CHCA (Alpha-cyano-4-hydroxycinnamate) est finalement déposé sur une plaque pour analyse dans le spectromètre de masse (Axima Performance de Shimadzu Biotech).

12.4. Création des super-spectres

Le logiciel utilisé, SARAMISTM Premium apporte une solution entièrement automatisée pour la recherche et l'identification microbienne. Elle permet d'identifier les bactéries, les champignons, les levures avec des valeurs de confiance et de gérer des données de milliers de spectres. Cette base offre une grande diversité d'agents pathogènes (clinique et de l'environnement). On a la possibilité d'identifier des échantillons mixtes.

Dans la création de super-spectres, on utilise les spectres de références (n= ~ 10) pour générer premièrement un spectre consensus. Le choix des spectres de référence est affiné par un algorithme de distance qui sélectionne les spectres similaires à 70%. Ainsi, seules les masses enregistrées avec une fréquence élevée dans un lot de spectres, sont sélectionnées. Les différences entre les spectres sont dues à la variabilité entre les isolats (type/souches), à la variabilité des spectres de masse des isolats simples (conditions de croissance) et à des déviations analytiques (reproductibilité). Le super-spectre est le résultat d'un spectre consensus par attribution de pondérations de pics à chaque signal de masse. Ce sont des spectres de masse artificielle très spécifiques qui permettent l'identification sans ambiguïté d'un isolat inconnu quand son spectre de masse montre le motif de masse spécifique d'un super-spectre particulier (Fig. 31).

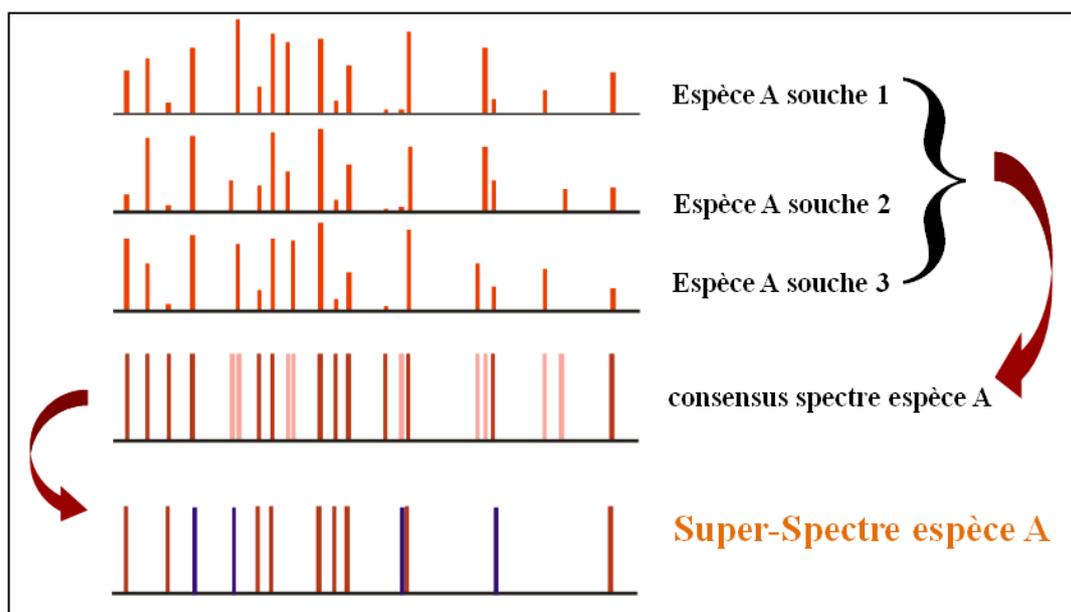


Figure 31. Modèle théorique de création d'un Super-spectre

13. Conservation des souches

13.1. Congélation

Les fragments de gélose contenant des kystes d'amibes ont été introduits dans des cryotubes (Nunc) contenant 5% de DMSO ou 20 % de glycérol (Sigma), dilués dans de l'eau ultrapure. Les cryotubes ont été conservés une heure à 4°C dans une boîte en polystyrène afin de permettre une diminution lente de la température, puis ont été mis au congélateur à -20°C.

13.2. Décongélation

Les solutions de conservation ont été décongelées de façon rapide en mettant les cryotubes au bain sec à 37°C. Le bout de gélose contenant les amibes a été lavé avec une solution de sérum physiologique pour éliminer le DMSO et le glycérol, puis a été déposé sur un milieu NNA-*E. coli*.

PARTIE III : Résultats et discussion

1. Résultats

1.1. Mise au point d'un protocole de détection et d'identification des amibes pathogènes en Guadeloupe

La mise en place d'un protocole expérimental nous permettant de détecter les amibes thermophiles présentes dans les bains chauds de la Guadeloupe et d'en identifier les espèces pathogènes, a été réalisée à l'Institut Pasteur de Guadeloupe en 2011, avec l'aide du Dr. Johann De Jonckheere, venu passer une semaine au laboratoire pour nous initier à sa méthode.

Une première série de prélèvements a été effectuée aux Bains Jaunes, aux Bains de Dolé et Dolé-escalier, au Bain des Amours, au Bain de Capès, au Bain du Curé de l'Anse-à-Sable, et au bassin de l'Anse Thomas en bordure de mer. Pour ce premier essai, nous avons concentré les amibes par centrifugation avant la mise en culture à 44°C. Après 48h d'incubation, toutes les boîtes étaient négatives, sauf celles correspondant au Bain de Dolé-escalier et celles du Bain du Curé. Trois clones ont ensuite été repiqués pour obtenir une sous-culture de chacun. Les ADN ont été extraits puis testés par PCR avec les différents couples d'amorces du Dr. De Jonckheere. Toutefois, cette première recherche par centrifugation s'est révélée négative et ne nous a pas permis d'obtenir de résultats sur l'identification des amibes.

Nous avons alors modifié les différents protocoles de prélèvement, de concentration des amibes, d'extraction d'ADN pour les adapter à nos échantillons. Après une mise au point, nous avons finalement réussi à obtenir des résultats positifs, révélés sur le gel d'électrophorèse ci-dessous (Fig. 32). Le témoin positif utilisé dans cette expérience et les suivantes correspondait à de l'ADN d'une souche pure de *Naegleria fowleri* (réf : # 0359) aimablement fourni par le Dr. De Jonckheere qui donne un produit de PCR de 448 pb avec les primers ITS et JITS, ainsi qu'un produit légèrement plus petit de 359 bp avec les primers spécifiques de *N. fowleri* NFITS et Naeg-1. Comme indiqué sur la figure 32, les primers Naeg-1 et NFITS n'ont amplifié aucun fragment d'ADN de nos échantillons ce qui a montré qu'il n'y avait pas d'amibe pathogène de l'espèce *N. fowleri* dans ces prélèvements d'eau, tandis que les primers ITS et JITS, ont donné un produit amplifié de 403 pb confirmant la présence d'amibes du genre *Naegleria*.

Cette première souche d'amibe libre thermophile que nous avons mise en évidence en Guadeloupe, identifiée ultérieurement par séquençage, correspond à l'espèce non pathogène *N. lovaniensis*, très proche de *N. fowleri*. Nous l'avons détectée dans le Bain du Curé à Anse-à-Sable, ainsi que dans le Bain de Dolé-escalier. A cette époque, en comparant les méthodes de concentration des amibes par centrifugation et par filtration des échantillons d'eau, nous nous sommes rendu compte que la filtration nous donnait une meilleure perception des amibes à l'œil nu dans les boîtes de culture, ainsi qu'au microscope inversé.

En effet nous pouvions mieux visualiser les fronts amibiens qui émergeaient des filtres, contrairement à ce que nous observions par la méthode de centrifugation, avec laquelle nous n'arrivions pas à voir les fronts. Nous pensons que cette observation est due à deux facteurs, le faible nombre d'amibes retrouvées dans nos échantillons et notre manque d'expérience sur la reconnaissance des amibes au début de l'étude. Pour cette raison, nous avons abandonné la centrifugation des échantillons d'eau et continué les analyses en utilisant systématiquement la filtration et en déposant les filtres sur la gélose des boîtes de culture après les avoir découpés en plusieurs fragments.

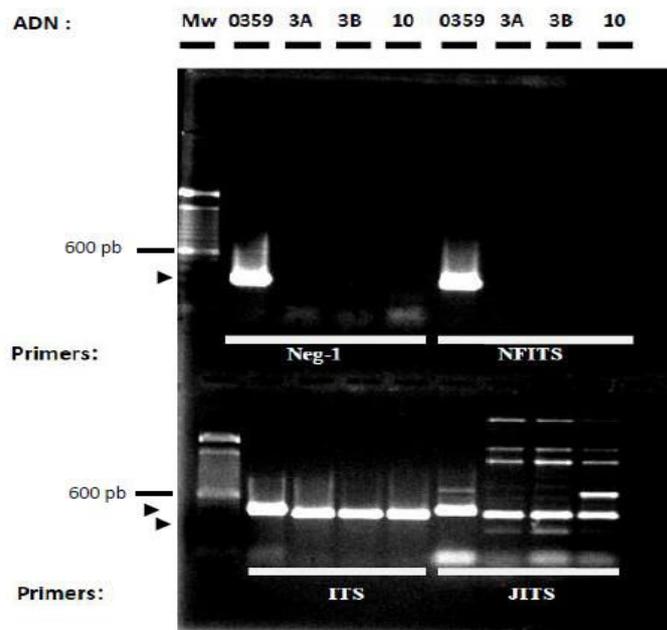


Figure 32. Electrophorèse sur gel d'agarose (1%) en présence de BET, des produits de PCR obtenus après filtration et mise en culture des prélèvements d'eau du Bain de Dolé-escalier (3A, 3B) et du Bain du Curé à Anse-à-Sable (10) avec les différents couples de primers Naeg-1, NFITS, ITS et JITS. MW: Marqueurs de poids moléculaires (100-bp DNA ladder), #0359: témoin positif *N. fowleri* (5ng).

1.2. Recherche des amibes libres dans les différents bains chauds de Guadeloupe (début 2011).

Après avoir mis au point la méthode de détection la plus adaptée à nos échantillons, nous avons démarré en routine, en collaboration avec l'ARS, un programme de suivi mensuel des amibes thermophiles, dans les principaux bains chauds de la Guadeloupe fréquentés par le public (Tableau 12).

Dans ces premières expérimentations, nous avons prélevé systématiquement de l'eau en surface et en profondeur et à différents niveaux des bassins. Dans certains cas, nous avons également récupéré des sédiments (sable, boues, algues) dans le fond, ainsi que du biofilm, écouvillonné sur les parois. A cette époque, nous ne cherchions pas à déterminer le nombre d'amibes en présence et nous n'avons pas encore mis au point le comptage des clones se développant en culture ce qui explique que nous n'avons relevé que la présence (+) ou l'absence (-) des différentes espèces dans les prélèvements (Tableau 12). Comme le montre sans ambiguïté le gel de PCR de la figure 33, un fragment amplifié à la taille attendue (359 bp) correspondant à l'ADN de l'amibe pathogène *N. fowleri* a été mis en évidence pour la première fois dans l'eau du Bain de Capès (Fig. 33, 6f), ainsi que dans les sédiments des Bains Jaunes (Fig. 33, 7a), confirmant ainsi le risque potentiel d'exposition à *N. fowleri* lors de la baignade dans ces sources géothermales de Guadeloupe. Ces résultats nous ont permis de poser un premier diagnostic sur la présence de l'amibe pathogène dans les eaux chaudes et de cibler plus précisément par la suite les bains les plus à risques.

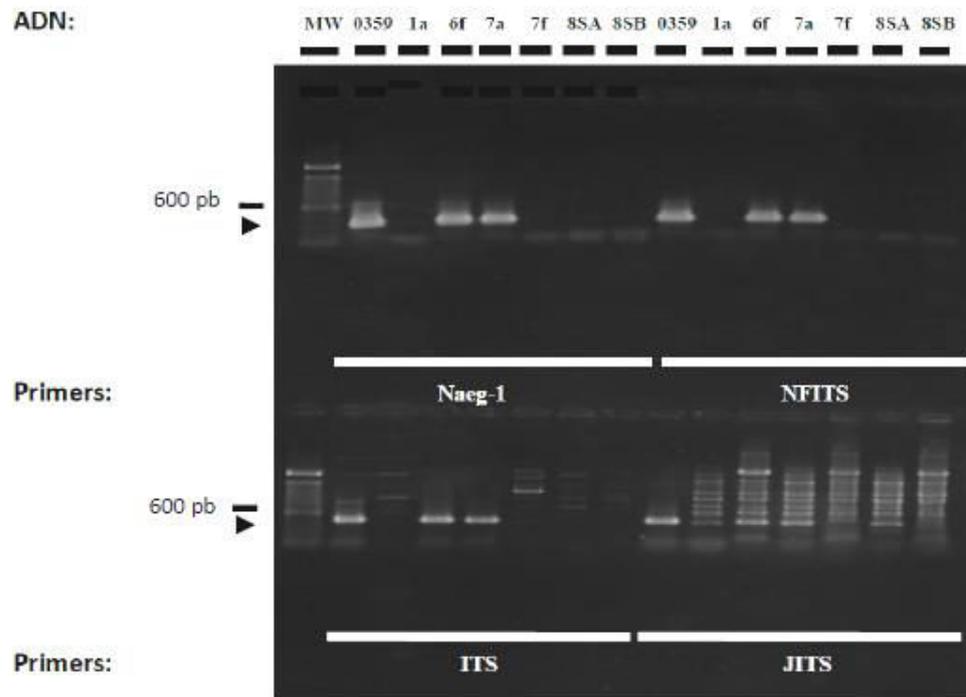


Figure 33. Electrophorèse sur gel d'agarose (1%) en présence de BET, des produits de PCR obtenus après filtration et mise en culture des prélèvements d'eau du Bain de Dolé (1a) et du Bain de Capès (6f), des sédiments (7a) et de l'eau des Bains Jaunes (7f) et du Bain du Curé à Anse-à-Sable (8SA, 8SB) avec les différents couples de primers Naeg-1, NFITS, ITS et JITS. MW: Marqueurs de poids moléculaire (100-bp DNA ladder), #0359: témoin positif *N. fowleri* (5ng).

Tableau 12. Suivi des amibes libres, détectées par PCR, dans l'eau, les sédiments et les biofilms des principaux bains chauds de la Guadeloupe fréquentés par la population au début 2011, entre janvier et avril. Dans ce tableau sont indiquées seulement la présence (+) ou l'absence (-) des espèces de la famille des Vahlkampfiidae (V.sp.), celles du genre *Naegleria* (N.sp.) et l'espèce pathogène *N. fowleri* (N.f).

		2011											
Bains		Janvier			Février			Mars			Avril		
		Sp.	N.I	N.f	Sp.	N.I	N.f	Sp.	N.I	N.f	Sp.	N.I	N.f
Bains Jaunes	Eau	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Séd	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	Ecouv										-	-	-
Bain des Amours	Eau	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Ecouv										-	-	-
Bain des Amours-Amont	Eau				-	-	-						
	Séd							-	-	-	-	-	-
Capès	Eau	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	Séd							-	-	-	-	-	+
Bain de Dolé	Eau	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
	Séd							-	-	-	-	-	+
	Ecouv										-	-	+
Dolé Amont	Eau	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	Séd							-	-	-	-	+	-
	Ecouv										-	-	+
Dolé escalier	Eau	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
	Séd							-	-	+	-	-	-
	Ecouv												
Ravine chaude	Eau							-	-	+	-	-	+
	Séd							-	-	-	-	-	-
	Ecouv												
Sofaïa	Eau										-	-	-
	Ecouv										-	-	-
Pigeon-Bain du Curé	Eau	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	Séd	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	Ecouv										-	+	-
Anse Thomas	Eau	-	-	-				-	-	-			
	Séd							-	-	-			
	Ecouv							-	-	-			
Centrale géothermique	Séd												
La Lise	Eau							-	-	+	-	-	+
	Séd							-	+	+	-	-	+
	Ecouv												

Au cours de ces premières investigations du début 2011, l'espèce non pathogène *N. lovaniensis* a été détectée dans quelques bains assez peu utilisés, tels que le Bain du Curé à Anse-à-Sable, les bains de la Lise ou dans le Bain de Dolé-escalier (Tableau 12). Cependant et de façon inquiétante, l'espèce pathogène *N. fowleri* a été retrouvée dans plusieurs bains très fréquentés par la population, les Bains Jaunes au pied du volcan, les Bains de Dolé et Dolé-amont, ainsi que le Bain de Capès à Gourbeyre, de même que dans les bains plus discrets, tels que celui de la Lise à Bouillante ou le captage de Ravine Chaude au Lamentin (Tableau 12). De façon plus rassurante, nous n'avons pas trouvé l'espèce pathogène dans des sites très visités tels que le Bain des Amours à Gourbeyre, les douches soufrées de Sofaïa au Nord, ainsi que dans l'eau chaude, mélangée à l'eau de mer, de l'Anse Thomas à Bouillante ou le canal de décharge de la centrale géothermique (Tableau 12).

L'amibe pathogène *N. fowleri* ayant été retrouvée dans les deux bassins les plus fréquentés par la population locale et touristique, les Bains Jaunes et le Bain de Dolé, ces derniers ont donc été systématiquement retenus par l'ARS pour la suite de la surveillance mensuelle, de même que le Bain des Amours qui, bien que négatif, se situe à proximité du Bain de Dolé et fait partie des bains les plus populaires.

En revanche, les douches de Sofaïa au Nord et le bassin de l'Anse-Thomas en bordure de mer au Sud de Bouillante, n'ont pas fait partie de la surveillance régulière, car ils se sont révélés négatifs à chacun des prélèvements effectués, en raison de la forte concentration en soufre de l'un et en chlorure de sodium de l'autre respectivement. Par ailleurs, les trois bassins de La Lise qui se sont révélés plusieurs fois positifs pour *N. fowleri* n'ont pas fait partie non plus de la surveillance régulière, car ils sont localisés dans une propriété privée et sont très peu visités du public.

Dès le premier trimestre 2011, nous avons pris conscience que les amibes thermophiles étaient présentes dans la plupart des bains chauds de la Guadeloupe et qu'il était important de nous focaliser sur les bains les plus fréquentés. En concertation avec l'ARS, nous avons rajouté la surveillance du bassin très populaire de la rivière Grosse-Corde, ainsi que celui des chutes du Carbet, l'un et l'autre situés au pied du volcan sur la commune de Capesterre-Belle-Eau, mais que nous n'avions pas testés au début et qui se sont révélés également positifs. Par la suite, le Bain de Morphy au nord de Pointe Noire et le Bain de Matouba, ont été inclus à la surveillance régulière en 2012.

1.3. Caractérisation des souches isolées par PCR et séquençage de l'ITS

Trois espèces d'amibes thermophiles différentes, se développant à 44°C en culture, ont été détectées dans les prélèvements d'eau chaude de la Guadeloupe et identifiées par PCR avec les amorces NFITS et ITS, selon les profils électrophorétiques ci-dessous (Fig. 34).

La première espèce, identifiée comme *N. fowleri* après séquençage, donne un produit de PCR de 359 pb avec les primers NFITS, similaire à celui obtenu avec le témoin positif et un produit de PCR de taille plus importante de 448 pb avec les primers ITS (Fig. 34, panneau de gauche). La seconde espèce retrouvée fréquemment dans les sources chaudes de la Guadeloupe, caractérisée ultérieurement par séquençage, est l'amibe libre *N. lovaniensis*, elle ne donne pas de produit de PCR avec les primers NFITS et donne un produit légèrement plus petit (403pb) avec les primers ITS (Fig. 34, tête de flèche, panneau central). Enfin, la PCR réalisée avec l'ADN de la troisième espèce thermophile, rencontrée quelques fois dans les bains de Guadeloupe, est négative avec les primers NFITS, mais donne un produit de 900pb avec les primers ITS. Cette espèce a été identifiée après séquençage comme une amibe du genre *Hartmanella* (Fig. 34, panneau de droite).

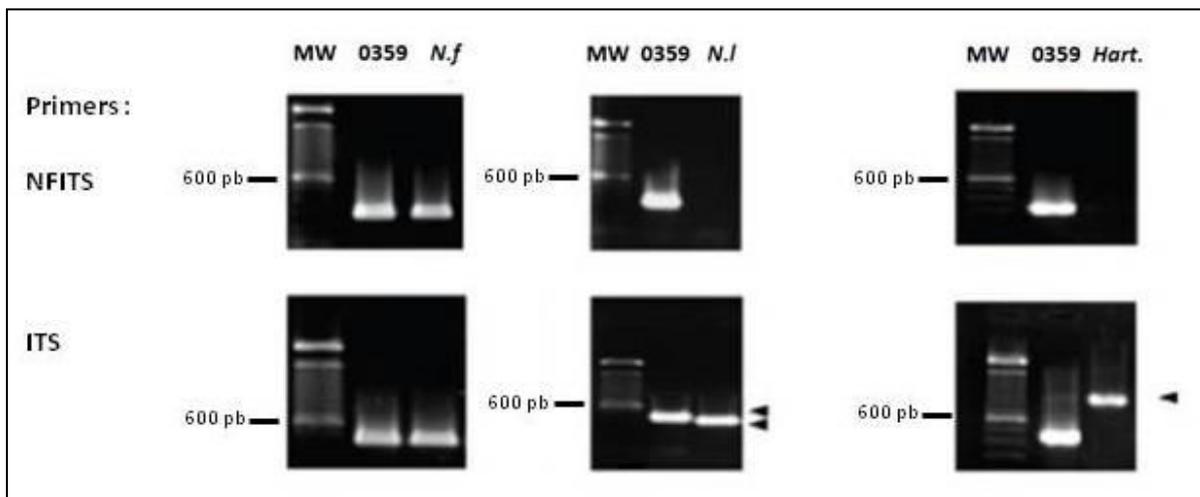


Figure 34. Electrophorèse sur gel d'agarose (1%) en présence de BET des produits PCR obtenus avec les primers NFITS et ITS à partir de l'ADN de souches d'amibes thermophiles, isolées en culture à 44°C, à partir des prélèvements d'eaux chaudes de Guadeloupe. *N. fowleri* (*N.f*), *N. lovaniensis* (*N.l*), *Hartmanella* sp. (*Hart.*). La taille relative des amplicons obtenus pour chaque espèce est précisée par les têtes de flèche. MW : Marqueurs de poids moléculaire ; #0359 : témoin positif *N. fowleri* (5ng).

Le séquençage des produits de PCR obtenus avec les primers ITS a permis de confirmer la présence de *N. fowleri* et d'identifier les autres amibes libres *N. lovaniensis* et *Hartmanella* sp. Les séquences de ces souches guadeloupéennes, dénommées respectivement DOLE, PIGEON et CAPES ont été déposées dans GenBank selon les numéros d'accèsion respectifs : JX910445, JX910446 et JX910447 (Tableau 13). Les séquences obtenues de *N. fowleri*, *N. lovaniensis* et *Hartmanella* sp. présentent 100% d'homologie respectivement avec les numéros d'accèsion de GenBank X96562.1, X96569.1 et AB330066. Notons que nous retrouvons les unités répétitives R2, R1, M2 et M1 dans l'ITS1 de *N. fowleri* permettant son identification sans difficulté.

Tableau 13. Numéros d'accèsion, séquences de l'ITS1, origine et dénomination des trois souches identifiées dans les bains chauds de Guadeloupe déposées dans GenBank.

N° accèsion	Séquence ITS1	Souches isolées	Espèces
JX910445	ATGGTAAAAAGGTGAAAACCTTTTTATGGTAAAAAGGTGTATGGTAAAAAGGTGAAAACCTTTTTCCATTACAAAAAT	DOLE	<i>N. fowleri</i>
JX910446	ATGGTAAAAAGGTGAAAACCTTTTTCTTAATTA AAAAC	PIGEON	<i>N. lovaniensis</i>
JX910447	GAACCATCCCGGGGAGACACCAAAAACCGTAGCCCCCTCGGCGAAACATCGATCGAGGGAGGGATCGCTCGTCGATCCTCCGAGAAACGAGAAT	CAPES	<i>Hartmanella</i> sp.

■ R2 ■ R1 ■ M2 ■ M1 ■ [M1 + 1 délétion[§] + 4 transitions[†]] *

* CCT[†] TA[†] A[†] T[†] TAAAA AC[§]
 CCA TT T A CAAAA AAT

Le séquençage de nos produits de PCR a également montré que toutes les souches de *N. fowleri* que nous avons isolées en Guadeloupe correspondent au Type 3, Euro-Américain, le même que celui de la souche isolée à partir du LCR de l'enfant décédé de MEAP en 2008. L'ITS1 a une longueur de 86pb et comporte les unités répétitives R2, R1, M2 et M1 et il existe également un T à la place du C à la position 31 dans l'ADNr 5.8S (Fig. 35).

ATGGTAAAAAAGGTGAAAACCTTTTTT ATGGTAAAAAAGGTGTATGGTAAAA
 AAGGTGAAAACCTTTTTT CCATTACAAAAAAT AACTCTGTGCAATGGAGCAC
 ACGGCTCGTG ATCGATGAAGCCCGCGGCAAAAAGCGATATGTAATGAGAT
 TCGTTAGCCTCGAGATTCATCAAATTGGTGAACACAGTCTGGACCTCGCAA
 GAGGTA CTACGTTAGAGTGCTAGTTTTATCAATTGATACTGGTAAAAGG
 TGTATTTAATCAATAGATTTTTACGCCCTAGCTGGTTATGCCGGATTCTCTTT
 GAGAAAACCGGATTGTCCCATTGAAATTTTTTCAAATGGTCAATCTTTATT
 TAACTAGCCTCTAATGTGAGAGGGTACCCCTGGATTTAAGC

ITS 1 = R2 + R1 + M2 + M1 ARN 5,8S = T à la position 31 ITS 2 + ARN 28S

Figure 35. Séquence de la région ITS1 d'une souche de *N. fowleri* isolée du Bain de Dolé obtenue avec les primers ITSFW et ITSRV.

1.4. Conservation des souches

Après caractérisation des différentes souches par séquençage, les kystes ont été conservés dans le glycérol seul (20%) ou dans le DMSO (5%) ou dans le mélange des deux. Après plusieurs semaines de stockage à -20°C et décongélation rapide (37°C) nos résultats montrent que les amibes redémarrent en culture à 44°C à partir de 48h à 72h. La croissance est plutôt lente par rapport à une culture qui n'a pas été congelée, quelque soit la solution de conservation.

1.5. Suivi des différents bains chauds entre 2011 et 2013

Après cette première série d'investigations au cours desquelles, nous n'avions pas cherché à estimer le nombre d'amibes présentes dans nos échantillons, il nous est apparu important de mettre au point une méthode de comptage fiable et efficace. Dans les premiers prélèvements que nous avons réalisés, nous nous sommes aperçus que le nombre de fronts repérés était plutôt faible et que lorsque l'on déposait le filtre entier il était difficile de comptabiliser les clones se trouvant au milieu du filtre. Nous avons alors eu l'idée de découper le filtre en plusieurs morceaux, deux, cinq ou dix pièces (voir matériels et méthodes) de façon à répartir au maximum les colonies sur des fragments de filtre différents et pouvoir ainsi les compter plus facilement et plus précisément. Ainsi à partir de juin 2011, nous avons pu proposer à l'ARS une estimation de la concentration d'amibes thermophiles par litre, à l'aide d'un protocole adapté aux faibles concentrations des eaux chaudes de la Guadeloupe. A cette époque nous réalisons un seul échantillon d'eau par site, en prélevant à différents

niveaux du bassin en surface et en profondeur, associé à un prélèvement de sédiments et un autre de biofilm.

1.6. Suivi du second semestre 2011

Les résultats de la surveillance des bains chauds au cours du second semestre 2011 sont indiqués dans le tableau 2, avec l'estimation du nombre d'amibes par litre (n=1), dans les sédiments (n=1) et les biofilms (n=1) pour chacune des espèces retrouvées (Tableau 14).

La concentration en *N. fowleri* détectée dans ces bains au cours de cette période est plutôt faible, comprise entre 0 et 30 amibes par litre. L'amibe pathogène est régulièrement retrouvée à Dolé, avec des valeurs pouvant atteindre 22 *N. fowleri* par litre, en amont du bassin principal. La plus forte concentration de *N. fowleri* lors de cette campagne a été obtenue à la rivière Grosse-Corde avec 30 amibes par litre. En revanche, *N. fowleri* est moins fréquemment rencontrée aux Bains Jaunes bien qu'elle ait atteint une fois la valeur de 10 amibes par litre. La concentration la plus faible en *N. fowleri* (une seule amibe par litre) a été retrouvée de façon exceptionnelle dans l'eau du Bain des Amours au mois d'août. Les douches de Sofaïa, le Bain du Curé, Ravine-Chaude et Dolé-escalier n'ont pas été analysés régulièrement et se sont révélés négatifs, ainsi que le bassin le plus chaud des chutes du Carbet (44°C) où *N. fowleri* n'a pas été trouvée du tout, mais où *N. lovaniensis* et d'autres espèces thermophiles non *Naegleria* ont été rencontrées en abondance. Par ailleurs, on peut également constater que des amibes thermophiles sont également présentes dans les sédiments et les biofilms du Carbet (Tableau 14).

Tableau 14. Suivi de la détection des amibes thermophiles au cours du second semestre 2011 dans les bains chauds de Guadeloupe les plus fréquentés du public et proposés par l'ARS. Prélèvement d'1L d'eau à différents niveaux et de hauteur d'eau (n=1), de sédiments (n=1) et de biofilm (n=1). Nombre d'espèces non *Naegleria* par litre (sp./L) ; Nombre de *N. lovaniensis* par litre (N.l./L) ; Nombre de *N. fowleri* par litre (N.f./L).

		2011																						
Bains		Moy	Moy	Juin			Juillet			Août			Septembre			Octobre			Novembre			Décembre		
		T°C	pH	Sp./L	N.l./L	N.f./L	Sp./L	N.l./L	N.f./L	Sp./L	N.l./L	N.f./L	Sp./L	N.l./L	N.f./L	Sp./L	N.l./L	N.f./L	Sp./L	N.l./L	N.f./L	Sp./L	N.l./L	N.f./L
Bains Jaunes	Eau	31,5	6,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	5	1	0	10	0	0	0
	Sed			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Ecouv			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bain des Amours	Eau	34,4	7,2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Sed			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Ecouv			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bain de Capès	Eau	29,8	7,2	9	0	0										4	0	6				6	4	0
	Sed			+	-	-										-	-	-				-	-	-
	Ecouv															-	-	-				-	-	-
Bain de Dolé	Eau	31,6	8,3	0	0	8	0	20	8	0	0	7	0	0	6	0	0	2	1	0	13	0	0	6
	Sed																							
	Ecouv			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dolé Amont	Eau	31,6	7,5				0	0	22	0	0	0	0	2	2	0	0	6	0	0	2	0	0	9
	Sed						-	-	-							-	-	-						
	Ecouv																					+	-	-
Dolé escalier	Eau	30,5	7,1	0	0	0																0	0	0
	Sed																							
	Ecouv																							
Carbet 1	Eau	43	6,85	8	0	0	60	200	0	51	249	0												
	Sed			+	+	-																		
	Ecouv									+	+	-												
Carbet 2	Eau	34,3	7,19	0	4	0	2	23	9	0	7	7												
	Sed			+	-	-																		
Grosse Corde	Eau	36,05	6,56	0	0	30	5	1	4															
Sofaïa	Eau	30,6	7,67	0	0	0																		
	Ecouv			-	-	-																		
Pigeon-Bain du Curé	Eau	40														10	4	0						

1.7. Suivi du premier semestre 2012

Des résultats similaires ont été retrouvés au début 2012 avec des valeurs sensiblement plus faibles pour *N. fowleri* (de 2 à 7 amibes /L) dans la plupart des bains étudiés (Tableau 15). L'amibe pathogène a été retrouvée exceptionnellement aux Bains Jaunes et plus régulièrement aux Bains de Capès et Dolé et n'a pas été détectée dans l'eau des autres bains, bien qu'elle ait été mise en évidence dans les sédiments de différents bains et en particulier dans ceux du Bain des Amours en mars et en mai 2012 (Tableau 15).

Tableau 15. Suivi de la détection des amibes thermophiles au cours du premier semestre 2012 dans les bains chauds de Guadeloupe les plus fréquentés du public et proposés par l'ARS. Prélèvement d'1L d'eau à différents niveaux et de hauteur d'eau (n=1), de sédiments (n=1) et de biofilm (n=1). Nombre d'espèces non *Naegleria* par litre (sp./L) ; Nombre de *N. lovaniensis* par litre (N.l./L) ; Nombre de *N. fowleri* par litre (N.f./L).

		2012																							
Bains		Moy Moy		Jan			Fev			Mars			Avr			Mai			Juin			Juillet			
		T°C	pH	Sp./L	N.l/L	N.f/L	Sp./L	N.l/L	N.f/L																
Bains Jaunes	Eau	31,3	6,7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Sed						-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Ecouv																								
Bain des Amours	Eau	34,1	7,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Sed			+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	
	Ecouv			-	-	-				+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Bain de Capès	Eau	28,2	7	10	3	6	0	0	0	6	0	0	3	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	
	Sed						-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	
	Ecouv			-	-	-				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Bain de Dolé	Eau	31,7	8	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	0	0	
	Sed																								
	Ecouv																								
Dolé Amont	Eau	31,9	8	4	12	0	0	0	0	0	2	4	0	0	0	0	0	7	1	0	0	0	0	0	
	Sed			-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	
	Ecouv			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	
Dolé escalier	Eau	30,7	7,5	0	6	0				0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	0	0	0	0	0	
	Sed									+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Ecouv			+	-	-				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Ravine chaude	Eau	33,9	7																			2	2	0	
Pigeon-Bain du Curé	Eau	41,6	7,5																			7	13	0	
Morphy	Eau	29,2	7																			2	0	0	
La Lise	Eau	35,6	7																			40	0	0	
Centrale géothermique	Eau	34,5	7,5	4	2	0																			

1.8. Bilan des comptages obtenus sur une année entière, entre juin 2011 et juillet 2012

Si l'on dresse un bilan chiffré du nombre d'amibes comptabilisées sur l'ensemble des bains chauds de la Guadeloupe au cours de la première année de campagne, entre juin 2011 et juillet 2012, on constate que des amibes libres thermophiles ont été détectées au moins une fois dans tous les bains investigués et dans 35 prélèvements d'eau sur les 73 analysés, soit 47,9 % des échantillons. Des amibes thermophiles ont également été retrouvées dans les sédiments testés (35,5 %) et dans les biofilms (14,8%) de façon significative ($p < 0,01$). L'amibe pathogène *N. fowleri* est l'espèce thermophile la plus fréquemment rencontrée, elle

est retrouvée dans 28 sur les 73 prélèvements d'eau testés (38.3%) et dans 5 sur les 48 échantillons de sédiments (10.4%), mais n'a pas été retrouvée dans les biofilms ($p < 0,01$).

L'espèce non pathogène *N. lovaniensis* est moins fréquente que *N. fowleri*, elle n'est retrouvée que dans 7 des 73 prélèvements d'eau (9.6%), 5 des échantillons de sédiments sur les 48 (10.4%) et est absente des biofilms ($p < 0,01$). Ces valeurs chiffrées nous ont permis également de suivre graphiquement l'évolution du nombre d'amibes pathogènes par litre d'eau, plus particulièrement dans les bains entretenus par les municipalités au cours de l'année 2011-2012, en faisant abstraction des bains naturels non entretenus (Fig. 36). On constate sur ce graphe que le nombre le plus important d'amibes pathogènes est détecté dans ces bassins pendant la période hivernale, s'étendant du mois d'octobre au mois de janvier avec un maximum entre novembre et décembre. Nous pouvons noter d'ailleurs que c'est le Bain de Dolé qui présente la concentration la plus importante de *N. fowleri*. Ce graphe nous permet aussi de retrouver la seule amibe pathogène détectée dans le Bains des Amours en août 2011 et que nous avons signalée précédemment dans le tableau 15.

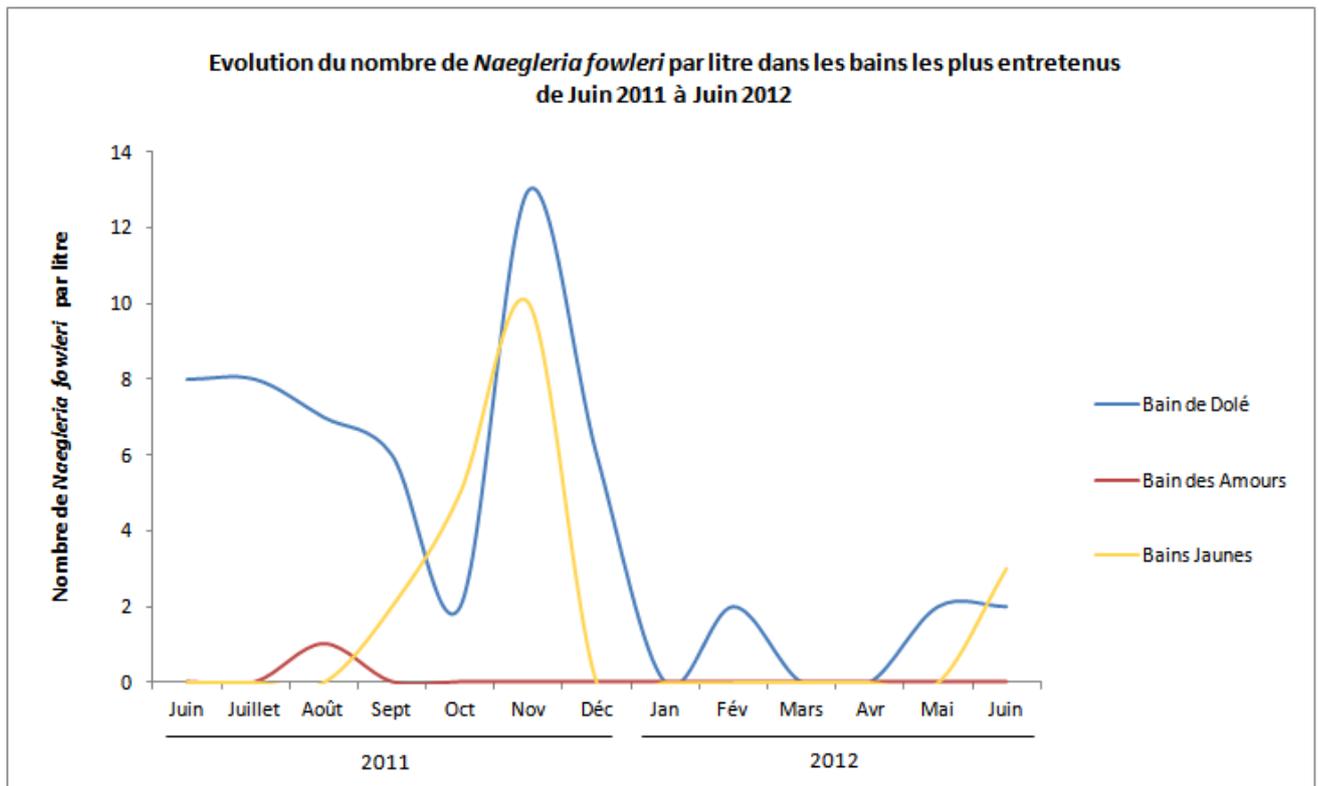


Figure 36. Evolution du nombre de *N. fowleri* par litre d'eau dans les bains chauds entretenus, sur des prélèvements mensuels ($n=1$) entre juin 2011 et juin 2012.

Ces premières données de suivi annuel, de juin 2011 à juin 2012 nous ont permis à l'époque d'émettre l'hypothèse selon laquelle les amibes thermophiles seraient plus abondantes pendant la saison des pluies (septembre-décembre) qu'en saison sèche (janvier-avril). La température de l'eau étant assez stable dans les sources géothermales, on a pensé que le lessivage important des sols en saison des pluies était à l'origine d'un apport de sédiments susceptibles d'héberger les amibes que l'on retrouvait ensuite dans les bassins.

Ces résultats nous ont permis d'alerter les pouvoirs publics sur le risque potentiel de contracter une amibe pathogène en se baignant dans les eaux chaudes de la région, même si les concentrations retrouvées restaient faibles. A la suite de quoi, l'ARS et les municipalités ont mis en place des moyens de communication et de prévention à destination du public, en installant des panneaux explicatifs à proximité des bassins les plus fréquentés, le Bain de Dolé, les Bains Jaunes et le Bain des Amours. Le panneau informe de la présence probable de l'amibe pathogène en la décrivant brièvement par un texte, illustré d'un dessin plus accessible pour les enfants. Des consignes y sont délivrées pour éviter la contamination lors de la baignade (Fig. 37). Depuis cette époque, le bassin de Dolé est vidangé et nettoyé très régulièrement par un agent communal, au moins deux fois par semaine, avec de l'eau de la ville additionnée de chlore (Javel en poudre, dichloroisocyanurate de sodium dihydrate à 56% - Chlorex) et au moyen d'un nettoyeur haute pression.



Figure 37. Panneau de prévention installé par l'ARS sur le site de Dolé (A), nettoyage du bassin de Dolé au chlore et (B) avec de l'eau sous haute pression.

1.9. Suivi du second semestre 2012

A partir d'août 2012, la procédure de prélèvement a été encore simplifiée, nous avons procédé à un échantillonnage mixte, consistant à réaliser un seul échantillon sur l'ensemble du site, mais regroupant de l'eau et des sédiments prélevés à différents niveaux de la zone et de la hauteur d'eau (voir matériels et méthodes, prélèvement n°2). Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 16.

Tableau 16. Suivi de la détection des amibes thermophiles au cours du second semestre 2012 dans les bains chauds de Guadeloupe les plus fréquentés du public demandés par l'ARS. Prélèvement d'1L d'eau et de sédiments à différents niveaux et de hauteur d'eau (n=1). Nombre d'espèces non *Naegleria* par litre (sp./L) ; Nombre de *N. lovaniensis* par litre (*N.l*/L) ; Nombre de *N. fowleri* par litre (*N.f*/L).

Bains	2012																
	Moy T°C	Moy pH	Août			Septembre			Octobre			Novembre			Décembre		
			Sp./L	<i>N.l</i> /L	<i>N.f</i> /L	Sp./L	<i>N.l</i> /L	<i>N.f</i> /L	Sp./L	<i>N.l</i> /L	<i>N.f</i> /L	Sp./L	<i>N.l</i> /L	<i>N.f</i> /L	Sp./L	<i>N.l</i> /L	<i>N.f</i> /L
Bains Jaunes	31	6				0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0
Bain des Amours	34,3	7				0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bain de Dolé	31,5	7,65				0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Grosse Corde	32,5	6,7	0	16	24				2	2	2	0	0	6	0	10	2
Carbet 1	42,6	7,2	33	0	7				26	0	0						
Carbet 2	27,7	7	26	6	0												
Matouba	40,1	6	16	0	8							16	26	0			
Morphy	28,7	6,9	8	0	4				0	0	0	6	0	0	0	0	0
Sofaia	30,6	6	0	0	0												
La Lise	35	7,1	0	40	0										0	6	0

Contrairement à ce que nous observions au premier semestre, *N. fowleri* n'est plus détectée dans le Bain de Dolé, alors qu'on la retrouve très régulièrement dans le bassin naturel de la rivière Grosse-Corde, où elle atteint même la concentration de 24 amibes par litre. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que les données de surveillance de l'année précédente, transmises à l'ARS ainsi que nos interventions régulières sur le site, ont eu pour effet d'alerter la municipalité et d'augmenter la fréquence de nettoyage du bassin de Dolé, ce qui a fait baisser le niveau de contamination. Cette hypothèse se vérifie d'ailleurs au mois d'août, au cours duquel *N. fowleri* est toujours présente dans les bassins jamais nettoyés, tels que ceux du Carbet, de Matouba et de Morphy (Tableau 16). En revanche, de façon étonnante, l'amibe pathogène n'a pas été retrouvée comme c'était le cas en 2011 (Tableau 12), dans les Bains de

la Lise qui ne sont pas entretenus du tout et qui contiennent une épaisse couche de sédiments. Cependant, il est à noter que ces bassins présentent un nombre assez important de *Naegleria* d'espèces différentes (40 N./L) (Tableau 16), suggérant peut-être un phénomène de compétition entre les microorganismes présents, au détriment de l'amibe pathogène.

Comme précédemment, nous avons reporté graphiquement nos données chiffrées, obtenues depuis le début des comptages et jusqu'en décembre 2012 avec les baignoires régulièrement entretenues, pour détecter une éventuelle rythmicité saisonnière de la contamination des bassins d'eau chaude par *N. fowleri* (Fig. 38).

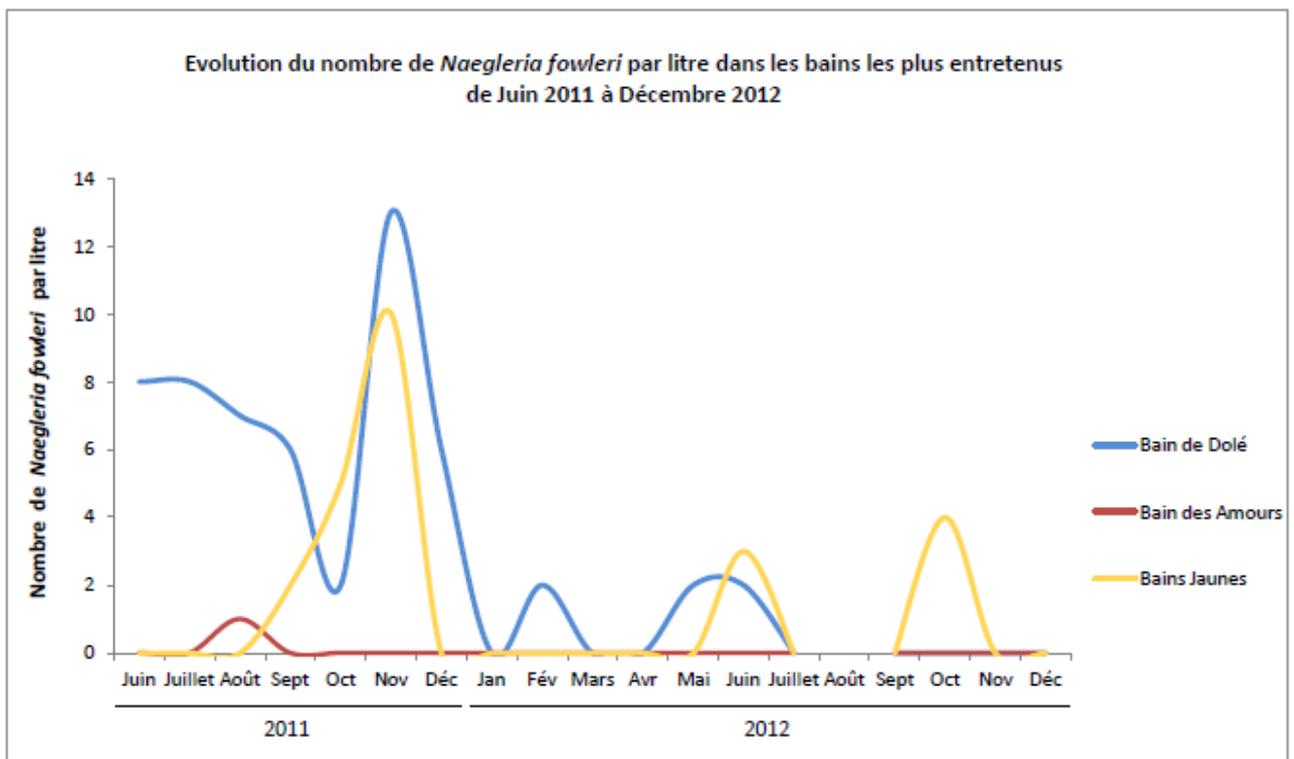


Figure 38. Evolution de la concentration en *N. fowleri* dans les baignoires chaudes entretenues, sur des prélèvements mensuels (n=1) de juin 2011 à décembre 2012.

L'analyse de ces courbes obtenues sur un an et demi cette fois, montre une diminution régulière et progressive, assez sensible, du nombre d'amibes pathogènes dans les baignoires chaudes régulièrement entretenues depuis 2011. L'hypothèse de saisonnalité envisagée précédemment, avec les seules données de l'année 2011, n'est donc pas confirmée en 2012. Il semble bien que ce soit l'augmentation de la fréquence des nettoyages des bassins, y compris de celui des Bains Jaunes, qui soit responsable de cette baisse de contamination par *N. fowleri*.

1.10. Suivi de l'année 2013

A partir du mois de Mai 2013, nous avons adopté la méthode de comptage par estimation statistique du nombre le plus probable (NPP), validée par la communauté scientifique, afin de combler le manque de précision de notre méthode pouvant être considérée comme “artisanale”. De plus, par rapport aux suivis de 2011 et 2012, et en accord avec l'ARS, nous avons abandonné les prélèvements en amont du bassin de Dolé, pour nous concentrer sur le bassin principal, le plus utilisé (Tableau 17) et nous avons suivi régulièrement le bassin de la rivière Grosse-Corde.

Les résultats montrent que la baisse notable de la contamination des bassins les plus entretenus, Bains Jaunes, Bain de Dolé et Bain des Amours, déjà amorcée en 2012 (Tableau 16, Fig. 37), se maintient sur toute l'année 2013, mis à part à Dolé en février-mars (Tableau 17). La contamination des bassins non entretenus, tels que les bassins de la rivière Grosse-Corde et du Carbet ou les bains de Matouba et de Morphy, déjà signalée en août 2012 (Tableau 16) existe toujours selon la régularité des prélèvements, avec une valeur assez importante relevée au mois de mai à la rivière Grosse-Corde (Tableau 17).

On peut constater également que des espèces thermophiles non pathogènes sont assez régulièrement rencontrées dans les bassins non entretenus (Grosse-Corde, Carbet, Morphy) alors que leur présence est épisodique dans les bains entretenus (Bain des Amours en novembre). De plus, comme précédemment discuté pour les Bains de la Lise, ces résultats, notamment ceux du Bassin de la rivière Grosse-Corde, suggèrent un phénomène de compétition entre les espèces thermophiles pathogènes et les espèces non pathogènes. En effet, des valeurs importantes de *N. fowleri* sont enregistrées dans ce bassin en mai 2013 quand il y a peu d'amibes non pathogènes, alors que la situation inverse est observée en février 2013 (Tableau 17).

Tableau 17. Suivi de la détection des amibes thermophiles de janvier à décembre 2013 dans les bains chauds de Guadeloupe les plus fréquentés du public demandés par l'ARS. Prélèvement mixte d'1L d'eau et de sédiments à différents niveaux et de hauteur d'eau (n=1). Nombre d'espèces non *Naegleria* par litre (sp./L) ; Nombre de *N. lovaniensis* par litre (N./L) ; Nombre de *N. fowleri* par litre (N.f/L). A partir de mai 2013 (*), estimation obtenue par la méthode NPP ; (***) estimation obtenue après filtration de 10 L d'eau (10x1L).

2013																							
Bains	Moy Moy		Janvier			Février			Mars			Avril			Mai*			Juin*			Juillet*		
	°C	pH	Sp./L	N./L	N.f/L	Sp./L	N./L	N.f/L	Sp./L	N./L	N.f/L	Sp./L	N./L	N.f/L	Sp./L	N./L	N.f/L	Sp./L	N./L	N.f/L	Sp./L	N./L	N.f/L
Bains Jaunes	30	6,2	0	0	0	0	0	0	1	7	0	0	0	0	<	<	0,7 [0,3-2]**	<	<	<	<	<	<
Bain des Amours	33,4	7	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	<	<	<	<	<	<	<	<	<
Bain de Dolé	31,4	8,3	0	0	0	3	2	2	7	4	11	0	0	0	<	<	0,2 [0,1-1,4]**	<	<	<	<	<	<
Grosse Corde	35,2	6,9	0	4	4	10	6	0	0	2	3	0	0	0	<	<	19 [9-41]	8 [3,7-17,5]**	3,6 [1,8-7]**	0,6 [0,2-1,9]**	<	<	<
Carbet	42	7										0	42	5				2,2 [1,1-4,5]	3,5 [1,7-6,5]**	0	88 [39-191]	<	<
Matouba	33,7	6,4							0	6	6												
Morphy	28,6	6,9				6	0	0	8	0	0	0	0	2	2	<	<	<	<	<	<	<	<

2013																	
Bains	Moy Moy		Août*			Septembre*			Octobre*			Novembre*			Décembre*		
	°C	pH	Sp./L	N./L	N.f/L	Sp./L	N./L	N.f/L	Sp./L	N./L	N.f/L	Sp./L	N./L	N.f/L	Sp./L	N./L	N.f/L
Bains Jaunes	30,7	6,5	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	2 [1-14]	<	<	<	
Bain des Amours	34	7,3	<	<	<	<	<	<	<	<	<	5 [1-16]	<	<	<	<	
Bain de Dolé	31	8	<	<	<	<	<	<	<	<	<	2 [1-14]	<	<	<	<	
Grosse Corde	36	6,7	<	2 [1-14]	<	<	2 [1-14]	2 [1-14]	5 [1-16]	2 [1-14]	<	29 [14-58]	<	2 [1-14]	7 [3-20]	5 [1-16]	2 [1-14]
Carbet	37,1	7	21 [10-43]	35 [18-70]	<										17 [8-37]	32 [16-14]	4 [1-14]
Morphy	28,6	7,1	11 [5-27]	<	<	18 [9-39]	<	5 [1-16]	2 [1-14]	<	<	12	<	<	13	<	<

L'analyse statistique des comptages de *N. fowleri* dans les bains régulièrement entretenus pendant ces trois années (2011-2013), en utilisant les corrélations de Pearson (paramétrique) ou de Spearman (non paramétrique) avec les logiciels R ou XLSTAT, confirme la diminution régulière significative de la présence de l'amibe pathogène uniquement dans le Bain de Dolé (p=0,001), malgré une dispersion des points assez importante ($R^2 = 0,304$) (Fig. 39).

En revanche, l'analyse statistique des variations du nombre de *N. fowleri* et du nombre d'amibes non pathogènes, enregistrées dans les autres bains, montre qu'elles ne sont pas significatives au cours de ces trois années et ne sont pas corrélées entre elles.

pathogène (Fig. 40B), l'augmentation que l'on constate n'est pas validée statistiquement, les différences observées de 47,8%, 25% et 33,4% respectivement entre les niveaux de *N. fowleri* dans les rivières, les bains vétustes et les bassins entretenus, ne sont pas significatives ($p=0,68$).

Par ailleurs, si l'on considère les proportions d'échantillons dans lesquels on a trouvé un grand nombre d'amibes (≥ 20), présentées sur ces histogrammes comparatifs entre les différents bassins (Fig. 40A, B), il est intéressant de remarquer que l'on trouve toujours plus d'amibes libres non pathogènes que de *N. fowleri*, quelque soit la nature du bassin confortant ainsi l'hypothèse de la compétition entre ces espèces.

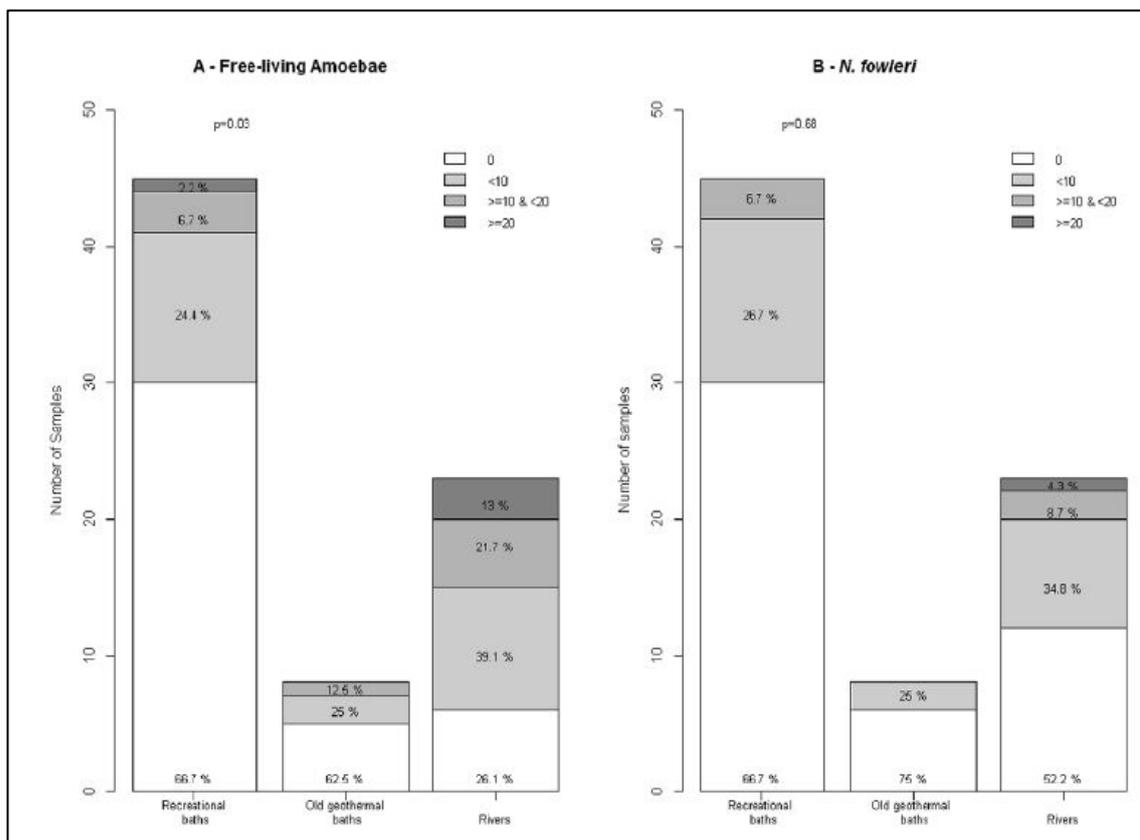


Figure 40 . Proportions d'amibes libres thermophiles (A) non pathogènes et (B) de *N. fowleri* détectées dans les eaux chaudes de Guadeloupe entre 2011 et 2012, selon le type de bassin (Moussa *et al.* 2013)

1.11.2. Effet de la température et du pH

La température et le pH dans les bains les plus populaires ont été mesurés en parallèle de l'estimation de la concentration en *N. fowleri*. Les données obtenues sont présentées dans la figure 41 et le tableau 18.

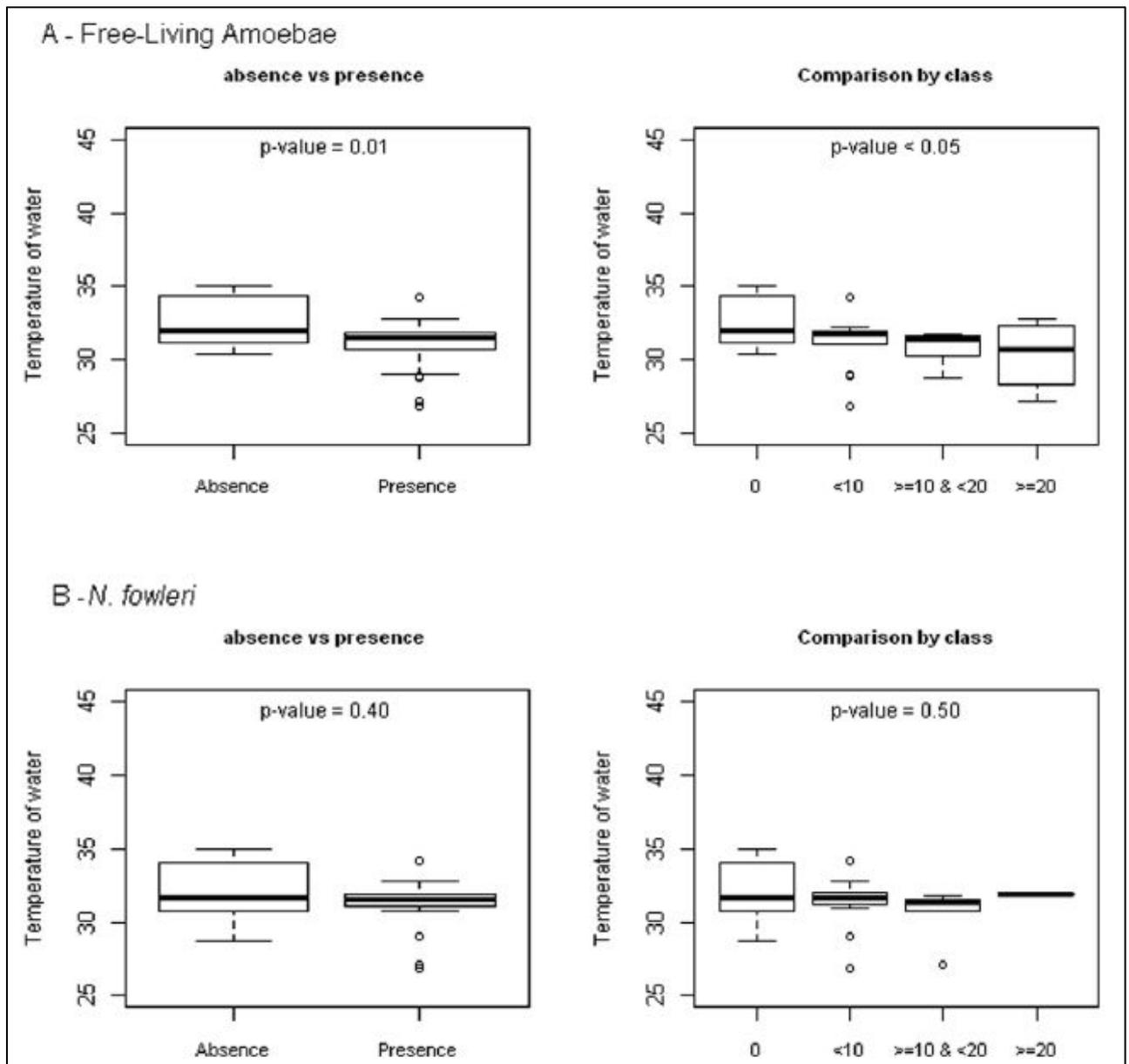


Figure 41. Proportion d'amibes libres thermophiles, selon la température dans les eaux chaudes de Guadeloupe en 2011-2012. (A) Amibes libres thermophiles non pathogènes ; (B) *N. fowleri* (Moussa *et al.* 2013).

Tableau 18. Nombre de *N. fowleri* isolées des bains les plus fréquentés de la Guadeloupe en 2011-2012, en fonction de la température et du pH (Moussa *et al.* 2013).

Dates	Bains Jaunes			Bain des Amours			Bain de Dolé			Dolé Amont			Bain de Capès		
	T°C	pH	N./L	T°C	pH	N./L	T°C	pH	N./L	T°C	pH	N./L	T°C	pH	N./L
Jun-11	31.7	5.5	0	33.6	6.9	0	31.4	8.2	8	ND	ND	ND	28.5	6.8	0
Jul-11	31.8	6.9	0	34.2	6.9	0	31.7	8.3	8	31.9	6.9	22	ND	ND	ND
Aug-11	30.7	6.5	0	34.2	7.0	2	31.9	8.2	7	31.0	6.9	0	ND	ND	ND
Sep-11	31.5	6.5	1	34.7	7.5	0	32.2	8.9	6	31.6	6.9	2	ND	ND	ND
Oct-11	31.8	6.3	5	34.7	7.6	0	31.5	8.9	2	31.6	9.0	6	31.5	7.9	6
Nov-11	31.6	6.7	10	34.4	7.6	0	31.7	8.8	13	31.5	8.2	2	ND	ND	ND
Dec-11	31.3	5.5	0	34.9	6.9	0	31.0	6.4	6	31.9	6.8	9	29.5	6.9	0
Jan-12	31.2	6.5	0	34.4	6.3	0	31.3	7.9	0	31.6	7.7	0	27.1	6.4	6
Feb-12	31.3	6.8	0	34.7	7.1	0	31.4	8.1	1	31.7	7.2	0	28.2	6.7	0
Mar-12	31.7	6.4	0	34.0	7.3	0	31.6	8.2	0	32.1	6.9	4	28.7	7.1	0
Apr-12	32.0	6.2	0	34.1	6.9	0	31.3	7.8	0	32.0	7.6	0	28.9	6.9	0
May-12	30.7	5.5	0	34.4	7.5	0	32.1	8.0	2	32.0	7.5	7	29.0	7.5	2
Jun-12	31.0	6.5	3	33.6	7.7	0	31.7	7.7	2	31.7	7.7	0	26.9	6.5	2
Jul-12	31.0	8.0	0	33.7	7.5	0	32.0	8.0	0	32.2	8.0	0	28.9	7.5	0

Concernant l'influence de la température sur les populations d'amibes, et comme le montre l'analyse statistique des données (Fig. 41), les amibes libres non pathogènes sont rencontrées plus fréquemment, et de façon significative, quand la température de l'eau diminue (Fig. 41A, panneau de gauche, $p=0,01$) et en plus grande concentration ($p<0,05$). En revanche lorsque l'on considère *N. fowleri*, nous n'observons aucune influence de la température (Fig. 41B).

Les effets éventuels de la température et du pH sur le développement de l'amibe pathogène *N. fowleri* ont alors été analysés au cours de l'année 2011-2012, dans les bains chauds les plus fréquentés (Tableau 18). On constate que les températures varient de 26,9°C pour le Bain de Capès à 34,9°C pour le Bain des Amours et que le pH varie de 5.5 pour les bains Jaunes, à 9.0 en amont du Bain de Dolé (Tableau 18). Cependant, aucune corrélation n'a pu être mise en évidence de façon significative entre la température, le pH et la présence de *N. fowleri*. En effet, dans chaque bain pris individuellement, le nombre d'amibes pathogènes peut varier de 0 à 10-20/L au cours de l'année indépendamment de ces deux paramètres (Tableau 18).

1.11.3. Effet des autres paramètres physico-chimiques

Les caractéristiques physico-chimiques de l'eau des bains les plus fréquentés sont généralement assez stables au cours de l'année, elles ont été mesurées régulièrement pendant

seulement quatre mois, d'octobre 2011 à janvier 2012, et comparées à la concentration de *N. fowleri* (Tableau 19).

Les résultats montrent que certains paramètres varient sensiblement d'un bassin à l'autre, en fonction de sa localisation, comme par exemple la concentration en sulfates qui est particulièrement importante aux Bains Jaunes. En effet, l'émergence de cette source se situe à proximité du dôme de la Soufrière et la concentration en sulfates atteint 315 mg/L alors qu'elle ne varie que de 51 à 92 mg/L dans le Bain de Capès et le Bain des Amours respectivement. Cependant aucune corrélation ne peut être établie entre la concentration des différents paramètres physico-chimiques et le nombre de *N. fowleri*, si ce n'est le niveau de turbidité dont l'augmentation, probablement due à la présence de sédiments, s'accompagne significativement d'une augmentation du nombre d'amibes pathogènes ($p=0,02$) (Tableau 19).

Tableau 19. Nombre de *N. fowleri* isolées des baignades les plus fréquentées de Guadeloupe en fonction des caractéristiques physico-chimiques de l'eau (Moussa *et al.* 2013).

Month	Baths	T°C	pH	N.f n/l	Turbidity NFU	Alkalimetric titre (°F)	Complete Alkalimetric titre (°F)	Total hardness (°F)	K mg/l	HCO mg/l	Ca mg/l	Mg mg/l	SO ₄ mg/l	Cl mg/l	Na mg/l	SiO ₂ mg/l	C mg/l	KMnO ₄ mg/l O ₂	NH ₄ mg/l	NO ₃ mg/l
	Bains Jaunes	31.8	6.4	5	0.3	0.0	2.0	22.1	6.0	24.4	95.0	23.7	310.0	59.0	37.6	112.5	<0.5	<0.4	<0.05	<1
	Bain de Capès	31.5	7.9	6	0.6	0.0	17.0	16.2	6.6	207.4	49.2	19.3	80.0	28.0	33.2	85.4	<0.5	0.8	<0.05	3.8
Oct-11	Bain des Amours	34.7	7.7	0	0.3	0.0	19.5	16.1	7.2	237.9	57.4	21.9	90.0	29.0	34.5	81.5	<0.5	0.9	<0.05	2.6
	Bain de Dolé	31.5	9.0	2	0.6	0.7	17.0	15.7	5.7	207.4	44.9	18.2	69.0	25.0	28.4	78.1	<0.5	<0.4	<0.05	3.1
	Dolé Amont	31.6	9.0	6	0.5	1.0	16.5	15.8	5.7	201.3	45.0	18.1	69.0	26.0	29.5	82.9	<0.5	0.9	<0.05	3.0
	Bains Jaunes	31.6	6.7	10	0.3	0.0	2.0	24.6	6.2	24.4	99.3	24.4	318.0	59.0	37.1	113.9	<0.5	<0.4	<0.05	<1
Nov-11	Bain des Amours	34.4	7.6	0	0.1	0.0	21.0	16.7	7.4	256.2	60.4	22.9	93.0	30.0	35.6	90.1	<0.5	<0.4	<0.05	2.8
	Bain de Dolé	31.7	8.8	13	0.4	0.0	17.0	16.4	5.8	207.4	48.5	18.7	69.0	25.0	30.1	76.7	<0.5	1.6	0.1	3.6
	Bains Jaunes	31.3	5.5	0	0.2	0.0	2.5	16.7	6.1	30.5	96.0	24.0	311.0	57.0	36.3	97.6	<0.5	<0.4	<0.05	<1
	Bain de Capès	29.5	6.9	0	0.1	0.0	15.0	14.0	5.1	184.2	37.9	147.1	51.0	21.0	25.5	68.4	<0.5	0.6	<0.05	6.4
Dec-11	Bain des Amours	34.9	6.9	0	0.2	0.0	21.0	20.0	7.2	256.2	57.1	23.0	92.0	29.0	34.6	80.1	0.9	1.2	<0.05	3.0
	Bain de Dolé	31.0	6.5	6	0.1	0.6	17.0	15.9	5.6	207.4	45.9	18.2	68.0	25.0	28.9	75.1	<0.5	<0.4	<0.05	3.8
	Dolé/Escalier	30.5	6.4	0	0.1	0.9	16.0	13.2	5.0	192.2	39.2	16.0	55.0	22.0	26.6	61.7	0.8	<0.4	<0.05	3.3
	Dolé/Amont	31.9	6.8	9	0.2	1.1	17.0	17.1	5.6	207.4	45.6	18.3	66.0	24.0	29.2	61.2	<0.5	1.6	<0.05	2.7
	Bains Jaunes	31.2	6.5	0	0.2	0.0	3.0	27.8	6.3	36.6	109.0	25.0	328.0	63.0	56.0	62.2	41.6	1.4	0.1	<1
Jan-12	Bain de Capès	27.1	6.4	6	0.9	0.0	14.5	13.1	5.2	176.9	42.0	15.0	56.0	22.0	27.0	62.6	0.6	1.8	<0.05	6.0
	Bain des Amours	34.4	6.4	0	0.4	0.0	21.0	19.6	7.4	256.2	63.0	23.0	96.0	30.0	36.0	52.5	0.9	0.1	<0.05	2.4
	Dolé/Escalier	30.2	6.5	0	0.1	0.6	16.0	14.5	5.1	195.2	48.0	18.0	66.0	23.0	27.0	58.8	<0.5	1.9	0.1	3.5

1.12. Distribution des espèces

Le suivi de la présence des amibes libres au cours de l'année 2011-2012 a montré après séquençage de la région ITS que *N. fowleri* était l'espèce la plus fréquemment retrouvée dans les baignades chaudes de la Guadeloupe, suivie principalement de l'espèce non pathogène *N. lovaniensis*. Une espèce thermophile, non pathogène également *Hartmanella* sp. (Identifiée

comme *Vahlkampfia* sp. dans les bases de données), n'a été retrouvée que dans le Bain de Capès (Tableau 20).

Tableau 20. Distribution des souches isolées et séquencées dans les différents bains de Guadeloupe en 2011 et 2012 (Moussa *et al.* 2013).

N° accession	Espèces	Bain de Capès	Bain de Dolé	Dolé Amont	Dolé escalier	Bains Jaunes
JX910445	<i>N. fowleri</i>	+	+	+		+
JX910446	<i>N. lovaniensis</i>	+		+	+	
JX910447	<i>Hartmanella</i> sp	+				

1.13. Détermination de l'origine de contamination des eaux par *Naegleria fowleri*

Dans les résultats précédents, nous avons constaté que la contamination des bassins aménagés persistait malgré leur entretien régulier et pouvait même présenter des épisodes de ré-infestation transitoire importante, en particuliers dans le Bain de Dolé (Fig. 39). En revanche le Bain des Amours qui a été aménagé récemment, maintient de façon stable un niveau de contamination très faible. Nous avons vu également que les paramètres physico-chimiques n'avaient pas d'effet significatif sur la présence de *N. fowleri* à l'exception de la turbidité de l'eau. A l'issue de ces constats, nous nous sommes donc posé la question de savoir quelle pouvait être la véritable origine de contamination des bassins.

Nous avons émis l'hypothèse que le sol et en particulier la terre située en amont des bassins, était susceptible de contenir les amibes et pourrait être la cause de leur contamination. Les amibes entraînées par le ruissellement des pluies sur le sol, comme nous l'avions suggéré en 2011, seraient alors ramenées vers le lit de la rivière et entraînées par le courant d'eau chaude vers les bassins.

Nous avons testé cette hypothèse en réalisant une étude sur les 4 sites les plus fréquentés de Guadeloupe (Bain de Dolé, Bains Jaunes, Bain des Amours et Matouba) présentant chacun un aménagement particulier décrit ci-dessous.

En analysant la configuration des bains, nous constatons que dans les quatre cas testés, l'eau provenant des sources est acheminée sur des distances assez variables avant d'alimenter les bassins. Les amibes pathogènes ont donc été recherchées au niveau des captages, puis à

l'arrivée de l'eau dans les bassins, de même que dans la terre entre ces deux points ou en amont, juste au dessus du bassin (Méthode n°3, Matériels et méthodes). Le comptage a été effectué par la méthode NPP.

1.13.1. Configuration des bains étudiés

Dans le cas du Bain des Amours, la source située à proximité du bassin, émerge de la roche à seulement 3 mètres en amont, l'eau est aussitôt captée dans un petit regard en béton à partir duquel émergent trois tuyaux qui alimentent directement le bassin carrelé (Fig. 42A, B, C).

Le cas du Bain de Dolé est très différent car la source est assez éloignée du bassin, située à 30m en amont. Il s'agit d'une émergence souterraine captée dans une première retenue d'eau en béton, construite à 6m de profondeur dans le rocher. L'eau est ensuite remontée par une pompe (Fig. 42D) et canalisée dans un tuyau souterrain pour alimenter l'usine d'embouteillage d'eau minérale. Le trop plein, rejeté directement dans la nature (Fig. 42E), court sur le sol, alimente plusieurs bassins naturels dans les rochers avant d'être guidé par une structure bétonnée à l'air libre dans le Bain de Dolé (Fig. 42F), à la suite d'un parcours sous la végétation.

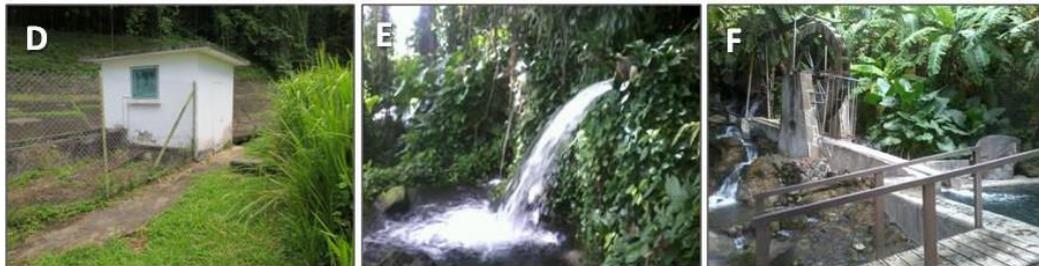
Le troisième cas qui nous intéresse est celui des Bains Jaunes au pied de la Soufrière, il s'agit d'une source de débordement qui émerge de la roche directement dans le bassin aménagé de longue date (Fig. 42G, H, I). Dans ce cas, le trajet parcouru entre la source et le bain est quasiment nul ; seule la paroi rocheuse naturelle du bassin est susceptible d'apporter des sédiments.

Enfin, le dernier cas que nous avons étudié est celui de la source de Matouba alimentant d'un côté le Bain Chaud (Fig. 42J) et de l'autre la Clinique des Eaux-Vives à St-Claude (Fig. 42L). L'eau hyperthermale (50-60°C) émerge d'une source artésienne qui est captée dans des tuyaux pour alimenter la clinique, tandis que le trop plein est canalisé à l'air libre pour alimenter le Bain Chaud de Matouba (Fig. 42J). Celui-ci est situé dans les hauteurs (1055m d'altitude) en pleine forêt tropicale à 1100m du dôme de la Soufrière comme on l'a vu dans le chapitre Matériels et Méthodes. L'eau canalisée dès sa sortie est acheminée jusqu'à la clinique, située à 3 km en contrebas, par un système de tuyaux disposés au sol à travers la forêt (Fig. 42K). A l'arrivée dans la clinique, l'eau chaude traversait un ancien dispositif à UV hors d'usage avant d'être déversée dans un bassin à disposition des curistes.

Bain des Amours



Bain de Dolé



Bains Jaunes



Bain de Matouba



Figure 42. Configuration de l'alimentation en eau des bains chauds les plus fréquentés. (A, B, C) Bain des Amours ; (D, E, F) Bain de Dolé ; (G, H, I) Bains Jaunes ; (J) Bain chaud de Matouba ; (K) Alimentation dans la forêt ; (L) Clinique des Eaux-Vives.

1.13.2. Mise en évidence de *N. fowleri* dans l'eau, à la source, à l'arrivée des bassins et dans les sols

Dans cette expérience renouvelée trois fois, 11L d'eau ont été prélevés d'abord à la source, puis à l'arrivée des bassins, à l'exception du Bain chaud de Matouba pour lequel seulement 2L ont été récupérés, compte tenu de la longue marche à effectuer en forêt tropicale sur les pentes du volcan. La source des Bains Jaunes se trouvant à l'intérieur du bassin, l'eau a été prélevée directement au niveau de l'émergence, lors des vidanges et nettoyages mensuels du bassin par le Parc National. Des échantillons de la terre localisée juste en amont et à proximité des bassins ont également été récupérés et testés à chaque fois.

Les résultats obtenus révèlent de façon rassurante que toutes les sources sont dépourvues d'amibes thermophiles au niveau de leur émergence (Tableau 21A). En revanche, *N. fowleri* a été détectée au moins une fois dans l'eau de tous les bassins, à l'exception du Bain des Amours (Tableau 21A). Le Bain de Matouba et celui de la Clinique étaient les plus contaminés par l'amibe pathogène. De façon tout à fait remarquable également, si *N. fowleri* a été détectée dans l'eau à l'arrivée dans le bassin de la clinique au début de l'expérimentation, en mars et en avril, elle n'a plus été retrouvée par la suite, en mai, après avoir supprimé l'ancien appareil de traitement par les UV dans lequel circulait l'eau chaude et après l'avoir remplacé par une tuyauterie neuve. Il avait probablement un rôle dans le développement des amibes et la contamination de cette station.

Alors que nous n'avons pas trouvé d'amibes thermophiles à l'émergence des différentes sources, notre étude montre qu'elles sont présentes en grand nombre dans la terre en amont de tous les bains, confirmant ainsi l'hypothèse de la contamination par les sols. En ce qui concerne plus particulièrement l'amibe pathogène, *N. fowleri* a été retrouvée dans les sols au moment de nos investigations, en amont du Bain de Dolé et en amont du Bain chaud de Matouba (Tableau 21B).

On constate plus précisément, à la lecture de ce tableau, que les amibes thermophiles sont présentes dans la terre en nombre plus important en amont du Bain de Dolé (52-1033 AT/g) et en amont du Bain des Amours (110-696 AT/g), alors que nous n'en avons détecté qu'une faible proportion en amont des Bains Jaunes (2-97 AT/g) et du Bain chaud de Matouba (6-58 AT/g). Par contre, *N. fowleri* a surtout été détectée dans la terre en amont du Bain chaud de Matouba, là où nous n'avons pas trouvé beaucoup d'amibes thermophiles, confirmant ainsi l'hypothèse de la compétition entre ces espèces et l'hypothèse de la "niche vide" (Tableau 21B).

Tableaux 21. (A) Nombre de *N. fowleri* par litre (*Nf/L*) déterminé par la méthode NPP, à l'émergence et à l'arrivée des eaux chaudes des Bain de Dolé, Bains Jaunes, Bain des Amours et de la Clinique des Eaux-Vives. (*) Après avoir retiré l'appareillage à U.V et installé des tuyaux neufs.

(B) Nombre d'amibes totales (AT/g) et de *N. fowleri* par gramme (*Nf/g*) de terre déterminée par la méthode NPP, en amont et près des bassins (Moussa *et al.* 2014).

A	Bain de Dolé		Bains Jaunes		Bain des Amours		Matouba		
	Origine	Bassin	Origine	Bassin	Origine	Bassin	Origine	Bassin	Clinique
Moyenne T°C	32	32	32	30	34	34	58	39	34
<i>Nf/L</i> Mars [95% IC]	<2	2 [1-14]	<2	<2	<2	<2	<2	8 [3-22]	0,4 [0,1-1,6]
<i>Nf/L</i> Avril [95% IC]	<2	0	<2	<2	<2	<2	<2	2 [1-14]	7 [3-20]
<i>Nf/L</i> Mai [95% IC]	<2	0,2 [0,1-1,4]	<2	0,7 [0,3-2]	<2	<2	<2	7 [3-20]	<2*

B	Bain de Dolé		Bains Jaunes		Bain des Amours		Matouba	
	AT/g	<i>Nf/g</i>	AT/g	<i>Nf/g</i>	AT/g	<i>Nf/g</i>	AT/g	<i>Nf/g</i>
Echantillon 1	461 [206-1033]	<2	7 [2-20]	<2	241 [110-529]	<2	14 [6-32]	2 [1-14]
Echantillon 2	141 [60-330]	2 [1-14]	10 [4-25]	<2	321 [150-696]	<2	29 [14-58]	2 [1-14]
Echantillon 3	122 [52-285]	<2	48 [24-97]	<2	>461	<2	17 [8-37]	<2

1.14. Validation des méthodes de dénombrement des amibes

Les expérimentations présentées dans ce paragraphe ont été réalisées au cours du stage de Master 1 d'Océane Tissot. Nous avons comparé les différentes méthodes de détection que nous utilisons de façon à pouvoir optimiser la suite de nos investigations.

1.14.1. Comparaison des méthodes de comptage des amibes, méthodes CFU et NPP

La méthode de comptage des colonies (CFU) qui émergent des filtres en culture, que nous avons mise au point au début de notre étude, permet une estimation convenable du nombre d'amibes initialement présentes sur le filtre, mais manque de précision et ne donne pas d'intervalle de confiance. De plus, cette technique risque de sous-estimer le nombre d'amibes car plusieurs trophozoïtes ou kystes différents peuvent être à l'origine d'une même colonie.

Afin de vérifier cette hypothèse et pour trouver la meilleure méthode de dénombrement des amibes, nous avons comparé la méthode de comptage des CFU d'une part et l'estimation de leur nombre le plus probable (NPP) d'autre part. Cette expérience renouvelée trois fois au cours des mois de janvier-février 2013 a été réalisée à partir de prélèvements d'eau et de sédiments de 500ml au Bain de Dolé. Les moyennes des comptages ($n=3$, \pm SD) des amibes thermophiles totales et de *N. fowleri* sont reportées dans les histogrammes ci-dessous (Fig. 43). La comparaison des méthodes de comptages CFU et NPP a également été réalisée dans une autre expérience, à partir d'eau prélevée aux Bains Jaunes, préalablement filtrée au laboratoire et dopée par une souche de *N. fowleri* à raison de 500, 50 et 5 amibes par litre (résultats non présentés).

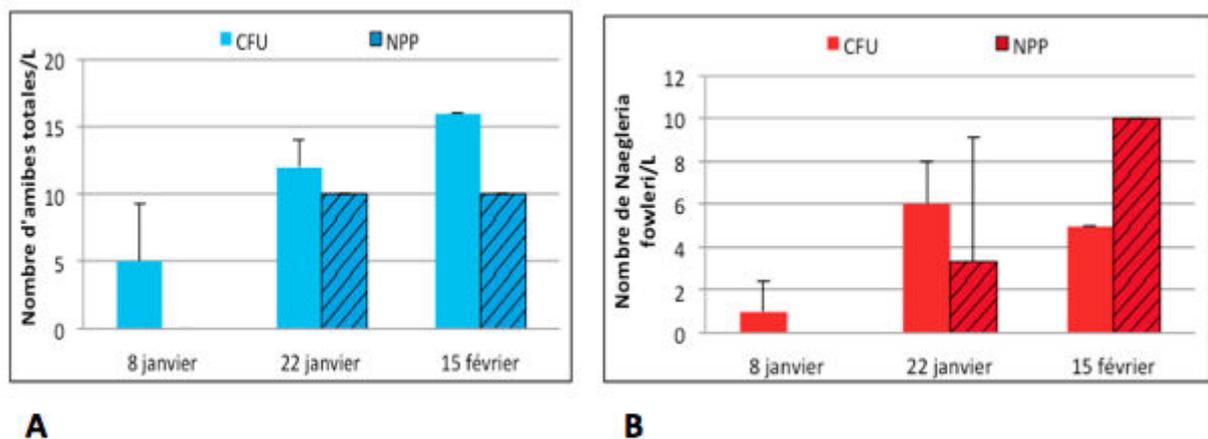


Figure 43. Comparaison des nombres (A) d'amibes thermophiles totales et (B) de *N. fowleri* par litre d'eau du Bain de Dolé (moy \pm SD, $n = 3$) à trois dates successives, obtenus par la méthode de comptage des CFU et par l'estimation du NPP (rapport de Master d'Océane Tissot, 2013).

Dans ces expériences qui restent toutefois préliminaires, compte tenu à la fois du faible nombre d'échantillons analysés, du faible nombre d'amibes dans l'eau de l'environnement, des données manquantes et de l'écart-type élevé sur certains points, la comparaison statistique des données, par le test non paramétrique de Wilcoxon, n'a pas détecté de différence significative entre le comptage direct des colonies (CFU) et l'estimation du NPP, que ce soit pour l'une ou l'autre des espèces. La technique de comptage direct des colonies offre donc, dans nos conditions expérimentales, le même niveau d'efficacité que l'estimation du nombre le plus probable.

De plus, quelques expériences complémentaires ont été réalisées pour comparer l'efficacité du comptage des amibes par CFU et NPP, après centrifugation ou filtration

d'échantillons d'eau prélevés à Dolé, mais n'ont pas révélé non plus de différence significative entre les deux méthodes (résultats non présentés).

1.14.2. Simplification de la méthode d'estimation du nombre le plus probable

La méthode CFU, à la fois simple et rapide, s'étant révélée statistiquement aussi efficace que la méthode NPP, plus lourde à mettre en œuvre, nous avons imaginé un moyen de combiner la simplicité de l'une avec la précision statistique de l'autre, en mettant au point une méthode NPP simplifiée. Comme nous l'avons décrite au chapitre des Matériels et Méthodes, cette méthode consiste à filtrer séparément 1L d'eau sur un premier filtre d'une part, et 100 ml d'eau sur un second filtre d'autre part, de découper chacun des filtres en 10 pièces pour obtenir les répétitions de la méthode NPP, de compter les colonies qui émergent des morceaux de filtres en culture comme dans la méthode CFU et de reporter les résultats des répétitions sur les tables statistiques NPP.

Nous avons comparé ces deux types de comptages pour les amibes libres thermophiles et pour *N. fowleri*, à partir de 24 échantillons d'eau, dont 19 provenaient directement de l'environnement et 5 autres provenait d'une eau d'environnement dopée par des concentrations successives de 36, 18, 8, 4 et 2 *N. fowleri* par litre. Les résultats sont reportés dans le tableau 22.

Tableau 22. Comparaison du nombre d'amibes thermophiles totales et de *N. fowleri* obtenues par la méthode NPP classique et par la méthode NPP simplifiée. * Echantillons 20, 21, 22, 23, 24 : eau dopée avec les concentrations respectives de 36, 18, 8, 4, 2 *N.f/L*.

Echantillons	Amibes libres thermophiles						<i>Naegleria fowleri</i>					
	Méthode NPP classique			Méthode NPP simplifiée			Méthode NPP classique			Méthode NPP simplifiée		
	Boîtes positives			Filtres positifs			Boîtes positives			Filtres positifs		
	100 ml	10 ml	Nombre NPP	100 ml	10 ml	Nombre NPP	100 ml	10 ml	Nombre NPP	100 ml	10 ml	Nombre NPP
1	10	3	86 [39-191]	9	6	80 [37-175]	3	0	7 [3-20]	1	2	6 [2-19]
2	3	3	14 [6-31]	5	3	21 [10-43]	0	0	<2	0	0	<2
3	10	10	>461	10	10	>461	0	0	<2	0	0	<2
4	1	0	2 [1-14]	1	0	2 [1-14]	0	0	<2	0	0	<2
5	0	0	<2	0	0	<2	0	0	<2	0	0	<2
6	10	10	>461	10	10	>461	0	0	<2	0	0	<2
7	10	8	321[150-696]	10	7	241 [110-529]	0	0	<2	0	0	<2
8	1	0	2 [1-14]	2	0	5 [1-16]	0	0	<2	1	0	2 [1-14]
9	0	0	<2	0	0	<2	0	0	<2	0	0	<2
10	1	0	2 [1-14]	1	0	2 [1-14]	0	0	<2	0	0	<2
11	3	0	7 [3-20]	0	0	<2	0	0	<2	0	0	<2
12	7	0	21[10-43]	4	1	12[5-28]	0	0	<2	0	0	<2
13	7	0	21[10-43]	7	4	35 [18-70]	1	0	2 [1-14]	1	0	2 [1-14]
14	10	7	241 [110-529]	10	10	>461	0	0	<2	1	1	4 [1-16]
15	4	0	10[4-25]	7	0	13 [6-30]	0	0	<2	1	0	2 [1-14]
16	2	0	5 [1-16]	5	0	13 [6-30]	0	0	<2	0	0	<2
17	0	0	<2	0	0	<2	0	0	<2	0	0	<2
18	4	1	12 [5-28]	5	0	13 [6-30]	0	0	<2	0	0	<2
19	10	10	>461	10	4	109 [47-253]	0	0	<2	1	0	2 [1-14]
20*	8	0	26 [13-54]	9	0	35 [18-69]	8	0	26 [13-54]	9	0	35 [18-69]
21*	8	0	26 [13-54]	9	0	35 [18-69]	8	0	26 [13-54]	9	0	35 [18-69]
22*	4	1	12 [5-28]	6	0	16 [8-36]	4	1	12 [5-28]	6	0	16 [8-36]
23*	3	0	7 [3-20]	4	0	10 [4-25]	3	0	7 [3-20]	4	0	10 [4-25]
24*	1	0	2 [1-14]	2	0	5 [1-16]	1	0	2 [1-14]	2	0	5 [1-16]

Concernant les amibes libres thermophiles, l'analyse statistique des résultats par le test de Wilcoxon montre qu'il n'y a pas de différence significative entre les deux types de comptages, quelque soit l'échantillon de l'environnement ou d'eau dopée étudié. En revanche, concernant *N. fowleri*, le test appliqué sur les échantillons de 100 ml, montre une augmentation significative du nombre de filtres positifs ($p=0,02$) et un NPP plus élevé ($p=0,009$) avec la méthode NPP simplifiée (Tableau 22).

1.14.3. Effet de la température et de la durée du transport sur le développement des amibes.

La température à laquelle on maintient les prélèvements d'eau pendant le transport jusqu'au laboratoire et la durée de ce trajet sont des facteurs qui peuvent influencer la survie ou le développement des amibes dans les échantillons. Nous avons donc voulu tester ces deux paramètres et étudier leurs effets sur le dénombrement des amibes. En règle générale, les prélèvements d'échantillons biologiques sont transportés à +4°C pour éviter toute dégradation, or, les amibes que nous recherchons étant thermophiles, il nous est apparu intéressant de tester l'effet d'un transport à la température ambiante de notre région, soit environ +30°C. De même, bien qu'un délai de moins de 2h soit généralement préconisé pour l'analyse de l'eau, la localisation des sources chaudes en Guadeloupe, parfois en montagne, nécessite des trajets et des durées de stockage plus longs pouvant atteindre 24h, si l'on devait effectuer les prélèvements sur les îles voisines.

Dans cette expérimentation, 8 prélèvements de 10 litres d'eau ont été réalisés à Dolé (n=8). Chaque prélèvement a été réparti en 10 échantillons, 5 correspondant aux temps de transport à +4°C (1h30, 2h, 4h, 8h, 24h) et 5 autres aux mêmes temps de transport à +30°C (Fig. 44). Ils ont ensuite été filtrés et mis en culture à 44°C, puis les amibes thermophiles ont été dénombrées par la méthode CFU (Matériels et Méthodes). La moyenne des nombres de colonies obtenus ($n = 8 \pm \text{SD}$) pour chaque temps de transport est calculée pour les deux températures (Fig. 44). L'analyse statistique a été réalisée par les tests Wilcoxon et de Kruskal-Wallis.

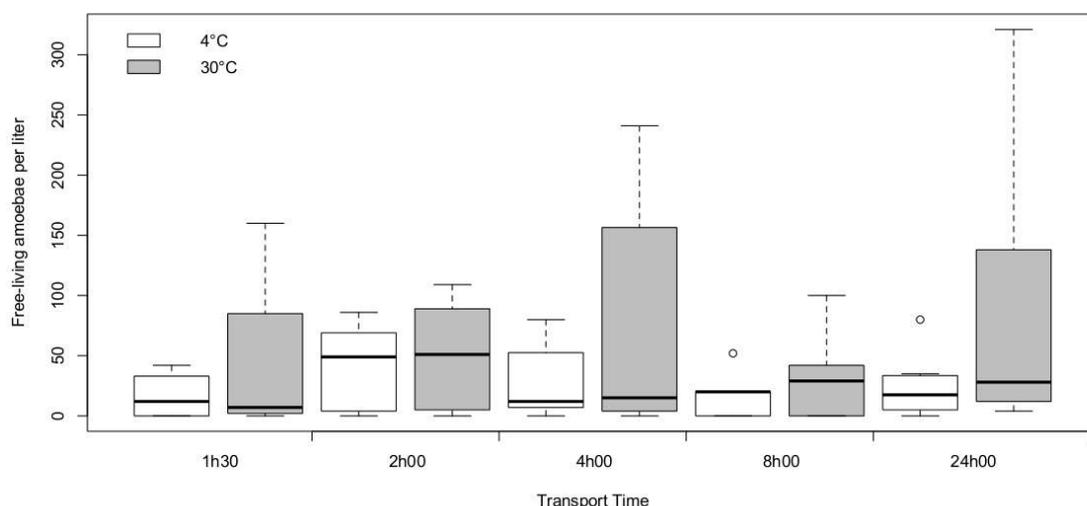


Figure 44. Moyennes ($n = 8 \pm \text{SD}$) du nombre d'amibes thermophiles par litre obtenues après transport à 4°C et 30°C pendant 1h30, 2h, 4h, 8h et 24h, après filtration et mise en culture à 44°C.

Les résultats obtenus montrent que le nombre d'amibes thermophiles présentes dans les prélèvements n'est pas modifié par la durée du transport et du stockage, que ce soit à +4°C ou à +30°C. En revanche, il y a une différence très nette entre les échantillons conservés à +30°C et ceux transportés sur la glace. Le nombre d'amibes thermophiles dénombrées après un transport à 4°C est toujours plus faible qu'à +30°C et de façon significative ($p < 0,01$) (Fig. 44).

1.14.4. La PCR quantitative en temps réel

Afin de pouvoir détecter et estimer les faibles concentrations d'amibes pathogènes présentes dans les eaux de Guadeloupe, nous avons tenté de mettre au point la technique de PCR quantitative (qPCR) en utilisant la technologie SYBR Green, classiquement reconnue pour sa grande sensibilité.

La première étape a été de chercher à discriminer les ADN de *N. fowleri* et de *N. lovaniensis* en recherchant les températures de fusion des amplicons de leurs régions ITS respectives. La deuxième étape, réalisée à partir d'une gamme d'échantillons d'eau ultrapure dopée par une souche de *N. fowleri* connue, a été de définir le nombre minimal d'amibes pouvant être détectées dans nos conditions expérimentales, en traçant la droite exprimant le nombre de cycles seuil (Ct) en fonction de la quantité d'ADN présente (cf. principe de la qPCR, Matériels et Méthodes). La dernière étape enfin, a été de rechercher et d'estimer le nombre de *N. fowleri* présentes dans l'eau prélevée directement dans l'environnement.

1.14.4.1. Caractérisation de *N. fowleri* et de *N. lovaniensis* par qPCR

L'ADN référence # 0359 de *N. fowleri* (3.7 ng/μl) et l'ADN extrait de *N. lovaniensis* (1.5 ng/μl), provenant d'une souche isolée du Bain de Dolé et préalablement identifiée par PCR classique, ont été utilisés pour caractériser ces deux espèces par qPCR. Les courbes de fluorescence, obtenues en fonction du nombre de cycles, nous ont permis de déterminer le cycle seuil de *N. fowleri* (Ct = 19) et le cycle seuil de *N. lovaniensis* (Ct = 25) (Fig. 45).

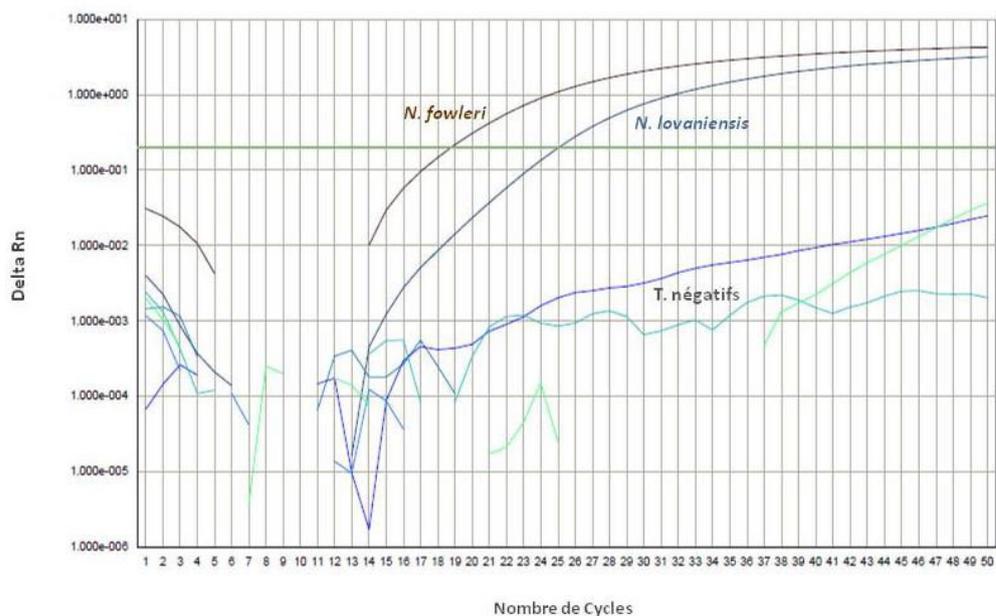


Figure 45. Courbes de fluorescence obtenues en fonction du nombre de cycles pour *N. fowleri*, #0359 (3,7 ng/μl), pour *N. lovaniensis* (1,5 ng/μl) et pour le témoin négatif (eau ultrapure) avec les primers ITS. (Delta Rn) amplitude de fluorescence normalisée, proportionnelle à la quantité de produits PCR générés.

Les courbes de fusion obtenues dans nos expérimentations caractérisent spécifiquement les ADN des deux souches d'amibes étudiées. L'ADN de *N. fowleri* génère 3 pics différents correspondant aux températures de fusion (T_m) de 74°C, 77°C et de 79°C, tandis que l'ADN de *N. lovaniensis* génère seulement 2 pics différents des précédents de $T_m = 76^\circ\text{C}$ et 80°C (Fig. 46).

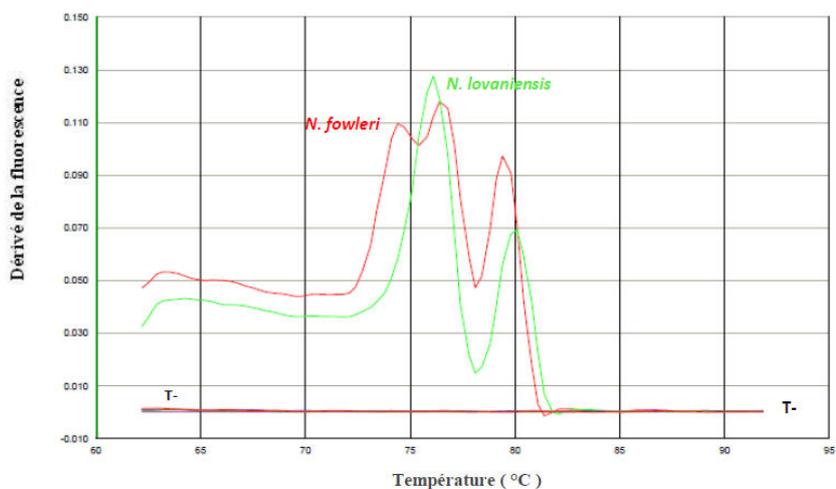


Figure 46. Courbes de fusion obtenues avec l'ADN de *N. fowleri* (#0359) et celui de *N. lovaniensis* exprimées en dérivée de la fluorescence en fonction de la température.

1.14.4.2. Recherche du seuil de détection de la méthode de qPCR

A. Gamme de 2 à 100 amibes dans de l'eau ultrapure

Après avoir vérifié la spécificité de la qPCR, pour discriminer les espèces dans nos conditions expérimentales, nous avons voulu tester la sensibilité de cette technique. Etant donné que les concentrations d'amibes pathogènes retrouvées en Guadeloupe sont très faibles et généralement inférieures à 100 amibes par litre, nous avons réalisé une calibration de la qPCR, en dopant de l'eau ultrapure au laboratoire par une souche de *N. fowleri* préalablement caractérisée par PCR classique, de façon à obtenir une gamme de suspensions cellulaires contenant, après comptage sur cellule de Malassez, les concentrations de 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50 et 100 amibes dans 50ml. Une centrifugation de chaque suspension cellulaire a été réalisée, suivie d'une extraction d'ADN à partir des culots obtenus. Toutefois, les concentrations d'ADN extrêmement faibles de ces échantillons n'ont pas pu être mesurées avec la sensibilité du NanoDrop que nous utilisons.

Dans cette étape de calibration de la qPCR, les courbes de fluorescence des différents échantillons se décalent vers la droite du graphique de façon régulière et quantitative avec des valeurs de Ct inversement proportionnelles au nombre d'amibes présentes dans les échantillons. Avec cette gamme, une limite de détection fiable est obtenue pour l'échantillon contenant uniquement 2 amibes qui est amplifié avec un Ct de 42 cycles. On remarquera toutefois que le Ct obtenu avec 5 et 10 amibes est légèrement plus élevé et atteint 47 cycles (Fig. 47A).

Les courbes de fusion obtenues avec l'ADN témoin #0359 et avec chacun des échantillons de la gamme, y compris l'échantillon ne contenant que 2 amibes, présentent des profils caractéristiques possédant les trois Tm spécifiques de *N. fowleri* de 74, 77 et 79°C (Fig. 47B).

Enfin, la droite standard, exprimant le Ct en fonction du nombre d'amibes dans l'échantillon, que nous avons pu tracer avec les données obtenues par cette gamme, montre que tous les échantillons sont détectables et qu'ils s'alignent sans dispersion, avec un coefficient de détermination $R^2 = 0,76$ et une pente permettant d'estimer l'efficacité de cette PCR quantitative à $E = 27\%$, selon l'équation $E = 10^{(-\text{pente})} - 1$ (Fig. 47C).

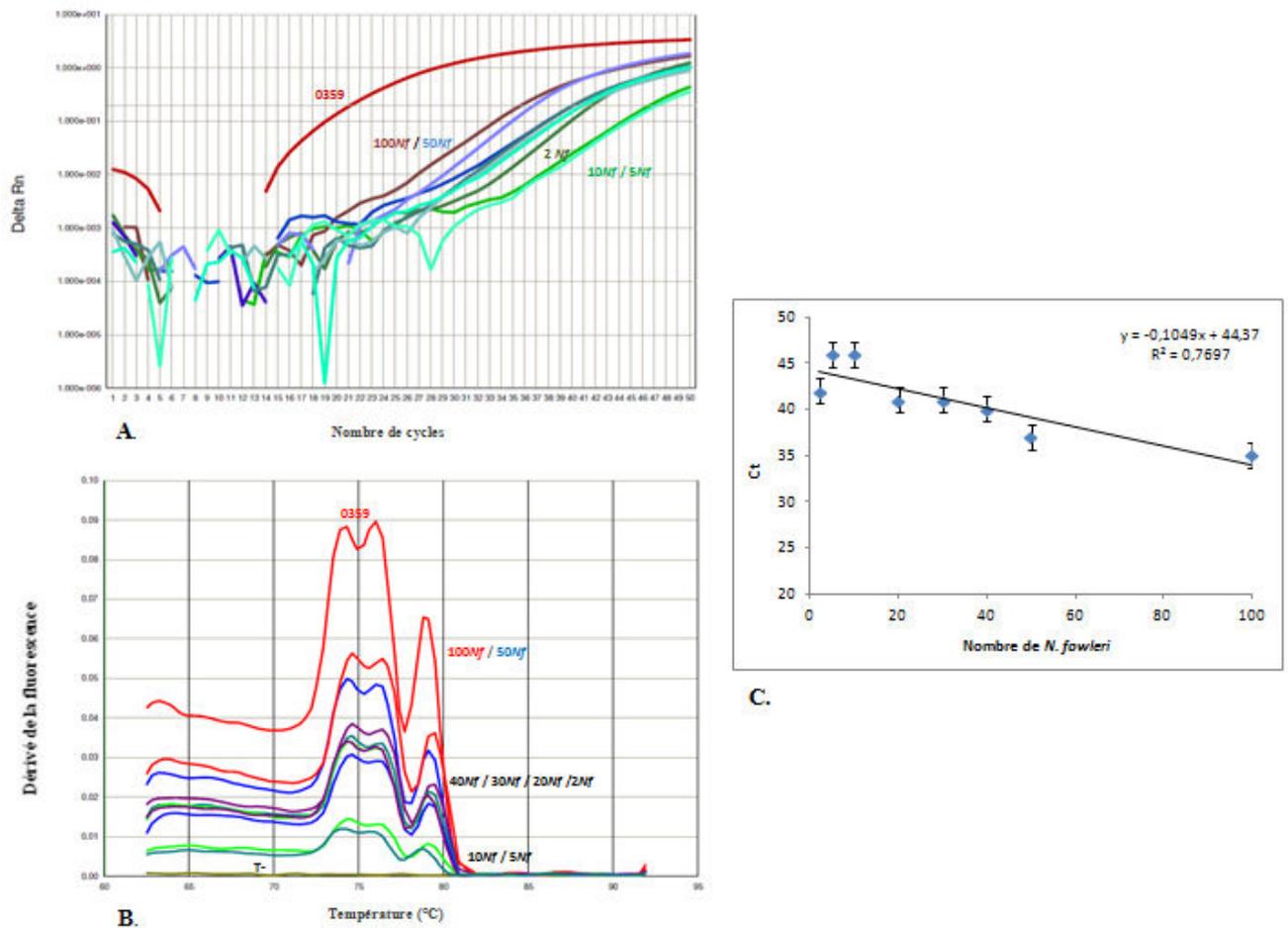


Figure 47. Expérience de qPCR à partir d'eau ultrapure dopée avec une gamme de concentrations de *N. fowleri* allant de 2 à 100 amibes. (A) Courbes de fluorescence en fonction du nombre de cycles, (B) courbes de fusion, (C) droite standard exprimant les Ct en fonction du nombre d'amibes, (#0359) témoin positif ; (T-) témoin négatif (eau ultra pure).

B. Gamme de 2 à 100 amibes dans de l'eau de l'environnement dépourvue de sédiments

Après avoir validé la méthode avec de l'eau ultrapure, nous avons cherché à calibrer la qPCR avec de l'eau de l'environnement. Dans cette expérience, de l'eau limpide de Dolé prélevée dans le bassin principal, a été dopée au laboratoire par une souche de *N. fowleri*, comme précédemment, pour obtenir une gamme de 2 à 100 amibes par échantillon.

Les courbes de fluorescences obtenues avec cette gamme de concentrations sont régulières et révèlent des Ct qui augmentent de façon proportionnelle à la quantité d'ADN présent, en passant de 28 cycles pour 100 amibes à 38 cycles pour l'échantillon ne contenant que 2 cellules (Fig. 48A).

Ce résultat montre que la technique de qPCR, dans nos conditions expérimentales a une sensibilité suffisante pour détecter seulement 2 amibes de l'espèce pathogène *N. fowleri* dans de l'eau de l'environnement dopée et en absence de sédiments. Les courbes de fusion obtenues présentent chacune les 3 pics caractéristiques correspondant aux valeurs de Tm spécifiques de l'ITS de *N. fowleri*, y compris avec l'échantillon de 2 amibes (Fig. 48B).

Enfin, la droite standard, exprimant le Ct en fonction du nombre d'amibes montre à nouveau que tous les échantillons sont détectés et s'alignent avec un coefficient de détermination encore plus robuste que précédemment $R^2 = 0,9$ et une pente indiquant une efficacité de 27% (Fig. 48C).

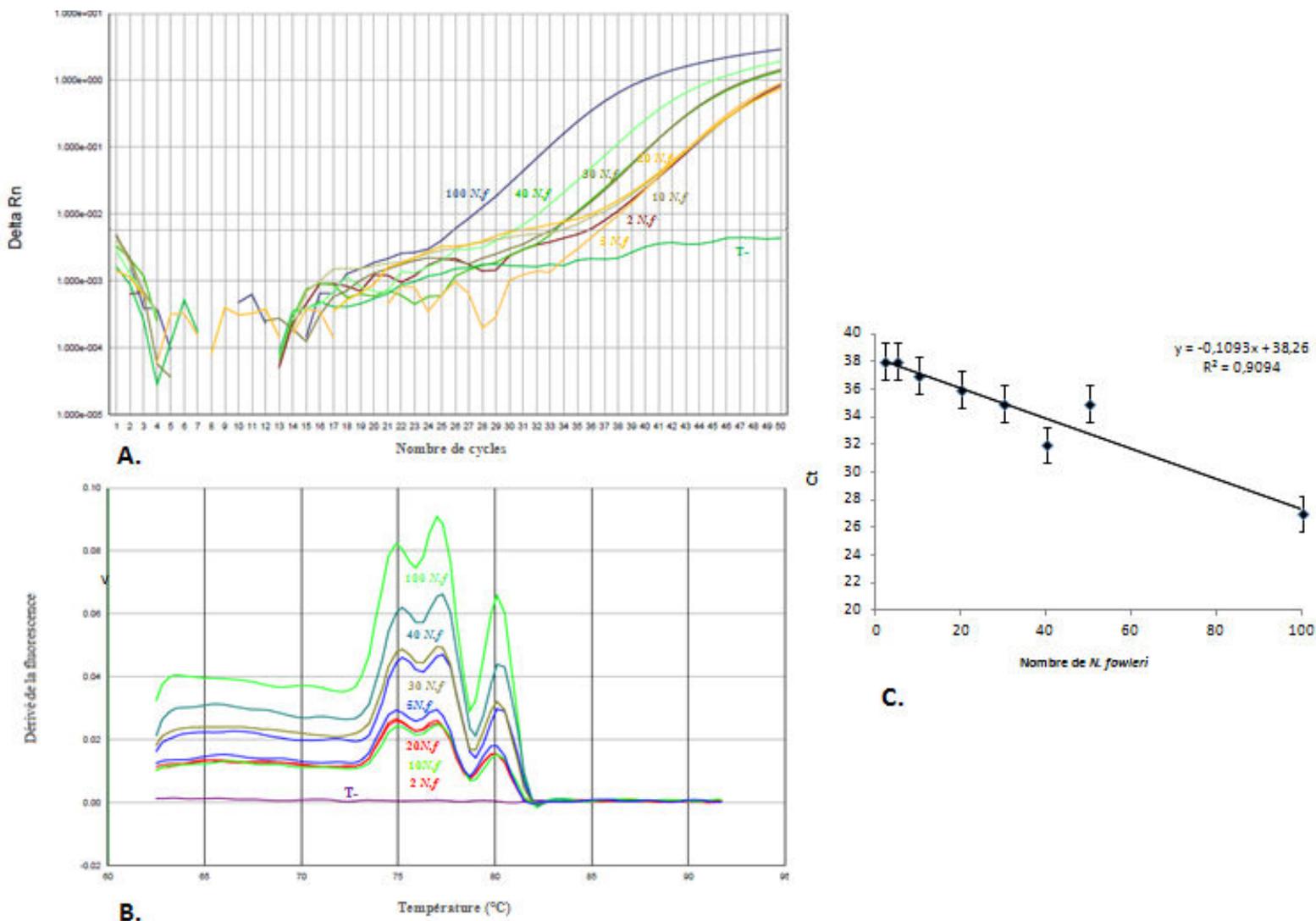


Figure 48. Expérience de qPCR à partir d'eau de Dolé dopée avec une gamme de concentrations de *N. fowleri* allant de 2 à 100 amibes. (A) Courbes de fluorescence en fonction du nombre de cycles, (B) courbes de fusion, (C) droite standard exprimant les CT en fonction du nombre d'amibes, (T-) témoin négatif (eau ultra pure).

C. Gamme de 2 à 100 amibes avec de l'eau de l'environnement avec des sédiments

Avant de tester le dénombrement des amibes par qPCR directement à partir de prélèvements de routine dans les bassins, nous avons voulu confirmer les résultats précédents en refaisant une calibration avec de l'eau prélevée en amont du bassin de Dolé comportant des sédiments. Une gamme de concentrations allant de 2 à 100 *N. fowleri* dans 2ml d'eau a été réalisée dans cette expérimentation. Malheureusement, comme nous pouvons le constater ci-dessous, le dopage des amibes dans de l'eau de l'environnement contenant des sédiments n'a pas donné de résultats en qPCR (Fig. 49A et B). Des courbes de fluorescence irrégulières

apparaissent de façon non spécifique, sans se détacher de la ligne de base et aucune courbe de fusion n'est mise en évidence.

Par ailleurs, nous avons tenté une expérimentation complémentaire à partir de grands volumes d'eau des Bains de la Lise, riches en sédiments (4x5L). Les amibes présentes sur les filtres, identifiées en PCR classique, n'ont pas pu être mises en évidence par qPCR (résultats non illustrés) confirmant ainsi l'effet inhibiteur des sédiments avec cette méthode.

L'ensemble de ces résultats permet de conclure que la technique de qPCR est extrêmement sensible et permet de détecter des concentrations très faibles d'amibes directement à partir de l'eau de l'environnement à condition que celle-ci soit limpide, dépourvue de sédiments, comme c'est le cas dans le Bain de Dolé. Cette nouvelle donnée suggère que la méthode de prélèvement consistant à collecter de l'eau et des sédiments pour un même échantillon, comme nous le faisons dans nos derniers suivis est à proscrire si nous privilégions la détection par qPCR.

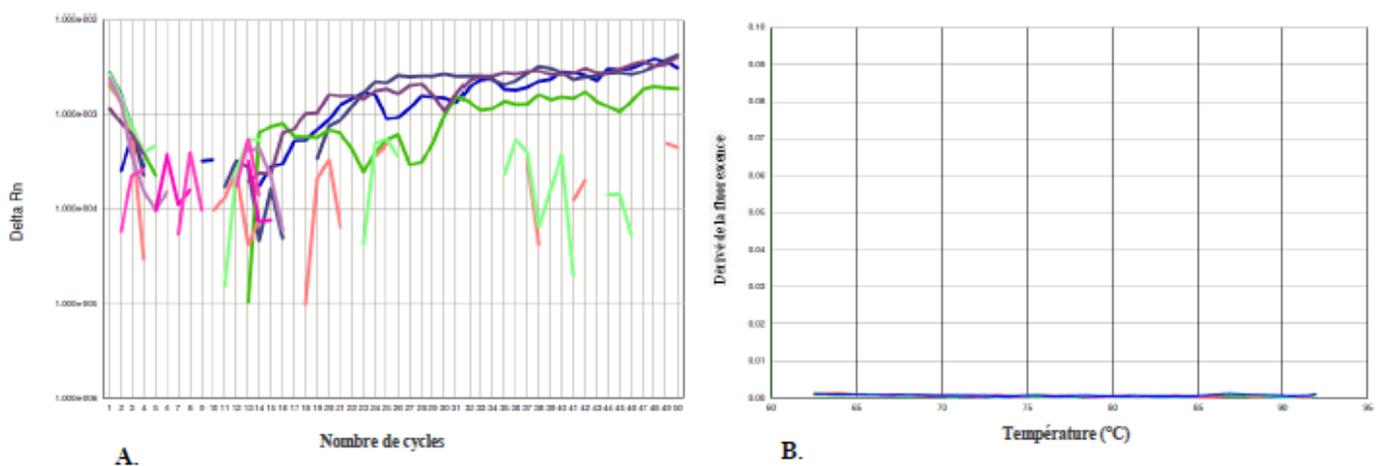


Figure 49. (A) Courbes de fluorescence et (B) courbes de fusion d'une expérience de qPCR réalisée à partir des ADN extraits de prélèvements d'eau de Dolé contenant des sédiments et dopée par une gamme de concentrations allant de 2 à 100 *N. fowleri*.

1.14.5. MALDI-TOF-MS

Comme nous l'avons vu dans le chapitre du Matériels et Méthodes, la technologie MALDI-TOF-MS est une méthode d'analyse par spectrométrie de masse qui peut être utilisée pour l'étude des microorganismes. Elle permet d'identifier une espèce donnée à partir de sa signature protéique mais aussi d'avoir une analyse plus fine en identifiant spécifiquement les protéines du vivant.

La détection des amibes étant assez longue par les techniques classiques, nous avons voulu optimiser nos outils de détections des amibes pathogènes de Guadeloupe en profitant de la rapidité d'analyse du MALDI-TOF-MS. Pour cela nous avons choisi les deux espèces (pathogène et non pathogène) les plus fréquemment rencontrées dans les eaux chaudes. Notre échantillonnage a été réalisé à partir d'une série d'échantillons identifiés au préalable par PCR, sur la base de leur profil ITS et NFITS.

L'analyse MALDI-TOF-MS a été réalisée à partir de 6 souches d'amibes différentes dont 3 de *N. fowleri* en provenance des sources de : Grosse-Corde, Bains Jaunes et Carbet et 3 souches de *N. lovaniensis* provenant des sources de : Bains de Dolé et de la Lise. Chaque souche a été cultivée dans différentes conditions de température, 37°C et 44°C et en présence de 3 espèces de bactéries (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*).

1.14.5.1. Profils protéiques de *N. fowleri* et de *N. lovaniensis*

Les résultats de MALDI-TOF-MS obtenus à partir des 6 souches étudiées sont proches et montrent que les extraits protéiques des amibes génèrent des profils spectraux très reproductibles (Fig. 50A et B), contenant de 20 à 40 pics de rapport masse/charge spécifique (m/z : 2000-7000Da). Le profil spectral obtenu avec la souche de *N. fowleri* isolée du Carbet (Fig. 50A) diffère sensiblement de celui obtenu avec la souche de *N. lovaniensis* provenant de Dolé (Fig. 50B), cultivées dans les mêmes conditions. En effet, l'intensité des signaux correspondant aux pics (m/z : 2000 et 2500Da) est plus importante avec *N. lovaniensis* et on peut remarquer également qu'un pic d'intensité très élevée (m/z : 4134) n'existe que chez *N. fowleri*.

En parallèle, nous avons procédé à des comparaisons de spectres obtenus avec différentes espèces d'amibes cultivées avec différentes souches bactériennes et différentes températures (Fig. 51). Pour *N. fowleri* mise en présence d'*E. coli* à 44°C, nous observons 2 pics (4993,30 et 6224,92Da) que nous ne retrouvons pas à 37°C (Fig. 51D). En revanche, concernant *N. lovaniensis* en présence d'*E. cloacae*, c'est à 37°C, que nous constatons l'apparition de pics supplémentaires. Il s'agit de quatre pics de 2899.80Da, 5128.99Da, 5696.28Da et 7313.29Da non présents sur les profils correspondant à 44°C (Fig. 51E). Les profils de *N. fowleri* mise en culture à 37°C en présence d'*E. cloacae* ou de *K. pneumoniae*, montrent également des différences : 3 pics de 4983.25Da, 6224.09Da et 6738.58Da supplémentaires dans les cultures avec *E. cloacae* (Fig. 51F). Il est important de préciser que

tous les pics supplémentaires observés correspondant aux cultures additionnées de différentes bactéries, n'existent pas dans le profil propre des ces bactéries (résultats non montrés).

Ces observations suggèrent qu'il existe des chemins métaboliques différents selon le type de bactérie dont les amibes se nourrissent, mais aussi en fonction de la température de culture.

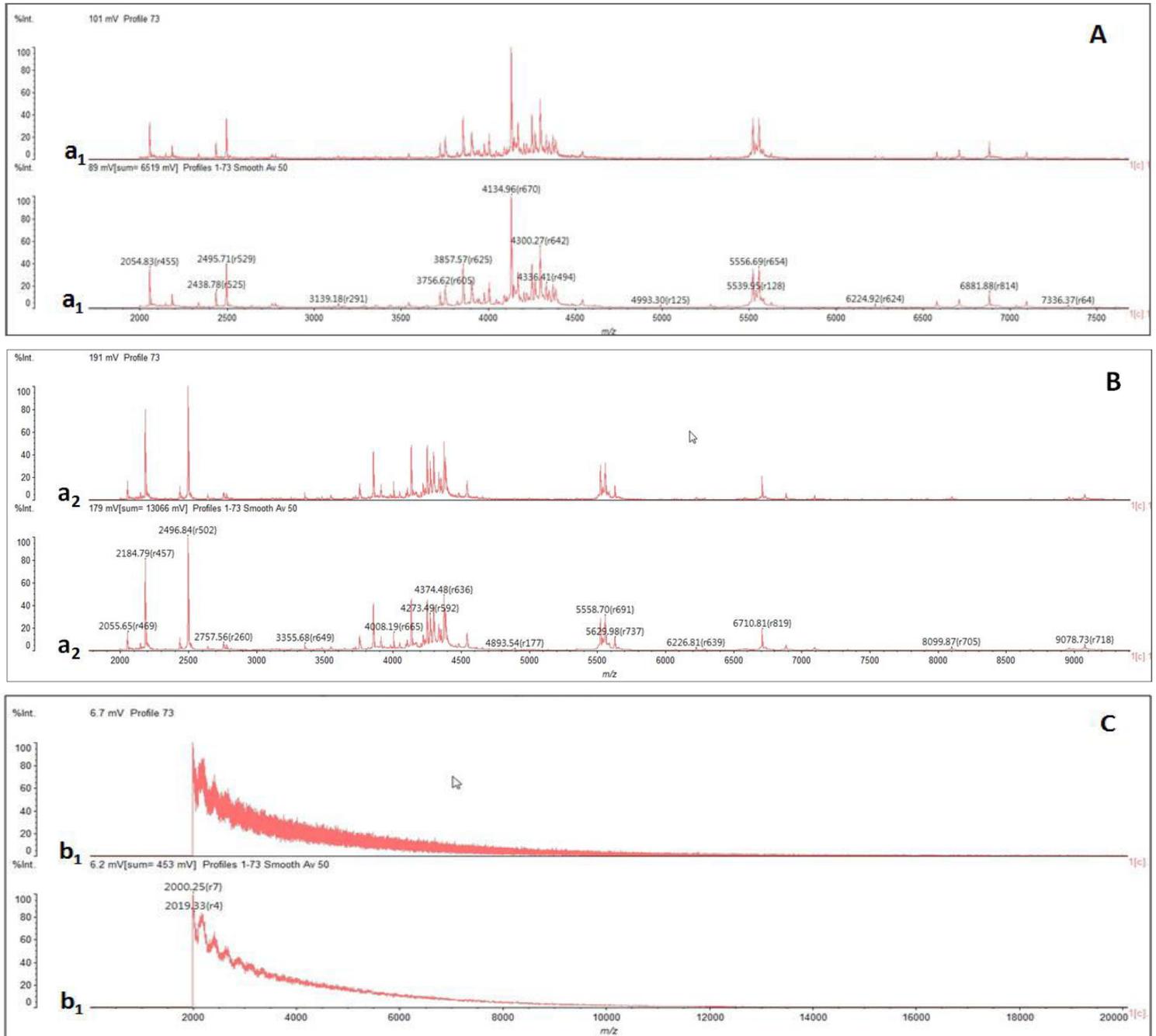


Figure 50. Profils des spectres de masse sur charge m/z (Da) obtenus en MALDI-TOF-MS à partir des extraits protéiques (0,5mg à 1mg). (A) d'une souche de *N. fowleri* du Carbet (a₁) et (B) d'une souche de *N. lovaniensis* de Dolé (a₂), mises en culture en présence d'*E. coli* à 37°C. (C) témoin négatif (eau ultrapure) (b₁).

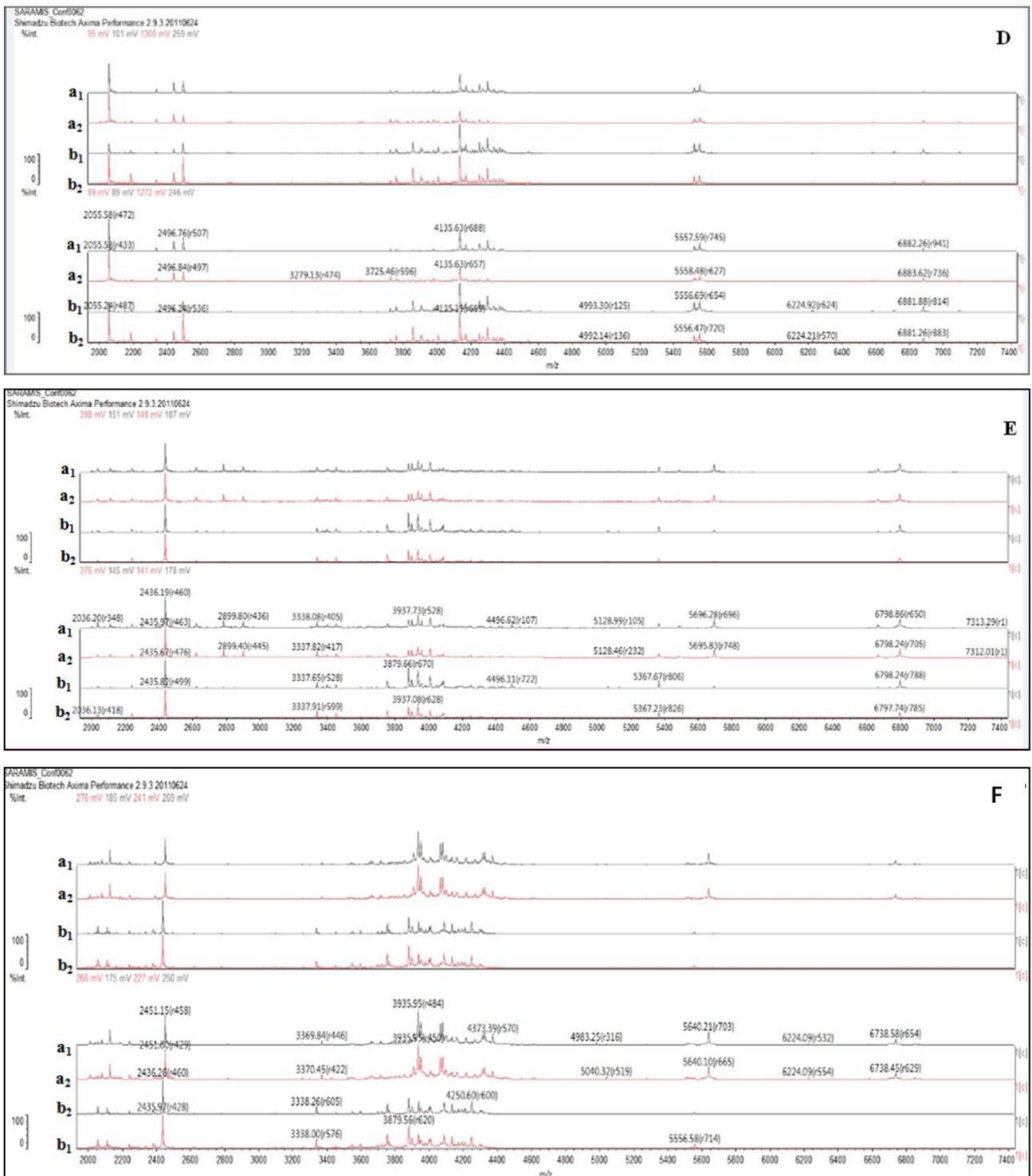
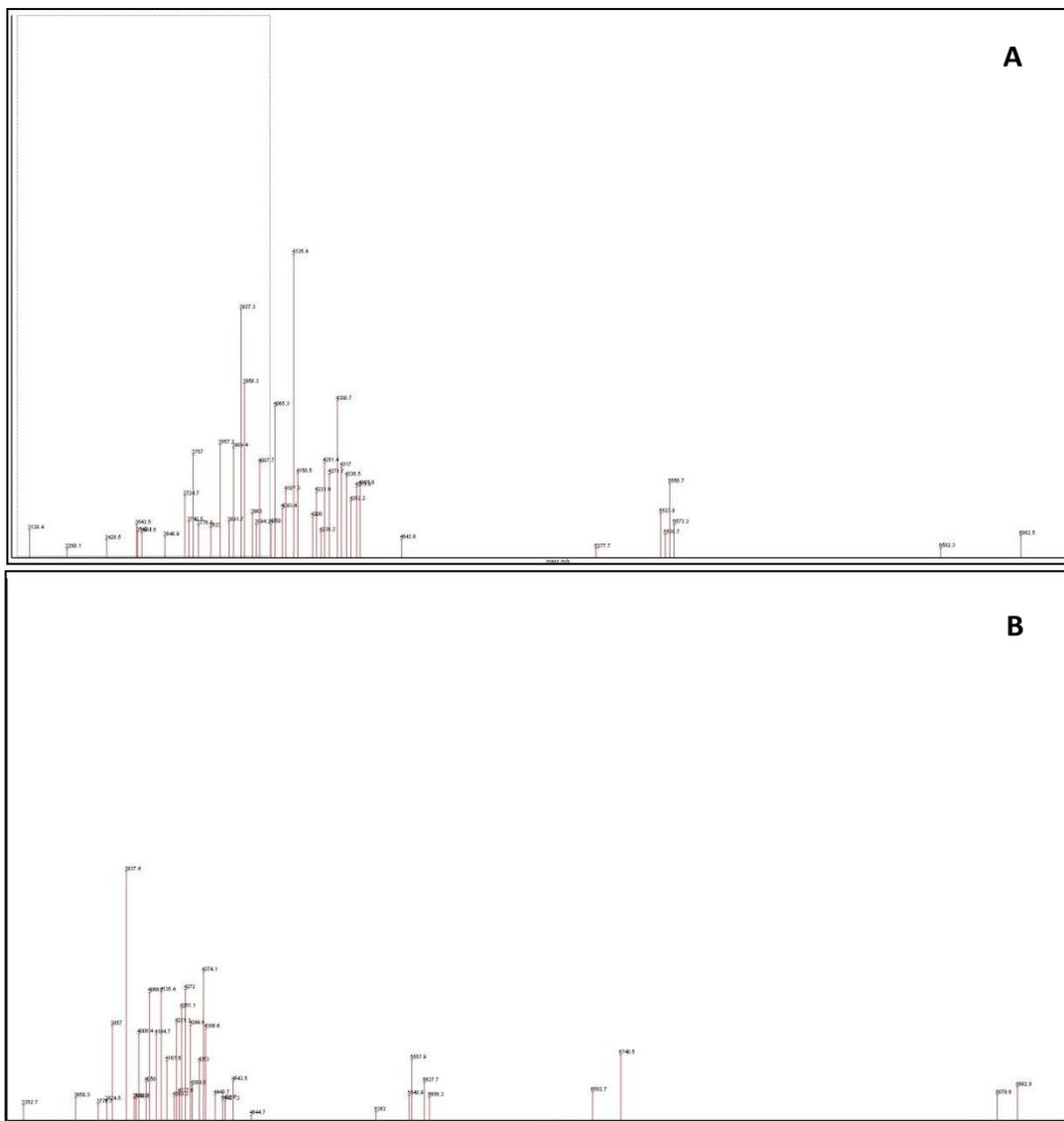


Figure 51. Comparaison des profils spectraux d'extraits protéiques (0,5mg à 1mg) en fonction de la température et de la souche bactérienne mise en présence, à partir du MALDI-TOF-MS: (D) *N. fowleri* mise en culture en présence d'*E. coli* à 37°C (a₁ et a₂) et à 44°C (b₁ et b₂). (E) *N. lovaniensis*, mise en culture en présence d'*E. cloacae* à 37°C (a₁ et a₂) et à 44°C (b₁ et b₂). (F) *N. fowleri*, mise en culture à 37°C en présence d'*E. cloacae* (a₁ et a₂) et *K. pneumoniae* (b₁ et b₂).

1.14.5.2. Création de super-spectres spécifiques de *N. fowleri* et de *N. lovaniensis*

L'ensemble des spectres obtenus précédemment à partir des extraits protéiques des 6 souches mises en culture dans les différentes conditions, mentionnées plus haut, a permis de créer des super-spectres dans le but d'identifier l'espèce d'amibe concernée : *N. fowleri* (Fig. 52A) ou *N. lovaniensis* (Fig. 52B). L'analyse bioinformatique des différents spectres obtenus montre que les souches de *N. lovaniensis* se distinguent des autres microorganismes du vivant à 78% et que les souches de *N. fowleri* sont reconnues pour certaines à 98% (non illustré). Quelques essais dans différentes conditions avec des amibes de genres différents sont encore nécessaires pour affiner les résultats et obtenir des super-spectres plus fiables.



1.15. Etude morphologique de *N. fowleri* et de *N. lovaniensis* en microscopie

Après avoir distingué et caractérisé *N. fowleri* et *N. lovaniensis* à l'échelle moléculaire, nous avons cherché à savoir si l'on pouvait détecter des différences morphologiques, à l'échelle photonique et au microscope électronique à balayage, entre ces deux principales espèces d'amibes libres thermophiles des bains chauds de la Guadeloupe. Des cultures de *N. lovaniensis* provenant du Bain de Dolé et de *N. fowleri* isolées des bassins de la rivière Grosse-Corde et des chutes du Carbet, préalablement identifiées et confirmées par PCR ont été utilisées pour l'observation.

1.15.1. Observation au microscope inversé

Les amibes ont été observées *in vivo* au microscope inversé en fond clair, directement sur la gélose de la boîte de culture, sans utiliser de fixateur (Fig. 53 à 56). Conformément aux données de la littérature, nos résultats confirment que les deux espèces ne peuvent pas être distinguées à l'échelle du microscope optique. L'observation en fond clair montre que les trophozoïtes de *N. fowleri* (Fig. 53) comme ceux de *N. lovaniensis* (Fig. 55), changent constamment de forme, s'allongent, s'arrondissent et se rétractent en permanence (Fig. 53A-D, 55A-D). De même, les kystes des deux espèces sont semblables, ils apparaissent petits, ronds avec un diamètre proche de 10µm (Fig. 53 et 55). L'observation des deux espèces à fort grossissement offre davantage de détails, bien que leurs déplacements constants ne nous permettent pas d'obtenir une mise au point stable. A l'objectif x20 et x40, les kystes matures, au cœur très réfringent et d'un diamètre inférieur à 10µm se distinguent des prékystes plus gros dont on perçoit encore le cytoplasme et dont seule la paroi est entourée d'un liseré noir ou réfringent (Fig. 53B, 53C, 55C, 55D). On observe également la présence de petites vésicules accolées à la paroi des kystes et prékystes, ainsi que sur la membrane plasmique des trophozoïtes (Fig. 53B, 53C, 55C, têtes de flèche).

En observant les cultures en continu, avec enregistrements vidéos, on remarque le déplacement rapide des vésicules d'endocytose à l'intérieur du cytoplasme des trophozoïtes et des prékystes de même que le mouvement des vacuoles contractiles qui se gonflent et se dégonflent rythmiquement (Fig. 53C, 55C, vidéos 1 et 3). On prend conscience ainsi du déplacement des trophozoïtes dont les déformations constantes, sont provoquées par d'importants courants cytoplasmiques qui permettent la projection des pseudopodes (lobopodes) (Fig. 53C, D, Fig. 54A-H, Fig. 55D, Fig. 56A-H, vidéo 3).

On peut surprendre parfois des phénomènes curieux comme le désenkystement d'une amibe dont le pseudopode rentre et sort rythmiquement du kyste à travers l'opercule, pendant que les vésicules bougent au centre du kyste (Fig. 53D). On peut également constater que les trophozoïtes de l'une ou l'autre espèce passent beaucoup de temps à tourner sans cesse autour des kystes (Fig. 53D, 55D) (vidéo 2).

L'observation des colonies en continu permet également de mettre en évidence, non seulement les déplacements, mais également les divisions et fusions fréquentes des trophozoïtes de *N. fowleri* (Fig. 54A-H) et de *N. lovaniensis* (Fig. 56A-H). On découvre ainsi le phénomène assez étonnant d'une amibe qui s'étire pour amorcer une division (Fig. 54A), qui divise son noyau dès les deux premières minutes (Fig. 54B, flèche), puis refusionne ensuite les noyaux fils au bout de 5 min (Fig. 54G, flèche) avant de reconstituer le trophozoïte initial (Fig. 54H). Ce phénomène a également été observé chez *N. lovaniensis* dont les deux cellules filles issues d'un trophozoïte (Fig. 56A) sont restées séparées de plusieurs micromètres pendant une minute entière, reliées par un imperceptible filet de cytoplasme (Fig. 56B-G, flèches) avant de refusionner à nouveau (Fig. 56H).

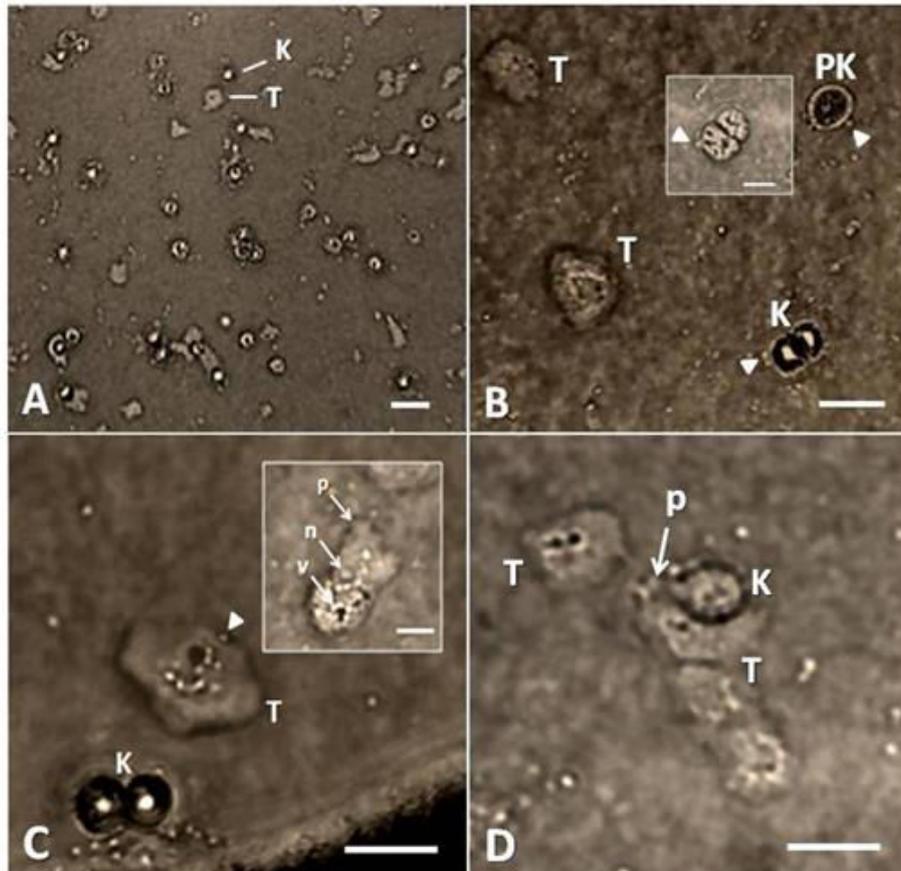


Figure 53. *N. fowleri* observée au microscope inversé. (A) à l'objectif x10, barre = 25 μ m ; (B) à l'objectif x20, barre = 20 μ m ; (C) et (D) à l'objectif x40, Barres = 22 μ m ; (T) trophozoïte ; (PK) prékyste ; (K) Kyste ; (n) noyau ; (p) pseudopode ; (tête flèche) : vésicules.

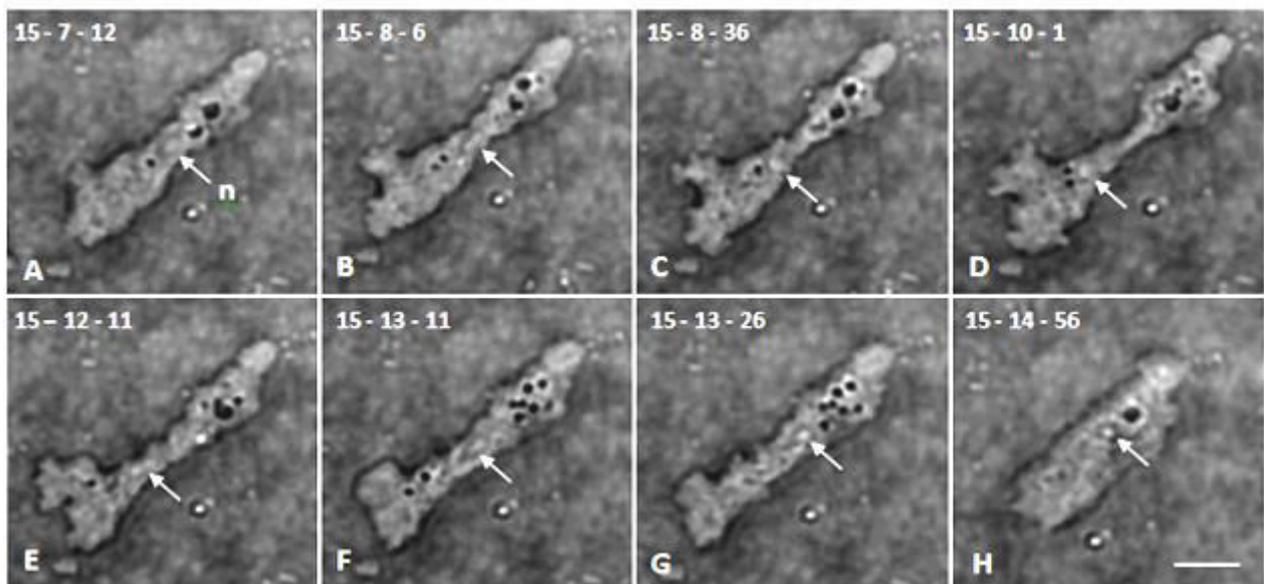


Figure 54. *N. fowleri*, séparation et fusion d'un trophozoïte observées au microscope inversé en fond clair entre 15h 07'12'' et 15h 14'56'' (A à H) ; (n) noyau ; Barre = 15 μ m.

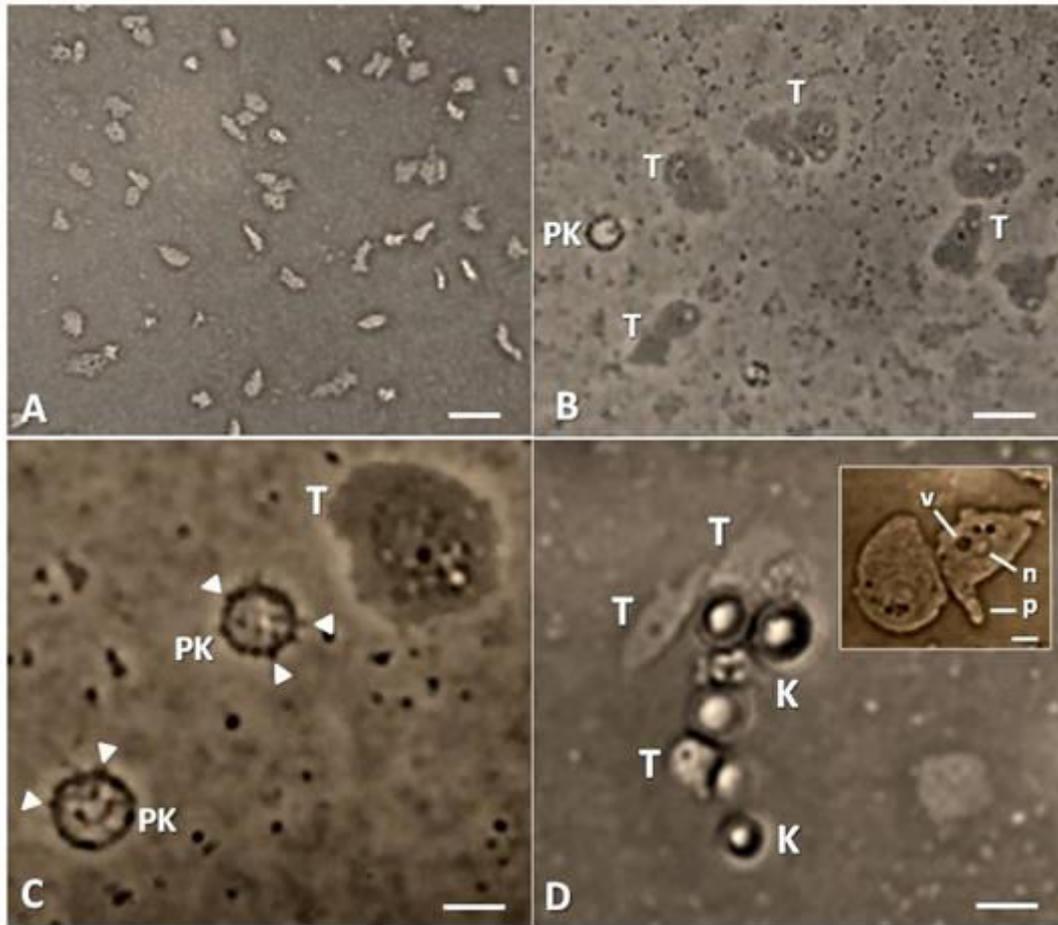


Figure 55. *N. lovaniensis* observées au microscope inversé en fond clair. (A) barre = 50 μm ; (B) barre = 25 μm ; (C) barre = 15 μm et (D) barre = 13 μm ; (T) trophozoïtes ; (PK) prékystes ; (K) kystes ; (p) pseudopode ; (v) vacuole.

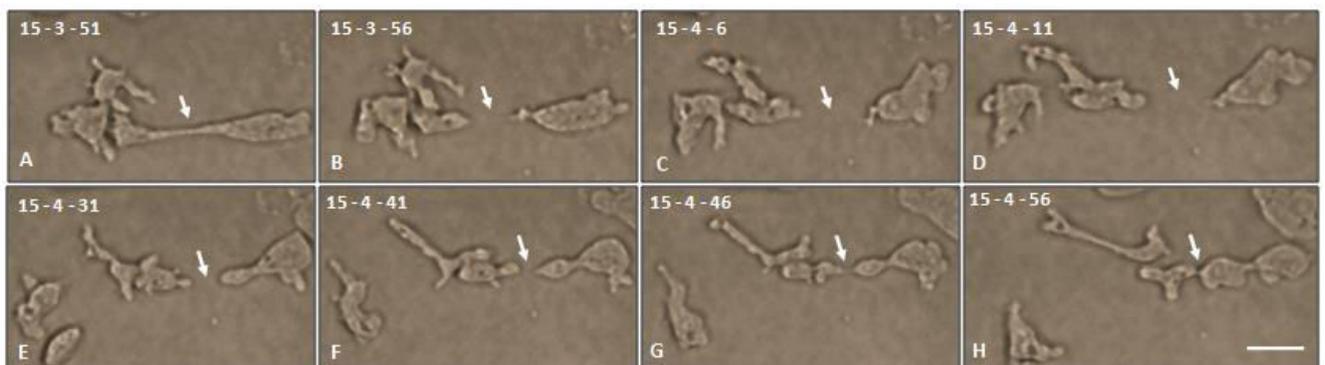


Figure 56. *N. lovaniensis*, séparation et fusion d'un trophozoïte observées au microscope inversé en fond clair entre 15h 03'51" et 15h 04' 56" (A à H) ; Barre = 20 μm .

Des photos prises toutes les 5 secondes nous ont permis de réaliser des vidéos en accéléré (Vidéos 1 et 2) montrant les comportements dynamiques des amibes que nous avons décrits ci-dessus. La vidéo 1 révèle les déplacements des formes trophozoïtes balayant la surface gélosée par émission de pseudopodes. Les trophozoïtes se touchent ou se collent parfois l'un contre l'autre, suggérant de possibles échanges de matériels entre eux. Nous pouvons également observer 2 prékystes accolés bougeant à l'intérieur de la paroi qui sont peut-être en phase de désenkystement. La vidéo 2 met en évidence le déplacement en "locomotive" des trophozoïtes autour des kystes et prékystes.

La vidéo 3, contrairement aux 2 autres, a été tournée en direct et nous a permis de surprendre un flagellé, reconnaissable par sa forme ovale et son mouvement relativement rapide et vigoureux. Nous pouvons remarquer que l'appareil flagellaire n'est pas perceptible dans cette vidéo. Nous voyons de façon assez nette les courants cytoplasmiques évoqués précédemment permettant la formation des lobopodes qui se projettent pour faire avancer la cellule, ainsi que le gonflement et dégonflement des vacuoles.

Vidéo 1. Trophozoïtes et prékystes de *N. fowleri*

<https://dl.dropboxusercontent.com/u/62066251/Carbet-NF-Tropho%2Bkystes.mp4>

Vidéo 2. *N. lovaniensis* : Trophozoïtes tournant autour des kystes

<https://dl.dropboxusercontent.com/u/62066251/N.lovaniensis-Dol%C3%A9.wmv>

Vidéo 3. Trophozoïtes et flagellé de *N. lovaniensis* en mouvement

[https://dl.dropboxusercontent.com/u/62066251/N.%20lovaniensis%20flagell%C3%A9.](https://dl.dropboxusercontent.com/u/62066251/N.%20lovaniensis%20flagell%C3%A9.mov)

[mov](#)

1.15.2. Observation au microscope électronique à balayage (MEB)

Observation de *N. fowleri* :

La fixation d'un front amibien sur la gélose, directement exposée aux vapeurs d'osmium, nous a permis de façon inattendue, de mettre en évidence un phénomène de vésiculation important à la surface des trophozoïtes (Fig. 57A et B). Ceux-ci présentent de nombreuses protubérances ou bulles (*blebs*) sur leur membrane plasmique qui sont libérées ensuite sous forme d'une multitude de petites vésicules d'environ 1µm de diamètre que l'on retrouve éparées sur la gélose (Fig. 57A et B). Ce phénomène de "*blebbing*" préalable à l'enkystement est probablement accentué par l'effet toxique des vapeurs d'osmium. En

revanche, ce type de fixation progressive, maintient les trophozoïtes dans un état relativement turgescent qui ne permet pas de visualiser les amébstomes "*food cups*" classiquement décrits dans la littérature sur des cellules très rétractées ; on ne distingue ici que de petites invaginations rappelant ces formations membranaires caractéristiques (Fig. 57A, B, flèches). Une fixation du front amibien par le glutaraldéhyde en présence de sucrose, suivie d'une post-fixation par immersion dans l'osmium, provoque une rétraction des amibes qui permet de mieux visualiser les nombreuses formations membranaires caractéristiques des cellules phagocytaires, telles que les spicules, les filopodes, les bulles et les lamellipodes qui permettent aux trophozoïtes de se nourrir et de se déplacer autour des kystes (Fig. 57C, D).

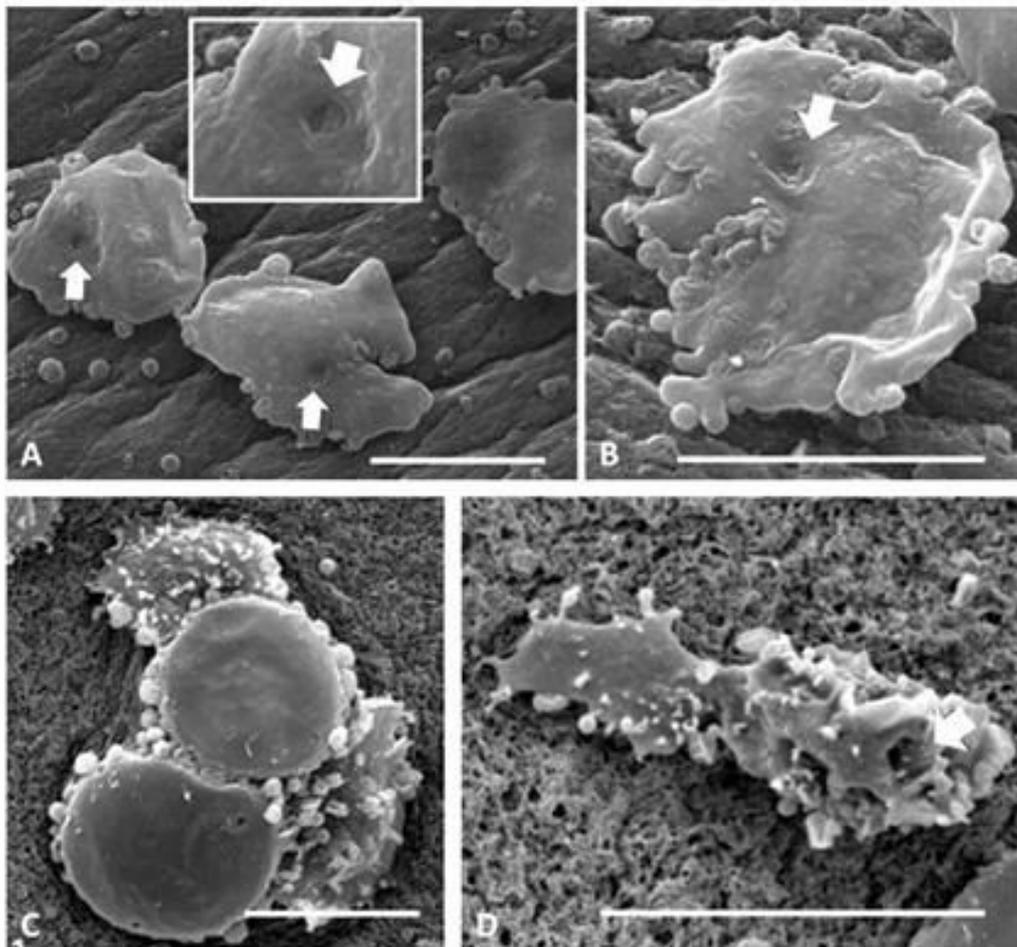


Figure 57. Trophozoïtes et prékystes de *N. fowleri*. (A) trophozoïtes entourés de vésicules sur la gélose, osmium ; (B) trophozoïte formant des vésicules, osmium; (C) trophozoïtes autour des prékystes, glutaraldéhyde/osmium ; (D) trophozoïte en déplacement, glutaraldéhyde/osmium ; (flèche) "*food cup*", barres = 10 μ m.

Observation des kystes et prékystes de *N. fowleri* :

La fixation aux vapeurs d'osmium, directement sur la gélose, nous a permis également de mettre en évidence les différents stades de maturation des kystes et de constater qu'ils présentent à leur périphérie, un important phénomène de vésiculation, analogue à celui des trophozoïtes (Fig. 57A). Cette observation suggère un relargage important de matériel cellulaire dans le milieu de culture au moment de l'enkystement, par un processus particulier d'exocytose dans la région équatoriale du prékyste. Les kystes en fin de maturation, quant à eux, sont de forme discoïde, aplatie, légèrement bombée au centre, ils présentent une paroi lisse avec deux ou trois pores (ostioles) et n'ont presque plus de vésicules associées (Fig. 58B). Dans certains cas, un pseudopode fait saillie sur l'extérieur (Fig. 58C) suggérant la sortie possible du trophozoïte en cours d'enkystement. Enfin, les kystes matures de *N. fowleri* de taille inférieure à 10 μ m et parfaitement sphériques présentent une surface lisse ou très légèrement granuleuse (Fig. 58D).

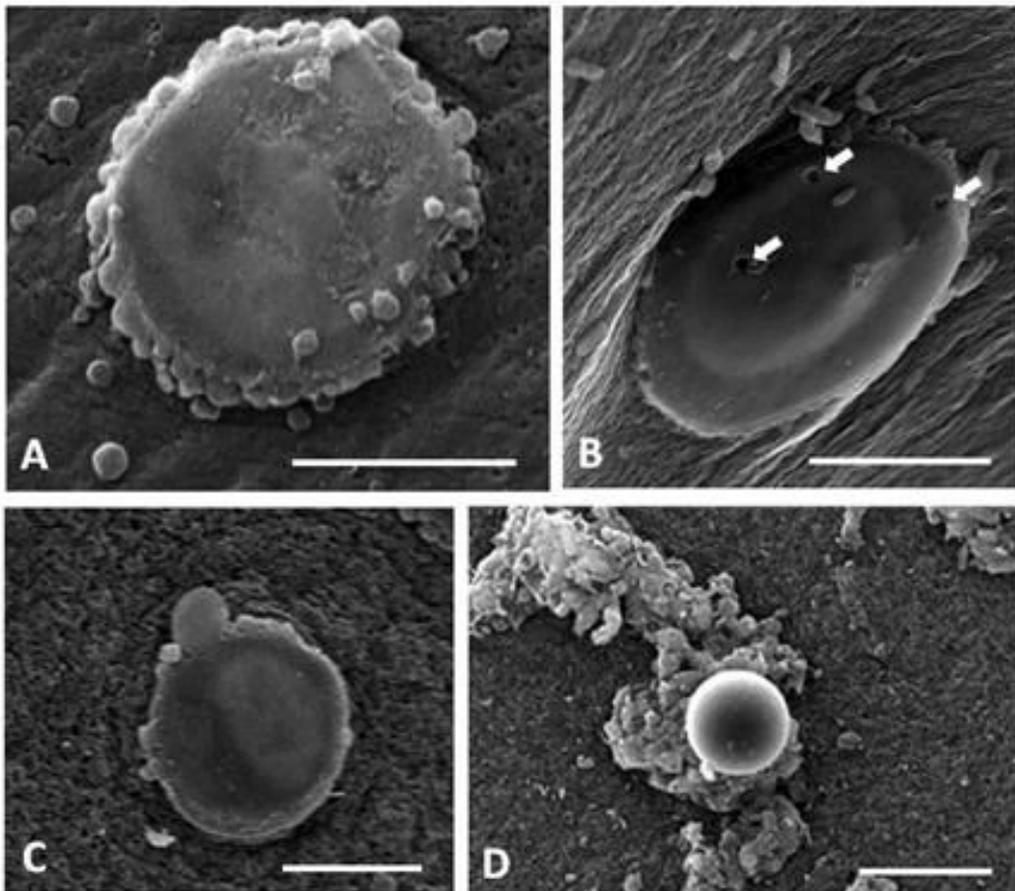


Figure 58. Observation des kystes et prékystes de *N. fowleri*.

(A) prékyste avec vésicules à la périphérie, osmium ; (B) prékyste avec ostioles (flèches), glutaraldéhyde et post-fixation osmium ; (C) prékyste avec pseudopode émergent, osmium ; (D) kyste mature, osmium et post-fixation glutaraldéhyde ; barres = 10 μ m.

Observation des trophozoïtes de *N. lovaniensis* :

La fixation d'une colonie de *N. lovaniensis* aux vapeurs d'osmium, directement sur la gélose, nous a permis de mettre en évidence le même phénomène de *blebbing* que celui découvert chez *N. fowleri* (Fig. 59A, B, flèche), de visualiser la formation de pseudopodes (Fig. 59C, flèche) et d'observer la présence de nombreuses petites invaginations (flèches) gardant la trace des bacilles ingérés, analogues aux "*food cups*" décrits dans la littérature (Fig. 59D).

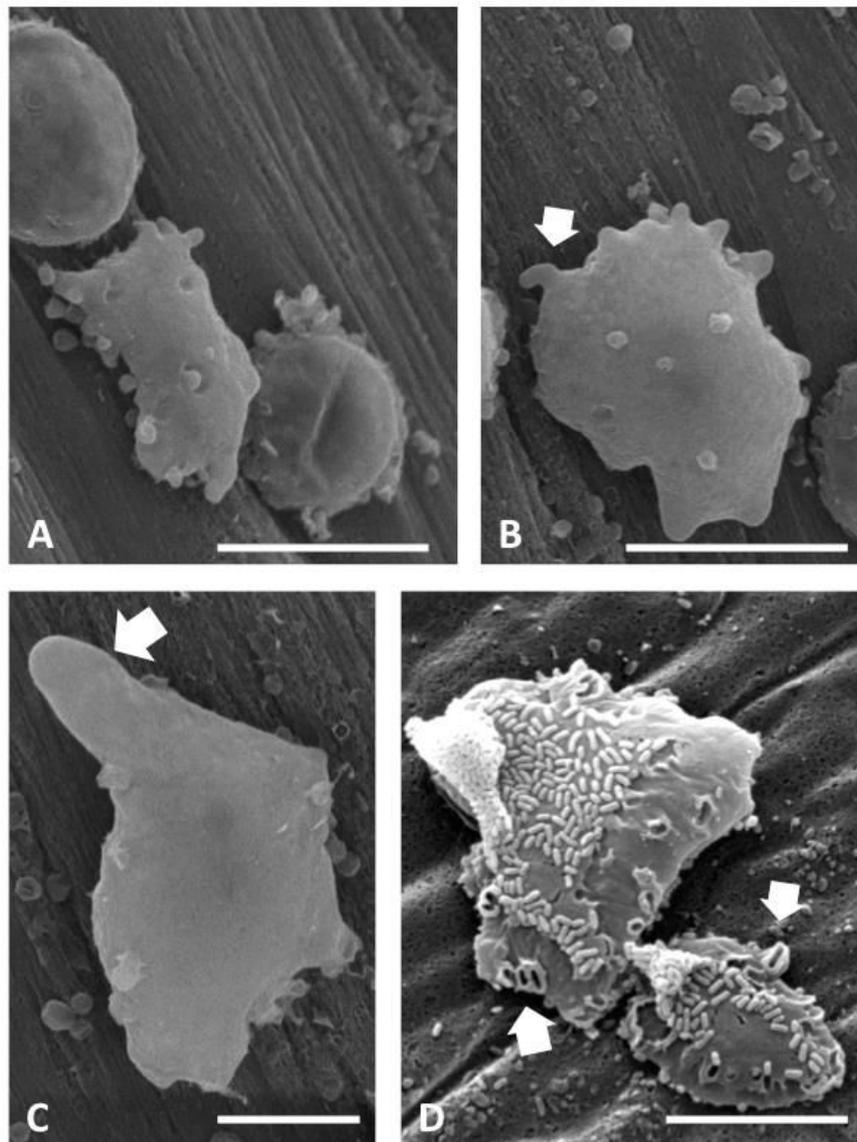


Figure 59. Trophozoïtes de *N. lovaniensis*. (A, B) formation de vésicules (flèche) à la surface des trophozoïtes, osmium, barre = 10 μ m ; (C) formation de pseudopodes (flèche), osmium, barre = 5 μ m ; (D) trophozoïtes avec *food cups* (flèches) couverts de bactéries, osmium, barres =10 μ m.

Observation des kystes et prékystes de *N. lovaniensis* :

Les kystes et prékystes de *N. lovaniensis* fixés directement dans la boîte de culture par les vapeurs d'osmium se présentent, selon les préparations, en masses compactes composées de très nombreux kystes matures agglutinés dans les anfractuosités de la gélose (Fig. 60A et B) ou en amas plus petits de quelques prékystes en cours de maturation, associés à de petites vésicules (Fig. 60C). Les kystes matures sont parfaitement sphériques et possèdent une paroi légèrement granuleuse percée de deux ou trois ostioles (Fig. 60D, flèche).

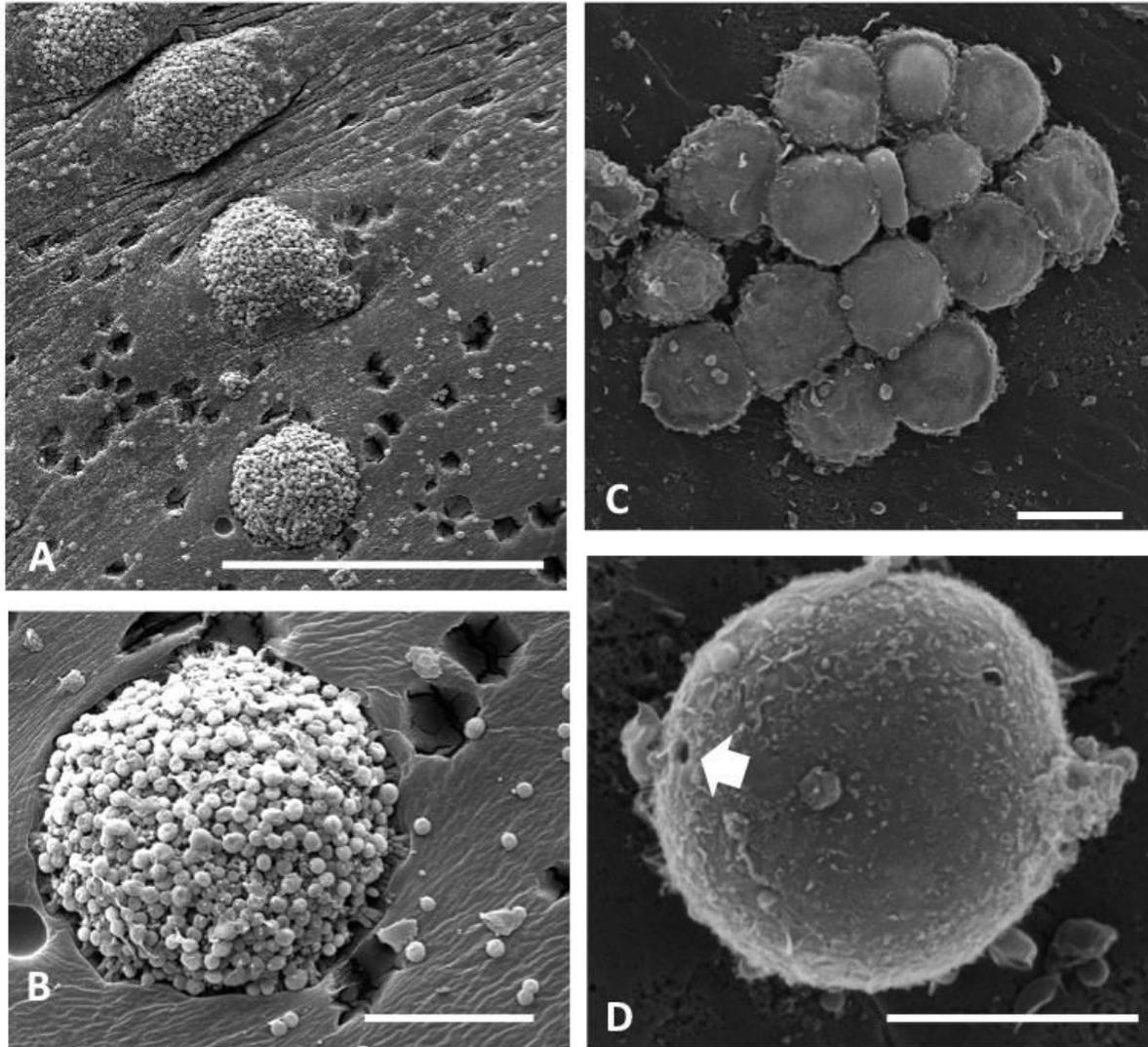


Figure 60. Observation des kystes de *N. lovaniensis*. (A) amas de très nombreux kystes matures sur la gélose, osmium, barre = 500 μ m ; (B) détail d'un amas de kystes matures, osmium, barre = 100 μ m ; (C) amas de prékystes en formation avec vésicules, osmium, barre = 10 μ m ; (D) détail d'un kyste mature avec 2 ostioles (flèche), osmium, barre = 5 μ m.

A l'issue de cette étude en microscopie photonique et électronique à balayage, nous pouvons constater qu'aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre ces deux espèces très proches du point de vue phylogénétique que sont *N. fowleri* et *N. lovaniensis*, quelque soit le stade du cycle végétatif considéré, trophozoïte, prékyste ou kyste mature. Toutefois, la méthode de fixation des amibes directement sur la gélose de la boîte de culture, par les vapeurs d'osmium, que nous avons utilisée a permis de mettre en évidence un important phénomène de vésiculation sur les trophozoïtes et sur les prékystes, jamais décrit dans la littérature jusqu'à présent et dont il reste à caractériser l'ultrastructure au microscope électronique à transmission. En revanche, cette méthode de fixation n'a pas permis d'observer les amebostomes (*food cups*) classiquement décrits en microscopie électronique chez *Naegleria*.

2. Discussion

Ce travail de thèse a permis de réaliser un premier état des connaissances sur les amibes libres thermophiles de la Guadeloupe. En effet, l'étude de ces microorganismes et les conséquences graves que certaines espèces peuvent entraîner, n'avaient encore jamais été véritablement abordées de manière approfondie au niveau local. Bien qu'un suivi mensuel des bains chauds les plus fréquentés ait été initié par l'ARS et l'Institut Pasteur depuis le premier cas de MEAP de 2008 en Guadeloupe, il est apparu important de développer un axe de recherche sur ces amibes libres afin de mieux comprendre les risques de leur présence dans notre environnement. Avant la création de l'équipe dédiée à cette recherche au sein de l'Unité Environnement-Santé, l'analyse de l'eau se limitait au prélèvement des échantillons par l'ARS, à la filtration et mise en culture par l'Institut Pasteur et à l'envoi des boîtes de pétri dans des laboratoires spécialisés de métropole, pour la suite du processus. Ce suivi impliquant un long délai de transport à une température inférieure à 44°C, risquait de favoriser le développement d'amibes non thermophiles et ne nous semblait pas réunir les conditions optimales pour une estimation proche de la réalité du nombre de *N. fowleri*. Il est donc apparu nécessaire, avant de débiter tout projet d'étude sur les amibes libres, de développer une technique de détection dans son intégralité sur place dans notre laboratoire. Après avoir mis en place les méthodes de prélèvement, de mise en culture, de sélection et d'identification, avec le soutien du Docteur Johan De Jonckheere, nous avons commencé les prospections dans toutes les sources géothermales de la Guadeloupe. Le suivi des bains a été réalisé en recherchant tout d'abord la présence ou l'absence des amibes thermophiles dans les prélèvements, sans les compter, de façon à repérer les zones contaminées par l'amibe pathogène et par la suite en estimant le plus précisément possible le nombre d'amibes par litre. Nous avons réussi à détecter et identifier *N. fowleri* par PCR et le séquençage des ADN extraits des souches isolées a permis de confirmer la présence du type 3 Euro-américain, déjà identifié lors du cas de MEAP de 2008. D'après la carte décrivant la distribution et la migration de *N. fowleri* dans le monde (De Jonckheere 2011), nous pouvons donc supposer que le type 3 de la Guadeloupe, située dans l'Arc Antillais, entre la mer des Caraïbes et l'Océan Atlantique Nord, provient du continent nord Américain.

Dès les premiers prélèvements de 2011, nous avons constaté que la plupart des bains chauds de la Guadeloupe hébergeaient des amibes libres pathogènes. Cependant, leur nombre

est relativement faible, inférieur au seuil de 100 *N.f* par litre à ne pas dépasser dans les eaux de baignades, conformément aux recommandations du Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France (CSHPF 1996). Cette faible densité d'amibes thermophiles dans l'eau est une caractéristique des bains chauds de la Guadeloupe qui rend leur détection difficile avec les méthodes de centrifugation, de filtration classique et de comptage du nombre le plus probable.

Nous avons donc rapidement abandonné la technique peu sensible dans nos mains de centrifugation de l'eau prélevée, au profit de la technique de filtration de l'échantillon sur un seul filtre, découpé ensuite en plusieurs pièces avant mise en culture. A l'issue du comptage des clones émergeant des morceaux de filtres après 48h de culture, les données obtenues nous ont permis de faire un premier diagnostic sur la densité et la répartition des deux principales espèces d'amibes thermophiles *N. fowleri* et *N. lovaniensis* rencontrées dans les différents bassins et de mettre en évidence une souche d'*Hartmanella* sp., proche de l'espèce *Vermaobae vermiformis* (anciennement *Hartmanella vermiformis*) dans le Bain de Capès. Les résultats de nos travaux ont conduit l'ARS à lancer une campagne de sensibilisation marquée par l'installation d'affiches de prévention à destination du public.

En général, dans l'environnement, les espèces non pathogènes sont majoritaires par rapport aux espèces pathogènes (Tiewcharoen & Junnu 2001). En effet, il a été démontré qu'après une longue période de conditions favorables stables (température, sédiment, biofilm), l'amibe pathogène finit par être remplacée par d'autres amibes thermophiles non pathogènes (Goudot *et al.* 2012). Nous constatons également ce phénomène en Guadeloupe, en particulier dans le Bain du Carbet-1 (Tableau 14) caractérisé par une eau calme dépassant 40°C, réunissant des conditions favorables à la compétition entre les espèces et dans lequel une concentration un peu plus élevée de *N. lovaniensis* et d'espèces thermophiles autre que *Naegleria* a été détectée. Le cas se présente aussi dans l'eau courante du canal de décharge de la centrale géothermique de Bouillante et de la source du Bain du Curé à Pigeon où n'a été retrouvée que l'espèce non pathogène, *N. lovaniensis*.

Cependant, nos résultats de la première année de suivi, de juin 2011 à juin 2012, ont montré au contraire, que dans la plupart des autres bassins *N. fowleri* était généralement l'espèce la plus fréquemment rencontrée, bien qu'à des taux relativement bas de 2 à 30 amibes /L. C'est le cas dans les bains chauds régulièrement nettoyés (Dolé, Bains Jaunes) de même que dans les bassins naturels jamais nettoyés (Capès, Grosse-Corde, Carbet-2).

La présence de *N. fowleri* dans les bassins nettoyés rappelle l'hypothèse de la "niche vide" de Griffin, selon laquelle une perturbation environnementale peut-être à l'origine de la

disparition des amibes non pathogènes qui rentrent en compétition avec *N. fowleri* et favorise ainsi sa colonisation dans le milieu (Griffin 1983). Cette observation poserait alors le problème d'un nettoyage épisodique des bassins qui pourrait, contre toute attente, favoriser le développement de l'espèce pathogène. Cependant, nos résultats montrent que le nettoyage régulier des bassins et en particulier du Bain de Dolé, tend au contraire à faire diminuer significativement la contamination et que l'hypothèse de Griffin ne correspond pas à ce bassin. Par ailleurs, la présence majoritaire de *N. fowleri* dans les bassins naturels jamais nettoyés (Capès, Grosse-Corde, Carbet-2), qui n'ont pas subi cette perturbation, montre également que l'hypothèse de Griffin ne peut pas être appliquée ici et que le nombre d'amibes pathogènes est naturellement faible, mais reste supérieur au nombre d'amibes non pathogènes dans ces environnements.

Nous ne connaissons pas le nombre minimal de *N. fowleri* capable de déclencher une MEAP chez l'homme, mais il est généralement admis que le risque de contracter la maladie est proportionnel à la concentration du pathogène (Cabanes *et al.* 2001). On peut alors penser que le taux de *N. fowleri* était plus important à Dolé en 2008, à l'époque où a eu lieu le décès du jeune garçon et que suite à cet accident et au vu de nos résultats de 2011 et 2012, rapportant la présence régulière de l'amibe pathogène dans les baignades les plus fréquentées et notamment dans le Bain de Dolé, le nettoyage régulier du bassin a conduit à la baisse de la contamination que l'on constate aujourd'hui.

Les variations de la composition et de la qualité de l'eau influent sur l'équilibre de la faune amibienne dans les environnements naturels (Behets *et al.* 2007). Nous avons donc mesuré les principales caractéristiques physico-chimiques de l'eau des baignades les plus fréquentées pour tenter de trouver un lien avec la présence de *N. fowleri* dans ces bassins. Nos résultats montrent d'une façon générale et en particulier en amont du Bain de Dolé que seule la turbidité, due à la suspension des sédiments, est en corrélation avec le nombre d'amibes pathogènes, conformément aux observations de Tyndall qui montre que les concentrations en *Naegleria* spp. thermophiles et *N. fowleri* peuvent être plus élevées dans les sédiments que dans l'eau (Tyndall *et al.* 1989). Ces résultats pourraient aussi expliquer la tendance que nous avons observée dans certains bassins d'un nombre plus important de *N. fowleri* dans l'eau en saison des pluies.

N. fowleri ayant déjà été isolée à partir des sols avec des concentrations plus importantes que dans l'eau (Brown *et al.* 1983), nous avons alors émis l'hypothèse selon laquelle les amibes pathogènes de Guadeloupe pourraient provenir de la terre en amont des

bassins et être apportées par le ruissellement de l'eau de pluie, ce qui nous a amené à rechercher les amibes dans les sols.

Pour vérifier cette hypothèse nous avons procédé dans un premier temps à la recherche de l'amibe pathogène dans l'eau, à l'émergence des sources et à l'arrivée des bains les plus fréquentés (Bain de Dolé, Bains Jaunes, Bain des Amours, Bain de Matouba et clinique des Eaux-Vives). L'absence de *N. fowleri* dans ces différentes sources et sa présence, au moins une fois, dans chacun des bains, à l'exception du bain des Amours, montre effectivement que la contamination n'est pas liée à l'eau de la source, mais qu'elle arrive le long de son cheminement jusqu'au bassin. La configuration un peu particulière du Bain des Amours, dont l'eau prélevée directement à la source est acheminée dans le bain par des tuyaux, en évitant le contact de l'eau avec le sol, explique que nous n'ayons pas retrouvé d'amibes et constitue un élément supplémentaire qui nous permet de valider notre hypothèse. De même, le fait que le retrait de la machine à UV hors d'usage, à l'arrivée du Bain de la clinique des Eaux-Vives ait supprimé la contamination du bassin, montre que les amibes ne sont pas apportées par l'eau de source mais qu'elles se développent sur le parcours, avant d'arriver dans les bassins si les conditions le permettent.

Dans un second temps, nous avons donc recherché les amibes directement dans les sols en amont des bassins. A l'issue de cette étude, la mise en évidence de *N. fowleri* dans la terre en amont des bains les plus contaminés, le Bain de Dolé et le Bain de Matouba, nous a permis de confirmer l'origine de la contamination. Cependant, contre toute attente, nous avons retrouvé dans ces échantillons de terre, d'avantage d'amibes thermophiles non *Naegleria* que d'amibes du genre *Naegleria*, bien que les bassins soient le plus souvent contaminés par *N. fowleri* et *N. lovaniensis*. Cette observation peut peut-être s'expliquer par le fait que ces deux espèces ont la capacité de flageller contrairement aux autres, ce qui leur confère un avantage pour investir les milieux liquides. Le faible taux de *N. fowleri* relevé dans les échantillons de terre en culture, peut aussi être dû à une inhibition de sa croissance, induite par le développement des autres amibes thermophiles en nombre important dans le sol.

Par ailleurs, notre étude sur les amibes présentes dans les sols a montré qu'il y avait d'avantage d'amibes thermophiles dans les échantillons de la terre de Dolé et du Bain des Amours que dans la terre des Bains Jaunes et de Matouba en montagne, la température extérieure légèrement plus fraîche en altitude (20°C en moyenne au lieu de 24°C) pourrait expliquer cette observation.

Notre étude ayant montré que le sol en amont des bassins était le réservoir naturel des amibes pathogènes, nos résultats devraient permettre aux autorités de santé et aux collectivités

locales de mettre en place des mesures de préventions adéquates pour limiter la contamination. Il suffirait effectivement d'installer pour chaque bain un système de canalisation entre la source et le bassin pour acheminer l'eau sans passer par le sol, comme c'est déjà partiellement le cas au Bain des Amours et à la clinique de Matouba. Ceci explique aussi probablement pourquoi les douches de Sofaïa ne sont jamais contaminées. Nous avons ainsi pu conseiller utilement le Parc National de la Guadeloupe lors de la réfection des bains de Matouba. Des douches alimentées par un tuyau ont été installées comme à Sofaïa afin d'éviter la contamination par ruissellement sur le sol et la stagnation dans le bain puisque la distance rendait l'entretien du bain très compliquée. Ainsi grâce à ce système, alors que l'on trouvait auparavant jusqu'à 20 *N. fowleri* par litre à l'arrivée dans le bain, nous n'avons trouvé dans les douches aucune amibe dans 10 litres d'eau. (Fig. 61).



Figure 61. Bain de Matouba après son aménagement en douches suite aux conseils de l'Institut Pasteur de Guadeloupe.

Etant donné que le risque d'infection dépend de la concentration d'amibes pathogènes dans l'eau (Cabanes *et al.* 2001), la seconde partie de notre étude a été consacrée à l'optimisation des techniques de détection et de comptage des amibes pathogènes dans nos prélèvements, en les adaptant aux spécificités et contraintes des bains chauds de la

Guadeloupe. Cet aspect nous a semblé particulièrement important à développer, compte tenu du faible nombre d'amibes pathogènes dans nos eaux, inférieur à 50 *N.f/L* et compte tenu de l'éloignement des bassins qui nécessite une ou plusieurs heures de transport des échantillons pour les ramener au laboratoire.

Dans un tout premier temps, nous avons cherché à concentrer les amibes par centrifugation des prélèvements d'eau. Cette méthode n'ayant pas donné de résultat positif, nous avons rapidement opté pour la méthode de filtration qui nous est apparue plus sensible pour les faibles densités d'amibes de nos échantillons. Cependant, la filtration d'un litre d'eau qui ne contient que deux amibes sur un seul filtre s'est également avérée peu efficace et nous a donc amené à augmenter la sensibilité de la technique en coupant le filtre en plusieurs morceaux (de 2 à 10) de façon à repérer plus efficacement les colonies (CFU) qui émergent des bords des filtres dans les boîtes de culture. Par ailleurs, notre méthode de comptage direct des CFU n'étant pas classiquement utilisée dans la littérature, nous avons également mis en place un comptage par estimation statistique du nombre le plus probable (NPP) par litre, qui permet de bénéficier d'un intervalle de confiance autour des moyennes déterminées par les tables (Pernin *et al.* 1998). Toutefois, devant les difficultés rencontrées au laboratoire pour manipuler en routine le grand nombre de boîtes de cultures nécessaire au comptage NPP, nous avons mis en place une méthode d'estimation statistique moins lourde à mettre en œuvre.

Cette méthode combine le comptage direct des CFU avec la précision statistique de la méthode NPP, en découpant le filtre d'une boîte de culture en 10 pièces pour obtenir les répétitions du comptage NPP. Nos résultats montrent que le comptage NPP simplifié donne des résultats tout à fait similaires au comptage NPP classique avec même un léger avantage en ce qui concerne *N. fowleri*.

Cette différence est significative et peut s'expliquer par un phénomène de compétition des autres amibes libres avec *N. fowleri* sur le même filtre et qui serait atténué lorsque le filtre est découpé en 10 morceaux. En effet, pendant la filtration l'eau se concentre au milieu du filtre plutôt qu'à la périphérie favorisant ce phénomène de compétition. Ainsi, si le filtre est découpé en plusieurs pièces, la distance de migration des amibes devient plus courte et la compétition entre les amibes est limitée.

Cette méthode permet un gain de temps et d'argent car la méthode NPP classique se révèle beaucoup plus longue à réaliser, en utilisant 20 boîtes et donc 20 filtres par échantillon au lieu de deux, à observer pendant 7 jours. Cette technique pourrait également être utilisée pour d'autres microorganismes tels que les bactéries pour certaines études, affranchissant ainsi le laboratoire de toutes les contraintes de la méthode classique.

Toujours dans cet axe d'optimisation des méthodes de comptage, nous avons cherché à améliorer le mode de transport des échantillons. En effet, les recommandations pour le transport des échantillons d'eau destinés à l'analyse pour la recherche d'amibes thermophiles ne sont pas toujours clairement définies et adaptées à la situation locale. En général les pathogènes sont transportés à 4°C et un délai de 2h est préconisé entre le prélèvement et la filtration au laboratoire (Behets *et al.* 2007).

Etant donné que les amibes que nous étudions sont thermophiles, qu'elles se développent à des températures situées entre 28°C et 45°C et que la température ambiante est proche de +30°C au cours de la journée en Guadeloupe, nous avons voulu vérifier si un transport à +4°C ne risquait pas d'avoir un impact sur la quantité d'amibes dénombrées. De même, nous avons recherché un éventuel effet de la durée du trajet entre le site de prélèvement et le laboratoire, sur le développement des amibes. Nos résultats ont montré que la durée du trajet n'a pas d'effet particulier sur le développement des amibes alors que le transport des échantillons sur glace diminue très significativement la quantité d'amibes dénombrées après deux jours de culture.

Cet effet de la température est probablement dû au fait que les formes trophozoïtes restent dans cet état quand on les transporte à +30°C et reprennent très rapidement leur développement en culture, alors qu'elles sont peut-être détruites par le passage brutal à +4°C qui ne leur laisse pas le temps de s'enkyster. En revanche, comme il a été montré que les kystes résistent très bien à des températures basses (Carter 1970 ; Chang 1978 ; Welling *et al.* 1977 ; De Jonckheere 1977 ; John *et al.* 1995a, Warhurst 1980 ; Biddick *et al.* 1984 ; Gupta 1999), les colonies que l'on compte après un transport à 4°C pourraient provenir des kystes ou prékystes déjà formés au moment du prélèvement et qui se seraient réactivés en culture. Ce résultat doit encourager les chercheurs qui étudient les microorganismes thermophiles à transporter leurs échantillons à une température proche de celle du prélèvement. Par ailleurs, l'observation que la durée du trajet y compris jusqu'à 24h ne modifie pas le dénombrement des amibes est intéressante car elle donne plus de souplesse pour organiser les prélèvements en particulier sur les longues distances.

Dans cette troisième partie d'optimisation des méthodes, nous avons essayé de mettre en place la PCR quantitative qui est une technique d'amplification de l'ADN très sensible, bien adaptée à la détection des concentrations faibles (Puzon *et al.* 2009). Son principal avantage est donc la possibilité de détecter rapidement la présence de microorganismes, sans passer par la mise en culture qui dure plusieurs jours.

En nous basant sur la séquence de la région ITS qui permet de détecter toutes les amibes du genre *Naegleria* (De Jonckheere 2011), nous avons réussi à obtenir des courbes de fusion permettant de discriminer sans ambiguïté *N. fowleri* de *N. lovaniensis* dans nos échantillons. Après cette étape de validation, nous avons cherché à tester la sensibilité de la technique en traçant les droites standards exprimant le nombre de cycle en fonction de la quantité d'ADN et donc du nombre d'amibes présentes dans différents types d'eau. Les résultats obtenus à partir d'une gamme de *N. fowleri* préparée dans de l'eau ultrapure ont révélé la grande sensibilité de la technique qui détecte la présence de seulement deux amibes, de même qu'avec une gamme de *N. fowleri* préparée dans de l'eau de l'environnement parfaitement limpide prélevée à Dolé en absence de sédiments. En revanche, aucun résultat n'a pu être obtenu avec *N. fowleri* dans de l'eau de l'environnement en présence de sédiments. Cette donnée suggère la présence d'inhibiteurs dans les sédiments comme cela a déjà été montré par différents auteurs dans les environnements complexes (Hill *et al.* 2010 ; Mull *et al.* 2013) et c'est la raison pour laquelle dans d'autres études ce sont des kits d'extraction pour les sols qui ont été utilisés pour la qPCR (Puzon *et al.* 2009). Par ailleurs, nous n'avons pas réussi à atteindre la très faible sensibilité de détection à 0,01 cellule obtenue dans l'étude de Robinson (Robinson *et al.* 2006). Ces différents résultats montrent que la détection des amibes par qPCR peut encore être améliorée dans nos conditions expérimentales. Il conviendrait en particulier de tester l'effet de l'ajout de BSA lors de la PCR. Cet ajout s'avère indispensable pour les PCR réalisées sur des extraits d'ADN de sols et semblerait très utile pour des eaux contenant des sédiments.

Après avoir mis au point les techniques d'amplification de la région ITS par PCR et qPCR, pour discriminer l'espèce pathogène des espèces non pathogènes du point de vue phylogénétique, nous avons souhaité aller plus loin en essayant d'identifier ces espèces du point de vue de leur signature protéique, dans le but d'aborder l'étude de la pathogénicité de *N. fowleri*. Pour ce faire, nous avons utilisé le MALDI-TOF-MS qui est une technique de spectrométrie de masse fréquemment mise à profit pour caractériser les microorganismes et qui a été récemment mise au point pour distinguer rapidement les amibes libres du genre *Naegleria* ainsi que les types I à III de *N. fowleri* (Moura *et al.* 2015). Nous avons donc mis en place cette technique au laboratoire qui nous a permis de définir et caractériser les spectres protéiques de référence de *N. fowleri* et de *N. lovaniensis* et de créer les super-spectres correspondant à ces deux espèces les plus fréquemment rencontrées en Guadeloupe. Il s'agit de spectres virtuels consensus d'une dizaine de spectres de référence où des paramètres tels que l'intensité et le nombre de pics sont pris en compte. Ces spectres seront ajoutés à la base

de données SARAMIS qui contient une multitude d'organismes des mondes eucaryote et procaryote. Ainsi, la discrimination de nos spectres sera plus stringente que celle réalisée par Moura puisque nos spectres devront se différencier de ceux de centaines d'autres organismes.

La base de données ne contenant pas encore de spectres d'amibes, nous pourrons l'alimenter avec de nouveaux spectres et super-spectres caractéristiques de ces espèces. Ces données pourront constituer les prémices d'une base de données utile pour surveiller l'évolution des différentes espèces d'amibes en Guadeloupe et pourrait devenir une référence mondiale pour les chercheurs d'autres pays. Néanmoins, les tests réalisés sur certaines de nos souches d'amibes n'ont pas permis de distinguer les *Naegleria* au niveau de l'espèce (résultat non illustré) ce qui montre qu'il est nécessaire de continuer ce travail de mise au point. Par ailleurs, les résultats obtenus en cultivant les amibes avec différentes souches bactériennes et à différentes températures sont encourageants, les nouveaux pics obtenus donnent une image plus fine de l'expression des protéines des amibes en fonction de leur environnement et devraient nous permettre d'aborder l'étude de la pathogénicité, en cultivant *N. fowleri* et *N. lovaniensis* en présence de cellules d'eucaryotes supérieurs et en recherchant les protéines correspondant aux différents pics.

Parallèlement à ces travaux, l'observation régulière des différentes souches d'amibes au microscope inversé à chaque prélèvement et mise en culture, nous a fait prendre conscience qu'elles étaient réellement très difficiles à distinguer à cette échelle, sur une base uniquement morphologique, comme cela a été souvent décrit dans la littérature (Brown 1978; Brown 1979 ; Marciano-Cabral & Fulford 1986). Néanmoins, la prise de photos répétées à intervalles réguliers toutes les 5 secondes et l'utilisation d'enregistrements vidéos nous ont révélé des détails morphologiques et des comportements dynamiques très particuliers chez l'une et l'autre des deux espèces rencontrées en Guadeloupe, *N. fowleri* et *N. lovaniensis*.

L'intense activité de l'amibe à l'intérieur du prékyste, par exemple, est tout à fait étonnante et dure de nombreuses minutes ou heures, ses vacuoles contractiles s'activent et le matériel cytoplasmique tourne sans arrêt sous la paroi. On observe en microscopie photonique également des pseudopodes qui sortent et rentrent régulièrement à travers l'opercule ainsi que des vésicules qui apparaissent à la périphérie de la paroi, impliqués probablement dans la sécrétion de matériel fibrillaire nécessaire à l'élaboration de la paroi du kyste et rappelant les microvésicules décrites sous la membrane plasmique des trophozoïtes en cours d'enkystement (Smirnov 1999 ; Fouque *et al.* 2014 ; Chavez-Munguia *et al.* 2009 ; Chavez-Munguia *et al.* 2005). La disposition des vésicules, observées en microscopie photonique à la périphérie des prékystes, suggère également l'exocytose de matériel cytoplasmique dans le milieu

extracellulaire. Les trophozoïtes libres peuvent rester agglutinés entre eux en restant plus ou moins immobiles, comme cela a déjà été étudié (Price 1995), ou présenter une intense activité de déplacements en tous sens sur la gélose (Thong & Ferrante 1986), nous avons constaté qu'ils se déforment continuellement, s'étirent, se rétractent, se divisent et refusionnent. Un tel comportement nécessiterait d'ailleurs une analyse plus fine en immunocytochimie pour suivre et comprendre l'évolution de la mitose au cours de ces cycles de division/fusion. Les trophozoïtes interagissent entre eux en permanence, ils se frôlent, se croisent, s'éloignent, absorbent des particules sur la gélose, les rejettent. Ils semblent très attirés aussi par les kystes et prékystes autour desquels ils peuvent tourner des heures entières suggérant une communication et peut-être même des échanges de matériel. Un tel déplacement de "locomotive" pouvant servir à regrouper les kystes en amas, suggère un comportement social qui a été récemment décrit chez *Vermamoeba vermiformis*, une espèce thermophile du genre *Hartmanella* (Fouque *et al.* 2014) proche de la souche isolée du bain de Capès. Les flagellées au contraire présentent une activité plus individuelle, avec des déplacements rapides et chaotiques sur de longues distances sans interaction apparente avec les autres formes.

L'étude des deux souches, pathogène et non pathogène, en microscopie électronique à balayage nous a permis de confirmer la présence des vésicules à la périphérie des trophozoïtes et des prékystes. Contrairement aux travaux précédemment évoqués (Smirnov & Michel 1999 ; Chavez-Munguia *et al.* 2009 ; Chávez-Munguía *et al.* 2005 ; Fouque *et al.* 2014) les vésicules que nous observons, grâce à la fixation des amibes aux vapeurs d'osmium, directement sur la boîte de culture et non pas en milieu liquide, ne se trouvent pas dans l'espace periplasmique sous la paroi kystique, mais sont situées à l'extérieur des trophozoïtes et des prékystes. De plus, du fait de notre mode de fixation, nous avons pu repérer ces vésicules qui ne disparaissent pas dans les liquides de rinçages mais restent fixées, éparses sur la gélose suggérant qu'une quantité importante de matériel cytoplasmique a ainsi été libéré dans le milieu extracellulaire et participerait à la diminution du volume cellulaire autant que les vacuoles d'autophagie habituellement décrites chez les amibes au moment de l'enkystement (Otto *et al.* 2004 ; Smirnov & Michel 1999 ; Fouque *et al.* 2014). Nos résultats, qui nécessiteraient d'être confirmés au microscope électronique à transmission, suggèrent le mode de formation de ces vésicules qui apparaissent sur les trophozoïtes sous la forme de protrusions de la membrane plasmique, en donnant naissance à des bulles (*blebs*) provenant d'une rupture localisée du cortex cellulaire d'actine sous-jacent (Charras & Paluch 2008). Ce phénomène de *blebbing* (ou *zeiosis*) est généralement observé sur les cellules en apoptose ou en réponse aux stress chimiques et physiques comme cela a déjà été décrit chez les amibes en

présence du complexe d'attaque (MAC) du système immunitaire (Marciano-Cabral 2007). Le *blebbing* joue également un rôle important dans la locomotion, la division des cellules et probablement ici, dans l'enkystement des amibes. On ne peut pas exclure que ce phénomène de *blebbing*, que nous observons déjà *in vivo* au microscope photonique, soit accentué par l'effet toxique de la fixation aux vapeurs d'osmium pour la microscopie électronique.

L'utilisation de blebistatine qui diminue l'interaction actine/myosine permettrait d'approfondir le rôle physiologique de ces bulles membranaires chez les amibes.

Par ailleurs, nos résultats au microscope à balayage confirment le rôle social des amibes en montrant les relations intimes entre les trophozoïtes et les amas de prékystes. Cependant, bien que les trophozoïtes présentent les nombreuses différenciations membranaires classiquement retrouvées sur les cellules phagocytes telles que les lamellipodes, spicules, bulles et contacts focaux, nous n'avons pas rencontré de spectaculaires amebostomes (*food cups*) habituellement décrits chez *Naegleria*, (Marciano-Cabral & John 1983) probablement en raison de notre mode de fixation. Seule de légères invaginations de la membrane, pouvant prendre la forme des bactéries ingérées suggèrent la présence de *food cups* chez l'une et l'autre des espèces.

PARTIE IV : Conclusion et perspectives

Suite au décès en 2008 d'un jeune enfant atteint d'une méningo-encéphalite primitive foudroyante, après une baignade dans le bassin d'eau chaude de Dolé, représentant ainsi le premier cas de MEAP en France lié à l'amibe libre thermophile de l'espèce *Naegleria fowleri*, l'ARS et l'Institut Pasteur de Guadeloupe ont mis en place une surveillance des bassins géothermaux les plus fréquentés, ainsi qu'un programme de recherche au sein de l'Unité Environnement Santé. Notre travail de thèse dans ce laboratoire a permis d'initier pour la première fois en Guadeloupe une étude sur les amibes libres présentes dans les sources géothermales très fréquentées par la population locale et touristique.

Notre premier objectif a été de réaliser un état des lieux sur le terrain et de recenser tous les bassins présentant des amibes libres thermophiles. Ce travail a révélé la présence de l'amibe pathogène *N. fowleri* et de l'amibe non pathogène *N. lovaniensis* dans les principaux bains chauds de la Guadeloupe, ainsi que d'une autre espèce thermophile du genre *Hartmanella*, proche de *Vermamoeba vermiformis*, dans l'un des bassins. Le premier constat important est la présence régulière de *N. fowleri* dans des bains très fréquentés comme le Bain de Dolé ou les Bains Jaunes, bien qu'à de très faibles concentrations de l'ordre de 2 à 30 amibes par litre. Cependant, les études sur la pathogénicité et la dose infectante létale étant encore très controversées (De Jonckheere 2012 ; Cabanes *et al.* 2001) on ne connaît pas réellement la concentration seuil à ne pas dépasser. Pour cette raison, la simple présence d'amibes pathogènes, même à de très faibles concentrations, constitue un risque réel pour la population qui se baigne très régulièrement dans ces bains. En conséquence, suite à nos travaux qui ont pu faire l'objet d'une première publication dans *PlosOne* (Moussa *et al.* 2013), l'ARS a mis en place une action de sensibilisation des usagers des bassins en installant des panneaux de prévention à proximité de chaque bain où l'amibe pathogène a été retrouvée.

Le deuxième objectif de notre étude, qui visait à déterminer l'origine de la contamination des bains, nous a permis de montrer que le sol en amont constitue le réservoir naturel des amibes thermophiles que l'on retrouve dans l'eau des différents bassins. Ce résultat, qui a donné lieu à une seconde publication dans *Parasitology Research* (Moussa *et al.* 2014) nous a permis de proposer aux autorités locales un moyen de prévention efficace par canalisation de

l'eau dès son émergence ce qui représente une solution conforme à la configuration des principaux bains de Guadeloupe et a déjà pu être mis en œuvre par le Parc National au Bain chaud de Matouba.

Le troisième objectif de ce travail était d'avantage axé sur la mise au point et l'optimisation des méthodes de détection de *N. fowleri* de façon à les adapter à la situation des bains chauds de Guadeloupe (faible concentration d'amibes, inhibiteurs de qPCR dans les sédiments) afin d'évaluer au mieux les risques liés à la présence des amibes pathogènes. Nous avons pu simplifier la méthode de comptage des amibes par estimation du nombre le plus probable ce qui a fait l'objet d'une note technique actuellement en préparation, tandis que l'utilisation de la qPCR et du MALDI-TOF nécessitent encore des tests complémentaires avant publication.

Enfin, notre étude en microscopie photonique couplée à la vidéo, actuellement en cours, est très encourageante et révèle des comportements dynamiques tout à fait originaux chez les amibes qui pourraient être approfondis, tels que les cycles de division/fusion ou les interactions entre les trophozoïtes et les prékystes. De même, nos observations en microscopie à balayage ont montré l'intérêt pour l'étude des amibes, d'une fixation aux vapeurs d'osmium, directement dans la boîte de culture, en faisant apparaître le phénomène original de *blebbing* très peu décrit dans la littérature chez ces espèces. Une étude au microscope électronique à transmission permettra de préciser l'ultrastructure et le mode de formation de ces vésicules sur les trophozoïtes et les prékystes.

L'ensemble des données obtenues à l'issue de ce travail de thèse ouvre un certain nombre de perspectives de recherches dans le domaine des amibes libres en Guadeloupe.

Pour améliorer la détection des amibes libres qui sont minoritaires dans les sols, en évitant les problèmes de compétition avec les autres espèces, il serait intéressant de mettre en place une étude de métagénomique directement à partir de l'ADN extrait de la terre. Cette approche permettrait aussi de dresser un inventaire des amibes libres en Guadeloupe, de mieux caractériser le réservoir de l'espèce pathogène et de mieux comprendre l'origine de la contamination.

Par ailleurs, nous connaissons la capacité des amibes à héberger en symbiose des bactéries telles que les légionnelles, susceptibles de potentialiser la virulence des amibes pathogènes ou

d'induire une virulence chez des amibes non pathogènes (Greub & Raoult 2004). La technique d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) pourrait être mise à profit pour rechercher ces bactéries dans les amibes de nos prélèvements d'eau et de terre des différents sites de baignade.

Un nouvel axe de recherche sur les mécanismes de la pathogénicité de *N. fowleri* pourrait faire l'objet des prochaines études à l'Institut Pasteur de la Guadeloupe. Comme nous l'avons déjà évoqué, la contamination est presque continue dans les bains chauds de notre région et malgré le nombre important de personnes qui s'y baignent, un seul cas mortel d'infection à *N. fowleri* a été recensé jusqu'à présent en Guadeloupe. Par ailleurs, des anticorps dirigés contre *N. fowleri* ont déjà été retrouvés chez des personnes qui fréquentent les eaux contaminées (Rivera *et al.* 2001) suggérant l'existence d'infections asymptomatiques (Marciano-Cabral & Cabral 2007). Il serait donc intéressant d'identifier des facteurs de pathogénicité de *N. fowleri*, en tentant d'évaluer le pouvoir pathogène des souches guadeloupéennes. Pour ce faire, il est possible d'étudier l'expression des gènes impliqués dans la pathogénicité sur un modèle souris, en collaboration avec la Plateforme mutualisée de confinement P3 du site INRA/CIRAD de Duclos, et sur un modèle de co-culture des différentes souches d'amibes avec des cellules d'eucaryotes supérieurs.

En conclusion, notre travail de Thèse a contribué à ouvrir la voie de la recherche sur les amibes libres en Guadeloupe et à tracer le chemin de futurs projets d'étude sur *N. fowleri* qui pourront apporter de nouveaux éléments pour comprendre l'origine, le développement et les mécanismes de virulence de ce pathogène, afin d'éviter la survenue d'un nouvel accident à la suite d'une baignade dans les sources géothermales de notre région.

PARTIE V : Références Bibliographiques

- Abraham, S.N. & Lawande, R. V, 1982. Incidence of free-living amoebae in the nasal passages of local population in Zaria, Nigeria. *The Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 85(5), pp.217–222.
- Adl, S.M., Simpson, A.G.B., Farmer, M.A., Andersen, R.A., Anderson, O.R., Barta, J.R., Bowser, S.S., Brugerolle, G., Fensome, R.A., Fredericq, S., James, T.Y., Karpov, S., Kugrens, P., Krug, J., Lane, C.E., Lewis, L.A., Lodge, J., Lynn, D.H., Mann, D.G., McCourt, R.M., Mendoza, L., Moestrup, O., Mozley-Standridge, S.E., Nerad, T.A., Shearer, C.A., Smirnov, A. V, Spiegel, F.W. & Taylor, M.F.J.R., 2005. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 52(5), pp.399–451.
- Adl, S.M., Simpson, A.G.B., Lane, C.E., Lukeš, J., Bass, D., Bowser, S.S., Brown, M.W., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenrath, M., Lara, E., Gall, L. Le, Lynn, D.H., McManus, H., Mitchell, E.A.D., Mozley-Stanridge, S.E., Parfrey, L.W., Pawlowski, J., Rueckert, S., Shadwick, L., Schoch, C.L., Smirnov, A. & Spiegel, F.W., 2012. The revised classification of eukaryotes. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 59(5), pp.429–493.
- AFNOR, 2009. NF EN ISO 10304–1 Qualité de l'eau - Dosage des anions dissous par chromatographie des ions en phase liquide - Partie 1 : dosage du bromure, chlorure, fluorure, nitrate, nitrite, phosphate et sulfate. *Paris, France: AFNOR Press.*, p.16.
- AFNOR, 2005. NF EN ISO 11732 Qualité de l'eau - Dosage de l'azote ammoniacal - Méthode par analyse en flux (CFA et FIA) et détection spectrométrique. *Paris, France: AFNOR Press.*, p.18.
- AFNOR, 1996a. NF EN ISO 13395 Qualité de l'eau - Détermination de l'azote nitreux et de l'azote nitrique et de la somme des deux par analyse en flux (CFA et FIA) et détection spectrométrique. *Paris, France: AFNOR Press.*, p.18.
- AFNOR, 1999. NF EN ISO 14911 Qualité de l'eau - Dosage par chromatographie ionique, des ions Li⁺, Na⁺, NH₄⁺, K⁺, Mn²⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Sr²⁺ et Ba²⁺ dissous - Méthode applicable pour l'eau et les eaux résiduaires. *Paris, France. Paris, France: AFNOR Press.*, p.20.
- AFNOR, 2000. NF EN ISO 7027 Qualité de l'eau - Détermination de la turbidité. *Paris, France: AFNOR Press.*, p.14.
- AFNOR, 1997. NF EN 1484 - Analyse de l'eau - Ligne directrices pour le dosage du carbone organique total (TOC) et carbone organique dissous (COD). *Paris, France: AFNOR Press.*, p.10.
- AFNOR, 1995. NF EN ISO 8467 Qualité de l'eau - Détermination de l'indice permanganate. *Paris, France: AFNOR Press.*, p.4.

- AFNOR, 1996b. NF EN ISO 9963–1 Qualité de l'eau - Détermination de l'alcalinité. *Paris, France: AFNOR Press.*, p.6.
- AFNOR, 1984. NF T90–003 Essais des eaux - Détermination de la concentration totale en calcium et magnésium - Méthode titrimétrique à l'EDTA. *Paris, France: AFNOR Press.*, p.8.
- AFNOR, 2001. NF T90–007 Qualité de l'eau - Dosage des silicates solubles - Méthode par spectrométrie d'absorption moléculaire. *Paris, France: AFNOR Press.*, p.8.
- Alexeieff, A., 1912. Sur les caractères cytologiques de la systématique des amibes du groupe des limax et des amibes parasites des vertébrés. *Bulletin de la Société Zoologique de France.*
- Amiri-Eliasi, B. & Fenselau, C., 2001. Characterization of protein biomarkers desorbed by MALDI from whole fungal cells. *Analytical Chemistry*, 73(21), pp.5228–5231.
- Anderson, K. & Jamieson, A., 1972. Primary Amoebic Meningoencephalitis. *Lancet*, 299(7756), pp.902–903.
- Anderson, K., Jamieson, A., Jadin, J.B., Willaert, E., 1973. Primary amoebic meningoencephalitis. *Lancet*, i, p.672.
- ANSES, 2013. Évaluation des risques liés à la présence d'amibes *Naegleria fowleri* dans les eaux de baignade. *Avis de l'Anses Rapport d'expertise collective.*
- Apley, J., Clarke, S.K., Roome, A.P., Sandry, S.A., Saygi, G., Silk, B. & Warhurst, D.C., 1970. Primary amoebic meningoencephalitis in Britain. *British Medical Journal*, 1(5696), pp.596–599.
- Ávila, D.I., Dra. Magda, R. de G., Infante, D.D., Llovera, D.V., Álvarez, T.O., Lic., Y. & Briceño, M., 2006. Amibas de vida libre potencialmente patógenas en aguas del parque “Las Cocuizas”, Maracay, Venezuela. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 58(1), pp.19–24.
- Baig, A.M., 2015. Pathogenesis of amoebic encephalitis: Are the amoebas being credited to an “inside job” done by the host immune response? *Acta Tropica*, 148, pp.72–76.
- Barnett, N.D.P., Kaplan, A.M., Hopkin, R.J., Saubolle, M.A. & Rudinsky, M.F., 1996. Primary amoebic meningoencephalitis with *Naegleria fowleri*: Clinical review. *Pediatric Neurology*, 15(3), pp.230–234.
- Bedi, H.K., Devapura, J.C. & Bomb, B.S., 1972. Primary amoebic meningoencephalitis. *Journal of the Indian Medical Association*, 58(1), pp.13–14.
- Behets, J., Declerck, P., Delaedt, Y., Verelst, L. & Ollevier, F., 2006. Quantitative detection and differentiation of free-living amoeba species using SYBR green-based real-time PCR melting curve analysis. *Current Microbiology*, 53(6), pp.506–509.

- Behets, J., Declerck, P., Delaedt, Y., Verelst, L. & Ollevier, F., 2007. Survey for the presence of specific free-living amoebae in cooling waters from Belgian power plants. *Parasitology Research*, 100(6), pp.1249–1256.
- Behets, J., Declerck, P., Delaedt, Y., Verelst, L. & Ollevier, F., 2007. A duplex real-time PCR assay for the quantitative detection of *Naegleria fowleri* in water samples. *Water Research*, 41(1), pp.118–126.
- Behets, J., Seghi, S., Declerck, P., Verelst, L., Duvivier, L., Van Damme, A. & Ollevier, F., 2003. Detection of *Naegleria* spp. and *Naegleria fowleri*: A comparison of flagellation tests, ELISA and PCR. *Water Science and Technology*. pp. 117–122.
- Bennett, W.M., Nespral, J.F., Rosson, M.W. & McEvoy, K.M., 2008. Use of Organs for Transplantation from a Donor with Primary Meningoencephalitis due to *Naegleria fowleri*. *American Journal of Transplantation*, 8(6), pp.1334–1335.
- Bézèlgues-Courtade, S. & Bes-De-Berc, S., 2007. Inventaire et caractérisation des sources thermales de Guadeloupe. *BRGM/RP-55060-FR*.
- Biddick, C.J., Rogers, L.H. & Brown, T.J., 1984. Viability of pathogenic and nonpathogenic free-living amoebae in long-term storage at a range of temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, 48(4), pp.859–860.
- Biyela, P., 2010. Water Quality Decay and Pathogen Survival in Drinking Water Distribution Systems. *Arizona State University*, p.190.
- Biyela, P.T., Hodon, R., Brown, A., Alum, A., Abbaszadegan, M. & Rittmann, B.E., 2012. Distribution systems as reservoirs of *Naegleria fowleri* and other amoebae. *Journal-American Water Works Association*, 104(1), pp.49–50.
- Blair, B., Sarkar, P., Bright, K. R., Marciano-Cabral, F., & Gerba, C.P., 2008. *Naegleria fowleri* in well water. *Emerging Infectious Diseases*, 14(9), pp.1499–1501.
- Bolivar, I., Fahrni, J.F., Smirnov, A. & Pawlowski, J., 2001. SSU rRNA-based Phylogenetic Position of the Genera Amoeba and Chaos (Lobosea, Gymnamoebia): The Origin of Gymnamoebae Revisited. *Molecular Biology and Evolution*, 18(12), pp.2306–2314.
- Boonton, G.C., Schuster, F.L., Carmichael, J.R., Fuerst, P.A. & Byers, T.J., 2003. *Balamuthia mandrillaris*: Identification of Clinical and Environmental Isolates Using Genus-Specific PCR. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*. pp. 508–509.
- Bory de Saint-Vincent, J. B. G. M., 1822-1831. Amiba. *Dictionnaire classique d'histoire naturelle*. Paris, Rey et Gravier, Baudoin frères, 1, p.260.
- Bory de Saint-Vincent, J. B. G. M., 1826. Essai d'une classification des animaux microscopiques. *Agasse, Paris*, p. 28.
- Bouyer, S., Imbert, C., Rodier, M.H. & Héchard, Y., 2007. Long-term survival of *Legionella pneumophila* associated with *Acanthamoeba castellanii* vesicles: Brief report. *Environmental Microbiology*, 9(5), pp.1341–1344.

- Bowers, B. & Korn, E.D., 1968. The fine structure of *Acanthamoeba castellanii*. *The Journal of Cell Biology*, 39(1), pp.95–111.
- Brass, K., 1972. Primäre Amöben-Meningoencephalitis. *Deutsch Medizinische Wochenschrift*, 97, pp.1983–1985.
- Brown, R.L., 1991. Successful treatment of primary amebic meningoencephalitis. *Archives of Internal Medicine*, 151(6), pp.1201–1202.
- Brown, T., 1979. Observations by immunofluorescence microscopy and electron microscopy on the cytopathogenicity of *Naegleria fowleri* in mouse embryo-cell cultures. *Journal of Medical Microbiology*, 12(3), pp.363–371.
- Brown, T., 1978. Observations by light microscopy on the cytopathogenicity of *Naegleria fowleri* in mouse embryo-cell cultures. *Journal of Medical Microbiology*, 11(3), pp.249–259.
- Brown, T.J., Cursons, R.T.M., Keys, E.A., Marks, M. & Miles, M., 1983. The occurrence and distribution of pathogenic free-living amoebae in thermal areas of the North Island of New Zealand. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 17(1), pp.59–69.
- Buse, H.Y. & Ashbolt, N.J., 2012. Counting *Legionella* cells within single amoeba host cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(6), pp.2070–2072.
- Buse, H.Y. & Ashbolt, N.J., 2011. Differential growth of *Legionella pneumophila* strains within a range of amoebae at various temperatures associated with in-premise plumbing. *Letters in Applied Microbiology*, 53(2), pp.217–224.
- Bütschli, O., 1889. Protozoa. Abt. III. Infusoria und System der Radiolaria. *Klassen und Ordnung des Thiers-Reichs*, 1, pp.1098–2035.
- Butt, C.G., 1966. Primary amebic meningoencephalitis. *The New England Journal of Medicine*, 274, pp.1473–1476.
- Cabanes, P.A., Wallet, F., Pringuez, E. & Pernin, P., 2001. Assessing the Risk of Primary Amoebic Meningoencephalitis from Swimming in the Presence of Environmental *Naegleria fowleri*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7), pp.2927–2931.
- Cable, B.L. & John, D.T., 1986. Conditions for maximum enflagellation in *Naegleria fowleri*. *The journal of Protozoology*, 33(4), pp.467–472.
- Cain, A.R., Wiley, P.F., Brownell, B. & Warhurst, D.C., 1981. Primary amoebic meningoencephalitis. *Archives of Disease in Childhood*, 56(2), pp.140–143.
- Callicott, J.H., Nelson, E.C., Jones, M.M., dos Santos, J.G., Utz, J.P., Duma, R.J. & Morrison, J. V., 1968. Meningoencephalitis due to pathogenic free-living amoebae. Report of two cases. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 206(3), pp.579–582.

- Carrasco-Yepey, M., Campos-Rodriguez, R., Lopez-Reyes, I., Bonilla-Lemus, P., Rodriguez-Cortes, A.Y., Contis-Montes de Oca, A., Jarillo-Luna, A., Miliar-Garcia, A. & Rojas-Hernandez, S., 2014. Intranasal coadministration of Cholera toxin with amoeba lysates modulates the secretion of IgA and IgG antibodies, production of cytokines and expression of pIgR in the nasal cavity of mice in the model of *Naegleria fowleri* meningoencephalitis. *Experimental parasitology*, 145 Suppl, pp.S84–92.
- Carrasco-Yepey, M., Rojas-Hernandez, S., Rodriguez-Monroy, M.A., Terrazas, L.I. & Moreno-Fierros, L., 2010. Protection against *Naegleria fowleri* infection in mice immunized with Cry1Ac plus amoebic lysates is dependent on the STAT6 Th2 response. *Parasite Immunology*, 32(9-10), pp.664–670.
- Carter, R.F., 1970. Description of a *Naegleria* sp. isolated from two cases of primary amoebic meningo-encephalitis, and of the experimental pathological changes induced by it. *The Journal of Pathology*, 100(4), pp.217–244.
- Carter, R.F., 1972. Primary amoebic meningo-encephalitis. An appraisal of present knowledge. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 66(2), pp.193–213.
- Carter, R.F., 1968. Primary amoebic meningo-encephalitis: Clinical, pathological and epidemiological features of six fatal cases. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 96(1), pp.1–25.
- Carter, R.F., 1969. Sensitivity to amphotericin B of a *Naegleria* sp. isolated from a case of primary amoebic meningoencephalitis. *Journal of Clinical Pathology*, 22(4), pp.470–474.
- Caruzo, G. & Cardozo, J., 2008. Primary amoebic meningoencephalitis: a new case from Venezuela. *Tropical Doctor*, 38(4), pp. 256 –257.
- Cassells, J.M., Yahya, M.T., Gerba, C.P. & Rose, J.B., 1995. Efficacy of a combined system of copper and silver and free chlorine for inactivation of *Naegleria fowleri* amoebas in water. *Water Science and Technology*, 31(5-6), pp.119–122.
- Castellani, A., 1930. Amoeba found in culture of yeast. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 33, p.160.
- Cavalier-Smith, T., 1983. A 6-kingdom classification and a unified phylogeny. In: *HEA Schenk, Schwemmler W (eds) Endocytobiology II. De Gruyter, Berlin*, pp. 1027–1034.
- Cavalier-Smith, T., 1998. A revised six-kingdom system of life. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 73(3), pp.203–266.
- Cavalier-Smith, T., 1993. Kingdom protozoa and its 18 phyla. *Microbiological Reviews*, 57(4), pp.953–994.
- Cavalier-Smith, T., 2002a. The neomuran origin of archaeobacteria, the negibacterial root of the universal tree and bacterial megaclassification. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(1), pp.7–76.

- Cavalier-Smith, T., 2002b. The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification on protozoa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(2), pp.297–354.
- Cavalier-Smith, T., Chao, E.E.-Y. & Oates, B., 2004. Molecular phylogeny of Amoebozoa and the evolutionary significance of the unikont *Phalansterium*. *European Journal of Protistology*, 40(1), pp.21–48.
- Cermeño, J.R., Hernández, I., El Yasin, H., Tinedo, R., Sánchez, R., Pérez, G., Gravano, R. & Ruiz, A., 2006. Meningoencephalitis by *Naegleria fowleri*: epidemiological study in Anzoátegui state, Venezuela. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 39(3), pp.264–268.
- Cerva, L., 1978. Some further characteristics of the growth of *Naegleria fowleri* and *N. gruberi* in axenic culture. *Folia Parasitologica*, 25(1), pp.1–8.
- Cerva, L., 1971. Studies of limax amoebae in a Swimming Pool. *Hydrobiologia*, 38(1), pp.141–161.
- Cerva, L., Ferdinandova, N., Novak, K., Ptackova, V., Schrottenbaum, M. & ZIMAK, V., 1969. Meningoencephalitis durch Amoebidae Naegleriidae. Einer weiteren Fall in der Tschechoslowakei. Isolierung des Erregers. *Münch. Med. Wschr.*, 111, pp. 2090–2094.
- Cerva, L., Jecná, P. & Hyhlík, R., 1980. *Naegleria fowleri* from a canal draining cooling water from a factory. *Folia Parasitologica*, 27(2), pp.103–107.
- Cerva, L., Kasprzak, W. & Mazur, T., 1982. *Naegleria fowleri* in cooling waters of power plants. *Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology and Immunology*, 26(2), pp.152–161.
- Cerva, L. & Novak, K., 1968. Amoebic Meningoencephalitis: Sixteen Fatalities. *Science*, 160(3823), p.92.
- Cerva, L. & Simanov, L., 1983. *Naegleria fowleri* in cooling circuits of industrial and power plants in North Moravia. *Folia Parasitologica*, 30(2), pp.97–101.
- Cervantes-Sandoval, I., Serrano-Luna, J.D.J., García-Latorre, E., Tsutsumi, V. & Shibayama, M., 2008. Mucins in the host defence against *Naegleria fowleri* and mucinolytic activity as a possible means of evasion. *Microbiology*, 154(Pt 12), pp.3895–3904.
- Chang, S.L., 1958. Cultural, Cytological and Ecological Observations on the Amoeba Stage of *Naegleria gruberi*. *Journal of General Microbiology*, 18(3), pp.565–578.
- Chang, S.L., 1974. Etiological, Pathological, Epidemiological, and Diagnostical Considerations of Primary Amoebic Meningoencephalitis. *Critical Reviews in Microbiology*, 3(2), pp.135–159.
- Chang, S.L., 1978. Resistance of pathogenic *Naegleria* to some common physical and chemical agents. *Applied and Environmental Microbiology*, 35(2), pp.368–375.

- Chang, S.L., 1971. Small free-living amebas: cultivation, quantitation, identification, classification, pathogenesis and resistance. *Current Topics in Comparative Pathobiology*, 1, pp.201–254.
- Champsaur, H., 1996. Méthodes générales d'examen bactériologique des eaux. *Rodier (ed.), L'analyse de l'eau. Dunod, Paris, France*, pp. 755–756.
- Charoenlarp, K., Jariya, P., Junyandeegul, P., Panyathanya, R. & Jaroonvesama, N., 1988. Primary amoebic meningoencephalitis: a second reported case in Thailand. *Journal of the Medical Association of Thailand.*, 71, pp.581–586.
- Charras, G. & Paluch, E., 2008. Blebs lead the way: how to migrate without lamellipodia. *Nature reviews. Molecular Cell Biology*, 9(9), pp.730–736.
- Chatton, E., 1953. Ordre des Amoebiens nus ou Amoebae dans traité de zoologie. *Grassé, P.P. I, Masson, Paris, Fasc.*, 1, pp.5–91.
- Chatton, E., 1925. Pansporella perplexa. Réflexions sur la biologie et la phylogénie des protozoaires. *Annales des sciences naturelles-zoologie et biologie animale, 10e serie*, VII, pp.1–84.
- Chatton, E. & Lalung-Bonnaire, 1912. Amoeba limax (Vahlkampfia n. gen.) dans l'intestin humain. *Bulletin of the Exotic Pathology Society*, 5, pp.135–143.
- Chávez-Munguía, B., Omaña-Molina, M., Castañón, G., Bonilla, P., González-Lázaro, M., Hernández-Martínez, D., Salazar-Villatoro, L., Esparza-García, A., Martínez-Palomo, A. & Ortega-Pierres, G., 2009. Ultrastructural study of the encystation and excystation processes in *Naegleria* sp. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 56(1), pp.66–72.
- Chávez-Munguía, B., Omaña-Molina, M., González-Lázaro, M., González-Robles, A., Bonilla, P. & Martínez-Palomo, A., 2005. Ultrastructural study of encystation and excystation in *Acanthamoeba castellanii*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 52(2), pp.153–158.
- Cho, M.-S., Jung, S.-Y., Park, S., Kim, K.H., Kim, H.-I., Sohn, S., Kim, H.-J., Im, K.-I. & Shin, H.-J., 2003. Immunological Characterizations of a Cloned 13.1-Kilodalton Protein from Pathogenic *Naegleria fowleri*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 10(5), pp.954–959.
- Chotmongkol, V., Pipitgool, V. & Khempila, J., 1993. Eosinophilic cerebrospinal fluid pleocytosis and primary amoebic meningoencephalitis. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health.*, 24, pp.399–401.
- Clark, C.G., 1990. Genome structure and evolution of *Naegleria* and its relatives. *The Journal of Protozoology*, 37(4), pp.25–65.
- Clark, C.G. & Cross, G.A., 1987. rRNA genes of *Naegleria gruberi* are carried exclusively on a 14-kilobase-pair plasmid. *Molecular and Cellular Biology*, 7(9), pp.3027–3031.

- Clark, C.G. & Cross, G.A., 1988. Small-subunit ribosomal RNA sequence from *Naegleria gruberi* supports the polyphyletic origin of amoebas. *Molecular Biology and Evolution*, 5(5), pp.512–518.
- Cogo, P.E., Scaglia, M., Gatti, S., Rossetti, F., Alaggio, R., Laverda, A.M., Zhou, L., Xiao, L. & Visvesvara, G.S., 2004. Fatal *Naegleria fowleri* meningoencephalitis, Italy. *Emerging Infectious Diseases*, 10(10), pp.1835–1837.
- Cooter, R., 2002. The history of the discovery of primary amoebic meningoencephalitis. *Australian family physician*, 31(4), pp.399–400.
- Cordingley, J.S., Willis, R.A. & Villemez, C.L., 1996. Osmolarity is an independent trigger of *Acanthamoeba castellanii* differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 61(2), pp.167–171.
- Coulon, C., 2011. Amibes libres de l'environnement : Résistance aux traitements de désinfection et interactions avec les Chlamydiales. *Université Paris-Sud*.
- Councilman, H. & Lafleur, W., 1891. Amoebic Dysentery. *Johns Hopkins Hospital Rep.*, 2, pp.395–548.
- Mac Croan, J. & Patterson, J., 1970. Primary amebic meningoencephalitis. Georgia. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 19, pp.413–414.
- Croxatto, A., Prod'hom, G. & Greub, G., 2012. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(2), pp.380–407.
- CSHPF, 1996. Le problème des amibes libres pathogènes : éléments d'évaluation des risques et actualité du problème en aval de la centrale de Dampierre en Burly, Séances des 14 mai et 11 juin 1996. *Avis.*, 1996-1.
- Cubero-Menendez, O. & Cubero-Rego, D., 2004. Meningoencefalitis amebiana primaria : comunicacion de un caso. *Revista de Neurología*, 38(4), pp.336–338.
- Culbertson, C.G., Smith, J.W. & Minner, J.R., 1958. *Acanthamoeba*: observations on animal pathogenicity. *Science (New York, N.Y.)*, 127(3313), p.1506.
- Cursons, R., Sleigh, J., Hood, D. & Pullon, D., 2003. A case of primary amoebic meningoencephalitis: North Island, New Zealand. *The New Zealand Medical Journal*, 116(1187), U712.
- Cursons, R.T., Brown, T.J. & Keys, E.A., 1980. Effect of disinfectants on pathogenic free-living amoebae: in axenic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 40(1), pp.62–66.
- Cursons, R.T.M., Brown, T.J., Bruns, B.J. & Taylor, D.E.M., 1976. Primary amoebic meningoencephalitis contracted in a thermal tributary of the Waikato river Taupo: a case report. *The New Zealand Medical Journal*, 84(578), pp.479–481.

- Cursons, R.T.M., Brown, T.J., Keys, E.A., Gordon, E.H., Leng, R.H., Havill, J.H. & Hyne, B.E., 1979. Primary amoebic meningo-encephalitis in an indoor heat-exchange swimming pool. *The New Zealand Medical Journal*, 90(646), pp.330–331.
- Danso, S.K. & Alexander, M., 1975. Regulation of predation by prey density: the protozoan-Rhizobium relationship. *Applied Microbiology*, 29(4), pp.515–521.
- Darbyshire, J.F., Page, F.C. & Goodfellow, L.P., 1976. Paratetramitus jugosus, an Amoeboid-Flagellate of Soils and Freshwater, Type-Species of Paratetramitus nov. gen. *Protistologica*, 12, pp.375–387.
- Das, S.R., 1974. Pathogenicity of flagellate stage of *Naegleria aerobia* and its bearing on the epidemiology of exogenous amoebiasis. *Annales de la Societe Belge de Medecine Tropicale*, 54(4-5), pp.327–332.
- Declerck, P., Behets, J., van Hoef, V. & Ollevier, F., 2007. Detection of *Legionella* spp. and some of their amoeba hosts in floating biofilms from anthropogenic and natural aquatic environments. *Water Research*, 41(14), pp.3159–3167.
- Delattre, J. & Oger, C., 1981. *Naegleria fowleri* and heated aquatic environments : A possible mechanism. *Annales de la Societe belge de Medecine Tropicale*.
- Derreumaux, A.L., Jadin, J.B., Willaert, E. & Moret, R., 1974. Action du chlore sur les amibes de l'eau. *Annales de la Societe belge de Medecine Tropicale*, 54, pp.415–428.
- Detterline, J.L. & Wilhelm, W.E., 1991. Survey of Pathogenic *Naegleria-Fowleri* and Thermotolerant Amebas in Federal Recreational Waters. *Transactions Of The American Microscopical Society*, 110(3), pp.244–261.
- Dive, D., Leclerc, H., Picard, J.P., Telliez, E. & Vangrevelinghe, R., 1978. Amoebae in swimming-pools: microbiological and epidemiological aspects (author's transl). *Annales de Microbiologie*, 129B(2), pp.225–244.
- Dive, D.G., Leclerc, H., De Jonckheere, J. & Delattre, J.M., 1981. Isolation of *Naegleria fowleri* from the cooling pond of an electric power plant in France. *Annales de Microbiologie*, 132A(1), pp.97–105.
- Dorsch, M., 1982. Primary amoebic meningoencephalitis : an historical and epidemiological perspective with particular reference to South Australia, Epidemiology Branch, South Australian Health Commission, 67.
- Dorsch, M.M., Cameron, A.S. & Robinson, B.S., 1983. The epidemiology and control of primary amoebic meningoencephalitis with particular reference to South Australia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 77(3), pp.372–377.
- Van den Driessche, E., Vandepitte, J., Van Dijck, P.J., De Jonckheere, J. & Van de Voorde, H., 1973. Letter: Primary amoebic meningoencephalitis after swimming in stream water. *Lancet*, 2(7835), p.971.

- Dubray, B.L., Wilhelm, W.E. & Jennings, B.R., 1987. Serology of *Naegleria fowleri* and *Naegleria lovaniensis* in a hospital survey. *The Journal of Protozoology*, 34(3), pp.322–327.
- Dujardin Félix, 1841. Histoire naturelle des zoophytes : Infusoires, comprenant la physiologie et la classification de ces animaux, et la manière de les étudier à l'aide du microscope par M. Félix Dujardin., Paris : Roret.
- Duma, R., 1981. Study of pathogenic free-living amebas in fresh-water lakes in Virginia. *Environmental Protection Agency, Washington, D.C.*
- Duma, R.J., 1980. Study of pathogenic free-living amebas in fresh-water lakes in Virginia. *National Technical Information Service, Springfield, Virginia.*
- Duma, R.J., Rosenblum, W.I., McGehee, R.F., Jones, M.M. & Nelson, E.C., 1971. Primary amoebic meningoencephalitis caused by *Naegleria*. Two new cases, response to amphotericin B, and a review. *Annals of Internal Medicine*, 74(6), pp.923–931.
- Dyková, I., Kyselová, I., Pecková, H., Oborník, M. & Lukeš, J., 2001. Identity of *Naegleria* strains isolated from organs of freshwater fishes. *Diseases of Aquatic Organisms*, 46(2), pp.115–121.
- Eddyani, M., De Jonckheere, J.F., Durnez, L., Suykerbuyk, P., Leirs, H. & Portaels, F., 2008. Occurrence of free-living amoebae in communities of low and high endemicity for Buruli ulcer in southern Benin. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(21), pp.6547–6553.
- Ehrenberg, C., 1830. Beiträge zur Kenntnib der Organisation der Infusorien und ihrer geographischen Verbreitung, besonders in Sibirien. *Abhandlungen der Königlichen Akademie der Wissenschaften zu Berlin*, pp.1–88.
- Fahrni, J.F., Bolivar, I., Berney, C., Nassonova, E., Smirnov, A. & Pawlowski, J., 2003. Phylogeny of lobose amoebae based on actin and small-subunit ribosomal RNA genes. *Molecular Biology and Evolution*, 20(11), pp.1881–1886.
- Fouque, E., Yefimova, M., Trouilhé, M.-C., Quellard, N., Fernandez, B., Rodier, M.-H., Thomas, V., Humeau, P. & Héchar, Y., 2014. Morphological Study of the Encystment and Excystment of *Vermamoeba vermiformis* Revealed Original Traits. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 62(3), pp.327–337.
- Fowler, M. & Carter, R.F., 1965. Acute Pyogenic Meningitis Probably Due to *Acanthamoeba* sp.: a Preliminary Report. *British Medical Journal*, 2(5464), pp.740–742.
- Franke, E.D. & Mackiewicz, J.S., 1982. Isolation of *Acanthamoeba* and *Naegleria* from the intestinal contents of freshwater fishes and their potential pathogenicity. *The Journal of Parasitology*, 68(1), pp.164–166.
- Fritzinger, A.E., Toney, D.M., MacLean, R.C. & Marciano-Cabral, F., 2006. Identification of a *Naegleria fowleri* membrane protein reactive with anti-human CD59 antibody. *Infection and Immunity*, 74(2), pp.1189–1195.

- Fritz-Laylin, L.K., Ginger, M.L., Walsh, C., Dawson, S.C. & Fulton, C., 2011. The *Naegleria* genome: a free-living microbial eukaryote lends unique insights into core eukaryotic cell biology. *Research in Microbiology*, 162(6), pp.607–618.
- Fritz-Laylin, L.K., Prochnik, S.E., Ginger, M.L., Dacks, J.B., Carpenter, M.L., Field, M.C., Kuo, A., Paredez, A., Chapman, J., Pham, J., Shu, S., Neupane, R., Cipriano, M., Mancuso, J., Tu, H., Salamov, A., Lindquist, E., Shapiro, H., Lucas, S., Grigoriev, I. V., Cande, W.Z., Fulton, C., Rokhsar, D.S. & Dawson, S.C., 2010. The Genome of *Naegleria gruberi* Illuminates Early Eukaryotic Versatility. *Cell*, 140(5), pp.631–642.
- Fulton, C., 1970. Amoeba-flagellates as research partners: The Laboratory Biology of *Naegleria* and *Tetramitus*. *Academic Press, New York*, 4, pp.341–376.
- Fulton, C., 1977. Intracellular regulation of cell shape and motility in *Naegleria*. First insights and a working hypothesis. *Journal of Supramolecular Structure*, 6(1), pp.13–43.
- Fulton, C. & Dingle, A.D., 1967. Appearance of the flagellate phenotype in populations of *Naegleria amebae*. *Developmental Biology*, 15(2), pp.165–191.
- Fulton, C. & Dingle, A.D., 1971. Basal bodies, but not centrioles, in *Naegleria*. *The Journal of Cell Biology*, 51(3), pp.826–836.
- Gautam, P.L., Sharma, S., Puri, S., Kumar, R., Midha, V. & Bansal, R., 2012. A rare case of survival from primary amebic meningoencephalitis. *Indian journal of Critical Care Medicine: peer-reviewed, official publication of Indian Society of Critical Care Medicine*, 16(1), pp.34–6.
- Gelman, B.B., Popov, V., Chaljub, G., Nader, R., Rauf, S.J., Nauta, H.W. & Visvesvara, G.S., 2003. Neuropathological and ultrastructural features of amebic encephalitis caused by *Sappinia diploidea*. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 62(10), pp.990-998.
- Gianinazzi, C., Schild, M., Wüthrich, F., Ben Nour, N., Fuchsli, H.P., Schürch, N., Gottstein, B. & Müller, N., 2009. Screening Swiss water bodies for potentially pathogenic free-living amoebae. *Research in Microbiology*, 160(6), pp.367–374.
- Glassmeyer, S.T., Ware, M.W., Schaefer, F.W. 3rd, Shoemaker, J.A. & Kryak, D., 2007. An improved method for the analysis of *Cryptosporidium parvum* oocysts by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 54, pp.479–481.
- Gogate, A. & Deodhar, L., 1985. Isolation and identification of pathogenic *Naegleria fowleri* (aerobia) from a swimming pool in Bombay. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 79(1), p.134.
- González-Robles, A., Cristóbal-Ramos, A.R., González-Lázaro, M., Omaña-Molina, M. & Martínez-Palomo, A., 2009. *Naegleria fowleri*: light and electron microscopy study of mitosis. *Experimental Parasitology*, 122(3), pp.212–217.

- Goode, D., 1975. Evolution of mitosis in protozoa: The association of chromosomes, nuclear envelope, kinetochores and microtubules. *Biosystems*, 7(3-4), pp.318–325.
- Górnik, K. & Kuźna-Grygiel, W., 2004. Presence of virulent strains of amphizoic amoebae in swimming pools of the city of Szczecin. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 11(2), pp.233–236.
- Goswick, S.M. & Brenner, G.M., 2003. Activities of therapeutic agents against *Naegleria fowleri* in vitro and in a mouse model of primary amebic meningoencephalitis. *The Journal of parasitology*, 89(4), pp.837–842.
- Grassi, B., 1879. Dei Protozoi parassiti e specialmente di quelli che sono nell'uomo. *Gazz. Med. Ita. Lombard.*, 39, pp.445–449.
- Grate, I., 2006. Primary amebic meningoencephalitis: A silent killer. *Canadian Journal of Emergency Medicine*, 8(5), pp.365–369.
- Greub, G. & Raoult, D., 2004. Microorganisms Resistant to Free-Living Amoebae. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(2), pp.413–433.
- Griffin, J.L., 1972. Temperature tolerance of pathogenic and nonpathogenic free-living amoebas. *Science (New York, N.Y.)*, 178(63), pp.869–870.
- Griffin, J.L., 1983. The pathogenic amoeboflagellate *Naegleria fowleri*: environmental isolations, competitors, ecologic interactions, and the flagellate-empty habitat hypothesis. *The Journal of Protozoology*, 30(2), pp.403–409.
- Gupta, N., Bhaskar, H., Duggal, S., Ghalaut, P.S., Kundra, S. & Arora, D.R., 2009. Primary amoebic meningoencephalitis: first reported case from Rohtak, North India. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 13(3), pp.236-237.
- Gupta, S. & Das, S.R., 1999. Stock cultures of free-living amebas: effect of temperature on viability and pathogenicity. *The Journal of Parasitology*, 85(1), pp.137–139.
- Hampl, V., Hug, L., Leigh, J.W., Dacks, J.B., Lang, B.F., Simpson, A.G.B. & Roger, A.J., 2009. Phylogenomic analyses support the monophyly of Excavata and resolve relationships among eukaryotic “supergroups”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(10), pp.3859–3864.
- Hannisch, W. & Hallagan, L.F., 1997. Primary amebic meningoencephalitis: a review of the clinical literature. *Wilderness & environmental medicine*, 8(4), pp.211–213.
- Hara, T. & Fukuma, T., 2005. Diagnosis of the primary amoebic meningoencephalitis due to *Naegleria fowleri*. *Parasitology International*, 54(4), pp.219–221.
- Harf, C. & Monteil, H., 1988. Interactions between free-living amoebae and *Legionella* in the environment. *Water Science and Technology*, 20(11-12), pp.235–239.
- Hartmann, M., 1910. Untersuchungen über parasitische Amöben. *Archiv für Protistenkunde*, 18, pp.207–220.

- Hebbar, S., Bairy, I., Bhaskaranand, N., Upadhyaya, S., Sarma, M. Sen & Shetty, A.K., 2005. Fatal case of *Naegleria fowleri* meningo-encephalitis in an infant: case report. *Annals of Tropical Paediatrics*, 25(3), pp.223-226.
- Hecht, R.H., Cohen, A.H., Stoner, J. & Irwin, C., 1972. Primary amebic meningoencephalitis in California. *California Medicine*, 117(1), pp.69–73.
- Hermanne, J., Jadin, J.B., Martin, J.J., 1973. Meningoencephalite amibienne primitive en Belgique. Quatre premiers cas. *Acta Paediatrica Belgica*, 27, pp.348–365.
- Hill, V.R., Narayanan, J., Vinjé, J. & Cromeans, T., 2010. Sample Preparation Methods for Molecular Techniques for Drinking Water [Project # 3108]. *Water Research Foundation*.
- Hsu, B.M., Huang, C.C., Chen, J.S., Chen, N.H. & Huang, J. Te, 2011. Comparison of potentially pathogenic free-living amoeba hosts by *Legionella* spp. in substrate-associated biofilms and floating biofilms from spring environments. *Water Research*, 45(16), pp.5171–5183.
- Hsu, B.-M., Lin, C.-L. & Shih, F.-C., 2009. Survey of pathogenic free-living amoebae and *Legionella* spp. in mud spring recreation area. *Water research*, 43(11), pp.2817–2828.
- Huang, S.-W. & Hsu, B.-M., 2010. Survey of *Naegleria* and its resisting bacteria-*Legionella* in hot spring water of Taiwan using molecular method. *Parasitology Research*, 106(6), pp.1395–1402.
- Huang, S.-W. & Hsu, B.-M., 2011. Survey of *Naegleria* from Taiwan recreational waters using culture enrichment combined with PCR. *Acta Tropica*, 119(2-3), pp.114–118.
- Huizinga, H.W. & McLaughlin, G.L., 1990a. Thermal ecology of *Naegleria fowleri* from a power plant cooling reservoir. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(7), pp.2200–2205.
- Hugo, E.R., Stewart, V.J., Gast, R.J., 1992. Purification of amoeba mtDNA using the UNSET procedure. *Protocols in Protozoology* (Eds. A. T. Soldo, J.J. Lee) Allen, Lawrence, Kansas, 7.1.
- Hysmith, R.M. & Franson, R.C., 1982. Elevated levels of cellular and extracellular phospholipases from pathogenic *Naegleria fowleri*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 711(1), pp.26–32.
- Ithoi, I., Ahmad, A.F., Nissapatorn, V., Lau, Y.L., Mahmud, R. & Mak, J.W., 2011. Detection of *Naegleria* Species in Environmental Samples from Peninsular Malaysia S. Bereswill, ed. *PLoS ONE*, 6(9), p.10.
- Jadin, J.B., 1974. Dispersion and cycle of free-living amoebae. *Annales de la Societe Belge de Medecine Tropicale*, 54(4-5), pp.371–385.

- Jaffar-Bandjee, M., Alessandri, J., Molet, B., Clouzeau, J., Jacquemot, L., Sampéris, S. & Saly, J., 2005. Méningo-encéphalite primitive à amibes libres : 1er cas observé à Madagascar. *Bulletin of the Exotic Pathology Society*, 98(1), pp.11–13.
- Jahn T. L. & Bovee, E. C., 1965. Mechanisms of movement in taxonomy of Sarcodina. I. As a basis for a new major dichotomy into two classes, Autotractea and Hydraulea. *American Midland Naturalist*, 73(1), pp.30–40.
- Jahnes, W.G. & Fullmer, H.M., 1957. Free living amoebae as contaminants in monkey kidney tissue culture. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 96(2), pp.484–488.
- Jain, R. & Tilak, V., 2011. Primary amoebic meningoencephalitis due to *Naegleria fowleri*. *Journal of the Indian Medical Association*, 109(7), pp.500–501.
- Jamerson, M., Remmers, K., Cabral, G. & Marciano-Cabral, F., 2009. Survey for the presence of *Naegleria fowleri* Amebae in lake water used to cool reactors at a nuclear power generating plant. *Parasitology Research*, 104(5), pp.969–978.
- Jamieson, A., 1973. The epidemiology of primary amoebic meningo-encephalitis in South Australia. *Prog. Protozool.*, p.198.
- Jamieson, A. & Anderson, K., 1973. A method for the isolation of *Naegleria* species from water samples. *Pathology*, 5(1), pp.55–58.
- Jarillo-Luna, A., Moreno-Fierros, L., Campos-Rodríguez, R., Rodríguez-Monroy, M.A., Lara-Padilla, E. & Rojas-Hernández, S., 2008. Intranasal immunization with *Naegleria fowleri* lysates and Cry1Ac induces metaplasia in the olfactory epithelium and increases IgA secretion. *Parasite Immunology*, 30(1), pp.31–38.
- Jarolim, K.L., McCosh, J.K., Howard, M.J. & John, D.T., 2000. A light microscopy study of the migration of *Naegleria fowleri* from the nasal submucosa to the central nervous system during the early stage of primary amebic meningoencephalitis in mice. *The Journal of Parasitology*, 86(1), pp.50–55.
- John, D.T., Cole, T.B. & Marciano-Cabral, F.M., 1984. Sucker-like structures on the pathogenic amoeba *Naegleria fowleri*. *Applied and Environmental Microbiology*, 47(1), pp.12–14.
- John, D.T. & Howard, M.J., 1995. Seasonal distribution of pathogenic free-living amebae in Oklahoma waters. *Parasitology Research*, 81(3), pp.193–201.
- John, D.T. & John, R. a., 1996. Viability of pathogenic *Acanthamoeba* and *Naegleria* and virulence of *N. fowleri* during long-term cryopreservation. *Folia Parasitologica*, 43(1), pp.43–46.
- John, D.T. & De Jonckheere, J.F., 1985. Isolation of *Naegleria australiensis* from an Oklahoma Lake. *The Journal of Protozoology*, 32(4), pp.571–575.

- Jollos, V., 1917. Untersuchungen zur Morphologie der Amoebenteilung. *In. Arch. f. Protistk. Bd.*, 37, pp.229–275.
- De Jonckheere, J.F., 1994a. Comparison of partial SSUrDNA sequences suggests revisions of species names in the genus *Naegleria*. *European Journal of Protistology*, 30(3), pp.333–341.
- De Jonckheere, J.F., 1994b. Riboprinting of *Naegleria* spp.: small subunit versus large subunit. *Parasitology Research*, 80, pp.230–234.
- De Jonckheere, J.F., 1977. Use of an axenic medium for differentiation between pathogenic and nonpathogenic *Naegleria fowleri* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 33(4), pp.751–757.
- De Jonckheere, J.F., Aerts, M., Martinez, A.J., 1983. *Naegleria australiensis*: experimental meningoencephalitis in mice. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 77(5), pp.712–716.
- De Jonckheere, J.F. & van de Voorde, H., 1977. Comparative study of six strains of *Naegleria* with special reference to nonpathogenic variants of *Naegleria fowleri*. *The Journal of Protozoology*, 24(2), pp.304–309.
- De Jonckheere, J.F. & Van De Voorde, H., 1976. Differences in destruction of cysts and pathogenic and nonpathogenic *Naegleria* and *Acanthamoeba* by chlorine. *Applied and Environmental Microbiology*, 31(2), pp.294–297.
- De Jonckheere J.F., Van Dijck P., Van De Voorde, H., 1975. The effect of thermal pollution on the distribution of *Naegleria fowleri*. *The Journal of Hygiene*, 75, pp.7–13.
- De Jonckheere, J.F., 2002. A century of research on the amoebaflagellate genus *Naegleria*. *Acta Protozoologica*, 41, pp.309–342.
- De Jonckheere, J.F., 1987. Characterization of *Naegleria* species by restriction endonuclease digestion of whole-cell DNA. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 24(1), pp.55–66.
- De Jonckheere, J.F., 1988. Geographic origin and spread of pathogenic *Naegleria fowleri* deduced from restriction enzyme patterns of repeated DNA. *Biosystems*, 21(3-4), pp.269–275.
- De Jonckheere, J.F., 1982. Isoenzyme patterns of pathogenic and non-pathogenic *Naegleria* spp. using agarose isoelectric focusing. *Annales de microbiologie*, 133(2), pp.319–342.
- De Jonckheere, J.F., 1979. Occurrence of *Naegleria* and *Acanthamoeba* in aquaria. *Applied and Environmental Microbiology*, 38(4), pp.590–593.
- De Jonckheere, J.F., 1998. Sequence Variation in the Ribosomal Internal Transcribed Spacers, Including the 5.8S rDNA, of *Naegleria* spp. *Protist*, 149(3), pp.221–228.

- De Jonckheere, J.F., 1989. Variation of electrophoretic karyotypes among *Naegleria* spp. *Parasitology Research*, 76(1), pp.55–62.
- De Jonckheere, J.F., 2014. What do we know by now about the genus *Naegleria*? *Experimental Parasitology*, 145 Suppl, pp.S2–9.
- De Jonckheere, J.F., Baumgartner, M., Eberhardt, S., Opperdoes, F.R. & Stetter, K.O., 2011. *Oramoeba fumarolia* gen. nov., sp. nov., a new marine heterolobosean amoeboflagellate growing at 54°C. *European Journal of Protistology*, 47(1), pp.16–23.
- De Jonckheere, J.F. & Brown, S., 1999. SSUrDNA analysis reveals the existence of a second *Naegleria* sp. with dividing flagellates: *N. robinsoni* sp. nov. *European Journal of Protistology*, 35(3), pp.264–266.
- De Jonckheere, J.F. & Brown, S., 2005. The identification of vahlkampfiid amoebae by ITS sequencing. *Protist*, 156(1), pp.89–96.
- De Jonckheere, J.F. & Brown, S., 1995. *Willaertia minor* is a species of *Naegleria*. *European Journal of Protistology*, 31(1), pp.58–62.
- De Jonckheere, J.F. & Dierickx, P.J., 1982. Determination of acid phosphatase and leucine amino peptidase activity as an identification method for pathogenic *Naegleria fowleri*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 76(6), pp.773–775.
- Jones, D.B., Visvesvara, G.S. & Robinson, N.M., 1975. *Acanthamoeba polyphaga* keratitis and *Acanthamoeba uveitis* associated with fatal meningoencephalitis. *Transactions of the ophthalmological societies of the United Kingdom*, 95(2), pp.221–231.
- Jung, S.Y., Kim, J.H., Lee, Y.J., Song, K.J., Kim, K., Park, S., Im, K. i. & Shin, H.J., 2008. *Naegleria fowleri*: nfa1 gene knock-down by double-stranded RNAs. *Experimental Parasitology*, 118(2), pp.208–213.
- Jung, S.Y., Kim, J.-H., Song, K.J., Lee, Y.J., Kwon, M.H., Kim, K., Park, S., Im, K. & Shin, H.-J., 2009. Gene silencing of nfa1 affects the in vitro cytotoxicity of *Naegleria fowleri* in murine macrophages. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 165(1), pp.87–93.
- Kadlec, V., 1981. Different virulence of *Naegleria fowleri* strains isolated from a swimming pool. *Folia Parasitologica*, 28(2), pp.97–103.
- Kao, P.M., Hsu, B.M., Hsu, T.K., Ji, W.T., Huang, P.H., Hsueh, C.J., Chiang, C.S., Huang, S.-W. & Huang, Y.-L., 2014. Application of TaqMan fluorescent probe-based quantitative real-time PCR assay for the environmental survey of *Legionella* spp. and *Legionella pneumophila* in drinking water reservoirs in Taiwan. *The Science of the Total Environment*, 490, pp.416–421.
- Kao, P.M., Tung, M.C., Hsu, B.M., Chou, M.Y., Yang, H.W., She, C.Y. & Shen, S.M., 2013. Quantitative detection and identification of *Naegleria* spp. in various environmental water samples using real-time quantitative PCR assay. *Parasitology Research*, 112(4), pp.1467–1474.

- Kasprzak, W. & Mazur, T., 1972. Free-living amoebae isolated from waters frequented by people in the vicinity of Poznań, Poland. Experimental studies in mice on the pathogenicity of the isolates. *Zeitschrift fur Tropenmedizin und Parasitologie*, 23(4), pp.391–398.
- Kasprzak, W., Mazur, T. & Cerva, L., 1982. *Naegleria fowleri* in thermally polluted waters. *Folia Parasitologica*, 29(3), pp.211–218.
- Kemble, S.K., Lynfield, R., DeVries, A.S., Drehner, D.M., Pomputius, W.F., Beach, M.J., Visvesvara, G.S., Da Silva, A.J., Hill, V.R., Yoder, J.S., Xiao, L., Smith, K.E. & Danila, R., 2012. Fatal *Naegleria fowleri* infection acquired in minnesota: Possible expanded range of a deadly thermophilic organism. *Clinical Infectious Diseases*, 54(6), pp.805–809.
- Khan, N.A. & Siddiqui, R., 2015. Is there evidence of sexual reproduction (meiosis) in *Acanthamoeba*? *Pathogens and global health*, p.2047773215Y0000000009.
- Kilvington, S., 1995. Identification of *Naegleria fowleri* and other *Naegleria* spp. (free-living amoebae) using cellulose acetate membrane electrophoresis of glucose phosphate isomerase. *FEMS Microbiology Letters*, 133(3), pp.219–223.
- Kilvington, S. & Beeching, J., 1995. Development of a Pcr for Identification of *Naegleria-Fowleri* from the Environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(10), pp.3764–3767.
- Kilvington, S. & White, D.G., 1986. Identification of *Naegleria fowleri* in fresh isolates of environmental amoebae using a staphylococcal coagglutination technique. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 80(4), pp.564–569.
- Kim, J.H., Sohn, H.J., Lee, J., Yong, H.J., Chwae, Y.J., Kim, K., Park, S., Shin, H.J., 2013. Vaccination with lentiviral vector expressing the nfa 1 gene confers a protective immune response to mice infected with *Naegleria fowleri*. *Clinical and Vaccine Immunology*, 20(7), pp.1055-1060.
- Kingston, D. & Warhurst, D.C., 1969. Isolation of amoebae from the air. *Journal of Medical Microbiology*, 2, pp.27–36.
- Kramer, M.H., Lerner, C.J. & Visvesvara, G.S., 1997. Kidney and liver transplants from a donor infected with *Naegleria fowleri*. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(4), pp.1032–1033.
- Kyle, D. & Noblet, G., 1987. Seasonal distribution of thermotolerant free-living amoebae. II. Lake Issaqueena. *The Journal of Protozoology*, 34(1), pp.10–15.
- Kyle, D.E. & Noblet, G.P., 1985. Vertical distribution of potentially pathogenic free-living amoebae in freshwater lakes. *The Journal of protozoology*, 32(1), pp.99–105.
- Lamouroux, M., 1824. Introduction à l’histoire des Zoophytes et animaux rayonnés. *Encyclopédie Méthodique*.

- Lares-Villa, F. & Hernández-Peña, C., 2010. Concentration of *Naegleria fowleri* in natural waters used for recreational purposes in Sonora, Mexico (November 2007-October 2008). *Experimental Parasitology*, 126(1), pp.33–36.
- Lares-Villa, F., De Jonckheere, J.F., De Moura, H., Rechi-Iruretagoyena, A., Ferreira-Guerrero, E., Fernandez-Quintanilla, G., Ruiz-Matus, C. & Visvesvara, G.S., 1993. Five cases of primary amebic meningoencephalitis in Mexicali, Mexico: Study of the isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 31(3), pp.685–688.
- Lattyak, M., Cabral, G. & Marciano-Cabral, F., 1985. Scanning electron microscopy of trophozoites of *Naegleria* species. *Proc. Elect. Microsc. Soc. Am.*, 43, pp.642–643.
- Lawande, R. V., 1983. Recovery of soil amoebae from the air during the harmattan in Zaria, Nigeria. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 77(1), pp.45–49.
- Lee, J., 2010. De novo formation of basal bodies during cellular differentiation of *Naegleria gruberi*: progress and hypotheses. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 21(2), pp.156–162.
- Lee, J., Kim, J.H., Sohn, H.J., Yang, H.J., Na, B.K., Chwae, Y.J., Park, S., Kim, K. & Shin, H.J., 2014. Novel cathepsin B and cathepsin B-like cysteine protease of *Naegleria fowleri* excretory-secretory proteins and their biochemical properties. *Parasitology Research*, 113(8), pp.2765–2776.
- Lee, J., Yoo, J., Sohn, H., Kang, H., Kim, D., Shin, H. & Kim, J., 2015. Protective immunity against *Naegleria fowleri* infection on mice immunized with the rNfa1 protein using mucosal adjuvants. *Parasitology Research*, 114(4), pp.1377–1385.
- Lee, Y.-J., Kim, J.-H., Jeong, S.-R., Song, K.-J., Kim, K., Park, S., Park, M.-S. & Shin, H.-J., 2007. Production of Nfa1-specific monoclonal antibodies that influences the in vitro cytotoxicity of *Naegleria fowleri* trophozoites on microglial cells. *Parasitology Research*, 101(5), pp.1191–1196.
- Lee, Y.J., Kim, J.H., Sohn, H.J., Lee, J., Jung, S.Y., Chwae, Y.J., Kim, K., Park, S. & Shin, H.J., 2011. Effects of immunization with the rNfa1 protein on experimental *Naegleria fowleri*-PAM mice. *Parasite Immunology*, 33(7), pp.382–389.
- Leeuwenhoek, A. van, 1675. De ontdekker der infusorien. *Leiden, Van Doesburgh, Haaxman, P.*
- Legrand, L., Poirier, G. & Leroy, P., 1981. Les équilibres carboniques et l'équilibre calco-carbonique dans les eaux naturelles. Etude graphique, utilisation de calculatrices. *Paris, France: Eyrolles Press.*, p.176.
- Leidy, J., 1878. Amoeba Proteus. *The American Naturalist*, 12(4), p.235.
- Leiva, B., Cladotter, E., Linder, E. & Winiecka-Krusnell, J., 2008. Free-living *Acanthamoeba* and *Naegleria* spp. amebae in water sources of León, Nicaragua. *Revista de Biología Tropical*, 56(2), pp.439–446.

- Lesage, 1905. Culture de l'amibe de la dysenterie des pays chauds. *Annales de l' Institut Pasteur*, 19, pp.9–16.
- Levine, N.D., Corliss, J.O., Cox, F.E., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B.M., Leedale, G.F., Loeblich, A.R., Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E.G., Page, F.C., Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J. & Wallace, F.G., 1980. A newly revised classification of the protozoa. *The Journal of Protozoology*, 27(1), pp.37–58.
- Linné, C., 1758. Systema naturæ per regna tria naturæ, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis. *Holmiæ, Impensis direct. Laurentii Salvii (Salvius publ.)*, Tome I.
- Lopez, C., Budge, P., Chen, J., Bilyeu, S., Mirza, A., Custodio, H., Irazuzta, J., Visvesvara, G. & Sullivan, K., 2012. Primary amebic meningoencephalitis: a case report and literature review. *Pediatric Emergency Care*, 28(3), pp.272–276.
- López-Corella, E., De León, B. & De Jonckheere, J.F., 1989. Primary amebic meningoencephalitis caused by *Naegleria fowleri* in an adolescent from Huetamo, Michoacan, Mexico. *Boletin medico del Hospital Infantil de Mexico*, 46(9), pp. 619–622.
- Lösch, F., 1875. Massive development of amebas in the large intestine. Fedor Aleksandrovich Lesh (Losch). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 24, pp.383–392.
- Lühe, M., 1913. Erstes Urreich der Tiere. In A. Lang, ed. *Handbuch der Morphologie der Wirbellosen Tiere*. G. Fischer.
- Ma, P., Visvesvara, G.S., Martinez, A.J., Theodore, F.H., Daggett, P.M. & Sawyer, T.K., 1990. *Naegleria* and *Acanthamoeba* infections: review. *Reviews of Infectious Diseases*, 12(3), pp.490–513.
- Mahittikorn, A., Mori, H., Popruk, S., Roobthaisong, A., Sutthikornchai, C., Koompaong, K., Siri, S., Sukthana, Y. & Nacapunchai, D., 2015. Development of a rapid, simple method for detecting *Naegleria fowleri* visually in water samples by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *PloS one*, 10(3), p.e0120997.
- Malhotra, K.K., Kakar, P.N., Pillay, P., Pathak, L.R. & Chuttani, H.K., 1978. Unusual presentation of primary amoebic meningoencephalitis--a serious diagnostic and therapeutic problem. *The Journal of tropical medicine and hygiene*, 81(6), pp.113–115.
- Mandal, B.N., Gudex, D.J., Fitchett, M.R., Pullon, D.H., Malloch, J.A., David, C.M. & Apthorp, J., 1970. Acute meningo-encephalitis due to amoebae of the order myxomycetale (slime mould). *New Zealand Medical Journal*, 71(452), pp.16–23.
- Marciano-Cabral, F., 1988. Biology of *Naegleria* spp. *Microbiological Reviews*, 52(1), pp.114–133.
- Marciano-Cabral, F. & Cabral, G., 2003. *Acanthamoeba* spp. as Agents of Disease in Humans. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(2), pp.273–307.

- Marciano-Cabral, F. & Cabral, G.A., 2007. The immune response to *Naegleria fowleri* amebae and pathogenesis of infection. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 51(2), pp.243–259.
- Marciano-Cabral, F. & Cline, M., 1987. Chemotaxis by *Naegleria fowleri* for bacteria. *The Journal of Protozoology*, 34(2), pp.127–131.
- Marciano-Cabral, F. & John, D.T., 1983. Cytopathogenicity of *Naegleria fowleri* for rat neuroblastoma cell cultures: scanning electron microscopy study. *Infection and Immunity*, 40(3), pp.1214–1217.
- Marciano-Cabral, F., Puffenbarger, R. & Cabral, G.A., 2000. The increasing importance of *Acanthamoeba* infections. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 47(1), pp.29–36.
- Marciano-Cabral, F.M. & Fulford, D.E., 1986. Cytopathology of pathogenic and nonpathogenic *Naegleria* species for cultured rat neuroblastoma cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 51(5), pp.1133–1137.
- Marshall, M., Naumovitz, D., Ortega, Y. & Sterling, C., 1997. Waterborne protozoan pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, 10(1), pp.67–85.
- Martinez, A., 1985. Free-Living Amebas: Natural History, Prevention, Diagnosis, Pathology, and Treatment of Disease. *CRC Press, Boca Raton, Fla, USA*.
- Martinez, A.J. & Visvesvara, G.S., 1997. Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, 7(1), pp.583–598.
- McCool, J.A., Spudis, E. V, McLean, W., White, J. & Visvesvara, G.S., 1983. Primary amebic meningoencephalitis diagnosed in the emergency department. *Annals of Emergency Medicine*, 12(1), pp.35–37.
- McLaughlin, G.L., Vodkin, M.H. & Huizinga, H.W., 1991. Amplification of repetitive DNA for the specific detection of *Naegleria fowleri*. *Journal of Clinical Microbiology*, 29(2), pp.227–230.
- Meisler DM, Rutherford I, Bican FE, Ludwig IH, Langston RH, Hall GS, Rhinehart E, V.G., 1985. Susceptibility of *Acanthamoeba* to surgical instrument sterilization techniques. *American Journal of Ophthalmology*, 99(6), pp.724–725.
- Michel, R., Raether, W. & Schupp, E., 1987. Ultrastructure of the amoeba-flagellate *ProtoNaegleria westphali*. *Parasitology Research*, 74(1), pp.23–29.
- Michel, R. & Smirnov, A.V., 1999. The genus *Flamella* Schaeffer, 1926 (lobosea, gymnamoebia), with description of two new species. *European Journal of Protistology*, 35(4), pp.403–410.
- Milyutina, I.A., Aleshin, V. V., Mikrjukov, K.A., Kedrova, O.S. & Petrov, N.B., 2001. The unusually long small subunit ribosomal RNA gene found in amitochondriate amoebiflagellate *Pelomyxa palustris*: its rRNA predicted secondary structure and phylogenetic implication. *Gene*, 272(1-2), pp.131–139.

- Moura, H., Izquierdo, F., Woolfitt, A.R., Wagner, G., Pinto, T., del Aguila, C. & Barr, J.R., 2015. Detection of Biomarkers of Pathogenic *Naegleria fowleri* through Mass Spectrometry and Proteomics. *Journal of Eukaryotic Cell*, 62(1), pp.12–20.
- Moura, H., Ospina, M., Woolfitt, A.R., Barr, J.R. & Visvesvara, G.S., 2003. Analysis of four human microsporidian isolates by MALDI-TOF mass spectrometry. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 50(3), pp.156–163.
- Moura, H., Woolfitt, A.R., Carvalho, M.G., Pavlopoulos, A., Teixeira, L.M., Satten, G.A. & Barr, J.R., 2008. MALDI-TOF mass spectrometry as a tool for differentiation of invasive and noninvasive *Streptococcus pyogenes* isolates. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 53(3), pp.333–342.
- Moussa, M., De Jonckheere, J.F., Guerlotté, J., Richard, V., Bastaraud, A., Romana, M. & Talarmin, A., 2013. Survey of *Naegleria fowleri* in geothermal recreational waters of Guadeloupe (French West Indies). *PloS one*, 8(1), p.e54414.
- Moussa, M., Tissot, O., Guerlotté, J., De Jonckheere, J.F. & Talarmin, A., 2014. Soil is the origin for the presence of *Naegleria fowleri* in the thermal recreational waters. *Parasitology Research*, 114(1), pp.311–5.
- Mull, B.J., Narayanan, J. & Hill, V.R., 2013. Improved method for the detection and quantification of *Naegleria fowleri* in water and sediment using immunomagnetic separation and real-time PCR. *Journal of Parasitology Research*, 2013.
- Müller, O.F., 1786. Animalcula infusoria fluvialia et marina, quae detexit, systematice descripsit et ad vivum delineari curavit.
- Müller, O.F., 1773. Vermivm terrestrium et fluviatilium, seu, Animalium infusoriorum, helminthicorum et testaceorum, non marinorum, succincta historia. v 1.
- Musgrave, 1906. The cultivation and pathogenesis of amoeba. *The Philippine Journal of Science*, 1.
- Nacapunchai, D., Lamom, C., Ruangsittichai, C. & Sriwichai, P., 1999. Isolation of Free-living Amebae from Soil and Water Resources in Thailand. *The Journal of Tropical Medicine and Parasitology*, 22(1), pp.22–26.
- Naegler, K., 1909. Entwicklungsgeschichtliche studien über Amoeben. *Arch. f. Protistenkunde. Bd.*, 15, pp.1–53
- Nerad, T.A. & Daggett, P.M., 1979. Starch gel electrophoresis: an effective method for separation of pathogenic and nonpathogenic *Naegleria* strains. *The Journal of Protozoology*, 26(4), pp.613–615.
- Newsome, A.L., Baker, R.L., Miller, R.D. & Arnold, R.R., 1985. Interactions between *Naegleria fowleri* and *Legionella pneumophila*. *Infection and Immunity*, 50(2), pp.449–452.

- Newsome, A.L. & Wilhelm, W.E., 1981. Effect of exogenous iron on the viability of pathogenic *Naegleria fowleri* in serum. *Experientia*, 37(11), pp.1160–1162.
- Newsome, A.L. & Wilhelm, W.E., 1983. Inhibition of *Naegleria fowleri* by microbial iron-chelating agents: Ecological implications. *Applied and Environmental Microbiology*, 45(2), pp.665–668.
- Nicolas, M., De Jonckheere, J.F., Pernin, P., Bataille, H., Le Bris, V. & Herrmann-Storck, C., 2010a. Molecular diagnosis of a fatal primary amoebic meningoencephalitis in Guadeloupe (French West Indies). *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique (1990)*, 103(1), pp.14–18.
- Niyyati, M., Lasjerdi, Z., Nazar, M., Haghghi, A. & Mojarad, E.N., 2012. Screening of recreational areas of rivers for potentially pathogenic free-living amoebae in the suburbs of Tehran, Iran. *Journal of Water and Health*, 10(1), pp.140–146.
- Noc, F., 1909. Recherches sur la dysenterie amibienne en Cochinchine. *Annales de l'Institut Pasteur*, 23, pp.177–204.
- Norton, R., Harris, P., Ryan, P. & Simpson, S., 2010. Another killer of the Australian bush: a rapidly fatal meningoencephalitis in a child. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 50(10), pp.1422–1424.
- Notomi, T., 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28(12), p.63e–63.
- Oh, Y.-H., Jeong, S.-R., Kim, J.-H., Song, K.-J., Kim, K., Park, S., Sohn, S. & Shin, H.-J., 2005. Cytopathic changes and pro-inflammatory cytokines induced by *Naegleria fowleri* trophozoites in rat microglial cells and protective effects of an anti-Nf1 antibody. *Parasite Immunology*, 27(12), pp.453–459.
- Olomu, N., Martinez, A.J., Lamarco, K.L., Nerad, T.A., Saha, A.K., Das, S. & Glew, R.H., 1986. Demonstration of various acid hydrolases and preliminary characterization of acid phosphatase in *Naegleria fowleri*. *The Journal of Protozoology*, 33(3), pp.317–321.
- Otto, G.P., Wu, M.Y., Kazgan, N., Anderson, O.R. & Kessin, R.H., 2004. Dictyostelium Macroautophagy Mutants Vary in the Severity of Their Developmental Defects. *Journal of Biological Chemistry*, 279(15), pp.15621–15629.
- Page, F., 1988. A New Key to Freshwater and Soil Gymnamoebae. *Freshwater Biological Association, Ambleside, Cumbria, England*.
- Page, F.C., 1975. Morphological Variation in the Cyst Wall of *Naegleria gruberi* (Amoebida, Vahlkampfiidae). *Protistologica*, 11, pp.195–204 ST – Morphological Variation in the Cyst.
- Page, F.C., 1967. Re-definition of the genus *Acanthamoeba* with descriptions of three species. *The Journal of Protozoology*, 14(4), pp.709–724.

- Page, F.C., 1974. *Rosculus ithacus* Hawes, 1963 (Amoebida, Flabelluidae) and the Amphizoic Tendency in Amoebae. *Acta Protozoologica*, 13, pp.143–154 ST.
- Painter, S.M., Pfau, R.S., Brady, J.A. & McFarland, A.M.S., 2013. Quantitative assessment of *Naegleria fowleri* and *Escherichia coli* concentrations within a Texas reservoir. *Journal of Water and Health*, 11(2), pp.346–357.
- Pallas, P.S., 1766. Elenchus zoophytorum sistens generum adumbrationes generaliores et specierum cognitarum succinctas descriptiones cum selectis auctorum synonymis. *Hagæ. (F. Varrentrapp)*, pp.1–28.
- Pan, N. & Ghosh, T., 1971. Primary amoebic meningoencephalitis in two Indian children. *Journal of Indian Medical Association*, 56, pp.134–137.
- Pánek, T., Silberman, J.D., Yubuki, N., Leander, B.S. & Cepicka, I., 2012. Diversity, Evolution and Molecular Systematics of the Psalteriomonadidae, the Main Lineage of Anaerobic/Microaerophilic Heteroloboseans (Excavata: Discoba). *Protist*, 163(6), pp.807–831.
- Parija, S.C. & Jayakeerthee, S.R., 1999. *Naegleria fowleri*: a free living amoeba of emerging medical importance. *The Journal of Communicable Diseases*, 31(3), pp.153–159.
- Park, J.S. and Simpson, A.G.B., 2011. Characterization of *Pharyngomonas kirbyi* (= "Macropharyngomonas halophila" nomen nudum), a very deep-branching, obligately halophilic heterolobosean flagellate. *Protist*, 55(6), pp.501–509.
- Patras, D. & Andujar, J.J., 1966. Meningoencephalitis due to *Hartmannella (Acanthamoeba)*. *American Journal of Clinical Pathology*, 46(2), pp.226–233.
- Patterson, M., Woodworth, T.W., Marciano-Cabral, F. & Bradley, S.G., 1981. Ultrastructure of *Naegleria fowleri* enflagellation. *Journal of Bacteriology*, 147(1), pp.217–226.
- Pélandakis, M. & Pernin, P., 2002. 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4), pp.2061–2065.
- Penard, E., 1890. Études sur les Rhizopodes d'eau douce. *Memoires de la Société de physique et d'histoire naturelle de Genève*, 31, pp.1–230.
- Pernin, P., 1984. Isoenzyme patterns of pathogenic and nonpathogenic thermophilic *Naegleria* strains by isoelectric focusing. *International Journal for Parasitology*, 14(5), pp.459–465.
- Pernin, P., Cariou, M.L. & Jacquier, A., 1985. Biochemical identification and phylogenetic relationships in free-living amoebas of the genus *Naegleria*. *The Journal of protozoology*, 32(4), pp.592–603.

- Pernin, P. & De Jonckheere, J.F., 1992. Appearance in Europe of *Naegleria fowleri* displaying the Australian type of restriction-fragment-length polymorphism. *Parasitology Research*, 78(6), pp.479–481.
- Pernin, P., Pélandakis, M., Rouby, Y., Faure, A. & Siclet, F., 1998. Comparative recoveries of *Naegleria fowleri* amoebae from seeded river water by filtration and centrifugation. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(3), pp.955–959.
- Petit, F., Vilchez, V., Torres, G., Molina, O., Dorfman, S., Mora, E. & Cardozo, J., 2006. Meningoencefalitis amebiana primaria: comunicacion de dos nuevos casos Venezolanos. *Archivos de Neuro-Psiquiatria*, 64(4), pp.1043–1046.
- Pierce, C.Y., Barr, J.R., Woolfitt, A.R., Moura, H., Shaw, E.I., Thompson, H.A., Massung, R.F. & Fernandez, F., 2007. Strain and phase identification of the U.S. category B agent *Coxiella burnetii* by matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and multivariate pattern recognition. *Analytica Chimica Acta*, 583, pp.23–31.
- Pitat, J., 1992. Dolé-les-Bains: historique et perspectives actuelles. *La presse thermale et climatique*, 129, pp.127–131.
- Postgate, J.R., 1969. Viable counts and viability. *Meth. Microbiol.*, 1, pp.611–628.
- Pougnard, C., Catala, P., Drocourt, J.-L., Legastelois, S., Pernin, P., Pringuez, E. & Lebaron, P., 2002. Rapid Detection and Enumeration of *Naegleria fowleri* in Surface Waters by Solid-Phase Cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(6), pp.3102–3107.
- Poungvarin, M. & Jariya, P., 1991. The fifth nonlethal case of primary amoebic meningoencephalitis. *Journal of the Medical Association of Thailand*, 74(2), pp.112–115.
- Price, J.A., 1995. Some factors stimulating movement by *Naegleria fowleri*. *European Journal of Protistology*, 31(1), pp.8–15.
- Puschkarew, B., 1913. Über die Verbreitungen der Susswasserprotozoen durch die Luft. *Arch. Protistenkd. BD*, 23, pp.323–362.
- Puytorac, P.D., Grain, J., Mignot, J.P., 1987. Précis de Protistologie. *Société Nouvelle des Editions Boubée*, p.581.
- Puzon, G.J., Lancaster, J.A., Wylie, J.T. & Plumb, I.J., 2009. Rapid detection of *Naegleria fowleri* in water distribution pipeline biofilms and drinking water samples. *Environmental Science Technology*, 43(17), pp.6691–6696.
- Qvarnstrom, Y., Da Silva, A.J., Schuster, F.L., Gelman, B.B. & Visvesvara, G.S., 2009. Molecular confirmation of *Sappinia pedata* as a causative agent of amoebic encephalitis. *The Journal of Infection Diseases*, 199(8), pp.1139–1142.

- Qvarnstrom, Y., Visvesvara, G.S., Sriram, R. & Da Silva, A.J., 2006. Multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, and *Naegleria fowleri*. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(10), pp.3589–3595.
- Pussard, R., Pons, M., 1979. Etudes des pores kystiques de *Naegleria* (Vahlkampfiidae-Amoebida). *Protistologica*, 15, pp.163–175.
- Ramesh, M.A., Malik, S.-B. & Logsdon, J.M., 2005. A phylogenomic inventory of meiotic genes; evidence for sex in *Giardia* and an early eukaryotic origin of meiosis. *Current Biology*, 15(2), pp.185–191.
- Reilly, M.F., White, K.L. & Bradley, S.G., 1983. Host resistance of mice to *Naegleria fowleri* infections. *Infection and Immunity*, 42(2), pp.645–652.
- Réveiller, F.L., Marciano-Cabral, F., Pernin, P., Cabanes, P.A. & Legastelois, S., 2000. Species specificity of a monoclonal antibody produced to *Naegleria fowleri* and partial characterization of its antigenic determinant. *Parasitology Research*, 86(8), pp.634–641.
- Réveiller, F.L., Varenne, M.P., Pougard, C., Cabanes, P.A., Pringuez, E., Pourima, B., Legastelois, S. & Pernin, P., 2003. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the identification of *Naegleria fowleri* in environmental water samples. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 50(2), pp.109–113.
- Rivera, F., Ramirez, P., Vilaclara, G., Robles, E. & Medina, F., 1983. A survey of the pathogenic and free-living amoebae inhabiting swimming pool water in Mexico City. *Environmental Research*, 32(1), pp.205–211.
- Rivera, F., Roy-Ocotla, G., Rosas, I., Ramirez, E., Bonilla, P. & Lares, F., 1987. Amoebae isolated from the atmosphere of Mexico City and environs. *Environmental Research*, 42(1), pp.149–154.
- Robinson, B.S., Christy, P., Hayes, S.J. & Dobson, P.J., 1992. Discontinuous genetic variation among mesophilic *Naegleria* isolates: further evidence that *N. gruberi* is not a single species. *The Journal of Protozoology*, 39, pp.702–712.
- Robinson, B.S., Monis, P.T. & Dobson, P.J., 2006. Rapid, sensitive, and discriminating identification of *Naegleria* spp. by real-time PCR and melting-curve analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(9), pp.5857–5863.
- Robinson, B.S., Monis, P.T., Henderson, M., Gelonese, S. & Ferrante, A., 2004. Detection and significance of the potentially pathogenic amoeboflagellate *Naegleria italica* in Australia. *Parasitology International*, 53(1), pp.23–27.
- Rodríguez-Zaragoza, S., 1994. Ecology of free-living amoebae. *Critical Reviews in Microbiology*, 20(3), pp.225–241.
- Roesel Von Rosenhof, A.J., 1755. Der monatlich herausgegebenen Insecten-Belustigung Dritter Theil. *Nuremberg*, 3.

- Rogerson, A. & Patterson, D., 2002. The Naked Ramicristate Amoebae (Gymnamoebae). In: Lee, J.J., Leedale, G.F., Bradbury, P. (Eds.), *An Illustrated Guide to the Protozoa*, 2nd ed. Society of Protozoologists, Lawrence, Kansas., pp.1023–1053.
- Rojas-Hernández, S., Jarillo-Luna, A., Rodríguez-Monroy, M., Moreno-Fierros, L. & Campos-Rodríguez, R., 2004. Immunohistochemical characterization of the initial stages of *Naegleria fowleri* meningoencephalitis in mice. *Parasitology Research*, 94(1), pp.31–36.
- Rojas-Hernández, S., Rodríguez-Monroy, M.A., López-Revilla, R., Reséndiz-Albor, A.A. & Moreno-Fierros, L., 2004. Intranasal coadministration of the Cry1Ac protoxin with amoebal lysates increases protection against *Naegleria fowleri* meningoencephalitis. *Infection and Immunity*, 72(8), pp.4368–4375.
- Rojas-Hernández, S., Rodríguez-Monroy, M.A., Moreno-Fierros, L., Jarillo-Luna, A., Carrasco-Yepez, M., Miliar-García, A. & Campos-Rodríguez, R., 2007. Nitric oxide production and nitric oxide synthase immunoreactivity in *Naegleria fowleri*. *Parasitology Research*, 101(2), pp.269–274.
- Rondanelli, E. G., Carosi, G., Lanzarini, G. & Filice, G., 1987. Ultrastructure of *Acanthamoeba-Naegleria* free-living amoebae. In: Rondanelli, E. G. (ed.), *Amphizoic Amoebae Human Pathology. Infectious Disease Color Atlas Monographs*. Picci Nuova Libreria, Padua, Italy., pp.87–125.
- Salazar H.C., Moura H., Fernandes O., et al., 1986. Isolation of *Naegleria fowleri* from a lake in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene*, 80(2), pp.348–349.
- Saleem, T., Rabbani, M. & Jamil, B., 2009. Primary amoebic meningoencephalitis: two new cases from Pakistan. *Tropical Doctor*, 39(4), pp.242–243.
- Dos Santos, J.G., 1970. Fatal primary amoebic meningoencephalitis, a retrospective study in Richmond. *American Journal of Clinical Pathology*, 54(4), pp.737–740.
- Sarkar, P., 2008. Occurrence and inactivation of emerging pathogens in the environment. *PhD Thesis, The University of Arizona*.
- Sarkar, P. & Gerba, C.P., 2012. Inactivation of *Naegleria fowleri* by chlorine and ultraviolet light. *Journal - American Water Works Association*, 104(3), pp.51–52.
- Sautet, 1968. Les ressources hydrominérales de la Guadeloupe. *Revue du Syndicat d'initiative de Basse-Terre*, 3^{ème} édition.
- Sawyer, T.K., 1989. Free-living pathogenic and nonpathogenic amoebae in Maryland soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(5), pp.1074–1077.
- Schaeffer, A.A., 1926. Taxonomy of the Amebas. *Carnegie Institution of Washington Publication*.

- Schardinger, F., 1899. Entwicklungskreis einer Amoeba (Gymnamoeba): *Amoeba gruberi*. *Sitzb Kaiserl. Akad. Wiss. Wien Abt. I*, 108, pp.713–734.
- Schaudinn, F., 1903. Untersuchungen über die Fortpflanzung einiger Rhizopoden. *Arb. Kasis. Gesund.*, 19, pp.547–576.
- Schoeman, C.J., van der Vyver, A.E. & Visvesvara, G.S., 1993. Primary amoebic meningoencephalitis in southern Africa. *The Journal of Infection*, 26(2), pp.211–214.
- Schuster, F., Guglielmo, B. & Visvesvara, G., 2006. In-vitro activity of miltefosine and voriconazole on clinical isolates of free-living amebas: *Balamuthia mandrillaris*, *Acanthamoeba* spp., and *Naegleria fowleri*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 53(2), pp.121–126.
- Schuster, F.L., 2002. Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amebas. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(3), pp.342–354.
- Schuster, F.L., 1975. Ultrastructure of mitosis in the amoeboflagellate *Naegleria gruberi*. *Tissue and Cell*, 7(1), pp.1–11.
- Schuster, F.L. & Visvesvara, G.S., 2004. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *International Journal for Parasitology*, 34(9), pp.1001–1027.
- Schuster, F.L. & Visvesvara, G.S., 2004. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *International Journal for Parasitology*, 34(9), pp.1001–1027.
- Seidel, J.S., Harmatz, P., Visvesvara, G.S., Cohen, A., Edwards, J. & Turner, J., 1982. Successful treatment of primary amoebic meningoencephalitis. *The New England Journal of Medicine*, 306, pp.346–348.
- Shakoor, S., Beg, M.A., Mahmood, S.F., Bandea, R., Sriram, R., Noman, F., Ali, F., Visvesvara, G.S. & Zafar, A., 2011. Primary amebic meningoencephalitis caused by *Naegleria fowleri*, Karachi, Pakistan. *Emerging Infectious Diseases*, 17(2), pp.258–261.
- Sheehan, K.B., Ferris, M.J. & Henson, J.M., 2003. Detection of *Naegleria* sp. in a thermal, acidic stream in Yellowstone National Park. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 50(4), pp.263–265.
- Shenoy, S., Wilson, G., Prashanth, H. V., Vidyalakshmi, K., Dhanashree, B. & Bharath, R., 2002. Primary meningoencephalitis by *Naegleria fowleri*: First reported case from Mangalore, South india. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(1), pp.309–310.
- Shibayama, M., Serrano-Luna, J. de J., Rojas-Hernández, S., Campos-Rodríguez, R. & Tsutsumi, V., 2003. Interaction of secretory immunoglobulin A antibodies with *Naegleria fowleri* trophozoites and collagen type I. *Canadian Journal of Microbiology*, 49(3), pp.164–170.

- Shin, H.J., Cho, M.S., Jung, S.U., Kim, H.I., Park, S., Kim, H.J. & Im, K.I., 2001. Molecular cloning and characterization of a gene encoding a 13.1 kDa antigenic protein of *Naegleria fowleri*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 48(6), pp.713–717.
- Simeon, E.C., Natividad, F.F., Enriquez, G.L., 1990. The pathogenicity of a Philippine isolate of *Naegleria* sp. in mice: effects of dose levels and routes of infection. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 21(4), pp.598–606.
- Singh, B.N. & Das, S.R., 1970. Studies on Pathogenic and Non-Pathogenic Small Free-Living Amoebae and the Bearing of Nuclear Division on the Classification of the Order Amoebida. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 259(832), pp.435–476.
- Sirinavin, S., Jariya, P., Lertlaituan, P., Chuahirun, S. & Pongkripetch, M., 1989. Primary amoebic meningoencephalitis in Thailand: report of a case and review literatures. *Journal of the Medical Association of Thailand*, 72 Suppl 1, pp.174–176.
- Smirnov, A., Nassonova, E., Berney, C., Fahrni, J., Bolivar, I. & Pawlowski, J., 2005. Molecular phylogeny and classification of the lobose amoebae. *Protist*, 156(2), pp.129–142.
- Smirnov, A. V & Michel, R., 1999. New data on the cyst structure of *Hartmannella*. *Protistology*, 1(2), pp.82–85.
- Sohn, H.J., Kim, J.H., Shin, M.H., Song, K.J. & Shin, H.J., 2010. The Nf-actin gene is an important factor for food-cup formation and cytotoxicity of pathogenic *Naegleria fowleri*. *Parasitology Research*, 106(4), pp.917–924.
- Somboonyosdej, S. & Pinkaew, P., 1987. Primary amoebic meningoencephalitis : a report of two cases in Trad Hospital. *J. Ped. Soc. Thai.*, 26, pp.6–8.
- Song, K.-J., Jang, Y.S., Lee, Y. a, Kim, K. a, Lee, S.K. & Shin, M.H., 2011. Reactive oxygen species-dependent necroptosis in Jurkat T cells induced by pathogenic free-living *Naegleria fowleri*. *Parasite Immunology*, 33(7), pp.390–400.
- Sparagano, O., Drouet, E., Brebant, R., Manet, E., Denoyel, G.A. & Pernin, P., 1993. Use of monoclonal antibodies to distinguish pathogenic *Naegleria fowleri* (cysts, trophozoites, or flagellate forms) from other *Naegleria* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 31(10), pp.2758–2763.
- Stevens, A.R., De Jonckheere, J. & Willaert, E., 1980. *Naegleria lovaniensis* new species: Isolation and identification of six thermophilic strains of a new species found in association with *Naegleria fowleri*. *International Journal for Parasitology*, 10(1), pp.51–64.
- Streby, A., Mull, B.J., Levy K., Hill, V.R., 2015. Comparison of real-time PCR methods for the detection of *Naegleria fowleri* in surface water and sediment. *Parasitology Research*, 114(5), pp.1739–1746.

- Sugita, Y., Fujii, T., Hayashi, I., Aoki, T., Yokoyama, T., Morimatsu, M., Fukuma, T. & Takamiya, Y., 1999. Primary amebic meningoencephalitis due to *Naegleria fowleri*: an autopsy case in Japan. *Pathology International*, 49(5), pp.468–470.
- Sykora, J.L., Keleti, G. & Martinez, A.J., 1983. Occurrence and pathogenicity of *Naegleria fowleri* in artificially heated waters. *Applied and Environmental Microbiology*, 45(3), pp.974–979.
- Taylor, P.W., 1977. Isolation and experimental infection of free-living amoebae in freshwater fishes. *The Journal of Parasitology*, 63(2), pp.232–237.
- Thomas, V., McDonnell, G., Denyer, S.P. & Maillard, J.-Y., 2009. Free-living amoebae and their intracellular pathogenic microorganisms: risks for water quality. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(3), pp.231–259.
- Thong, Y.H. & Ferrante, A., 1986. Migration patterns of pathogenic and nonpathogenic *Naegleria* spp. *Infection and Immunity*, 51(1), pp.177–180.
- Tiewchaloren, S. & Junnu, V., 1999. Factors Affecting the Viability of Pathogenic *Naegleria* Species Isolated from Thai Patients. *Journal of Tropical Medicine and Parasitology*, 22(1), pp.15–21.
- Tiewcharoen, S. & Junnu, V., 2001. Distribution of pathogenic *Naegleria* spp in Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 32(SUPPL. 2), pp.172–178.
- Trabelsi H, Dendana F, Sellami A, Sellami H, Cheikhrouhou F, Neji S, Makni F, A.A., 2012. Pathogenic free-living amoebae: epidemiology and clinical review. *Epidemiology and Clinical Review Pathologie Biologie*, 60(6), pp.399–405.
- Trnková K. & Madarová L., K.C., 2008. Primary Amoebic Meningoencephalitis (*Naegleriasis*) – Problem of Public Health? *Hygiene*, 53(2), pp.53–59.
- Tse, C. & Capeau, J., 2003. Quantification des acides nucléiques par PCR quantitative en temps réel. *Annales de Biologie Clinique*, 61(3), pp.279–293.
- Tuppeny, M., 2011. Primary Amoebic Meningoencephalitis With Subsequent Organ Procurement. *Journal of Neuroscience Nursing*, 43(5), pp.274–279.
- Tyndall, R.L., Ironside, K.S., Metler, P.L., Tan, E.L., Hazen, T.C. & Fliermans, C.B., 1989. Effect of thermal additions on the density and distribution of thermophilic amoebae and pathogenic *Naegleria fowleri* in a newly created cooling lake. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(3), pp.722–732.
- Vahlkampf, E., 1905. Beiträge zur Biologie und Entwicklungsgeschichte von *Amoeba limax*. *Arch. Protistenk*, 5, pp.167–220.
- Valenzuela, G., López-Corella, E. & De Jonckheere, J.F., 1984. Primary amoebic meningoencephalitis in a young male from northwestern Mexico. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 78(4), pp.558–559.

- Vandepitte, J., Van den Driessche, E., Van Dijck, P.J. & De Jonckheere, J., 1974. A new case of primary amoebic meningo-encephalitis observed in Belgium. *Annales de la Societe Belge de Medecine Tropicale*, 54(4-5), pp.297–303.
- Vargas-Zepeda, J., Gómez-Alcalá, A. V, Vásquez-Morales, J.A., Licea-Amaya, L., De Jonckheere, J.F. & Lares-Villa, F., 2005. Successful treatment of *Naegleria fowleri* meningoencephalitis by using intravenous amphotericin B, fluconazole and rifampicin. *Archives of Medical Research*, 36(1), pp.83–86.
- Villegas, E.N., Glassmeyer, S.T., Ware, M.W., Hayes, S.L. & Schaefer, F.W. 3rd, 2006. Matrixassisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry-based analysis of *Giardia lamblia* and *Giardia muris*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 53(Suppl 1), pp.S179–181.
- Viriyaajakul, P Rochanawutanon, M. & Sirinavin, S., 1997. Case report: *Naegleria meningomyeloencephalitis*. *Southeast Asian. Journal of Tropical Medicine Public Health.*, 28, pp.237–240.
- Visvesvara, G. & Healy, G., 1980. Disc electrophoretic patterns of esterase isoenzymes of *Naegleria fowleri* and *N. gruberi*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene*, 74(3), pp.411–412.
- Visvesvara, G.S., 2010. Free-Living Amebae as Opportunistic Agents of Human Disease. *Journal of Neuroparasitology*, 1, pp.1–13.
- Visvesvara, G.S., 2013. Infections with free-living amebae. *Handbook of Clinical Neurology*, 114, pp.153–168.
- Visvesvara, G.S., Moura, H. & Schuster, F.L., 2007. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 50(1), pp.1–26.
- Visvesvara, G.S., Moura, H. & Schuster, F.L., 2007. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 50(1), pp.1–26.
- Visvesvara, G.S. & Schuster, F.L., 2008. Opportunistic Free-living Amebae, Part I. *Clinical Microbiology Newsletter*, 30(20), pp.151–158.
- Volkonsky, M., 1931. *Hartmanella castellanii* Douglas, et classification des Hartmannelles. *Archives de Zoologie Expérimentale et Générale*, 72, pp.317–329.
- Wagner, W., Duma, R., McGehee, R. & Suter, G., 1969. Primary amoebic meningoencephalitis. *Morbidity Mortality Weekly Report*, 18, pp.241–242.
- Walker, E.L., 1908. The Parasitic Amebæ of the intestinal Tract of Man and other Animals. *The Journal of Medical Research*, 17(4), pp.379–460.7.

- Wang, A., Kay, R., Poon, W.S. & Ng, H.K., 1993. Successful treatment of amoebic meningoencephalitis in a Chinese living in Hong Kong. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 95(3), pp.249–252.
- Wang, W., Wei, F., Li, J., Li, N. & Liu, Q., 2014. Isolation and identification of *Naegleria* species from environmental water in Changchun, Northeastern China. *Iranian Journal of Parasitology*, 9(2), pp.254–259.
- Wattanaweeradej, W., Rudeewilai, S. & Simasathien, S., 1996. Primary amoebic meningoencephalitis: the first case report in Pramongkutklao Hospital and literature review. *Royal Thai Army Med. J.*, 49, pp.221–227.
- Weik, R.R. & John, D.T., 1977. Agitated mass cultivation of *Naegleria fowleri*. *The Journal of Parasitology*, 63(5), pp.868–871.
- Wellings, F.M., Amuso, P.T., Lewis, A.L., Farmelo, M.J., Moody, D.J. & Osikowicz, C.L., 1979. Pathogenic *Naegleria*: Distribution in Nature. *U.S. Environmental Protection Agency*.
- Willaert, E., Stevens, A.R. & Tyndall, R.L., 1978. *Acanthamoeba* royreba sp. n. from a human tumor cell culture. *The Journal of Protozoology*, 25(1), pp.1–14.
- Willmer, E.N., 1956. Factors Which Influence the Acquisition of Flagella by the Amoeba, *Naegleria* Gruberi. *The Journal of Experimental Biologie*, pp.583–603.
- Wiwanitkit, V., 2004. Review of clinical presentations in Thai patients with primary amoebic meningoencephalitis. *Medscape General Medicine*, 6(1), p.2.
- Wong, M.M., Karr, S.L. & Chow, C.K., 1977. Changes in the virulence of *Naegleria fowleri* maintained in vitro. *The Journal of Parasitology*, 63(5), pp.872–878.
- Wunschel, D.S., Hill, E.A., McLean, J.S., Jarman, K., Gorby, Y.A., Valentine, N. & Wahl, K., 2005. Effects of varied pH, growth rate and temperature using controlled fermentation and batch culture on matrix assisted laser desorption/ionization whole cell protein fingerprints. *Journal of Microbiological Methods*, 62(3), pp.259–271.
- Yoder, J.S., Eddy, B.A., Visvesvara, G.S., Capewell, L. & Beach, M.J., 2010. The epidemiology of primary amoebic meningoencephalitis in the USA, 1962-2008. *Epidemiology and Infection*, 138(7), pp.968–975.
- Yoder, J.S., Straif-Bourgeois, S., Roy, S.L., Moore, T.A., Visvesvara, G.S., Ratard, R.C., Hill, V.R., Wilson, J.D., Linscott, A.J., Crager, R., Kozak, N.A., Sriram, R., Narayanan, J., Mull, B., Kahler, A.M., Schneeberger, C., Da Silva, A.J., Poudel, M., Baumgarten, K.L., Xiao, L. & Beach, M.J., 2012. Primary amebic meningoencephalitis deaths associated with sinus irrigation using contaminated tap water. *Clinical Infectious Diseases*, 55(9), pp.79–85.
- Zhou, L., Sriram, R., Visvesvara, G.S. & Xiao, L., 2003. Genetic variations in the internal transcribed spacer and mitochondrial small subunit rRNA gene of *Naegleria* spp. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 50 Suppl, pp.522–526.

Annexes

Annexe I : Fiche de prélèvement

CAMPAGNE <i>Naegleria fowleri</i> 2013		
Nom de la commune :		
Nom du lieu dit :		
Nom de la source :		
Nom des agents effectuant les prélèvements :		
Date du prélèvement :		Heure du prélèvement :
Température de l'eau :	température de l'air :	pH :
Statut du site : Contrôle sanitaire S <input type="checkbox"/>		Campagne Amibes IPG-PE <input type="checkbox"/>
Aspect de l'eau : limpide <input type="checkbox"/> trouble <input type="checkbox"/>		
Nature du bassin : N – Naturel <input type="checkbox"/> ; B – Bétonné <input type="checkbox"/> ; C – Carrelé <input type="checkbox"/> ; A – Autre <input type="checkbox"/> à préciser :		
Profondeur approximative du bassin : H < 1 m <input type="checkbox"/>		H > 1 m <input type="checkbox"/>
Etat du bassin (algues, ...) : 1 – propre 2 – insuffisant 3- sale		
Présence d'algues sur les parois :		oui <input type="checkbox"/> non <input type="checkbox"/>
Présence de mousse sur les parois :		oui <input type="checkbox"/> non <input type="checkbox"/>
Présence d'algues sur le fond du bassin :		oui <input type="checkbox"/> non <input type="checkbox"/>
Présence de sédiments au fond du bassin :		oui <input type="checkbox"/> non <input type="checkbox"/>
Fréquentation du bassin : 0 – nulle ; 1 – faible ; 2 – moyenne ; 3 – importante		

Annexe II : Tables NPP

Nombre répétitions positives					
10 x 100 ml	10 x 10 ml	NPP/l	NPP/l corrigé	Lim inf	Lim sup
0	0		< 2		
0	1	0,91	2	1	14
0	2	1,83	4	1	16
0	3	2,77	6	2	19
0	4	3,70	8	3	22
0	5	4,65	10	4	25
0	6	5,61	12	5	28
0	7	6,58	14	6	31
0	8	7,55	16	7	35
0	9	8,54	18	8	38
0	10	9,53	20	9	41
1	0	0,95	2	1	14
1	1	1,92	4	1	16
1	2	2,89	6	2	19
1	3	3,88	8	3	22
1	4	4,87	10	4	26
1	5	5,88	12	5	29
1	6	6,90	14	6	32
1	7	7,94	16	8	36
1	8	8,98	18	9	39
1	9	10,04	21	10	43
1	10	11,11	23	11	47
2	0	2,01	5	1	16
2	1	3,03	7	2	20
2	2	4,07	9	3	23
2	3	5,12	11	5	27
2	4	6,19	13	6	30
2	5	7,27	15	7	34
2	6	8,37	17	8	37
2	7	9,48	19	9	41
2	8	10,62	22	11	45
2	9	11,77	24	12	49
2	10	12,93	26	13	53
3	0	3,18	7	3	20
3	1	4,28	9	4	24
3	2	5,40	11	5	27
3	3	6,53	14	6	31
3	4	7,69	16	7	35
3	5	8,86	18	9	39
3	6	10,06	21	10	43
3	7	11,28	23	11	47
3	8	12,52	26	13	51
3	9	13,78	28	14	56
3	10	15,07	31	15	61

Nombre répétitions positives					
10 x 100 ml	10 x 10 ml	NPP/l	NPP/l corrigé	Lim inf	Lim sup
4	0	4,52	10	4	25
4	1	5,71	12	5	28
4	2	6,92	14	6	32
4	3	8,16	17	8	37
4	4	9,43	19	9	41
4	5	10,72	22	11	45
4	6	12,05	25	12	50
4	7	13,40	27	14	55
4	8	14,79	30	15	60
4	9	16,21	33	17	65
4	10	17,67	36	18	71
5	0	6,06	13	6	30
5	1	7,37	15	7	34
5	2	8,71	18	8	39
5	3	10,08	21	10	43
5	4	11,50	23	12	48
5	5	12,95	26	13	53
5	6	14,45	29	15	59
5	7	16,00	32	16	65
5	8	17,59	36	18	71
5	9	19,23	39	20	77
5	10	20,93	42	21	84
6	0	7,88	16	8	36
6	1	9,35	19	9	41
6	2	10,86	22	11	46
6	3	12,43	25	13	52
6	4	14,06	29	14	58
6	5	15,74	32	16	64
6	6	17,50	36	18	70
6	7	19,32	39	20	78
6	8	21,22	43	22	85
6	9	23,20	47	24	94
6	10	25,27	51	26	104
7	0	10,12	21	10	43
7	1	11,81	24	12	49
7	2	13,58	28	14	56
7	3	15,43	31	16	62
7	4	17,38	35	18	70
7	5	19,44	39	20	78
7	6	21,60	44	22	87
7	7	23,89	48	24	97
7	8	26,32	53	26	107
7	9	28,89	58	29	119
7	10	31,61	64	31	132

Nombre répétitions positives					
10 x 100 ml	10 x 10 ml	NPP/l	NPP/l corrigé	Lim inf	Lim sup
8	0	12,99	26	13	54
8	1	15,05	31	15	61
8	2	17,24	35	18	69
8	3	19,59	40	20	79
8	4	22,12	45	23	89
8	5	24,85	50	25	101
8	6	27,81	56	28	114
8	7	31,03	63	30	130
8	8	34,54	70	33	147
8	9	38,38	77	36	167
8	10	42,56	86	39	190
9	0	17,05	35	18	69
9	1	19,79	40	20	79
9	2	22,84	46	23	92
9	3	26,27	53	26	107
9	4	30,16	61	30	125
9	5	34,62	70	33	147
9	6	39,78	80	37	175
9	7	45,76	92	41	207
9	8	52,69	106	46	245
9	9	60,65	122	52	285
9	10	69,74	140	60	328
10	0	23,98	48	24	97
10	1	28,72	58	28	118
10	2	34,77	70	33	148
10	3	42,87	86	39	191
10	4	54,23	109	47	253
10	5	70,22	141	60	330
10	6	91,78	184	81	418
10	7	120,41	241	110	529
10	8	160,94	321	150	696
10	9	230,26	461	206	1033
10	10		> 461		

Nombre répétitions positives					
10 x 1 ml	10 x 0.1 ml	NPP/l	NPP/l corrigé	Lim inf	Lim sup
0	0		< 96		
0	1	91,32	92	13	673
0	2	183,49	184	44	775
0	3	276,51	277	84	917
0	4	370,41	371	129	1069
0	5	465,20	466	177	1224
0	6	560,89	561	228	1382
0	7	657,51	658	281	1543
0	8	755,07	756	335	1706
0	9	853,60	854	390	1873
0	10	953,10	954	445	2043
1	0	95,31	96	14	675
1	1	191,68	192	47	787
1	2	289,14	290	90	938
1	3	387,72	388	138	1097
1	4	487,43	488	189	1261
1	5	588,30	589	243	1428
1	6	690,37	691	299	1598
1	7	793,66	794	356	1772
1	8	898,19	899	414	1949
1	9	1004,00	1004	474	2131
1	10	1111,11	1112	533	2318
2	0	200,67	201	51	800
2	1	303,05	304	96	960
2	2	406,85	407	147	1128
2	3	512,10	513	202	1301
2	4	618,85	619	260	1478
2	5	727,13	728	319	1659
2	6	837,00	837	380	1845
2	7	948,50	949	443	2036
2	8	1061,66	1062	506	2231
2	9	1176,53	1177	569	2432
2	10	1293,18	1294	634	2640
3	0	318,45	319	104	985
3	1	428,13	429	158	1163
3	2	539,68	540	217	1347
3	3	653,15	654	278	1536
3	4	768,62	769	342	1729
3	5	886,17	887	408	1929
3	6	1005,85	1006	475	2135
3	7	1127,74	1128	542	2347
3	8	1251,91	1252	611	2567
3	9	1378,44	1379	680	2796
3	10	1507,40	1508	750	3033

Survey of *Naegleria fowleri* in Geothermal Recreational Waters of Guadeloupe (French West Indies)

Mirna Moussa¹, Johan F. De Jonckheere^{2,3}, Jérôme Guerlotté^{1,4,5}, Vincent Richard⁶, Alexandra Bastaraud¹, Marc Romana⁷, Antoine Talarmin^{1*}

1 Unité Environnement-Santé, Institut Pasteur de la Guadeloupe, Les Abymes, Guadeloupe, France, **2** De Duve Institute, Brussels, Belgium, **3** Scientific Institute of Public Health, Brussels, Belgium, **4** Université des Antilles et de la Guyane, Pointe à Pitre, Guadeloupe, France, **5** Muséum National d'Histoire Naturelle, UMR 7205 MNHN/CNRS, Paris, France, **6** Institut Pasteur de Dakar, Dakar, Senegal, **7** Insem, U 665, Pointe-à-Pitre, Guadeloupe, France

Abstract

In 2008 a fatal case of primary amoebic meningoencephalitis, due to the amoeboflagellate *Naegleria fowleri*, occurred in Guadeloupe, French West Indies, after a child swam in a bath fed with geothermal water. In order to improve the knowledge on free-living amoebae in this tropical part of France, we investigated on a monthly basis, the presence of *Naegleria* spp. in the recreational baths, and stream waters which feed them. A total of 73 water samples, 48 sediments and 54 swabs samples were collected from 6 sampling points between June 2011 and July 2012. The water samples were filtered and the filters transferred to non-nutrient agar plates seeded with a heat-killed suspension of *Escherichia coli* while sediment and swab samples were placed directly on these plates. The plates were incubated at 44°C for the selective isolation of thermophilic *Naegleria*. To identify the *Naegleria* isolates the internal transcribed spacers, including the 5.8S rDNA, were amplified by polymerase chain reaction and the sequence of the PCR products was determined. Thermophilic amoebae were present at nearly all collection sites. The pathogenic *N. fowleri* was the most frequently encountered thermophilic species followed by *N. lovaniensis*. The concentration of *N. fowleri* was rather low in most water samples, ranging from 0 to 22 per liter. Sequencing revealed that all *N. fowleri* isolates belonged to a common Euro-American genotype, the same as detected in the human case in Guadeloupe. These investigations need to be continued in order to counsel the health authorities about prevention measures, because these recreational thermal baths are used daily by local people and tourists.

Citation: Moussa M, De Jonckheere JF, Guerlotté J, Richard V, Bastaraud A, et al. (2013) Survey of *Naegleria fowleri* in Geothermal Recreational Waters of Guadeloupe (French West Indies). PLoS ONE 8(1): e54414. doi:10.1371/journal.pone.0054414

Editor: Patricia Talamas-Rohana, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Mexico

Received: August 13, 2012; **Accepted:** December 12, 2012; **Published:** January 18, 2013

Copyright: © 2013 Moussa et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This research was supported by a grant ACIP (A-01-2011) from the Institut Pasteur, Paris. The authors are also grateful to the Agence Régionale de la Santé (ARS Guadeloupe) for financial support. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: atalarmin@pasteur-guadeloupe.fr

Introduction

Free-living amoebae (FLA) are highly diverse and show a worldwide distribution in aquatic habitats and soils. *Naegleria* is a free-living amoeboflagellate found in freshwater and feeding on bacteria. One species, *N. fowleri*, causes primary amoebic meningoencephalitis (PAM) in man [1], a rare but rapidly fatal central nervous system disease occurring after exposure to contaminated water. Phagocytic FLA are also carriers of potentially pathogenic microorganisms (e.g. *Legionella*) and as such, present an extra threat to human health [2]. FLA have been isolated from natural and man-made aquatic habitats such as fountains, swimming pools and spas, industrial cooling circuits and even from tap water [3–5]. Earlier studies indicated that densities of thermophilic amoebae in general and of thermophilic *Naegleria* spp. in particular correlated positively with higher temperatures of naturally or artificially heated waters [6–9]. Within the genus, *N. fowleri* as well as other ecological competitors, such as *N. lovaniensis*, tolerate temperatures of up to 45°C and proliferate successfully in natural bodies of water (e.g. lakes and rivers) during warmer months of the year, as well as in geothermally heated water or in industrial cooling water [10]. Such species which can survive at

temperatures of 37°C and higher [11] are thermotolerant competitors that develop better than *N. fowleri* at these temperatures [12]. While there are more than 40 species of *Naegleria* described [5], only one species, *N. fowleri* causes PAM. The disease occurs in otherwise healthy individuals with exposure to warm, untreated or poorly disinfected water with chlorine concentrations lower than 1 mg/l [13–15]. It is generally acquired while swimming and diving in freshwater lakes and ponds [16,17]. Infection of the brain occurs after amoebae reach the nasal cavity and invade the nasal mucosa. From there the amoebae penetrate the nasal epithelium to the olfactory nerves and migrate through the cribriform plate to invade the brain and meninges [18]. In April 2008, a 9-year-old previously healthy boy was referred to the Pointe-à-Pitre University Hospital of Guadeloupe (French West Indies) with a 2-day history of high-grade fever, severe headache, and seizures [19]. The possibility of a free-living amoeba infection was suspected both on the negativity of all bacterial and viral initial tests and on the observation of peculiar cells in stained cerebrospinal fluid samples, and was subsequently confirmed to be a PAM case by molecular methods. This first case of PAM in Guadeloupe was rapidly fatal in 7 days. There are many hot



Figure 1. Geographical distribution of sampling sites in the hot waters of the Basse-Terre of Guadeloupe. (1) the Bains Jaunes on the volcano near Saint Claude, (2) the Bains des Amours, (3) Capes River, (4) the bath of Dolé and Dolé Amont and (5) Dolé Escalier in Gourbeyre. doi:10.1371/journal.pone.0054414.g001

springs around the Soufrière volcano on the Basse-Terre part of Guadeloupe, and the patient presumably acquired the infection by swimming and diving in the Dolé bath supplied by natural thermal water one week before onset of the disease.

Guadeloupean people frequently come in contact with raw water at recreational springs, and visiting hot springs is a very popular form of recreation. The water sources of the hot baths are geothermal springs and streams. However, the potential infestation of *N. fowleri* in recreational waters has not been studied yet in Guadeloupe. An investigation of the occurrence and distribution of *Naegleria* in local water was imperative because of its possible health implications, as demonstrated by the PAM case [19]. During a few months at the beginning of 2011, we sampled a number of hot waters of Guadeloupe to better understand the

importance of the contamination of these waters. We observed that thermophilic amoeba and especially *Naegleria fowleri* were often detected although at low concentrations. We therefore undertook the following study to investigate the distribution and the density of thermophilic FLA in the most frequented recreational areas of Guadeloupe in order to evaluate the risk for humans and inform the health authorities.

Materials and Methods

Sample Collection

In Guadeloupe, a total of thirty geothermal resurgences can be counted, all of them being located on the island of Basse-Terre. Six of these, the most frequented by the population and tourists, and

Table 1. Survey of free-living amoeba isolated from geothermal recreational waters of Guadeloupe on a monthly basis (2011).

Baths	Average		June		July		August		September		October		November		December							
	T	pH	Sp.n	N/n	Sp.n	N/n	Sp.n	N/n	Sp.n	N/n	Sp.n	N/n	Sp.n	N/n	Sp.n	N/n						
Bains	Water	31,5	6,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	1	0	10	0	0	0	0	
Jaunes	Sed	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Swab	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Bain des	Water	34,4	7,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Sed	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Amours	Water	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Swab	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Bain de	Water	29,8	7,2	9	0	0	0	4	0	6	4	0	6	4	0	6	4	0	6	4	0	
	Sed	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Capès	Water	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Swab	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Bain de	Water	31,6	8,3	0	0	8	0	20	8	0	7	0	0	6	0	0	2	1	0	13	0	6
	Sed	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Dolé	Water	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Swab	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Dolé	Water	31,6	7,5	0	0	0	0	22	0	0	0	0	2	2	0	0	6	0	0	2	0	9
	Sed	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Amont	Water	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Swab	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Dolé	Water	30,5	7,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Sed	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Escalier	Water	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Swab	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Sp. : thermophilic amoebae non-*Naegleria* sp., **NJ** : *Naegleria lovaniensis*, **Nf** : *Naegleria fowleri*,
 (n) number of amoebae per liter of water; (+ ou -) presence or absence in sediment or swab; (blank) not investigated.
 doi:10.1371/journal.pone.0054414.t001

Table 2. Survey of free-living amoeba isolated from geothermal recreational waters of Guadeloupe on a monthly basis (2012).

Baths	Average	January		February		March		April		May		June		July	
		Sp.n	M/I/n	Sp.n	M/I/n	Sp.n	M/I/n	Sp.n	M/I/n	Sp.n	M/I/n	Sp.n	M/I/n	Sp.n	M/I/n
T	pH														
Bains	Water	31,3	6,7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Jaunes	Sed														
	Swab														
Bain	Water	34,1	7,3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
des	Sed														
	Swab														
Amours	Water	28,2	7	10	3	6	0	0	0	0	1	0	0	1	0
Capès	Sed														
	Swab														
Bain de	Water	31,7	8	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2	0	0
Dolè	Sed														
	Swab														
Dolè	Water	31,9	8	4	12	0	0	0	0	2	4	0	0	0	0
Amont	Sed														
	Swab														
Dolè	Water	30,7	7,5	0	6	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0
Escalier	Sed														
	Swab														

Sp.: thermophilic amoebae non-*Naegleria* sp., **Nf**: *Naegleria fowleri*, **M/I**: *Naegleria lovaniensis*, **Nf**: *Naegleria fowleri*, (n) number of amoebae per liter of water; (+ ou -) presence or absence in sediment or swab; (blank) not investigated.
doi:10.1371/journal.pone.0054414.t002

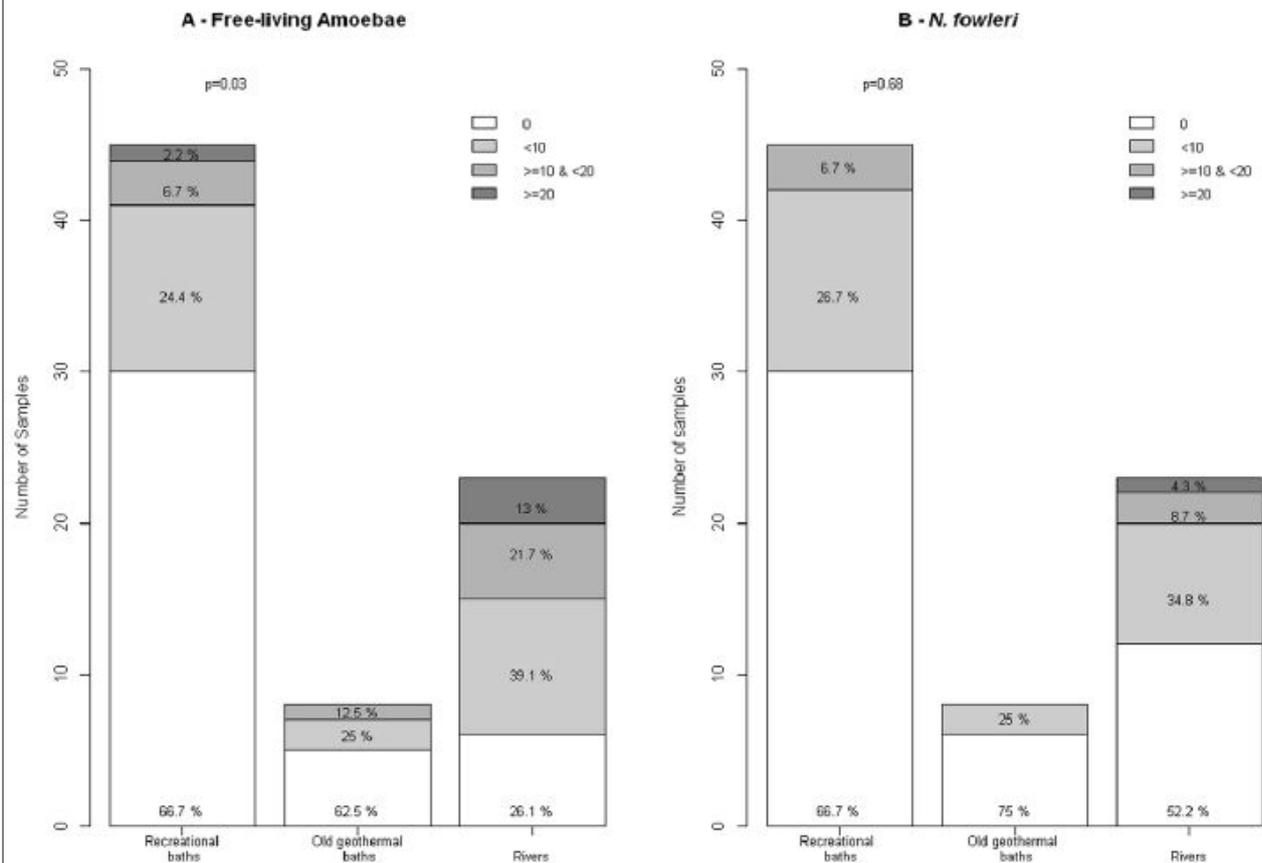


Figure 2. Levels of Free_living amoebae according to the type of water in Guadeloupe in 2011–2012. (A) free-living amoebae and (B) and *Naegleria fowleri*.

doi:10.1371/journal.pone.0054414.g002

located around the Soufrière volcano in the area of Gourbeyre and Saint-Claude (Fig. 1), were investigated in our study. Bains Jaunes, Bain de Dolé and Bains des Amours are recreational baths regularly washed with detergent and treated with chlorine by the staff in charge of maintenance. Dolé Amont and Capes are rivers. Dolé Escalier is an old geothermal baths nowadays untreated. Water samples were collected in these places between June 2011 and July 2012. Most frequented baths were analysed monthly, while more remote areas were less regularly tested, depending on weather conditions. Temperature and pH were measured on site for each sample taken. From each sampling point, one to four water samples were collected by submerging 500 ml sterile bottles beneath the surface of the water as well as at the bottom. Swabs (VWR, Strasbourg France) were gently scraped on around 10 cm² of rocks and interiors of baths to collect biofilm from each of these waterbodies as previously described [20,21]. When possible sediments were also taken in 15 ml sterile tubes. The water samples, all above 28°C, were transported to the laboratory at ambient temperature (around 31°C in Guadeloupe) to maintain the thermophilic amoebae in more natural conditions and were processed within 2 to 4 h after sampling.

Chemical Parameters

Besides pH and temperature, some chemical parameters were measured in water samples taken from the most frequented baths from October 2011 to January 2012. These parameters were

measured in a lab accredited by the French committee for Accreditation (COFRAC), according to French or international normalized methods. Turbidity by nephelometric determination [22]; alkalinity by potentiometric determination [23], hardness by potentiometric determination [24]; K, Ca, Mg, Na by ionic chromatography [25]; SO₄, Cl by ionic chromatography [26]; SiO₂ by molecular absorption spectrometry [27]; total organic carbon by combustion and IR spectrometry (TOC analyzer OI Aurora 1030) [28]; permanganate oxidizability [29]; NH₄ by continuous flow analysis [30]; NO₃ by continuous flow analysis [31]. HCO₃ was calculated according to Legrand & Poirier method [32].

Isolation of Amoebae

The water samples were thoroughly mixed and the total sample volume (500 ml) was filtered through a cellulose nitrate filter (pore size, 1.2 µm; diameter, 47 mm, Millipore (Fisher Scientific) [33,34]. Each filter was cut into ten pieces, and placed inverted diagonally on two 1.5% non-nutrient agar plates seeded with a thin layer of *Escherichia coli* (NNA-*E. coli*) [35] (i.e., five pieces of filter per plate). Cotton wool swab samples were directly streaked in the middle of the NNA-*E. coli* plates. One or two drops of the sediment samples were placed directly on NNA-*E. coli* plates. Plates were sealed with parafilm (Parafilm 'M'[®]) and incubated inverted at 44°C to select for thermophilic amoebae. The plates

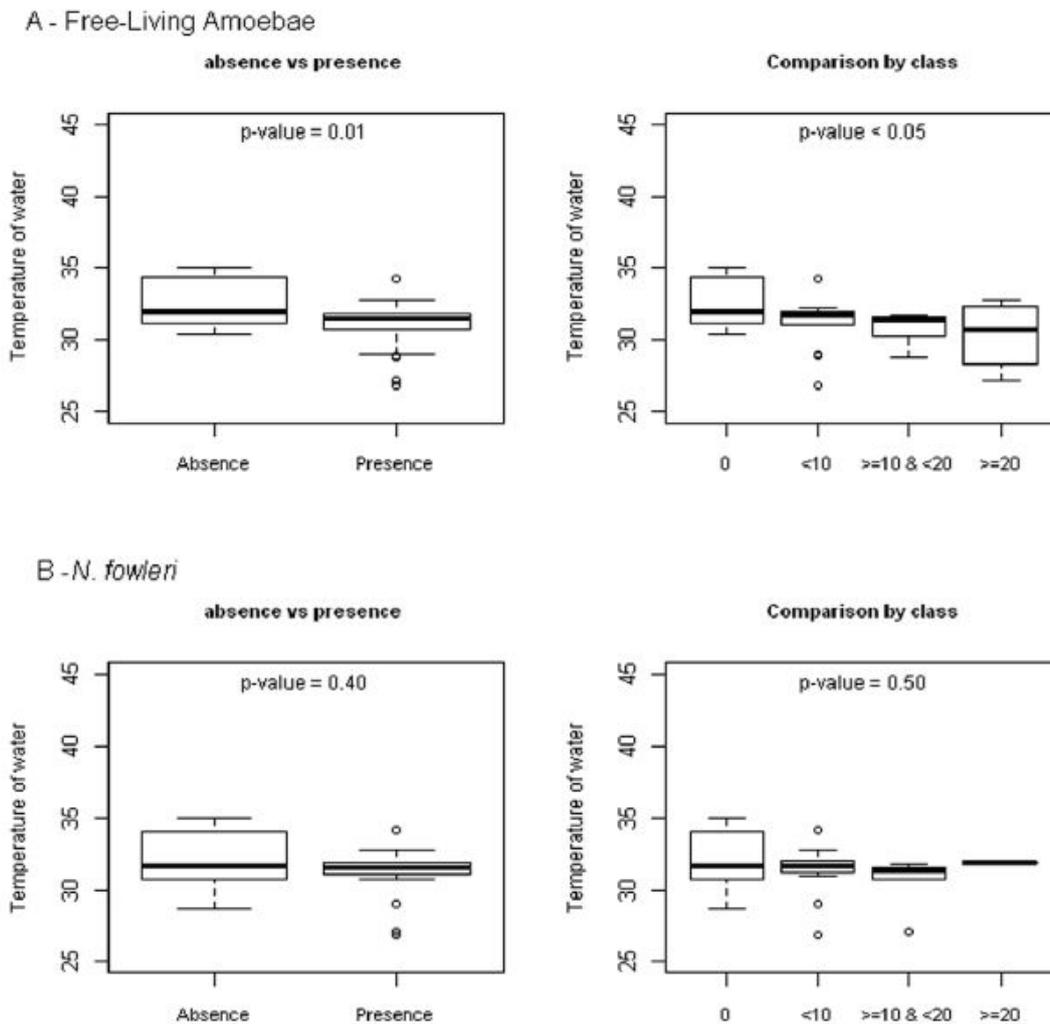


Figure 3. Levels of Free-living amoebae according to the temperature of water in Guadeloupe in 2011–2012. (A) free-living amoebae and (B) *Naegleria fowleri*.

doi:10.1371/journal.pone.0054414.g003

were inspected daily for amoebic growth (appearance of clearing zones) for up to 7 days.

Morphological Identification and Amoeba Counting

During incubation, the first line plates were examined with an inverted phase contrast microscopy (Will-Wetzlar “Wilvert” x400). Every amoeba plaque emerging along the filters was counted and picked for isolation and subcultured, on fresh NNA-*E. coli* (second line plates). The number of amoeba was multiplied by 2 to obtain a number/liter if only 500 ml had been filtered or a mean was realized if 2 or more 500 ml samples were filtered. Above 2 plaques per piece of filter, we considered that the precision was too low and therefore indicated the concentration of amoebae as $\geq 40/l$. The amoebic isolates were identified morphologically using Page’s taxonomy keys [35]. The definitive identification was systematically realized by PCR.

Statistical Analysis

Data were analysed using R software. The results were expressed as median and mean. Fisher’s exact test was used to

study categorical variables while the Kruskal Wallis test and the Spearman test were used to study non-parametric variables. Because of the lack of precision above 20 amoebae/liter data were analysed using classes (absence, $<10/l$, ≥ 10 and $<20/l$ and $\geq 20/l$). Values were considered statistically significant for $p < 0.05$.

DNA Extraction

Amoebae from second line plate were flushed from the agarose with 200 to 500 μ l of UNSET [36] lysis solution (urea 8 M, SDS 2%, NaCl 0.15 M, EDTA 0.001 M, Tris pH 7.5 0.1 M) and transferred into 1.5 ml tubes. DNA was further purified using a commercial kit (Qiagen DNA Mini kit, Qiagen, France) following the manufacturer’s instructions and stored at -20°C until further processing.

PCR Amplification and Sequencing

The complete ITS region (ITS1, 5.8S, and ITS2) was amplified using the primers previously described [37,38]. The ITS species specific primers were for *N. fowleri*: the forward primer NFITSFW, (5’-TGAAAACCTTTTTTCCATTTCACA-3’) and the reverse

Table 3. Number of *Naegleria fowleri* isolated from the most frequented baths of Guadeloupe according to temperature and pH (2011–12).

Dates	Bains Jaunes			Bain des Amours			Bain de Dolé			Dolé Amont			Bain de Capès		
	T°C	pH	N./L	T°C	pH	N./L	T°C	pH	N./L	T°C	pH	N./L	T°C	pH	N./L
Jun-11	31.7	5.5	0	33.6	6.9	0	31.4	8.2	8	ND	ND	ND	28.5	6.8	0
Jul-11	31.8	6.9	0	34.2	6.9	0	31.7	8.3	8	31.9	6.9	22	ND	ND	ND
Aug-11	30.7	6.5	0	34.2	7.0	2	31.9	8.2	7	31.0	6.9	0	ND	ND	ND
Sep-11	31.5	6.5	1	34.7	7.5	0	32.2	8.9	6	31.6	6.9	2	ND	ND	ND
Oct-11	31.8	6.3	5	34.7	7.6	0	31.5	8.9	2	31.6	9.0	6	31.5	7.9	6
Nov-11	31.6	6.7	10	34.4	7.6	0	31.7	8.8	13	31.5	8.2	2	ND	ND	ND
Dec-11	31.3	5.5	0	34.9	6.9	0	31.0	6.4	6	31.9	6.8	9	29.5	6.9	0
Jan-12	31.2	6.5	0	34.4	6.3	0	31.3	7.9	0	31.6	7.7	0	27.1	6.4	6
Feb-12	31.3	6.8	0	34.7	7.1	0	31.4	8.1	1	31.7	7.2	0	28.2	6.7	0
Mar-12	31.7	6.4	0	34.0	7.3	0	31.6	8.2	0	32.1	6.9	4	28.7	7.1	0
Apr-12	32.0	6.2	0	34.1	6.9	0	31.3	7.8	0	32.0	7.6	0	28.9	6.9	0
May-12	30.7	5.5	0	34.4	7.5	0	32.1	8.0	2	32.0	7.5	7	29.0	7.5	2
Jun-12	31.0	6.5	3	33.6	7.7	0	31.7	7.7	2	31.7	7.7	0	26.9	6.5	2
Jul-12	31.0	8.0	0	33.7	7.5	0	32.0	8.0	0	32.2	8.0	0	28.9	7.5	0

ND : non determined.

doi:10.1371/journal.pone.0054414.t003

primer NFITSRV (5'-AATAAAAAGATTGACCATTGAAA-3'), for *Naegleria* sp : the forward primer ITSFW (5'-AACCTGCGTAGGGATCATT-3') and the reverse primer ITSRV (5'-TTTCCTCCCTTATTAATAT-3') and for other *Vahlkampffidae* : the forward primer JITSFW (5'-GTCTTCGTAGGTGAACCTGC-3') and the reverse primer JITSRV (5'-CCGCTTACTGATATGCTTAA-3'). Amplification was carried out with a PCR mix (5X Green or Colorless GoTaq Flexi Buffer, Promega) containing 2.5 mM MgCl₂ and 0.25 mM of each dNTP, 1 μM of each primer, 1.25 U of Taq DNA polymerase, and 50–100 ng of genomic DNA in a final volume of 50 μl. Amplifications were run in a BioRad thermocycler. After 6 min for denaturation at 94°C, the PCR temperature profiles consisted of 30/40 cycles at 94°C for 1 min, 55°C for 1.5 min, and 72°C for 2 min with a final elongation step at 72°C for 10 min.

Aliquots (10 μl) of each PCR products were mixed with 2 μl of loading buffer (10 mM EDTA, 10% glycerol, 0.015% bromophenol blue, 0.17% SDS), run in a 1% agarose gel in TBE buffer (89 mM Tris, 89 mM Boric Acid, 2 mM EDTA, pH 8.3) and visualized with ethidium bromide. A 100-bp DNA ladder (Invitrogen) was used as a size marker in the gels. Negative DNA controls (template DNA replaced with distilled water), and positive controls (*N. fowleri* # 0359) and sample DNA were analyzed using the three sets of primers.

Nucleotide Sequencing

The PCR products obtained with the ITS primers were purified using a QIAamp PCR purification kit (Qiagen) and directly sequenced in both directions with the respective forward and reverse primers using the BigDye Terminator Sequencing v3.1 kit and an ABI 310™ Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A homology search was performed with BLAST software from the National Center for Biotechnology Information homepage (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). The sequence data obtained were aligned by ClustalW software (<http://www.nig.ac.jp>) with the sequences of *Naegleria* species deposited in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Nucleotide Sequence Accession Numbers

The nucleotide sequences determined from this study were submitted to GenBank and assigned the accession numbers JX910445, JX910446, JX910447.

Ethic Statement

All baths tested are public baths that are managed by towns or villages. All necessary permits were obtained for the described field studies. These permits were given by Regional Health Agency (ARS) which has the responsibility for testing the quality of all kind of waters in Guadeloupe (for drinking or bathing).

The field studies did not involve endangered or protected species.

Results

The results of the monthly monitoring for thermophilic amoebae occurrence are presented in tables 1 and 2. Thermophilic amoebae were detected at least one time at all collection sites, in 35 out of the 73 water samples analyzed (47.9%), 18 of the 48 sediment samples (37.5%) and 8 of 54 swabs tested (14.8%) ($p < 0.01$). *N. fowleri* was the most frequently encountered thermophilic species, found in 28 of the 73 water samples (38.3%), 5 of the 48 sediment samples (10.4%) and none of the 54 swab samples collected ($p < 0.01$). *N. lovaniensis* was less frequently isolated than *N. fowleri*. It was found in 7 of the 73 water samples (9.6%), 5 of the 48 sediment samples (10.4%) and in none of the 54 swab samples collected ($p < 0.01$).

Differences were observed according to the type of waters analyzed. FLA were more often found and in higher concentrations in rivers (73.9% of positive samples), than in old geothermal baths (37.5%), recreational baths (33.3%) ($p = 0.03$); the difference was not significant if we considered *N. fowleri* (Fig. 2).

The concentration of *N. fowleri* was rather low, from 0 to 22 amoebae per liter of water samples (Tables 1–2).

The most popular site of Bain de Dolé, yielded thermophilic amoebae, including *N. fowleri*, continually during the hot season

Table 4. Number of *Naegleria fowleri* isolated from the most frequented baths of Guadeloupe according to physicochemical characteristics (2011–12).

Month	Baths	T°C	pH	N/f n/l	Turbidity NFU	Alkalimetric titre (°F)	Complete Alkalimetric titre (°F)	Total hardness (°F)	K mg/l	HCO mg/l	Ca mg/l	Mg mg/l	SO ₄ mg/l	Cl mg/l	Na mg/l	SiO ₂ mg/l	C mg/l	KMnO ₄ mg/l O ₂	NH ₄ mg/l	NO ₃ mg/l
Oct-11	Bains Jaunes	31.8	6.4	5	0.3	0.0	2.0	22.1	6.0	24.4	95.0	23.7	310.0	59.0	37.6	112.5	<0.5	<0.4	<0.05	<1
	Bain de Capès	31.5	7.9	6	0.6	0.0	17.0	16.2	6.6	207.4	49.2	19.3	80.0	28.0	33.2	85.4	<0.5	0.8	<0.05	3.8
	Bain des Amours	34.7	7.7	0	0.3	0.0	19.5	16.1	7.2	237.9	57.4	21.9	90.0	29.0	34.5	81.5	<0.5	0.9	<0.05	2.6
Nov-11	Bain de Dolé	31.5	9.0	2	0.6	0.7	17.0	15.7	5.7	207.4	44.9	18.2	69.0	25.0	28.4	78.1	<0.5	<0.4	<0.05	3.1
	Dolé/Amont	31.6	9.0	6	0.5	1.0	16.5	15.8	5.7	201.3	45.0	18.1	69.0	26.0	29.5	82.9	<0.5	0.9	<0.05	3.0
	Bains Jaunes	31.6	6.7	10	0.3	0.0	2.0	24.6	6.2	24.4	99.3	24.4	318.0	59.0	37.1	113.9	<0.5	<0.4	<0.05	<1
Dec-11	Bain des Amours	34.4	7.6	0	0.1	0.0	21.0	16.7	7.4	256.2	60.4	22.9	93.0	30.0	35.6	90.1	<0.5	<0.4	<0.05	2.8
	Bain de Dolé	31.7	8.8	13	0.4	0.0	17.0	16.4	5.8	207.4	48.5	18.7	69.0	25.0	30.1	76.7	<0.5	1.6	0.1	3.6
	Bains Jaunes	31.3	5.5	0	0.2	0.0	2.5	16.7	6.1	30.5	96.0	24.0	311.0	57.0	36.3	97.6	<0.5	<0.4	<0.05	<1
Jan-12	Bain de Capès	29.5	6.9	0	0.1	0.0	15.0	14.0	5.1	184.2	37.9	147.1	51.0	21.0	25.5	68.4	<0.5	0.6	<0.05	6.4
	Bain des Amours	34.9	6.9	0	0.2	0.0	21.0	20.0	7.2	256.2	57.1	23.0	92.0	29.0	34.6	80.1	0.9	1.2	<0.05	3.0
	Bain de Dolé	31.0	6.5	6	0.1	0.6	17.0	15.9	5.6	207.4	45.9	18.2	68.0	25.0	28.9	75.1	<0.5	<0.4	<0.05	3.8
Jan-12	Dolé/Escalier	30.5	6.4	0	0.1	0.9	16.0	13.2	5.0	192.2	39.2	16.0	55.0	22.0	26.6	61.7	0.8	<0.4	<0.05	3.3
	Dolé/Amont	31.9	6.8	9	0.2	1.1	17.0	17.1	5.6	207.4	45.6	18.3	66.0	24.0	29.2	61.2	<0.5	1.6	<0.05	2.7
	Bains Jaunes	31.2	6.5	0	0.2	0.0	3.0	27.8	6.3	36.6	109.0	25.0	328.0	63.0	56.0	62.2	41.6	1.4	0.1	<1
Jan-12	Bain de Capès	27.1	6.4	6	0.9	0.0	14.5	13.1	5.2	176.9	42.0	15.0	56.0	22.0	27.0	62.6	0.6	1.8	<0.05	6.0
	Bain des Amours	34.4	6.4	0	0.4	0.0	21.0	19.6	7.4	256.2	63.0	23.0	96.0	30.0	36.0	52.5	0.9	0.1	<0.05	2.4
	Dolé/Escalier	30.2	6.5	0	0.1	0.6	16.0	14.5	5.1	195.2	48.0	18.0	66.0	23.0	27.0	58.8	<0.5	1.9	0.1	3.5

doi:10.1371/journal.pone.0054414.t004

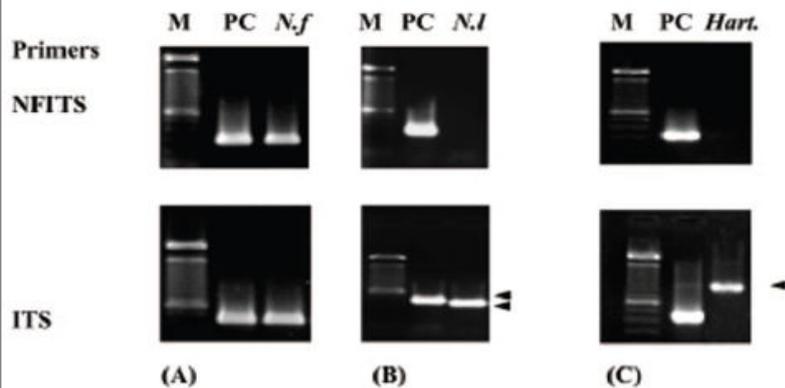


Figure 4. PCR results for the three major thermophilic amoeba species found in Guadeloupe. PCR detection and agarose gel electrophoresis of ITS rDNA of *N. fowleri* (A), *N. lovaniensis* (B) and *Hartmannella* sp. (C). M : 100 bp ladder, PC : Positive control (DNA of *Naegleria fowleri* (#. 359)) gives a single PCR product of 359 bp with the NFITS primers and a 448 bp with the ITS primer set. *N.f* : *Naegleria fowleri*, *N.I* : *Naegleria lovaniensis*, the ITS amplification gives a 403 bp PCR product while no band was obtained with the NFITS primers, *Hart* : *Hartmannella* sp., the ITS amplification gives a 900 bp while no band was observed with the NFITS primer set.
doi:10.1371/journal.pone.0054414.g004

between June and December in 2011, but less frequently and in lower concentration in 2012. Curiously, *N. fowleri* was less often isolated from the Bains Jaunes samples, although this bath is less frequently cleaned. Amoebae and in particular *N. fowleri* (1 per liter) were detected only once in 2011 in Bain des Amours but could be found sometimes in the sediments upstream of the bath in 2012.

Temperatures at the sites ranged from 26.9°C at Capes river to 34.9°C at Bains des Amours and the pH from 5.5 at Bains Jaunes to 9.0 at Dolé Amont (Table 3). No significant differences could be found in the presence or not of FLA or *N. fowleri* according to pH. Concerning temperature, FLA were significantly more frequently encountered ($p < 0.01$) and in highest number ($p < 0.05$) when the temperature decreased. No difference could be evidenced concerning *N. fowleri* (Fig. 3). These differences can also be due to the fact that amoeba were more numerous in the Capes River where the temperature was lower. No difference could be evidenced according to temperature in the same bath (Table 3).

An analysis of physicochemical properties of water from the sampling places was performed (Table 4). Since parameters were rather stable in the same bath analyses were only performed from October 2011 to January 2012. Parameters could widely vary between sites, such as sulfates, which were found at a rather high concentrations in Bains Jaunes (around 315 mg/L) and at lower concentrations in other baths (from 51 mg/L in Bain de Capes to 92 mg/L in Bains des Amours). However, no correlation could be found between the concentration of the different parameters and

the number of *N. fowleri*, with the exception of turbidity. Indeed, the number of *N. fowleri* increased along with turbidity ($p = 0.02$).

The identifications by ITS sequencing gave relatively similar results in the different hot springs (Fig. 4). The only thermophilic amoebae detected and identified after culture at 44°C belonged to the genus *Naegleria* (*N. fowleri*, Fig. 4A and *N. lovaniensis* Fig. 4B) and to the genus *Hartmannella* (Fig. 4C). The latter, however, is indicated in databases to be *Vahlkampfia* [34], but a recent study [39] has demonstrated that the sequences of these AK-2007 strains do not belong to vahlkampfiids, but to the amoebozoan *Hartmannella*.

The *N. fowleri* DNA positive control (PC # 539) gives a PCR product of 448 bp with the ITS primer set and a 359 bp with NFITS primer set. *N. lovaniensis* was identified in samples in which an ITS-PCR fragment of 403 pb was obtained, while a NFITS-PCR fragment was absent. *Hartmannella* sp. was identified in samples in which an ITS-PCR fragment of 900 pb was obtained while a NFITS-PCR product was absent.

The distribution and identification of thermophilic amoebae in each sampling areas are shown in tables 1 and 2. The major ITS-PCR positive products obtained from amoebae isolated from the sampling sites were analyzed by DNA sequencing. Among a total of 41 amplicons that were sequenced, only 2 were obtained from thermophilic amoeba other than *Naegleria*. Gene sequences were submitted to the GenBank database in order to allow blast searching, and the highest percentage identity was taken to identify the species. The sequence analysis revealed that the

Table 5. ITS1 sequences of the three isolates identified in the different geothermal waters of Guadeloupe.

Acc. N°	ITS1 sequence	Isolate	Species
JX910445	atggtaaaaaagggtgaaaacctttttttatggtaaaaaagggtgatggtaaaaaagggt gaaaaccttttttccatttcaaaaaaat	DOLE	<i>N. fowleri</i>
JX910446	atggtaaaaaagggtgaaaaccttttttcccttaattaaaaac	PIGEON	<i>N. lovaniensis</i>
JX910447	gaaccatcccgggggagacacaaaaaccgtagcccccctcgggcgaaacatcgatcgaggga gggatcgctcgatccttccggaacagagaat	CAPES	<i>Hartmannella</i> sp.

doi:10.1371/journal.pone.0054414.t005

Table 6. Distribution of sequenced isolates from the different geothermal baths of Guadeloupe.

Acc. N°	Species	Bain de Capès	Bain de Dolé	Dolé Amont	Dolé Escalier	Bains Jaunes
JX910445	<i>N. fowleri</i>	x	x	x		x
JX910446	<i>N. lovaniensis</i>	x		x	x	
JX910447	<i>Hartmannella</i> sp.	x				

doi:10.1371/journal.pone.0054414.t006

pathogenic *N. fowleri* was the most frequently encountered thermophilic species, seconded by *N. lovaniensis*; in some cases *Hartmannella* sp. was identified (see above about the *Vahlkampfia-Hartmannella* sp. identification). These sequencing results are shown in Table 5. *N. fowleri* was found with a 100% identity with the Genbank accession number # X96562.1 [37], in the following baths (Dolé, Dolé Amont, Bains Jaunes and Capes), while *N. lovaniensis* sequences (Dolé Amont, Dolé/Escalier and Capes) showed a 100% identity with the Genbank accession number # X96569.1 [37] (Table 6). Thermophilic *Hartmannella* sp. (indicated as *Vahlkampfia* sp. in databases, see above) with a 100% max identity with the Genbank accession number # AB330066.1 [34], were sequenced only in the bath of Capes (Table 6). The present study showed that all *N. fowleri* isolates from the Guadeloupean environment belonged to the Type-3 common Euro-American genotype with the 86 bp long ITS1 with a T instead of C at location 31 in the 5.8S rDNA [10,37].

Discussion

Our present study aimed at detecting the presence of pathogenic *N. fowleri* in the different recreational hot waters of Guadeloupe, without considering the exact numeration of amoebae in the water. At the beginning of 2011 we have tried different methods, such as different volumes of centrifugation since this method had been described as more efficient than filtration to recover trophozoites [40]. Due to the low number of amoeba detected, we have chosen filtration and to cut the filter in ten pieces because with the whole filter it is impossible to know if there is one amoeba or many. More accurate concentrations could probably be obtained by (i) determining the most probable number (MPN) per liter in serial repetitions of different sample volumes, either using different filtration membranes or by centrifuging the samples. However, when the concentrations are less than 100/l, it is difficult to have accurate numbers [40].

Taking into account the previously PAM case that occurred in 2008 and the high frequentation of the hot springs of Guadeloupe, we have chosen to focus the survey on the pathogenic *N. fowleri*. It is known that isolation of *N. fowleri* requires culture temperatures between 42°C and 45°C in an attempt to suppress the growth of other amoebae [5]. Accordingly, the culture temperature at 44°C used in this study was not suitable for the isolation of the other pathogenic *Naegleria* spp. which grow at 42°C maximum (*N. australiensis* and *N. italica*), and non-pathogenic and non-thermophilic *Naegleria* spp. Our results showed that the thermophilic and pathogenic *N. fowleri* is a common and widely distributed species in the hot waters in Guadeloupe. Considering the physical parameters, temperatures were almost similar throughout the year for the same place. On the other hand, pH could range from 5.5 to 9.0 in recreational baths, probably due to the cleaning procedure used or not in the bath. Indeed, Capes bath which is natural and never cleaned has a more narrow range of pH. Concerning the other physical and chemical parameters, given the stability of the results

obtained from one month to another in each bath, between October 2011 and January 2012, period which included both rainy and dry periods, and due the high cost of analyses, we could not afford to carry these tests for a longer period. Only turbidity correlated with the number of amoebae. This can be explained by the fact that turbidity increases when sediments are suspended and it has been reported that concentrations of thermophilic *Naegleria* spp. and pathogenic *N. fowleri* can be higher in sediment samples [41]. In our study, sediments were less often positive than water samples (10.4% vs 38.3%). However, concentrations are probably much higher in sediments since we compared around 100 mg of sediments for each sample vs 500 g for water samples.

The public health ministry of France established an upper limit of 100 amoebae per liter, not to be exceeded in watercourses where human exposure is possible [42]. We found that the concentration of *N. fowleri* in the hot springs of Guadeloupe remained below this standard. However, our method probably underestimates the actual concentration [40], so that the concentration could sometimes be higher than 100 *N. fowleri* per liter in some waters. The detection of a PAM case related to these warm waters [19], could be due to the fact that human infection is possible with lower concentrations of *N. fowleri*. However the concentration may have been higher in 2008 since the baths were probably cleaned less often than now. Moreover, the dose of amoebae inhaled must be taken into account.

The other most frequently species is the thermophilic but non-pathogenic *N. lovaniensis*, which is also the closest phylogenetic relative [10]. It has been reported that *N. lovaniensis* is usually the most dominant species of *Naegleria* in warm water [5], but the present data show that in Guadeloupe *N. fowleri* is the most frequently encountered one. The reason for this feature observed in Guadeloupe should be the subject for further investigation.

In the recreational bath of Dolé, *N. fowleri* was found almost all year-round, in spite of a regularly cleaning of the bath, which suggests that there is a continuous upstream contamination of the water.

Pathogenic *N. fowleri* have been detected on all continents, except for Antarctica, and seven types were demonstrated to occur in Europe and three on the American continent [10]. Type 3 is a common type on both continents and was evidenced in all the hot waters tested in this study as well as in the previously described PAM case [19]. As depicted in the map showing the distribution of *N. fowleri* types and the possible routes of dispersal [10], the European Type 3 probably reached the Guadeloupean archipelago, located in the middle of the West Indies between the Caribbean sea and the North Atlantic ocean, from the American continent.

In summary, our study is the first to use a PCR-based approach to document the presence of *N. fowleri* in a variety of aquatic geothermal sites in the Guadeloupe National Park. Our results provide evidence that *N. fowleri* is not a transient organism but thrives in most hot springs. This amoeba poses health risks to people who use the hot springs for recreation. Obviously,

considering the thousands of persons who swim each year in the different hot springs of Guadeloupe, the probability of being in contact with *N. fowleri* is rather important. This is in contrast with the only one case of PAM described in Guadeloupe, although it cannot be excluded that other cases escaped diagnosis. Considering the limited understanding of the ecology of *N. fowleri*, practical measures for prevention and control of *Naegleria* infections include education of the public, awareness within the medical community and regular survey of swimming areas. Our results allowed the regional health agency to develop a communication campaign and to install panels explaining the potential infestation of all the geothermal recreational waters of Guadeloupe.

References

- Carter RF (1970) Description of a *Naegleria* sp. isolated from two cases of primary amoebic meningo-encephalitis, and of the experimental pathological changes induced by it. *J Pathol* 100: 217–244.
- Greub G, Raoult D (2004) Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin Microbiol Rev* 17: 413–433.
- Schluster FI, Vivesvara GS (2004) Opportunistic amoebae: Challenges in prophylaxis and treatment. *Drug Resist Updat* 7: 41–51.
- Sheehan KB, Fagg JA, Ferris MJ, Henson JM (2003) PCR Detection and Analysis of the Free-Living Amoeba *Naegleria* in Hot Springs in Yellowstone and Grand Teton National Parks. *Appl Environ Microbiol* 69: 5914–5918.
- De Jonckheere JF (2002) A century of research on the amoeboflagellate genus *Naegleria*. *Acta Protozool* 41: 309–342.
- Tyndall RL, De Jonckheere JF (1984) Environmental isolation of pathogenic *Naegleria*. *C R C Crit Rev Environ Cont* 13: 195–226.
- Tyndall RL (1985) Pathogenic microorganisms in thermally altered reservoirs and other waters. In Gunnison D, editor. *Microbial processes in reservoirs*. Dordrecht, The Netherlands: Dr J. Junk Publisher. 135–154.
- De Jonckheere JF, Van Dijk P, Van de Voorde H (1975) The effect of thermal pollution on the distribution of *Naegleria fowleri*. *J Hyg (Lond)* 75: 7–13.
- Brown TJ, Cursors RTM, Keys EA, Marks M, Miles M (1983) The occurrence and distribution of pathogenic free-living amoebae in thermal areas of the North Island of New Zealand. *New Zeal J Mar Fresh* 17: 59–69.
- De Jonckheere JF (2011) Origin and evolution of the worldwide distributed pathogenic amoeboflagellate *Naegleria fowleri*. *Infect Genet Evol* 11: 1520–1528.
- Stevens AR, De Jonckheere JF, Willaert E (1980) *Naegleria lamaniensis* new species: Isolation and identification of six thermophilic strains of a new species found in association with *Naegleria fowleri*. *Int J Parasitol* 10: 51–64.
- Griffin JL (1983) The pathogenic amoeboflagellate *Naegleria fowleri*: Environmental isolations, competitors, ecologic interactions, and the flagellate-empty habitat hypothesis. *J Protozool* 30: 403–409.
- Chang SL (1978) Resistance of pathogenic *Naegleria* to some common physical and chemical agents. *Appl Environ Microbiol* 35: 368–375.
- Cursors RT, Brown TJ, Keys EA (1980) Effect of disinfectants on pathogenic free-living amoebae: in axenic conditions. *Appl Environ Microbiol* 40: 62–66.
- Cassels JM, Yahya MT, Gerba CP, Rose JB (1995) Efficacy of a combined system of copper and silver and free chlorine for inactivation of *Naegleria fowleri* amoebae in water. *Water Sci & Technol* 31: 119–122.
- Marciano-Cabral F (1988) Biology of *Naegleria* spp. *Microbiol Rev* 52: 114–133.
- Martinez AJ, Vivesvara GS (1997) Free-living, amphizoic and opportunistic amoebae. *Brain Pathol* 7: 583–598.
- Carter SA (1978) Primary amoebic meningoencephalitis (A “new” disease associated with water pollution). *Intern J Environ Stud* 12: 199–205.
- Nicolas M, De Jonckheere JF, Pernin P, Bataille H, Le Bris V, et al. (2010) Molecular diagnosis of a fatal primary amoebic meningoencephalitis in Guadeloupe (French West Indies). *Diagnostic moléculaire d'une méningoencéphalite amibienne primitive à l'occasion d'un cas fatal en Guadeloupe* *Bull Soc Pathol Exot* 103: 14–18.
- John DT, Howard MJ (1995) Seasonal distribution of pathogenic free-living amoebae in Oklahoma waters. *Parasitol Research* 81: 193–201.
- Eddyani M, De Jonckheere JF, Durmez L, Suykerbuyk P, Leirs H, et al. (2008) Occurrence of free-living amoebae in communities of low and high endemicity for Buruli ulcer in southern Benin. *Appl Environ Microbiol* 74: 6547–6553.
- AFNOR (2000) NF EN ISO 7027 Qualité de l'eau - Détermination de la turbidité. Paris, France: AFNOR Press. 14 p.
- AFNOR (1996) NF EN ISO 9963-1 Qualité de l'eau - Détermination de l'alcalinité - partie 1 : détermination de l'alcalinité totale et composite. Paris, France: AFNOR Press. 6 p.
- AFNOR (1984) NF T90-003 Essais des eaux - Détermination de la concentration totale en calcium et magnésium - Méthode titrimétrique à l'EDTA. Paris, France: AFNOR Press. 8 p.
- AFNOR (1999) NF EN ISO 14911 Qualité de l'eau - Dosage par chromatographie ionique, des ions Li⁺, Na⁺, NH⁴⁺, K⁺, Mn²⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Sr²⁺ et Ba²⁺ dissous - Méthode applicable pour l'eau et les eaux résiduaires. Paris, France: AFNOR Press. 20 p.
- AFNOR (2009) NF EN ISO 10304-1 Qualité de l'eau - Dosage des anions dissous par chromatographie des ions en phase liquide - Partie 1 : dosage du bromure, chlorure, fluorure, nitrate, nitrite, phosphate et sulfate. Paris, France: AFNOR Press. 16 p.
- AFNOR (2001) NF T90-007 Qualité de l'eau - Dosage des silicates solubles - Méthode par spectrométrie d'absorption moléculaire. Paris, France: AFNOR Press. 8 p.
- AFNOR (1997) NF EN 1484 - Analyse de l'eau - Lignes directrices pour le dosage du carbone organique total (TOC) et carbone organique dissous (COD). Paris, France: AFNOR Press. 10 p.
- AFNOR (1995) NF EN ISO 8467 Qualité de l'eau - Détermination de l'indice permanganate. Paris, France: AFNOR Press. 4 p.
- AFNOR (2005) NF EN ISO 11732 Qualité de l'eau - Dosage de l'azote ammoniacal - Méthode par analyse en flux (CFA et FIA) et détection spectrométrique. Paris, France: AFNOR Press. 18 p.
- AFNOR (1996) NF EN ISO 13395 Qualité de l'eau - Détermination de l'azote nitreux et de l'azote nitrique et de la somme des deux par analyse en flux (CFA et FIA) et détection spectrométrique. Paris, France: AFNOR Press. 18 p.
- Legrand L, Poirier GPL (1981) Les équilibres carboniques et l'équilibre calco-carbonique dans les eaux naturelles. Etude graphique, utilisation de calculatrices. Paris, France: Eyrolles Press. 176 p.
- Behets J, Declerck P, Delaet Y, Verels L, Ollivier F (2007) Survey for the presence of specific free-living amoebae in cooling waters from Belgian power plants. *Parasitol Research* 100: 1249–1256.
- Edagawa A, Kimura A, Kawabuchi-Kurata T, Kusahara Y, Karani P (2009) Isolation and genotyping of potentially pathogenic *Acanthamoeba* and *Naegleria* species from tap-water sources in Osaka, Japan. *Parasitol Res* 105: 1109–1117.
- Page FC (1988) A New Key to Freshwater and soil Gymnamoebae. *Freshwater Biological Association, Ambleside, Cumbria, England*.
- Hugo ER, Stewart VJ, Gast RJ, Byers TJ (1992) Purification of amoeba mtDNA using the UNSET procedure. In Soldo AT & Lee JJ; Editors. *Protocols in protozoology*. Lawrence, Kansas: Allen Press publishers. pp D-7. 1–2.
- De Jonckheere JF (1998) Sequence variation in the ribosomal internal transcribed spacer, including 5.8S, of *Naegleria* spp. *Protist* 149: 221–228.
- De Jonckheere JF, Brown S (2005) The identification of vahlkampfiid amoebae by ITS sequencing. *Protist* 156: 89–96.
- De Jonckheere JF, Gryseels S, Eddyani M (2012) Knowledge of morphology is still required when identifying new amoeba isolates by molecular techniques. *Eur J Protistol* 48: 178–184.
- Pernin P, Pélendakis M, Roubly Y, Faure A, Sicet F (1998) Comparative recoveries of *Naegleria fowleri* amoebae from seeded river water by filtration and centrifugation. *Appl Environ Microbiol* 64: 955–959.
- Tyndall RL, Ironside KS, Meiler PL, Tan EL, Hazen TC, et al. (1989) 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* 55: 722–732.
- Cabanes PA, Wallet F, Pringuez E, Pernin P (2001) Assessing the Risk of Primary Amoebic Meningoencephalitis from Swimming in the Presence of Environmental *Naegleria fowleri*. *Appl Environ Microbiol* 67: 2927–2931.

Acknowledgments

We thank Cédric Broquère for his assistance in sequencing and all who assisted in the field and laboratory.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JFDJ AT JG AB. Performed the experiments: JFDJ MM JG MR AT. Analyzed the data: MM JG JFDJ AT MR VR. Contributed reagents/materials/analysis tools: JFDJ. Wrote the paper: MM JG JFDJ AT.

Soil is the origin for the presence of *Naegleria fowleri* in the thermal recreational waters

Mirna Moussa · Océane Tissot · Jérôme Guerlotté ·
Johan F. De Jonckheere · Antoine Talarmin

Received: 20 August 2014 / Accepted: 17 October 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract *Naegleria fowleri* is found in most geothermal baths of Guadeloupe and has been responsible for the death of a 9-year-old boy who swam in one of these baths in 2008. We wanted to determine the origin for the presence of this amoeba in the water. Water samples were taken at the origin of the geothermal sources and at the arrival in the baths. After filtration, cultures were made and the number of *Naegleria* present was determined using the most probable number method. Soil samples collected in the proximity of the baths were also tested for the presence of thermophilic amoebae. The species identification was obtained by PCR. During three consecutive months, no *Naegleria* could be found at the origin of any geothermal source tested. In contrast, *N. fowleri* was isolated at least once in all baths at the arrival of the water, except one. Thermophilic amoebae could be found in each soil sample, especially near the baths located at a lower altitude, but *N. fowleri* was only isolated near two baths, which were also the baths most often contaminated with this species. So it appears that the contamination of the water with *N. fowleri* occurs after emerging from the geothermal source when the water runs over the soil. Therefore, it should be possible to reduce the concentration of *N. fowleri* in the geothermal baths of Guadeloupe to for example less than 1 *N. fowleri*/10 L by installing a pipeline between the

geothermal sources and the baths and by preventing flooding water from entering the baths after rainfall. By taking these measures, we were able to eliminate *N. fowleri* from a pool located inside a reeducation clinic.

Keywords *Naegleria fowleri* · Reservoir · Soil · Prevention

Introduction

Free-living amoebae (FLA) are highly diverse and show a worldwide distribution in water and soil. FLA have been isolated from natural and man-made aquatic habitats such as fountains, swimming pools and spas, industrial cooling circuits, and even tap water (De Jonckheere 2002; Schuster and Visvesvara 2004). *Naegleria* is a free-living amoeboflagellate found in freshwater and feeding on bacteria. Earlier studies indicated that densities of thermophilic amoebae in general and of thermophilic *Naegleria* spp. in particular are correlated positively with higher temperatures of naturally or artificially heated waters (Brown et al. 1983; Tyndall and De Jonckheere 1984). Within the genus *Naegleria*, *Naegleria fowleri* tolerates temperatures of up to 45 °C and proliferates in natural bodies of water (e.g., lakes and rivers) during warmer months of the year, as well as in geothermal water or in industrial cooling water (De Jonckheere 2011). Although thermophilic *Naegleria* spp. are mostly found in warm waters, the origin of the pathogenic species in these waters is still unclear. It seems that the preferred habitat of the pathogenic free-living amoeba (PFLA) is soil which could act as a reservoir (Cursons et al. 1979; Singh 1975) and that water is being contaminated via runoff after rainfall (Brown et al. 1983).

While there are more than 40 species of *Naegleria* described (De Jonckheere 2002), only one species, *N. fowleri*, causes primary amoebic meningoencephalitis (PAM) in man (Carter 1970), a rare but rapidly fatal central nervous system

M. Moussa · O. Tissot · J. Guerlotté · J. F. De Jonckheere ·
A. Talarmin (✉)
Unité Environnement-Santé, Institut Pasteur de la Guadeloupe,
97183 Les Abymes CEDEX, Guadeloupe, France
e-mail: atalarmin@pasteur-guadeloupe.fr

J. Guerlotté
Université des Antilles et de la Guyane, F-97159, Pointe à Pitre,
Guadeloupe, France

J. Guerlotté
Muséum National d'Histoire Naturelle, UMR 7205 MNHN/CNRS,
75231 Paris CEDEX 5, France

disease occurring after exposure to contaminated water. The disease occurs in otherwise healthy individuals with exposure to warm, untreated, or poorly disinfected water with chlorine concentrations lower than 1 mg/L (Cassells et al. 1995; Chang 1978). PAM is generally acquired while swimming and diving in freshwater lakes and ponds (Marciano-Cabral 1988; Martinez and Visvesvara 1997). Infection of the brain occurs after amoebae reach the nasal cavity and invade the nasal mucosa. From there, the amoebae penetrate the nasal epithelium and migrate by the olfactory nerves through the cribriform plate to invade the brain and meninges (Carter 1978). After a 9-year-old boy died of PAM in 2008 after swimming in the Dolé geothermal bath of the French West Indies Guadeloupe Island (Nicolas et al. 2010), an investigation on the occurrence and distribution of *Naegleria* in warm waters was performed on a monthly basis during 2011 and 2012 (Moussa et al. 2013). This survey demonstrated that thermophilic amoebae and especially *N. fowleri* were often detected at low concentrations in most of the warm waters located around the Soufriere volcano. Surprisingly, the baths which appeared to be the most contaminated were not always the dirtiest ones. In order to try to understand the origin of the contamination, we decided to investigate the presence of *N. fowleri* in the water at the emergence from the geothermal sources and at the arrival in the baths, as well as in the nearby soil taken some meters upstream the baths.

Materials and methods

Sample collection

The four most frequented and popular baths were investigated in the present study. They are located around the Soufriere volcano (Fig. 1). Bain de Matouba (altitude 1070 m), Bains Jaunes (altitude 950 m), Bain de Dolé (altitude 220 m), and Bain des Amours (altitude 220 m) are outdoor recreational baths (Fig. 1-1a, 2b, 3b, 4b). The pool of Matouba (altitude 970 m) is a bath located 3 km downstream the geothermal source, inside a reeducation clinic (Fig. 1-1b). Both Bain and pool of Matouba are fed by the same geothermal source. The Bain de Matouba is fed by a little stream, emerging from the geothermal source located 20 m upstream (Table 1; Fig. 1-1a). The bath has no protection against water running into it after rainfall. The pool of the Matouba clinic, fed by a pipeline starting at the source, is located inside a building and is protected from rainfall and other water entering it (Table 1).

At Bains Jaunes, the geothermal water emerges from the rocks and is running directly into the bath (Table 1; Fig. 1-2a). However, there is no protection from water running into the bath after rainfall.

At Bain des Amours, the geothermal water emerges from a source at around 3 m from the bath and is running into a little

tank from which three pipelines drain the water into the bath (Fig. 1-3a).

The Bain de Dolé, in which place the PAM was contracted in 2008, is fed by a main stream, which is the overflow of the water catchment of a mineral water factory. This overflow is located 30 m above the bath, forming several little streams running on top of the soil, especially after rainfall, and forming the main stream that feeds the bath (Table 1; Fig. 1-4a). In Bain des Amours, as well as in Bain de Dolé, a wall protects the bath from running water after rainfall.

Water samples were collected three times at each location (Table 1). Water samples (11 L) were taken at the geothermal source and at the arrival of the water into the bath at each location. For Bain and source of Matouba, only 2 L were collected as it is an hour's walk in rainforest to reach them. Because the geothermal source of the Bains Jaunes is located inside the bath, water from the geothermal source was collected after the bath was emptied for cleaning (Fig. 1-2a). The water sample taken before the bath was emptied was considered as the water on arrival. The water samples were transported to the laboratory at ambient temperature (around 30 °C) and the isolation of amoebae was performed within 2 h after sampling.

Soil samples were also collected nearby the streams at the same time at some meters before the water enters the baths. Soils taken from three different locations near the same bath were mixed to constitute a unique sample for that place. These three locations were identical each time when soil was collected at that place.

Isolation of amoebae

The water samples were filtered through a cellulose nitrate filter (pore size, 1.2 µm; diameter, 47 mm, Millipore (Fisher Scientific)) (Behets et al. 2007; Edagawa et al. 2009), and the concentration of amoebae determined following the most probable number (MPN) method (Pernin et al. 1998). When 11 L was collected, 1 L and 100 mL were filtered 10 times for each volume; for the 2 L Matouba samples, 100 and 10 mL were filtered 10 times.

Each filter was cut into two pieces, and placed inverted on a 1.5 % non-nutrient agar plate seeded with a thin layer of *Escherichia coli* (NNA-*E. coli*) (Behets et al. 2007) (i.e., two pieces of filter per plate).

Soil samples were tested using a similar technique. For each mixed sample of soil, 10 spots of 1 g were placed on three plates and 10 spots of 100 µg were placed on two plates, in order to determine the MPN for each sample. All plates were sealed with parafilm (Parafilm M[®]) and incubated inverted at 44 °C to select for thermophilic amoebae (TA). The plates were inspected daily for amoebic growth for up to 7 days.

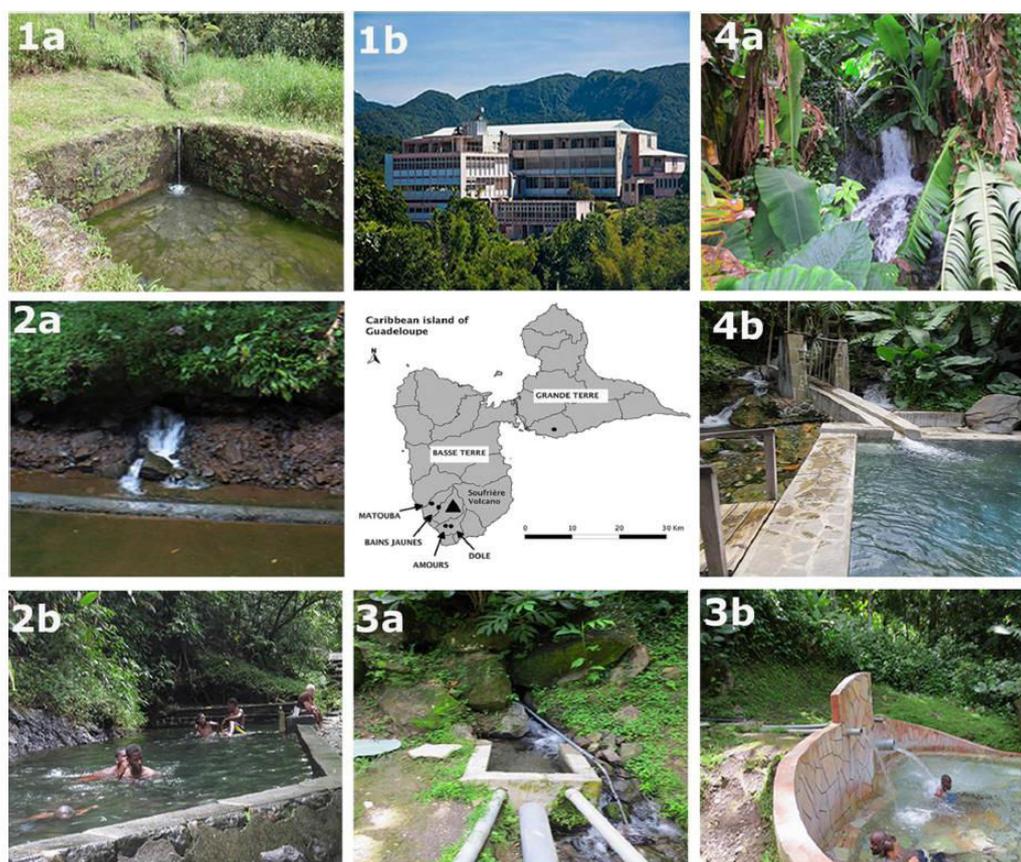


Fig. 1 Map of Guadeloupe with the location of the baths. *1a* Bain of Matouba fed by a little stream. *1b* Clinic of Matouba harboring a pool fed by a pipeline emerging from the same source as the Bain de Matouba. *2a* Source emerging inside the Bains Jaunes. *2b* Bains Jaunes after filling. *3a*

Source of Bain des Amours arriving in a little tank from which three pipelines leave to feed the water to the bath (*3b*). *4a* Emergence of a water catchment creating a stream feeding the Bain de Dolé (*4b*)

Morphological identification and amoeba counting

During incubation, the first-line plates were examined with an inverted phase contrast microscope (Will-Wetzlar “Wilovert” $\times 400$). Every amoeba plaque emerging along the filters was picked and subcultured, on fresh NNA-*E. Coli* (second-line plates). The isolates were pre-identified morphologically

using Page’s taxonomy key (Page 1988). The species identification was done by PCR as described previously (Moussa et al. 2013).

The concentration of *N. fowleri* was obtained by counting the total number of positive plates for each volume and by referring to the MPN table (Champsaur 1996). The number of positive plates was compared to the MPN table, according to a

Table 1 Main differences in the characteristics of the water feeding the bath and in the conception of the geothermal baths studied

	Emergence of the source	Delivery of the water to the bath	Protection of the bath against running water from outside the source
Bain de Dolé	30 m upstream	Natural stream	Yes
Bain des Amours	3 m upstream	Natural stream	Yes
Bains Jaunes	Inside the bath	NA	No
Bain de Matouba	20 m upstream	Natural stream	No
Matouba clinic	3 km upstream	Pipeline	Yes

NA not applicable

Table 2 Number of *N. fowleri* (Nf) per liter at the origin (geothermal source) and at the arrival into the baths

	Bain de Dolé		Bains Jaunes		Bain des Amours		Matouba		
	Origin	Bath	Origin	Bath	Origin	Bath	Origin	Bath	Clinic pool
Mean <i>T</i> (°C)	32	32	32	30	34	34	58	39	34
Nf/L in March N ^a , [95 % CI]	0	2 [1–14]	0	0	0	0	0	8 [3–22]	0.4 [0.1–1.6]
Nf/L in April N, [95 % CI]	0	0	0	0	0	0	0	2 [1–14]	7 [3–20]
Nf/L in May N, [95 % CI]	0	0.2 [0.1–1.4]	0	0.7 [0.3–2]	0	0	0	7 [3–20]	0 ^b

^a Number/L^b After useless UV machine and old pipes were removed

concentration. For 1-L and 100-mL plates, the number corresponding to 100 and 10 mL was divided by 10.

Results

No *Naegleria* were found in the water of any geothermal source. However, *N. fowleri* was isolated from the water which arrived at the bath at least one time each in all places, except for Bain des Amours. The waters feeding the Bain de Dolé (Table 2) and the bath of Matouba and the pool in the Matouba clinic were the most contaminated with *N. fowleri*.

In the pool of the Matouba clinic, *N. fowleri* was detected in March and April but not in May. Between April and May, all the materials (such an old UV water treatment machine through which the water runs before feeding the pool and different old pipes, with doubtful purpose, that were connected to the main pipe supplying the water) had been removed.

Amoebae were isolated from soil at all places. The number of TA was much higher in the soils of Bain des Amours and Bain de Dolé (mean of 350 and 241 TA/g of soil, respectively) than in that of Bain de Matouba and Bains Jaunes (20 and 22 TA/g of soil, respectively) (Table 3). However, *N. fowleri* was identified only in two out of the four places where soil was collected: near Bain de Dolé and Bain de Matouba (Table 3).

Discussion

The previous observation (Moussa et al. 2013) that the bath most contaminated by *N. fowleri* was one of the most

regularly cleaned indicated that the growth of *N. fowleri* inside the bath could not be the predominant reason for the presence of this amoeba.

Therefore, it was important to know whether the water at the geothermal source was already contaminated or became contaminated after the emergence from the geothermal source.

Our present results demonstrate that the water is contaminated after the emergence from the geothermal source and that the longer it runs on the soil, the more it becomes contaminated.

Therefore, it was important to test for the presence of *N. fowleri* in the soil between the thermal sources and the baths. The results indicate that the soil is indeed the real reservoir of *N. fowleri* and that the thermal water increases the concentration of *N. fowleri*. *N. fowleri* has already been isolated from soils before although on rare occasions, but the amoeba appeared to be in greater concentrations in the soil than in the water (Brown et al. 1983). In the present study, TA could be isolated from each soil sample. The difference in number of TA between Bain de Dolé and Bain des Amours on one side and Bain de Matouba and Bains Jaunes on the other side is striking. An explanation could be that Bains Jaunes and Bains de Matouba are at a higher altitude with a mean outside temperature of 20 °C while the two others baths have a higher mean outside temperature (22 °C) and temperature is probably important for *Naegleria* spp. in soils, as it has been shown in water (Behets et al. 2007; Kao et al. 2014).

In contrast with TA, *N. fowleri* was recovered only three times from soil near two different baths. These baths were also the most contaminated by *N. fowleri*. The growth of *N. fowleri* in vitro is probably inhibited by the development of other amoebae which were numerous in the soil samples. In order

Table 3 Number of thermophilic amoebae (TA) and *N. fowleri* (Nf) per gram of soil taken near the baths

	Bain de Dolé		Bains Jaunes		Bain des Amours		Matouba	
	TA	Nf	TA	Nf	TA	Nf	TA	Nf
1st sample	461 [206–1033]	<2	7 [2–20]	<2	241 [110–529]	<2	14 [6–32]	2 [1–14]
2nd sample	141 [60–330]	2 [1–14]	10 [4–25]	<2	321 [150–696]	<2	29 [14–58]	2 [1–14]
3rd sample	122 [52–285]	<2	48 [24–97]	<2	>461	<2	17 [8–37]	<2

to avoid the competition between amoebae while culturing, it might be useful to develop in the future a metagenomic approach for the detection and identification of amoebae in samples such as soils or sediments.

The pool of the Matouba clinic is a special case. Indeed, the water runs through a pipe from the geothermal source and, therefore, contamination from soil is impossible. Since no amoebae could be found at the geothermal water source, the contamination could only occur inside the clinic where there were different sources of contamination possible, namely, the pipes connected to the main pipe and the UV apparatus. Therefore, all the old pipes and the UV apparatus were removed in April. As a result, amoebae could not be detected anymore in the sample collected in May, confirming our hypothesis.

This study allows us to inform the health authorities that contamination with *N. fowleri* of the water feeding the baths can be drastically reduced by installing a pipe between the geothermal water sources and the baths, in order to avoid contact of the water with the soil (as demonstrated at the Matouba clinic after we removed all the useless materials).

Concerning the Bains Jaunes, it is a little more complicated since the source emerges inside the bath. Therefore, a pipeline to prevent contamination of the bath is impossible. A little wall should be built around the bath to deviate the water after rainfall and prevent it from running into the bath.

Since the risk of infection seems to be depending on the concentration (Cabanes et al. 2001), all measures aiming at reducing the number of *N. fowleri* in the bath are important. It is difficult to determine the acceptable risk in the light of the severity of the disease. But as in Guadeloupe, the prevention measures are quite simple, more than 1 *N. fowleri*/10 L in the different geothermal baths should be unacceptable.

Conclusion

This study resulted in two main conclusions, (i) soil is the reservoir for the presence of *N. fowleri* and other thermophilic amoebae in geothermal recreational baths in Guadeloupe and therefore, (ii) avoiding the contact between the warm water and soil before the arrival of the water in the recreational baths should reduce the risk of contamination with *N. fowleri*.

Acknowledgments This work was supported by a grant ACIP n°A01-11 from the Institut Pasteur and by a grant FEDER FED-1-1.4 32932 from the European Union. Mirna Moussa was supported by a grant FSE from the European Union and the Guadeloupe Region.

Conflict of interest The authors declare that there is no conflict of interest.

References

- Behets J, Declerck P, Delaedt Y, Verelst L, Ollevier F (2007) Survey for the presence of specific free-living amoebae in cooling waters from Belgian power plants. *Parasitol Res* 100:1249–1256
- Brown TJ, Cursons RTM, Keys EA, Marks M, Miles M (1983) The occurrence and distribution of pathogenic free-living amoebae in thermal areas of the North Island of New Zealand. *New Zeal J Mar Fresh* 17:59–69
- Cabanes PA, Wallet F, Pringuez E, Permin P (2001) Assessing the risk of primary amoebic meningoencephalitis from swimming in the presence of environmental *Naegleria fowleri*. *Appl Environ Microbiol* 67:2927–2931
- Carter RF (1970) Description of a *Naegleria* sp. isolated from two cases of primary amoebic meningo-encephalitis, and of the experimental pathological changes induced by it. *J Pathol* 100:217–244
- Carter SA (1978) Primary amoebic meningoencephalitis (a “new” disease associated with water pollution). *Int J Environ Stud* 12:199–205
- Cassells JM, Yahya MT, Gerba CP, Rose JB (1995) Efficacy of a combined system of copper and silver and free chlorine for inactivation of *Naegleria fowleri* amoebas in water. *Water Sci Technol* 31:19–22
- Champsaur H (1996) Méthodes générales d’examen bactériologique des eaux. Dunod, Paris
- Chang SL (1978) Resistance of pathogenic *Naegleria* to some common physical and chemical agents. *Appl Environ Microbiol* 35:368–375
- Cursons RT, Brown TJ, Keys EA, Gordon EH, Leng RH, Havill JH, Hyne BE (1979) Primary amoebic meningo-encephalitis in an indoor heat-exchange swimming pool. *New Zeal Med J* 90:330–331
- De Jonckheere JF (2002) A century of research on the amoeboflagellate genus *Naegleria*. *Acta Protozool* 41:309–342
- De Jonckheere JF (2011) Origin and evolution of the worldwide distributed pathogenic amoeboflagellate *Naegleria fowleri*. *Infect Genet Evol* 11:1520–1528
- Edagawa A, Kimura A, Kawabuchi-Kurata T, Kusuhara Y, Karanis P (2009) Isolation and genotyping of potentially pathogenic *Acanthamoeba* and *Naegleria* species from tap-water sources in Osaka, Japan. *Parasitol Res* 105:1109–1117
- Kao PM, Hsu BM, Hsu TK, Chiu YC, Chang CL, Ji WT, Huang SW, Fan CW (2014) Application of TaqMan qPCR for the detection and monitoring of *Naegleria* species in reservoirs used as a source for drinking water. *Parasitol Res* Aug 1.[Epub ahead of print]
- Marciano-Cabral F (1988) Biology of *Naegleria* spp. *Microbiol Rev* 52:114–133
- Martínez AJ, Visvesvara GS (1997) Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. *Brain Pathol* 7:583–598
- Moussa M, De Jonckheere JF, Guerlotte J, Richard V, Bastaraud A, Romana M, Talarmin A (2013) Survey of *Naegleria fowleri* in Geothermal Recreational Waters of Guadeloupe (French West Indies). *PLoS ONE* 8:e54414
- Nicolas M, De Jonckheere JF, Pemin P, Bataille H, Le Bris V, Herrmann-Storck C (2010) Molecular diagnosis of a fatal primary amoebic meningoencephalitis in Guadeloupe (French West Indies). *Bull Soc Path Exot* 103:14–18
- Page FC (1988) A new key to freshwater and soil gymnamoebae. Freshwater Biological Association, Ambleside
- Pemin P, Pélendakis M, Rouby Y, Faure A, Siclet F (1998) Comparative recoveries of *Naegleria fowleri* amoebae from seeded river water by filtration and centrifugation. *Appl Environ Microbiol* 64:955–959
- Schuster FL, Visvesvara GS (2004) Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int J Parasitol* 34:1001–1027
- Singh BN (1975) Pathogenic and non-pathogenic amoebae. Macmillan, London
- Tyndall RL, De Jonckheere JF (1984) Environmental isolation of pathogenic *Naegleria*. *Crit Rev Env Contr* 13:195–226