

## THÈSE

Pour l'obtention du grade de  
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE POITIERS  
UFR des sciences fondamentales et appliquées  
Ecologie et biologie des interactions - EBI (Poitiers)  
(Diplôme National - Arrêté du 7 août 2006)

École doctorale : Sciences pour l'environnement - Gay Lussac (La Rochelle)  
Secteur de recherche : Aspects moléculaire et cellulaire de la biologie

Présentée par :  
Emilie Fouque

### **Les processus de différenciation et la résistance des kystes aux traitements de désinfection chez l'amibe libre *Vermamoeba vermiformis***

Directeur(s) de Thèse :  
Yann Héchard, Philippe Hartemann

Soutenue le 09 décembre 2013 devant le jury

#### Jury :

|            |                                  |   |
|------------|----------------------------------|---|
| Président  | <b>Marie-Hélène Rabot-Rodier</b> | Professeur, praticien hospitalier, Université de Poitiers     |
| Rapporteur | <b>Julia Walochnik</b>           | Professor, Universität von Medizin von Wien, Österreich       |
| Rapporteur | <b>Michel Pelandakis</b>         | Maître de conférences, Université de Lyon 1                   |
| Membre     | <b>Yann Héchard</b>              | Professeur des Universités, Université de Poitiers            |
| Membre     | <b>Philippe Hartemann</b>        | Professeur des Universités, Université de Lorraine            |
| Membre     | <b>Marie-Cécile Trouilhé</b>     | Docteur, Centre scientifique et technique du bâtiment, Nantes |
| Membre     | <b>Vincent Thomas</b>            | Chef de projet R&D, Enterome, Paris                           |
| Membre     | <b>Francesc Codony</b>           | Ingeniero, Universidad politécnica de Cataluña, España        |

#### **Pour citer cette thèse :**

Emilie Fouque. *Les processus de différenciation et la résistance des kystes aux traitements de désinfection chez l'amibe libre Vermamoeba vermiformis* [En ligne]. Thèse Aspects moléculaire et cellulaire de la biologie. Poitiers : Université de Poitiers, 2013. Disponible sur Internet <<http://theses.univ-poitiers.fr>>

# THESE

pour l'obtention du Grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS**

(Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées)

(Diplôme National - Arrêté du 7 août 2006)

Ecole Doctorale : Sciences pour l'environnement Gay Lussac

Secteur de Recherche : ASPECT MOLECULAIRE ET CELLULAIRE DE LA BIOLOGIE

Présentée par :

**Emilie FOUQUE**

\*\*\*\*\*

## **Les processus de différenciation et la résistance des kystes aux traitements de désinfection chez l'amibe libre**

***Vermamoeba vermiformis***

\*\*\*\*\*

Directeurs de Thèse :

Yann HECHARD, Professeur, Université de Poitiers

Philippe HARTEMANN, Professeur, Université de Lorraine

\*\*\*\*\*

**Soutenue le 9 décembre 2013, devant la commission d'examen**

\*\*\*\*\*

### **JURY**

Présidente : Marie-Hélène RODIER, Professeur et Praticien Hospitalier, Université de Poitiers

Rapporteurs : Julia WALOCHNIK, Professeur, Université de Médecine de Vienne, Autriche  
Michel PELANDAKIS, Maître de conférences, HDR, Université Lyon 1

Examineurs : Vincent THOMAS, HDR, Chef de projet R&D, Enterome  
Francesc CODONY, Ingénieur, Université polytechnique de Catalogne, Espagne  
Marie-Cécile TROUILHE, Docteur, Centre Scientifique et Technique du Bâtiment  
Philippe HARTEMANN, Professeur, Université de Lorraine  
Yann HECHARD, Professeur, Université de Poitiers



# REMERCIEMENTS

Je souhaite tout d'abord remercier le Professeur Yann Héchard de l'Université de Poitiers et le Professeur Philippe Hartemann de l'Université de Lorraine d'avoir accepté d'être mes directeurs de thèse. Je les remercie pour leur encadrement de qualité tout au long de ses trois années.

Cette thèse a été réalisée en partenariat entre le Centre Scientifique et Technique du Bâtiment (CSTB) et le Laboratoire d'Ecologie et Biologie des Interactions (UMR 7267). Je souhaite donc remercier Jean-Michel Axès, le Directeur du CSTB de Nantes, de m'avoir accueilli durant deux ans au sein de son établissement. Je remercie également Philippe Humeau, le responsable thématique Eau et Assainissement du CSTB, de m'avoir intégré au sein de son équipe et le remercie pour tous ses encouragements. J'exprime ma gratitude et ma profonde reconnaissance à Marie-Cécile Trouilhé, Ingénieur de recherche au CSTB, pour son encadrement de qualité, sa disponibilité sans failles, ses conseils et sa gentillesse. Je garderai en mémoire plein de bons souvenirs de notre collaboration et des agréables moments passés ensemble. Je remercie également le Pr Yann Héchard, en plus de son rôle de directeur de thèse, de m'avoir accueilli durant un an au sein de l'équipe de Microbiologie de l'Eau du Laboratoire d'Ecologie et Biologie des Interactions de Poitiers.

J'exprime ma gratitude au Professeur Julia Walochnik de l'Université de Vienne et au Maître de Conférences Michel Pélandakis de l'Université de Lyon 1 d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail de thèse. Je remercie également Vincent Thomas, chef de projet R&D à Enterome, et Francesc Codony de l'Université Polytechnique de Catalogne d'avoir accepté d'être examinateurs de cette thèse. Je remercie vivement le Professeur et Praticien Hospitalier Marie-Hélène Rodier de l'Université et du Centre hospitalier Universitaire (CHU) de Poitiers d'avoir accepté d'être la présidente de mon jury de thèse. Et enfin je remercie Marie-Cécile Trouilhé pour sa participation au jury de ma thèse.

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué à ce travail de recherche. Nathalie Quellard et Béatrice Fernandez, ingénieures de recherche au service d'Anatomie et

de Cytologie Pathologiques du CHU de Poitiers, pour le temps qu'elles ont consacré à me former en microscopie électronique et leur aide technique. Et je leur exprime ma profonde gratitude pour leur accueil plus que chaleureux, leur gentillesse et tous les agréables souvenirs que je garderai de notre collaboration. Je remercie également Emile Beré, Adriana Dewail et Anne Cantereau de la plateforme d'imagerie de l'Université de Poitiers (imageUP) pour leur aide technique en microscopie électronique, cytométrie en flux et microscopie confocale. J'exprime ma gratitude au Professeur Marina Yefimova pour les fructueuses discussions que nous avons partagées et son aide pour l'interprétation des résultats dans l'étude des changements morphologiques et structuraux qui s'opèrent lors des processus de différenciation de *V. vermiformis*. Je remercie également Vincent Thomas et Marie-Hélène Rodier d'avoir accepté de faire partie de mon comité de suivi de thèse durant ces trois années, j'ai pu apprécier tous leurs conseils.

Je n'oublie pas mes collègues du Laboratoire d'Ecologie et Biologie des Interactions avec qui j'ai partagé une année et de laquelle je garderai de bons souvenirs. Et bien évidemment je souhaite exprimer ma profonde gratitude à mes collègues du CSTB de Nantes, et plus particulièrement à l'équipe d'Aquasim, pour tous les délicieux moments passés ensemble et les remercie pour tous les beaux souvenirs que je garderai en mémoire de ces deux années.

Enfin, je souhaite exprimer ma grande gratitude à tous mes proches et amis pour leur soutien, leurs encouragements et leur compréhension. Je remercie particulièrement ma maman pour tous ses excellents conseils et la remercie profondément de m'avoir toujours encouragé et soutenu dans mes projets. Pour finir, je souhaite remercier Jean-Baptiste pour son soutien sans failles, son infinie patience et pour tout son amour.

# RESUMES FRANÇAIS ET ANGLAIS

## Les processus de différenciation et la résistance des kystes aux traitements de désinfection chez l'amibe libre *Vermamoeba vermiformis*

*V. vermiformis* est une amibe libre répandue dans l'environnement et les milieux artificiels comme les réseaux d'eau chaude sanitaire (RECS). Il est maintenant bien établi qu'elle joue un rôle de réservoir pour des bactéries pathogènes, comme *L. pneumophila*. Le contrôle de *V. vermiformis* dans les RECS représente donc un enjeu sanitaire important. Les amibes libres peuvent passer d'une forme métaboliquement active (trophozoïte) à une forme de résistance, le kyste, lorsque les conditions sont défavorables ce qui leur confère une résistance aux traitements. Malgré la haute prévalence de *V. vermiformis* dans les RECS, les processus de différenciation et la résistance de ses kystes aux traitements n'ont été que peu étudiés. Nous avons donc investigué les changements morphologiques et ultrastructuraux qui s'opèrent lors de l'enkystement et déenkystement de *V. vermiformis*. Il en ressort que l'enkystement est un phénomène rapide (9 h) qui conduit à la formation de kystes entourés d'une paroi double couche. Lors du déenkystement, les trophozoïtes n'émergent pas à travers un ostiole comme c'est le cas chez *Acanthamoeba*. Puis, nous avons étudié l'effet des conditions environnementales et de la concentration cellulaire sur l'enkystement. Nous avons observé que plus la concentration cellulaire est élevée plus l'enkystement est rapide, ce qui suggère l'existence de mécanismes de communication intercellulaire. Enfin, nous avons étudié la résistance des kystes aux traitements utilisés dans les RECS et aux protéases. Ces traitements étaient efficaces, *in vitro*, pour inactiver les kystes de *V. vermiformis*. Ces travaux ont permis d'apporter des connaissances de bases sur les processus de différenciation et la résistance des kystes de *V. vermiformis*, une amibe libre peu étudiée.

**Mots clés :** *Vermamoeba vermiformis*, amibe libre, enkystement, déenkystement, microscopie électronique, communication intercellulaire, traitement de désinfection, réseau d'eau chaude sanitaire.

## The processes of differentiation and resistance of cysts to disinfection treatments in the free-living amoeba *Vermamoeba vermiformis*

*Vermamoeba vermiformis* is a free-living amoeba (FLA) widespread in the environment and artificial environments such as hot water networks. It is now well established that it acts as a reservoir for many pathogenic bacteria, such as *Legionella pneumophila*. The control of *V. vermiformis* in artificial environments represents an important health issue. FLA can turn from a metabolic active form (trophozoite) to a resistance form, called cyst, when conditions are unfavorable. Cysts are more resistant to treatments. Despite the high prevalence of *V. vermiformis* in hot water networks, the processes of differentiation and the resistance of cysts to disinfection treatments have been poorly studied. Therefore we investigated morphological and ultrastructural changes occurring during encystment and excystment of *V. vermiformis*. It appears that encystment is a fast process (9 h) which leads to the formation of cysts surrounded by a double-layered wall. During excystment, trophozoites do not emerge through an ostiole as is the case with *Acanthamoeba*. Then, we studied the effect of environmental conditions and cell concentration on encystment. We observed that the higher cell concentration was, the faster the encystment was, which suggests the existence of intercellular communication. Finally, we studied the resistance of cysts to conventional disinfection treatments used in hot water networks and to innovative treatment with proteases. These treatments were effective, *in vitro*, to inactivate *V. vermiformis* cysts. This work provides new finding regarding differentiation processes and cysts resistance of *V. vermiformis*, a free-living amoeba poorly studied.

**Keywords:** *Vermamoeba vermiformis*, free-living amoeba, encystment, excystment, electron microscopy, intercellular communication, disinfection treatment, hot water network.

# VALORISATION DE LA THESE

## 1. Articles dans des revues internationales avec comité de lecture répertoriées dans les bases de données internationales

### 1.1. Publication parue :

**Titre :** " Cellular, biochemical and molecular changes during encystment of free-living amoebae "

**Auteurs :** Fouque, E., Trouilhé, M.C., Thomas, V., Hartemann, P., Rodier, M.H., Héchard, Y.

**Journal et volume :** Eukaryotic cell, 11(4) : 382-387

**Année de parution :** 2012

### 1.2. Publications soumises :

**Titre :** " Encystment of *Vermamoeba (Hartmannella) vermiformis*: effects of environmental conditions and cell concentration. "

**Auteurs :** Fouque, E., Trouilhé, M.C., Thomas, V., Humeau, P., Héchard, Y.

**Journal :** Parasitology Research

**Date de soumission :** novembre 2013

-----  
**Titre :** " Sensitivity of *Vermamoeba (Hartmannella) vermiformis* cysts to conventional disinfectants and protease "

**Auteurs :** Fouque, E., Héchard, Y., Hartemann, P., Humeau, P., Trouilhé, M.C.

**Journal :** Water & Health

**Date de soumission :** février 2014

### 1.3. Une publication va être prochainement soumise :

**Titre :** " Dynamic study of the encystment and excystment of *Vermamoeba vermiformis* revealed original traits "

**Auteurs :** Fouque, E., Yefimova, M., Trouilhé, M.C., Quellard, N., Fernandez, B., Rodier, M.H., Thomas, V., Humeau, P., Héchard, Y.



**Journal sélectionné pour la soumission :** Eukaryotic Cell

## **2. Communication orale sans actes dans un congrès international ou européen**

**Congrès :** 15th International Meeting on the Biology and Pathogenicity of Free-Living Amoebae (FLAM) (juillet 2013, Vienne, Autriche)

**Titre :** " Ultrastructural study of encystment and excystment of *Hartmannella vermiformis* "

**Conférencier :** Mlle FOUQUE Emilie

---

**Congrès :** Seminar of European PhD Students on Water and Health (juin 2011, Cannes, France)

**Titre :** " A study on the encystment of free-living amoebae "

**Conférencier :** Mlle FOUQUE Emilie

## **3. Communication orale avec actes dans un congrès national**

**Congrès :** JIE Journées Informations Eaux (septembre 2012, Poitiers, France)

**Titre :** " Etude de l'enkystement et de la résistance des *Hartmannella* aux traitements de désinfection "

**Auteurs de l'article :** Fouque, E., Trouilhé, M.C., Humeau, P., Hartemann, P., Rodier, M.H., Thomas, V., Héchard, Y.

**Conférencier :** Mlle FOUQUE Emilie

## **4. Communication par affiche dans un congrès international**

**Congrès :** ISME 14 International Symposium of Microbial Ecology (août 2012, Copenhague, Danemark)

**Titre du poster :** " Study of encystment and resistance to disinfection treatments of *Hartmannella*, a free-living amoebae "

**Auteur du poster :** Mlle FOUQUE Emilie

## **5. Autres conférences ou posters**

**Conférence :** Journée de la microbiologie (septembre 2011, Poitiers, France)

**Titre de la conférence :** " Etude de l'enkystement des amibes libres "

**Conférencier :** Mlle FOUQUE Emilie

---

**Journée des doctorants du Centre Scientifique et Technique du Bâtiment 2013** : 22 octobre 2013 à Paris, France

**Titre du poster** : " Les processus de différenciation et la résistance aux traitements de l'amibe libre : *Vermamoeba vermiformis* "

**Auteur du poster** : Mlle FOUQUE Emilie

---

**Journée des doctorants du Centre Scientifique et Technique du Bâtiment 2012** : 22 octobre 2013 à Paris, France

**Titre de la conférence** : " Mise en place d'une stratégie innovante de maîtrise des amibes dans les biofilms pour la gestion des risques sanitaires "

**Auteur de la conférence** : Mlle FOUQUE Emilie

**Titre du poster** : " Etude de l'enkystement et de la résistance d'*Hartmannella*, une amibe libre, aux traitements de désinfection "

**Auteur du poster** : Mlle FOUQUE Emilie

---

**Journée des doctorants du Centre Scientifique et Technique du Bâtiment 2011** : 19 octobre 2011 à Champs-sur-Marne, France

**Titre du poster** : " Etude de l'enkystement des amibes libres "

**Auteur du poster** : Mlle FOUQUE Emilie



# TABLE DES MATIERES

|  |    |
|--|----|
| CHAPITRE I : Synthèse bibliographique .....                                  | 2  |
| 1. Amibes libres : généralités .....   | 2  |
| 1.1. Historique .....  | 3  |
| 1.2. Classification .....  | 5  |
| 1.3. Biologie .....  | 7  |
| 1.3.1. Morphologie .....   | 7  |
| 1.3.1.1. Forme trophozoïte .....   | 8  |
| 1.3.1.2. Forme kystique .....  | 9  |
| 1.3.1.3. Forme flagellée .....   | 10 |
| 1.3.2. Locomotion .....  | 11 |
| 1.3.3. Nutrition .....   | 12 |
| 1.3.4. Reproduction .....  | 14 |
| 1.4. Distribution dans l'environnement .....                                 | 14 |
| 1.4.1. Environnements naturels .....   | 15 |
| 1.4.2. Environnements artificiels .....                                      | 16 |
| 1.5. Pathogénicité des amibes libres .....                                   | 19 |
| 1.5.1. Atteintes du système nerveux .....                                    | 20 |
| 1.5.1.1. Encéphalite amibienne granulomateuse (EAG) .....                    | 20 |
| 1.5.1.2. Méningo-encéphalite amibienne primitive (MEAP) .....                | 21 |
| 1.5.2. Atteintes oculaires .....   | 22 |
| 1.5.3. Atteintes cutanées .....  | 23 |
| 1.6. Interaction des amibes libres avec des microorganismes pathogènes ..... | 24 |
| 1.6.1. Interaction avec les champignons .....                                | 24 |
| 1.6.2. Interaction avec les protozoaires .....                               | 25 |
| 1.6.3. Interaction avec des bactéries .....                                  | 25 |
| 1.6.4. Interaction avec les virus .....                                      | 28 |
| 2. Mécanismes de différenciation chez les amibes libres .....                | 30 |
| 2.1. Enkystement .....   | 30 |
| 2.2. Déenkystement .....   | 37 |
| 2.2.1. Induction .....   | 37 |

|  |    |
|--|----|
| 2.2.2. Changements morphologiques et structuraux.....                | 38 |
| 2.2.3. Mécanismes moléculaires .....                                 | 43 |
| 2.3. Bilan.....  | 45 |
| 3. Résistance des amibes libres aux traitements de désinfection..... | 47 |
| 3.1. Traitements physiques .....                                     | 47 |
| 3.1.1. Traitements thermiques.....                                   | 47 |
| 3.1.2. Filtration .....  | 49 |
| 3.1.3. Irradiation.....  | 49 |
| 3.1.3.1. Ultraviolets (UV).....                                      | 49 |
| 3.1.3.2. Rayons gamma .....  | 51 |
| 3.1.3.3. Rayons X .....  | 51 |
| 3.1.3.4. Micro-ondes .....   | 52 |
| 3.1.4. Très basses températures .....                                | 52 |
| 3.1.5. Arcs pulsés électriques .....                                 | 53 |
| 3.2. Traitements chimiques.....                                      | 53 |
| 3.2.1. Halogènes.....  | 53 |
| 3.2.1.1. Chlore et ses composés.....                                 | 53 |
| 3.2.1.3. Brome .....   | 59 |
| 3.2.1.4. Iode et les iodophores.....                                 | 60 |
| 3.2.2. Biocides cationiques.....                                     | 60 |
| 3.2.2.1. Biguanides .....  | 61 |
| 3.2.2.2. Composés d'ammonium quaternaire (QACs).....                 | 65 |
| 3.2.3. Agents oxydants .....   | 65 |
| 3.2.3.1. Ozone (O <sub>3</sub> ) .....                               | 66 |
| 3.2.3.2. Peroxyde d'hydrogène (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) ..... | 66 |
| 3.2.3.3. Dioxyde de chlore (ClO <sub>2</sub> ) .....                 | 68 |
| 3.2.3.4. Acide péracétique (PAA).....                                | 69 |
| 3.2.4. Alcools .....   | 69 |
| 3.2.5. Aldéhydes.....  | 70 |
| 3.2.6. Amidines.....   | 71 |
| 3.2.7. Isothiazolones.....   | 72 |
| 3.2.8. Ionisation cuivre-argent .....                                | 73 |
| 3.3. Bilan.....  | 74 |
| CHAPITRE II : Démarche scientifique et objectifs.....                | 78 |
| CHAPITRE III : Matériel et méthodes.....                             | 82 |

|  |     |
|--|-----|
| 1. Microorganismes.....  | 82  |
| 1.1. Souches amibiennes.....   | 82  |
| 1.1.1. Souches de <i>Vermamoeba vermiformis</i> .....  | 82  |
| 1.1.2. Souches d' <i>Acanthamoeba</i> .....  | 82  |
| 1.2. Souche bactérienne.....   | 83  |
| 1.3. Cryoconservation.....   | 83  |
| 2. Milieux de culture.....   | 84  |
| 2.1. Milieux nutritifs pour la culture des amibes.....   | 84  |
| 2.2. Milieu nutritif pour la culture d' <i>E. coli</i> .....   | 84  |
| 3. Enkystement et déenkystement des amibes.....  | 85  |
| 3.1. Enkystement des amibes.....   | 85  |
| 3.1.1. Enkystement en milieu liquide Neff.....   | 85  |
| 3.1.2. Enkystement sur gélose NNA- <i>E. coli</i> .....  | 85  |
| 3.2. Déenkystement des amibes.....   | 85  |
| 3.3. Dénombrement et mesure du taux d'enkystement.....   | 86  |
| 3.3.1. Dénombrement total des amibes.....  | 86  |
| 3.3.2. Dénombrement des kystes matures.....  | 86  |
| 3.3.3. Mesure du taux d'enkystement.....   | 86  |
| 3.4. Estimation de la viabilité.....   | 87  |
| 4. Traitements des kystes d'amibe.....   | 88  |
| 4.1. Traitements chlorés.....  | 89  |
| 4.2. Traitements thermiques.....   | 89  |
| 4.3. Traitements à l'acide péracétique couplé au peroxyde d'hydrogène.....   | 89  |
| 4.4. Traitements aux protéases.....  | 90  |
| 5. Microscopie photonique et électronique.....   | 91  |
| 5.1. Microscopie photonique.....   | 91  |
| 5.1.1. Microscopie à contraste de phase.....   | 91  |
| 5.1.2. Microscopie confocale.....  | 91  |
| 5.2. Microscopie électronique.....   | 91  |
| 5.2.1. Microscopie électronique à balayage (MEB).....  | 91  |
| 5.2.2. Microscopie électronique à transmission (MET).....  | 93  |
| CHAPITRE IV : Etude morphologique et ultrastructurale des processus d'enkystement et de déenkystement chez <i>V. vermiformis</i> ..... | 98  |
| 1. Choix et mise en place des techniques.....  | 98  |
| 2. Résultats et discussion.....  | 100 |

|   |     |
|---|-----|
| 2.1. Article « Dynamic study of the encystment and excystment of <i>Vermamoeba vermiformis</i> revealed original traits » .....                                 | 100 |
| 2.2. Illustrations complémentaires.....   | 117 |
| CHAPITRE V : Effet des conditions environnementales et de la concentration cellulaire sur l'enkystement de <i>V. vermiformis</i> .....                          | 120 |
| 1. Choix et mise en place des techniques .....  | 120 |
| 1.1. Mesure du taux d'enkystement chez <i>V. vermiformis</i> .....  | 121 |
| 1.1.1. Utilisation de la cytométrie en flux .....   | 121 |
| 1.1.2. Mesure du taux d'enkystement par dénombrement direct .....   | 122 |
| 1.2. Définition des conditions expérimentales pour l'étude de l'effet des conditions environnementales et de la concentration cellulaire sur l'enkystement..... | 123 |
| 2. Résultats et discussion .....  | 126 |
| 2.1. Article « Encystment of <i>Vermamoeba (Hartmannella) vermiformis</i> : effects of environmental conditions and cell concentration » .....                  | 126 |
| 2.2. Résultats complémentaires .....  | 140 |
| CHAPITRE VI : Etude de la résistance des kystes de <i>V. vermiformis</i> aux traitements de désinfection conventionnels et aux protéases .....                  | 144 |
| 1. Choix et mise en place des techniques .....  | 146 |
| 1.1. Définition des conditions expérimentales pour l'ensemble des traitements .....   | 146 |
| 1.2. Définition des conditions expérimentales propres à chaque traitement .....   | 147 |
| 1.2.1. Traitements chlorés.....   | 147 |
| 1.2.2. Traitements thermiques.....  | 148 |
| 1.2.3. Traitements à l'acide péracétique couplé au peroxyde d'hydrogène.....  | 149 |
| 1.2.4. Traitements aux protéases.....   | 151 |
| 2. Résultats et discussion .....  | 152 |
| 2.1. Article « <i>Sensitivity of Vermamoeba vermiformis</i> cysts to conventional disinfectants and protease ».....   | 152 |
| 2.2. Illustrations complémentaires.....   | 167 |
| CHAPITRE VII : Discussion générale.....   | 170 |
| CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....  | 182 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....   | 188 |

# LISTE DES FIGURES

## FIGURES DU MANUSCRIT

|  |     |
|--|-----|
| Figure 1 : Organisation structurale d'un trophozoïte.....  | 8   |
| Figure 2 : Trophozoïtes d'amibes libres. ....  | 9   |
| Figure 3 : Kystes d'amibes libres. ....  | 10  |
| Figure 4 : Kyste de <i>Naegleria fowleri</i> observé par microscopie électronique à balayage. ....   | 10  |
| Figure 5 : Forme flagellée de <i>Naegleria fowleri</i> observée par microscopie électronique à balayage..  | 11  |
| Figure 6 : Mouvement amiboïde. ....  | 12  |
| Figure 7 : Trophozoïte d' <i>A. castellanii</i> phagocytant des levures.....   | 13  |
| Figure 8 : « Bouche » d'un phagosome observée par microscopie électronique à balayage.....   | 13  |
| Figure 9 : « Food cup » observées par microscopie électronique à balayage. ....  | 14  |
| Figure 10 : Section des hémisphères cérébraux d'un patient décédé d'EAG. ....  | 21  |
| Figure 11 : Kystes d' <i>Acanthamoeba</i> dans une biopsie cérébrale d'un patient décédé d'EAG. ....   | 21  |
| Figure 12 : Aspect de l'abcès cornéen en forme d'anneau causé par une kératite amibienne.....  | 23  |
| Figure 13 : Nodules et ulcères cutanés causés par <i>Acanthamoeba</i> spp.. ....   | 23  |
| Figure 14 : Plaque nécrosée causée par <i>Acanthamoeba polyphaga</i> . ....  | 24  |
| Figure 15 : Trophozoïtes et kystes d' <i>Acanthamoeba castellanii</i> infectés par <i>Vibrio cholerae</i> .....  | 27  |
| Figure 16 : Les étapes du désenkystement chez <i>A. castellanii</i> .....  | 39  |
| Figure 17 : Les étapes du désenkystement chez <i>Acanthamoeba</i> observées en microscopie optique. ....   | 40  |
| Figure 18 : Les étapes du désenkystement chez <i>Acanthamoeba</i> spp. observées en microscopie électronique à balayage. ....                          | 41  |
| Figure 19 : Petits granules denses observés lors du désenkystement d' <i>A. castellanii</i> .....  | 42  |
| Figure 20 : Pseudopode et structure endocytiq ue observés dans la région de l'ostiole lors du désenkystement d' <i>A. castellanii</i> .....            | 42  |
| Figure 21 : Contenu macromoléculaires et désenkystement d' <i>A. culbertsoni</i> . ....  | 44  |
| Figure 22 : Mesure du taux d'enkystement. ....   | 87  |
| Figure 23 : Estimation de la viabilité des amibes libres. ....   | 88  |
| Figure 24 : Préparation des échantillons pour l'observation en microscopie électronique à balayage. ....   | 93  |
| Figure 25 : Préparation des échantillons pour l'observation en microscopie électronique à transmission. ....   | 96  |
| Figure 26 : Formation des agrégats de kystes de <i>V. vermiformis</i> (ATCC 50237) en milieu d'enkystement Neff.....                                   | 117 |
| Figure 27 : Formation des agrégats de kystes de <i>V. vermiformis</i> (ATCC 50237) en milieu d'enkystement Neff à faible concentration cellulaire..... | 117 |
| Figure 28 : Kystes d' <i>Acanthamoeba</i> sp. marqués au rouge Congo (A) et au calcofluor blanc (B) .....  | 122 |
| Figure 29 : Protocole d'enkystement de <i>V. vermiformis</i> dans différentes conditions de température, pH et pression osmotique. ....                | 125 |
| Figure 30 : Protocole d'enkystement de <i>V. vermiformis</i> à différentes concentrations cellulaires. ....  | 126 |
| Figure 31 : Kyste (K) et pseudokystes (P) d' <i>Acanthamoeba</i> marqués au rouge Congo .....  | 142 |
| Figure 32 : Protocole de traitement des kystes de <i>V. vermiformis</i> au chlore. ....  | 148 |



|  |     |
|--|-----|
| Figure 33 : Protocole de traitement des kystes de <i>V. vermiformis</i> par chocs thermiques. ....   | 149 |
| Figure 34 : Protocole de traitement des kystes de <i>V. vermiformis</i> à l'acide péracétique couplé au peroxyde d'hydrogène. ....   | 151 |
| Figure 35 : Protocole de traitement des kystes de <i>V. vermiformis</i> à la subtilisine, une protéase. ....   | 152 |
| Figure 36 : Aspect des kystes de <i>Vermamoeba vermiformis</i> en microscopie optique à contraste de phase avant (A) et après traitement (B) à 0,625 U.mL <sup>-1</sup> de subtilisine (protéase)..... | 167 |

### FIGURES DE L'ARTICLE 1 :

#### **Cellular, biochemical, and molecular changes during encystment of free-living amoebae**

Figure 1: Electron microscopy of *Acanthamoeba* sp.

Figure 2: Electron microscopy of *Hartmannella* sp.

Figure 3: Signals, signaling pathways, and responses involved in the encystment of *Acanthamoeba*.

### FIGURES DE L'ARTICLE 2 :

#### **Morphological and ultrastructural study of the encystment and excystment processes in *Vermamoeba (Hartmannella) vermiformis***

Figure 1: Trophozoites forms of *V. vermiformis* in SEM and TEM.

Figure 2: Cyst wall formation.

Figure 3: Autophagy is likely active during encystment.

Figure 4: Mitochondria rearranged around the nucleus.

Figure 5: Glycogen deposits formation.

Figure 6: Mature cysts of *V. vermiformis* and *Acanthamoeba* sp. in SEM and TEM.

Figure 7: Excystment in modified PYNFH medium of *V. vermiformis* 172A in SEM.

Figure 8: Excystment in modified PYNFH medium of *V. vermiformis* 172A in TEM.

### FIGURES DE L'ARTICLE 3 :

#### **Encystment of *Vermamoeba (Hartmannella) vermiformis*: effects of environmental conditions and cell concentration**

Figure 1: Kinetic of *Vermamoeba vermiformis* encystment.

Figure 2: Effect of temperature on the encystment rate of *Vermamoeba vermiformis*.

Figure 3: Microscopic observations of the temperature effect on the encystment of *Vermamoeba vermiformis*.

Figure 4: Effect of pH on the encystment rate of *Vermamoeba vermiformis*.

Figure 5: Effect of osmotic pressure on the encystment rate of *Vermamoeba vermiformis*.

Figure 6: Microscopic observations of the osmotic pressure effect on the encystment of *Vermamoeba vermiformis*.

Figure 7: Effect of cell concentration on the encystment rate of *Vermamoeba vermiformis*.

#### **FIGURES DE L'ARTICLE 4 :**

#### **Sensitivity of *Vermamoeba (Hartmannella) vermiformis* cysts to conventional disinfectants and protease**

Table 1: Disinfection procedures recommended by French regulation (DGS/SD7A/DHOS/EA n°2002/243, 2002-04-22) in hot water networks.

Figure 1: Amoebicidal activity of chlorine at different concentrations and exposure times on *Vermamoeba vermiformis* cysts.

Figure 2: Amoebicidal activity of temperature at different temperatures and exposure times on *Vermamoeba vermiformis* cysts.

Figure 3: Amoebicidal activity of peracetic acid mixed with hydrogen peroxide at different concentrations and exposure times on *Vermamoeba vermiformis* cysts.

Figure 4: Amoebicidal activity of subtilisin (protease) at different concentrations on *Vermamoeba vermiformis* cysts.



# LISTE DES TABLEAUX

|  |     |
|--|-----|
| Tableau 1 : Récapitulatif de l'historique des amibes libres.....                                 | 3   |
| Tableau 2 : Classification des principaux genres d'amibes libres (Adl <i>et al.</i> , 2012)..... | 7   |
| Tableau 3 : Nombre estimé d'EAG dans le monde.....   | 20  |
| Tableau 4 : Résumé du comportement des amibes libres vis-à-vis des traitements chlorés. ....     | 58  |
| Tableau 5 : Tableau de synthèse des souches amibiennes et milieux de culture.....                | 83  |
| Tableau 6 : Ensemble des traitements autorisés en France pour désinfecter les RECS. ....         | 145 |



## LISTE DES ABREVIATIONS

Acetyl-CoA : Acétyl coenzyme A - *Acetyl coenzyme A*

ADN/DNA : Acide désoxyribonucléique - *Deoxiribonucleic acid*

ADP : Adénosine diphosphate - *Adenosine diphosphate*

Ag<sup>+</sup> : Ion argent - *Silver ion*

AMPc/cAMP : Adénosine monophosphate cyclique - *Cyclic adenosine monophosphate*

APE : Agence de protection de l'environnement

ARN/RNA : Acide ribonucléique - *Ribonucleic acid*

ARNm/mRNA : ARN messenger - *Messenger RNA*

ATCC : *American type culture collection*

ATP : Adénosine triphosphate - *Adenosine triphosphate*

BIT : Benzisothiazolone – *Benzisothiazolone*

CAS : *Chemical Abstracts Service*

CCAP : *Culture collection of algae and protozoa*

CHG : Chlorhexidine - *Chlorhexidine*

Cl<sub>2</sub> : Dichlore - *Chlorine*

ClO<sub>2</sub> : Dioxyde de chlore - *Chlorine dioxide*

CMIT : 5-chloro-*N*-methyl-isothiazolone - *5-chloro-N-methyl-isothiazolone*

CO<sub>2</sub> : Dioxyde de carbone - *Carbon dioxide*

CSP21 : *Cyst-specific protein of 21 KDa*

Cu<sup>2+</sup> : Ion cuivrique ou ion cuivre II - *Copper II ion*

DMSO : Diméthylsulfoxyde - *Dimethyl sulfoxide*

EAG : Encéphalite amibienne granulomateuse - *Encephalitis amibien granulomatous*

EDTA : Acide éthylène diamine tétraacétique - *Ethylene diaminetetraacetic acid*

EEA : *Encystment-enhancing activity*

EPA : *Environmental Protection Agency*

ERK : *Extracellular signal-regulated kinases*

FLA : Amibes libres - *Free-living amoebae*

FPT : Protéine farnésyl transférase - *Farnesyl protein transferase*

GTP : Guanosine triphosphate - *Guanosine triphosphate*

GTPase : Enzymes qui lient et hydrolysent la GTP

H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> : Acide carbonique - *Carbonic acid*

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : Peroxyde d'hydrogène - *Hydrogen peroxide*

HOCl : Acide hypochloreux - *Hypochlorous acid*

InVS : Institut de veille sanitaire

LB : Luria Bertani

Log<sub>10</sub> : Logarithme décimal - *Decimal logarithm*

MAPK : *Mitogen-activated protein kinase*

MEAP/PAE or PAME : Méningo-encéphalite amibienne primitive - *Primary amoebic meningoencephalitis*

MEB/SEM : Microscopie électronique à balayage - *Scanning electron microscopy*

MET/TEM : Microscopie électronique à transmission - *Transmission electron microscopy*

NaClO : Hypochlorite de sodium - *Sodium hypochlorite*

NH<sub>2</sub>Cl : Monochloramine - *Monochloramine*

NNA : *Non Nutrient Agar*

NPP/MNP : Nombre le plus probable - *Most probable number*

O<sub>3</sub> : Ozone - *Ozone*

OPA : Orthophtalaldéhyde - *Ortho-phtalaldehyde*

PAA : Acide péracétique - *Peracetic acid*

PAPB : Polyaminopropyl biguanide - *Polyaminopropyl biguanide*

pCO<sub>2</sub> : Pression partielle en dioxyde de chlore - *Partial pressuse of chlorine dioxide*

PCR : *Polymerase chain reaction*

pH : Potentiel hydrogène - *Potential of hydrogen*

PHMB : Polyhexaméthylène biguanide - *Polyhexamethylene biguanide*

PI3K : *Phosphatidylinositide 3-kinase*

PMSF : Phénylméthylsulfonyl fluoride - *Phenylmethanesulfonyl fluoride*

PYG : *Peptone-Yeast extract-Glucose*

PYNFH : *Peptone - Yeast - Nucleic acid - Folic acid - Hemin*

QAC : Composé d'ammonium quaternaire - *Quaternary ammonium compound*

RECS : Réseau d'eau chaude sanitaire

RTK : *Receptor tyrosine kinase*

SDS : dodécylsulfate de sodium - *Sodium dodecyl sulfate*

SIDA/AIDS : Syndrome d'immunodéficience acquise - *Acquired immunodeficiency syndrome*

siRNA : *Small interfering ribonucleic acid*

SODIS : Désinfection solaire - *Solar disinfection*

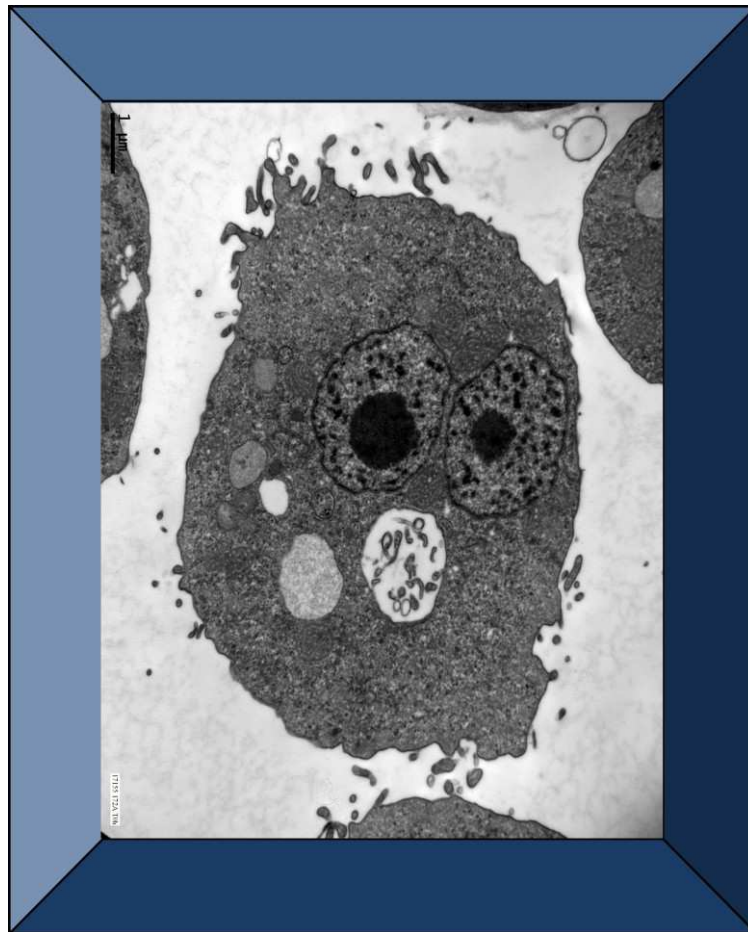
TAR : Tour aérorefrigérante

UV : Ultraviolet – *Ultraviolet*





# CHAPITRE I : Synthèse bibliographique



## CHAPITRE I : Synthèse bibliographique

### 1. Amibes libres : généralités

Les amibes sont des eucaryotes unicellulaires hétérotrophes qui appartiennent à l'ancien embranchement taxonomique des protozoaires. Elles se répartissent de façon ubiquitaire dans l'environnement. Il existe deux grands types d'amibes : les amibes nues et les amibes testacées ou thécamibiens qui sont entourées d'une coquille siliceuse appelée test ou thèque. Chez les amibes, en fonction de leur mode de vie, deux groupes se distinguent : les amibes parasites et les amibes libres.

Les amibes parasites sont en permanence à la recherche d'un hôte. Elles survivent dans l'environnement mais sont généralement incapables de s'y développer. Elles sont le plus fréquemment retrouvées dans le tube digestif de certains animaux et de l'Homme. Chez l'Homme, il existe huit espèces d'amibes parasitaires ; il s'agit d'*Entamoeba histolytica* (Schaudinn, 1903), *Entamoeba dispar* (Brumpt, 1925), *Entamoeba hartmanni* (von Prowazek, 1912), *Entamoeba coli* (Grassi, 1879), *Entamoeba gingivalis* (Gros, 1849), *Endolimax nana* (Wenyon et O'Connor, 1917), *Iodamoeba buetschlii* (von Prowazek, 1912) et *Dientamoeba fragilis* (Jepps et Dobell, 1918). Parmi ces huit espèces, seule *Entamoeba histolytica* est pathogène pour l'Homme. Elle est responsable d'une maladie infectieuse du côlon appelée dysenterie amibienne, amibiase, amoébose ou bien encore colite amibienne. Sa prévalence est élevée dans les zones tropicales et subtropicales, liée aux mauvaises conditions d'hygiène. Cinquante millions de cas cliniques et près de 100 000 décès par an sont recensés (Site Institut Pasteur : [www.pasteur.fr/](http://www.pasteur.fr/)).

Les amibes libres, contrairement aux amibes parasites, sont capables de se développer de façon autonome dans l'environnement. Elles se retrouvent dans des milieux aqueux et riches en matière organique (lacs, rivières, sols humides, compost...). Elles sont classées dans différents genres, les plus fréquemment rencontrés étant *Hartmannella*, *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Balamuthia* et *Vahlkampfia*. Certaines amibes libres sont capables d'amphizoïdie c'est-à-dire d'avoir, en plus de leur cycle externe, un cycle parasite. Elles causent différentes pathologies (cérébrales, oculaires, cutanés) rares mais souvent graves.

Dans cette synthèse bibliographique nous nous intéresserons uniquement aux genres d'amibes libres les plus fréquemment décrits dans la littérature, à savoir : *Hartmannella*, *Acanthamoeba*, *Naegleria* et *Balamuthia*.

### 1.1. Historique

Le tableau 1 résume de façon chronologique les principaux faits historiques concernant les amibes libres.

Tableau 1 : Récapitulatif de l'historique des amibes libres.

| Découverte   | Type d'amibe | Date de la découverte | Pathogénicité                                  | Références                       |
|--|--------------|-----------------------|--|----------------------------------|
| Découverte des amibes  |              | 1753                  |  | Baker, 1753                      |
| Première description   |              | 1757                  |  | Rösel von Rosenhoff, 1757        |
| Création du terme « amibe »  |              | 1822                  |  | Bory de Saint Vincent, 1822      |
| Première classification des amibes   |              | 1841                  |  | Dujardin, 1841                   |
| Première description d'une amibe libre   | Libre        | 1899                  |  | Schardinger, 1899                |
| Création du genre <i>Naegleria</i>   | Libre        | 1912                  |  | Alexeieff, 1912                  |
| Création du genre <i>Hartmannella</i>  | Libre        | 1912                  |  | Alexeieff, 1912                  |
| Création du genre <i>Vahlkampfia</i>   | Libre        | 1912                  |  | Chatton et Lalung-Bonnaire, 1912 |
| Création du genre <i>Acanthamoeba</i>  | Libre        | 1930                  |  | Castellani, 1930                 |
| Découverte des parasites et symbiontes des amibes libres   | Libre        | 1956                  |  | Drozanski, 1956                  |
| Découverte de la pathogénicité d'une <i>Naegleria</i> et création de l'espèce <i>Naegleria fowleri</i> | Libre        | 1968                  | Méningo-encéphalite amibienne primitive (MEAP) | Butt, 1968                       |
| Découverte de la pathogénicité des <i>Acanthamoeba</i> spp.  | Libre        | 1975                  | Kératite                                       | Jones <i>et al.</i> , 1975       |
|  |              | 1978                  | Encéphalite granulomateuse amibienne (EAG)     | Willaert <i>et al.</i> , 1978    |
| Découverte de l'espèce <i>Balamuthia mandrillaris</i>  | Libre        | 1986                  | EAG  | Visvesvara <i>et al.</i> , 1990  |
| Première évocation du rôle de réservoir des amibes libres vis-à-vis de certaines bactéries pathogènes  | Libre        | 1978                  | Rôle de réservoir de bactéries pathogènes      | Krishna-Prasad et Gupta, 1978    |

La découverte des amibes remonte au XVIII<sup>e</sup> siècle. En 1753, Henry Baker, un naturaliste anglais, les a observées pour la première fois au microscope (Baker, 1753). Fasciné par leur transformisme, il les baptisa alors *Proteus* en référence au dieu grec qui avait la capacité de changer d'apparence. Les premières descriptions et illustrations ont été faites quelques années plus tard, en 1757, par August Johann Rösel von Rosenhof, un naturaliste et illustrateur allemand (Rösel von Rosenhoff, 1757). Le terme « amibe » est apparu plus tard. Il a été donné en 1822, par un naturaliste et géographe français, Jean-Baptiste Bory de Saint-Vincent, en référence au grec *amoibê* signifiant changement (Bory de Saint-Vincent *et al.*, 1822). La première classification des amibes a été faite en 1841 par Felix Dujardin. Il créa la famille des amibiens qu'il classa dans l'ordre II des infusoires (Dujardin, 1841).

La première description d'une amibe libre a été faite en 1899 par Schardinger. Il découvrit des amibes ayant la capacité de se différencier en une forme flagellée, il les nomma *Amoeba gruberi* (Schardinger, 1899). Ce n'est qu'en 1912 que le genre *Naegleria*, regroupant les amibes présentant un stade flagellé, a été suggéré par Alexeieff. Dans le même ouvrage, il proposa la création du genre *Hartmannella* (Alexeieff, 1912a et b). Le genre *Vahlkampfia* a été décrit la même année par Chatton et Lalung-Bonnaire (Chatton et Lalung-Bonnaire, 1912). Le genre *Acanthamoeba* a été décrit en 1930 par Castellani (Castellani, 1930a, b, c, d) et en 1931 par Volkonsky (Volkonsky, 1931).

Il faudra attendre plus d'une trentaine d'années pour que le pouvoir pathogène des amibes libres à l'encontre de l'Homme soit évoqué. C'est en 1965 que Fowler et Carter ont retrouvé pour la première fois des amibes dans le cerveau de personnes décédées de méningo-encéphalite. Ils pensaient alors qu'il s'agissait d'amibes du genre *Acanthamoeba* (Fowler et Carter, 1965). L'année suivante Butt fit la même observation, il décrivit alors la maladie et la nomma méningo-encéphalite amibienne primitive (MEAP) (Butt, 1966). Ce n'est que deux ans plus tard qu'il isola l'agent étiologique de la MEAP. Il ne s'agissait pas d'amibes du genre *Acanthamoeba*, mais d'une espèce appartenant au genre *Naegleria* qu'il dénomma alors *Naegleria fowleri* en l'honneur du Dr Fowler (Butt, 1968). En 1972, un autre cas de méningo-encéphalite amibienne a d'abord été attribué à une amibe du genre *Hartmannella*, mais une étude rétrospective a montré que l'amibe responsable était *A. culberstoni* (Willaert *et al.*, 1978). Afin de distinguer les infections encéphaliques dues aux

*Acanthamoeba* de celles causées par *N. fowleri*, le nom d'encéphalite granulomateuse amibienne (EGA) a été donné. En 1975, Jones *et al.* ont découvert que les amibes du genre *Acanthamoeba* peuvent également générer des kératites (Jones *et al.*, 1975). L'espèce *Balamuthia mandrillaris*, seule représentante du genre *Balamuthia*, dont la pathogénicité est similaire à celle des *Acanthamoeba* a été découverte en 1986 par Visvesvara *et al.*. Elle était alors dénommée *Leptomyxid ameba* (Visvevara *et al.*, 1990). Il fallut attendre 1993 pour que Visvesvara *et al.* créent l'espèce *Balamuthia mandrillaris* (Visvesvara *et al.*, 1993).

La découverte des parasites et des symbiotes des amibes libres remonte à 1956 où Drozanski décrivit pour la première fois la présence de bactéries intracellulaires capables de lyser les amibes (Drozanski, 1956). En 1975, Proca-Ciobanu *et al.* ont observé par microscopie électronique des souches d'*Acanthamoeba castellanii* et ont découvert dans ces amibes la présence de bactéries endosymbiotiques (Proca-Ciobanu *et al.*, 1975). Ce n'est que trois ans plus tard que fut évoqué pour la première fois le rôle de réservoir des amibes libres vis-à-vis de certaines bactéries pathogènes (Krishna-Prasad et Gupta, 1978). Suite à ces découvertes de nombreux microbiologistes se sont intéressés à l'étude des interactions entre les amibes libres et les microorganismes. Depuis, de nombreuses bactéries, champignons ou virus sont très souvent décrits comme étant capables de s'associer aux amibes libres dans l'environnement. Ces microorganismes sont généralement appelés microorganismes résistants aux amibes libres ou bien microorganismes résistants à la phagocytose amibienne (Greub et Raoult, 2004 ; Thomas *et al.*, 2010).

## 1.2. Classification

Les premières classifications des amibes libres se basaient uniquement sur la morphologie des cellules observées en microscopie optique (Schaeffer, 1926). Plus tard, d'autres classifications prirent également en compte la division nucléaire pour différencier les amibes (Chatton, 1953 ; Singh, 1952), mais ce critère de différenciation ne s'est avéré que peu concluant. D'autres classifications plus récentes ont également pris en compte le mode de locomotion et le mouvement du cytoplasme pour distinguer les amibes (Jahn et Bovee, 1965 ; Jahn *et al.*, 1974), mais ce critère était très limitant pour la distinction des espèces. Puis, dans les années 80, le développement de la microscopie électronique a permis de mettre en évidence des ultrastructures et des particularités dans les cycles de vie des

amibes, ce qui a engendré la description d'amibes nouvelles ou déjà connues. En 1987, Page proposa une nouvelle classification en se basant sur des caractéristiques ultrastructurales, biologiques et physiologiques. Depuis, cette classification est régulièrement révisée grâce au développement des outils de biologie moléculaire. En 2005, Adl *et al.* ont publié une classification des eucaryotes avec une hiérarchie simplifiée pour chaque rang sans titre formel. Ceci a permis de s'affranchir des anciens systèmes hiérarchiques qui étaient très contraignants. Cette classification a été révisée en 2012 (Adl *et al.*, 2012), l'emplacement des genres *Hartmannella*, *Acanthamoeba*, *Naegleria* et *Balamuthia* est présenté dans le tableau 2. Il est important de souligner qu'avant 2011 le genre *Hartmannella* regroupait plusieurs espèces, comme : *H. cantabrigiensis*, *H. hyalina*, *H. lobifera*... et que l'espèce la plus fréquemment rencontrée dans l'environnement est *Hartmannella vermiformis*. Cependant *H. vermiformis* n'est pas étroitement liée aux autres espèces du genre *Hartmannella*, par exemple, lors d'un changement de direction elle a la capacité de produire temporairement deux ou plusieurs pseudopodes. C'est pourquoi, en 2011, elle a été reclassée dans un nouveau genre appelé *Vermamoeba* dont l'espèce *vermiformis* est l'unique représentante (Smirnov *et al.*, 2011). Dans la suite du manuscrit cette nouvelle classification sera utilisée, l'espèce anciennement appelée *Hartmannella vermiformis* sera donc dénommée *Vermamoeba vermiformis*.

Tableau 2 : Classification des principaux genres d'amibes libres (Adl *et al.*, 2012).

|           |          |   |   |
|-----------|----------|---|---|
| Eukaryota | Amorphea | Amoebozoa   | <ul style="list-style-type: none"> <li>•Tubulinea                             <ul style="list-style-type: none"> <li>••Euamoebida                                     <p style="margin-left: 40px;">Genre : <i>Hartmannella</i></p> <p style="margin-left: 40px;">Espèces : <i>abertawensis, agricola, cantabrigiensis, crumpae, hibernica, hyalina, lobifera, vacuolata...</i></p> </li> <li>••Arcellinida                                     <ul style="list-style-type: none"> <li>•••Echinamoebida   <p style="margin-left: 40px;">Genre : <i>Vermamoeba</i></p> <p style="margin-left: 40px;">Espèce : <i>vermiformis</i></p> </li> </ul> </li> </ul> </li> </ul> |
|           |          | Discosea  | <ul style="list-style-type: none"> <li>••Longamoebia                             <ul style="list-style-type: none"> <li>•••Centramoebida                                     <p style="margin-left: 40px;">Genre : <i>Acanthamoeba</i></p> <p style="margin-left: 40px;">Espèces : <i>astronyxis, castellanii, culbertsoni, hatchetti, lenticula, palestinensis, polyphaga, rhyodes...</i></p> <p style="margin-left: 40px;">Genre : <i>Balamuthia</i></p> <p style="margin-left: 40px;">Espèce : <i>mandrillaris</i></p> </li> </ul> </li> </ul>   |
|           | Excavata | <ul style="list-style-type: none"> <li>•Discoba                             <ul style="list-style-type: none"> <li>••Discicristata                                     <ul style="list-style-type: none"> <li>•••Heterolobosea   <ul style="list-style-type: none"> <li>••••Tetramitina   <p style="margin-left: 40px;">Genre : <i>Naegleria</i></p> <p style="margin-left: 40px;">Espèces : <i>andersoni, australiensis, clarki, fowleri, gruberi, indonesiensis, jadini, lovaniensis...</i></p> </li> </ul> </li> </ul> </li> </ul> </li> </ul> |   |

### 1.3. Biologie

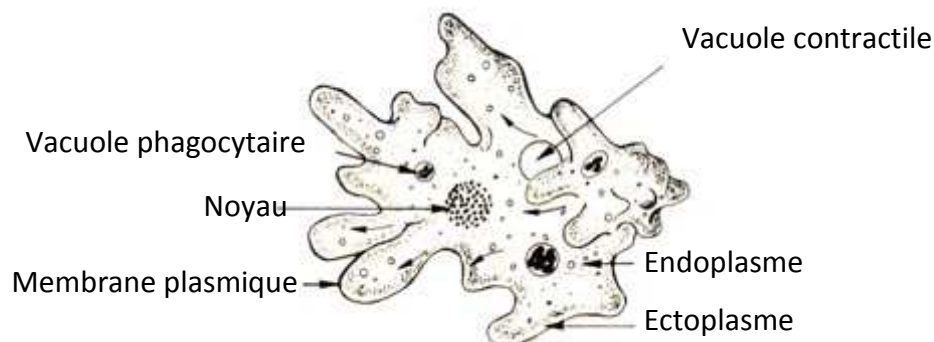
#### 1.3.1. Morphologie

Les amibes appartenant aux genres, *Hartmannella*, *Vermamoeba*, *Acanthamoeba* et *Balamuthia* possèdent deux stades de développement : une forme végétative appelée trophozoïte et une forme de résistance dénommée kyste. Les amibes du genre *Naegleria* possèdent un stade transitoire supplémentaire qui est une forme flagellée.



## 1.3.1.1. Forme trophozoïte

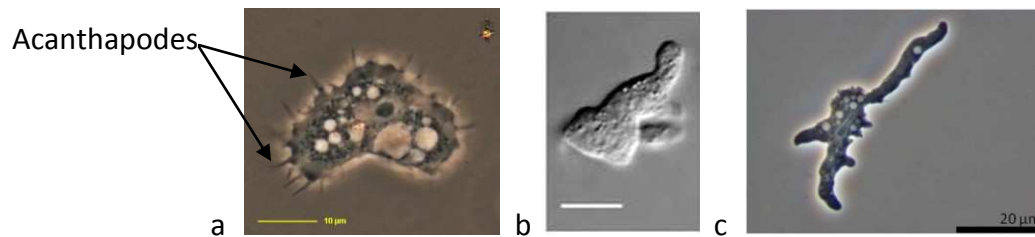
La forme végétative ou trophozoïte est la forme biologiquement active. Sous cette forme les amibes libres sont capables de se déplacer, de se nourrir et de se diviser. Les trophozoïtes ont une taille comprise entre 7 et 45  $\mu\text{m}$  en fonction des genres et des espèces. L'organisation structurale du trophozoïte est caractéristique des cellules eucaryotes. Il est composé d'un noyau avec un large nucléole central, d'un appareil de Golgi, d'un réticulum endoplasmique rugueux et lisse, de mitochondries, de ribosomes, de microtubules et de différents types de vacuoles (sécrétoires, contractiles et phagocytaires) (Figure 1). Le cytoplasme se compose de deux parties : l'ectoplasme et l'endoplasme. L'ectoplasme est la partie externe du cytoplasme, hyalin, homogène et visqueux c'est la partie non fluide du cytoplasme. Il contient essentiellement les filaments d'actine et joue donc un rôle important dans les phénomènes de cyclose (mouvement du cytoplasme) cellulaire. L'endoplasme est la partie centrale du cytoplasme, granuleux et vacuolaire c'est la partie fluide du cytoplasme. Il contient le noyau, les organites, des inclusions diverses et les filaments de myosine, il joue également un rôle important dans les phénomènes de cyclose cellulaire (Figure 1).



**Figure 1 :** Organisation structurale d'un trophozoïte.

(Source : Pearson Scott Foresman, <http://en.wikipedia.org/wiki/Amoeba>, en ligne le 16/08/13)

La structure de la membrane plasmique des amibes libres a été peu étudiée. Cette membrane est trilamellaire, sa nature et sa composition diffère en fonction des genres et des espèces. Par exemple, chez les *Acanthamoeba* spp., la membrane plasmique est recouverte de petites projections caractéristiques appelées acanthopodes (Figure 2a) (Marciano-Cabral et Cabral, 2003). Les autres genres comme *Naegleria* (Figure 2b) et *Vermamoeba* (Figure 2c) en sont dépourvus.



**Figure 2 :** Trophozoïtes d'amibes libres.

a : *Acanthamoeba* spp. (Barre : 10 µm), b : *Naegleria* spp. (Barre : 10 µm), c : *V. vermiformis* (Barre : 20 µm).

Sources : a : <http://starcentral.mbl.edu/microscope/portal.php?pagetitle=assetfactsheet&imageid=1> (En ligne le 16/08/13)

b : <http://altered-states.net/barry/newsletter387/index.htm> (En ligne le 16/08/13)

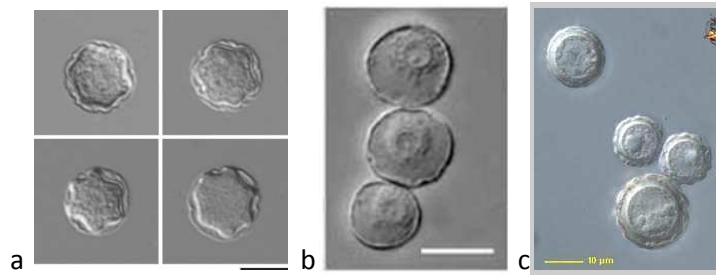
c : photo personnelle

### 1.3.1.2. Forme kystique

Le kyste est une forme de résistance qui présente une activité métabolique réduite. La forme kystique apparaît lorsque les conditions du milieu deviennent défavorables pour l'amibe. Le passage de la forme trophozoïte à la forme kystique est appelé enkystement (Krishna Murti et Shukla, 1984 ; Weisman, 1976). L'enkystement peut être déclenché par différents signaux tels que la déplétion nutritive, un stress osmotique, une faible pression partielle en oxygène, un pH fortement basique ou acide, ou bien encore des températures extrêmes (Byers, 1979 ; Cordingley *et al.*, 1996 ; Neff *et al.*, 1964 ; Raizada et Murti, 1971). Quand les conditions environnementales redeviennent favorables, l'amibe repasse sous la forme trophozoïte par un processus nommé désenkystement.

Les kystes ont une taille comprise entre 6 et 25 µm en fonction des genres et des espèces. Ils sont sphériques et sont entourés d'une paroi qui peut être simple, double ou triple couche en fonction du genre et de l'espèce considérée. La structure de la paroi kystique est bien décrite chez les *Acanthamoeba*, mais reste peu étudiée chez les autres genres amibiens. Chez les *Acanthamoeba* la paroi du kyste est double couche, la couche externe est appelée ectokyste et la couche interne est dénommée endokyste (Bowers et Korn, 1969). Les kystes de *Balamuthia mandrillaris* possèdent une couche intermédiaire appelée mésokyste (Visvesvara *et al.*, 1993). La paroi des kystes de *Naegleria* possèdent une à deux couches selon les auteurs (Chavez-Munguia *et al.*, 2009). Chez l'espèce *Vermamoeba vermiformis* la paroi est double couche, l'endokyste et l'ectokyste peuvent être accolées ou séparées (Dykova *et al.*, 2005 ; Page, 1986 ; Smirnov et Michel, 1999). L'aspect des kystes

varie en fonction des genres et des espèces (Figure 3). Par exemple, les kystes d'*Acanthamoeba castellanii* présentent une forme polygonale étoilée (Figure 3a).



**Figure 3 :** Kystes d'amibes libres.

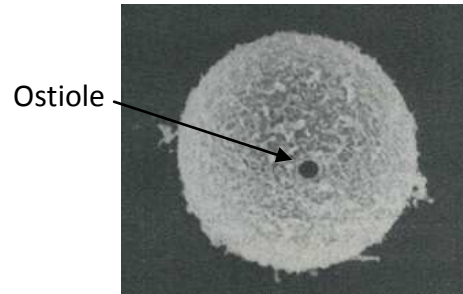
a : *Acanthamoeba* spp. (Barre : 10 µm), b : *Naegleria* spp. (Barre : 10 µm), c : *Balamuthia mandrillaris* (Barre : 10µm).

Sources : a : <http://synapse.koreamed.org/DOLx.php?id=10.3347/kjp.2006.44.4.313&vmode=FULL> (En ligne le 16/08/13)

b : <http://altered-states.net/barry/newsletter387/index.htm> (En ligne le 16/08/13)

c : [www.starcentral.mdu.edu](http://www.starcentral.mdu.edu) (En ligne le 25/10/11)

Chez certains genres, les kystes présentent des pores, appelés ostioles (Figure 4), qui permettent l'émergence du trophozoïte à l'extérieur du kyste lors du processus de désenkystement.

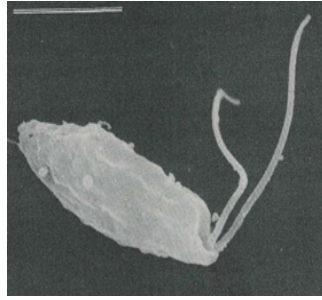


**Figure 4 :** Kyste de *Naegleria fowleri* observé par microscopie électronique à balayage.

(Source : Courtesy of Markell and Voge's *Medical Parasitology*)

### 1.3.1.3. Forme flagellée

Les amibes libres du genre *Naegleria* ont un stade de développement intermédiaire qui correspond à une forme flagellée. Cette forme est induite par des changements de concentrations ioniques (salinité...) dans le milieu (Parija et Jayakeerthee, 1999). La taille de la forme flagellée est comprise entre 7 et 18 µm. Elle possède deux flagelles polaires (Figure 5).

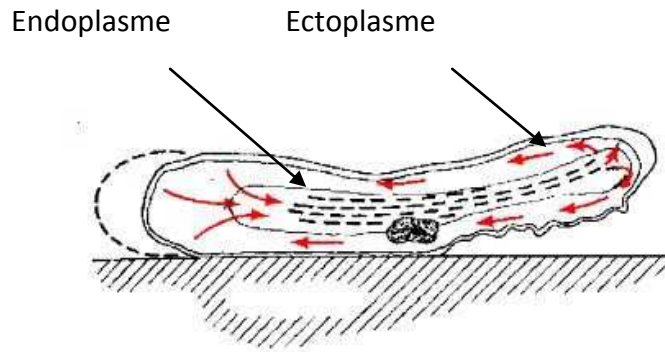


**Figure 5 :** Forme flagellée de *Naegleria fowleri* observée par microscopie électronique à balayage.

(Source : Courtesy of Markell and Voge's *Medical Parasitology*)

### 1.3.2. Locomotion

A l'exception de la forme flagellée des *Naegleria*, les amibes libres ont besoin, pour se mouvoir, d'adhérer à un substrat. Elles peuvent, alors, se déplacer grâce à une déformation de la membrane plasmique, causée par des interactions de type actine-myosine, appelées pseudopodes. Selon les genres, elles se déplacent avec un pseudopode principal (*Hartmannella* spp.) ou plusieurs pseudopodes (*Acanthamoeba* spp.). Les pseudopodes produisent un mouvement lent, caractéristique des amibes, appelé mouvement amiboïde. Ce mouvement est rendu possible grâce à la présence de deux types de cytoplasme, l'ectoplasme et l'endoplasme (cf. 1.3.1.1. Forme trophozoïque). Le mouvement se fait par un courant endoplasmique qui va des pseudopodes en rétractation, avec dépolymérisation de l'actine vers les pseudopodes en extension, avec une gélification par polymérisation de l'actine (Puytorac *et al.*, 1987). En résumé, l'ectoplasme agit à la manière d'un tube d'où jaillit l'endoplasme vers l'extrémité du pseudopode en formation. L'endoplasme, une fois à la périphérie de l'amibe, va se gélifier alors que l'endoplasme, dans la partie postérieure de l'amibe, reprend l'état fluide et devient de l'endoplasme, ce qui permet d'alimenter le mouvement (Figure 6).



**Figure 6 : Mouvement amiboïde.**

(Source : <http://www.er.uqam.ca/nobel/r17220/sarcomastigophora.htm> en ligne le 25/10/11)

Les déplacements des trophozoïtes ne sont pas aléatoires, ils sont influencés par des phénomènes de chimiotactisme. Par exemple, Schuster et Levandowsky ont démontré que les trophozoïtes d'*A. castellanii* sont attirés par différents produits bactériens tels que des peptides, le lipide A ou bien encore les lipopolysaccharides. Ceci suggère que les amibes libres possèdent à leur surface des récepteurs spécifiques à ces produits bactériens (Schuster et Levandowsky, 1996).

Les *Naegleria* peuvent également se déplacer sans adhérer à un substrat lorsqu'elles sont sous la forme flagellée. Sous cette forme, elles nagent grâce à la présence de deux flagelles qui correspondent à un faisceau de microtubules entouré d'une membrane cytoplasmique. Les flagelles sont animés d'un mouvement d'oscillations périodiques qui est entraîné par un moteur moléculaire rotatif qui consomme de l'ATP.

### 1.3.3. Nutrition

Les amibes libres utilisent deux modes de nutrition : la phagocytose et la pinocytose. La phagocytose correspond à la capture et à l'ingestion de particules solides inertes ou vivantes tandis que la pinocytose est l'absorption de gouttelettes de liquide extracellulaire.

Dans l'environnement, leur principal mode de nutrition est la phagocytose de bactéries, de micro-algues, de champignons et de levures. La phagocytose se fait par l'extension de pseudopodes qui entourent la particule à ingérer (Figure 7) et qui permettent la formation d'une vacuole appelée phagosome (Figure 8). Cette étape est rapide ; selon

Bowers elle durerait environ 40 s (Bowers, 1977). Le phagosome va ensuite subir une maturation puis fusionne avec un lysosome qui contient les enzymes digestives.

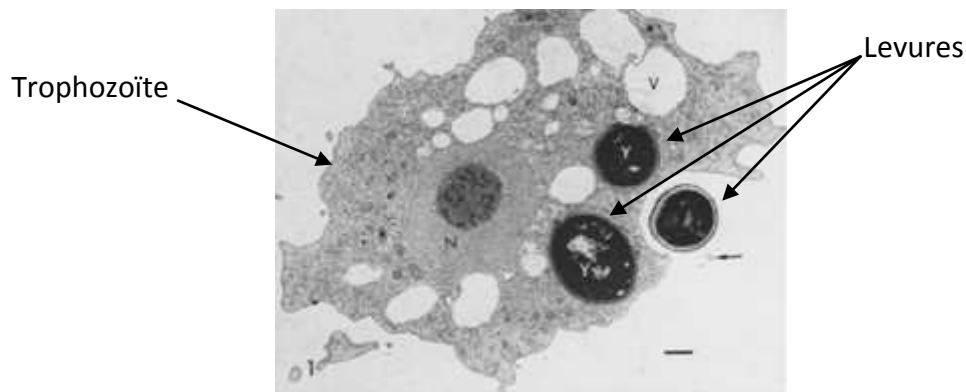


Figure 7 : Trophozoïte d'*A. castellanii* phagocytant des levures.

Deux levures sont phagocytées, la troisième est en cours d'inclusion par un pseudopode

(Barre : 1  $\mu$ m).

(Source : Bowers, 1977)

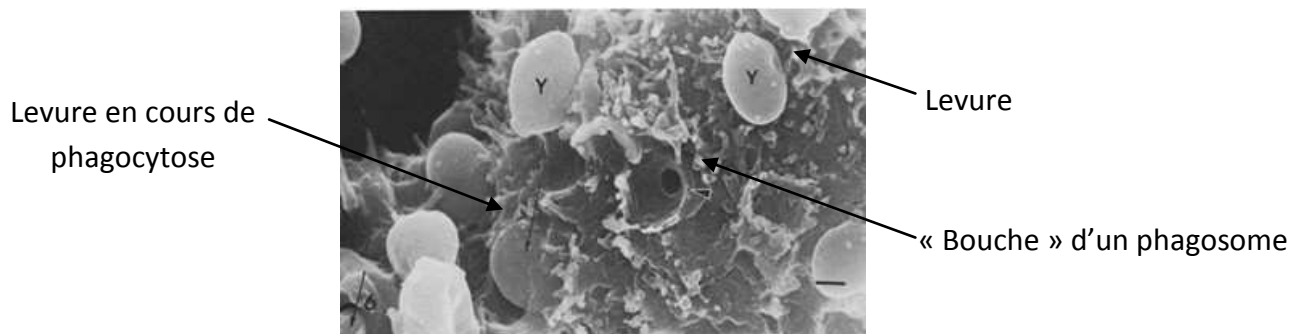


Figure 8 : « Bouche » d'un phagosome observée par microscopie électronique à balayage

(Barre : 1  $\mu$ m). (Source : Bowers, 1977)

Il a également été décrit, par certains auteurs, la formation de « Food cup » à la surface des trophozoïtes (Figure 9). Les « Food cup » sont des structures temporaires qui permettent la capture de bactéries, de levures ou de débris cellulaires (Marciano-Cabral et Cabral, 2003).

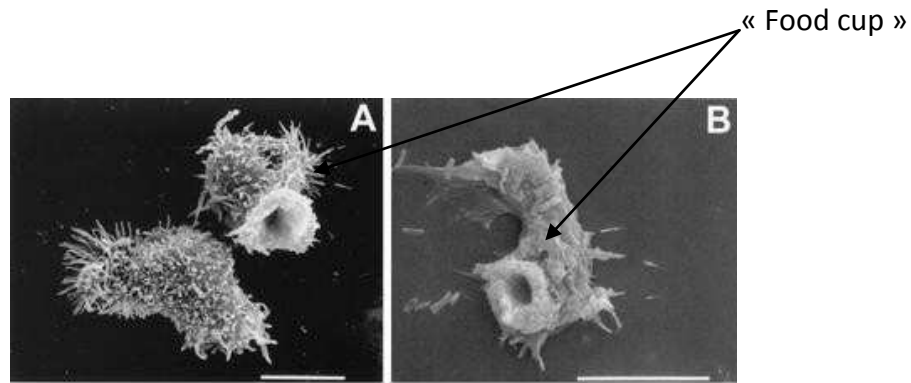


Figure 9 : « Food cup » observées par microscopie électronique à balayage.  
 A : trophozoïte d'*A. culbertsoni*, B : trophozoïte d'*A. astronyxis* (Barre : 10  $\mu$ m).  
 (Source : Marciano-Cabral et Cabral, 2003)

La pinocytose permet aux amibes libres d'internaliser, par invagination de la membrane plasmique, des liquides organiques ou des éléments nutritifs dissous (Bowers, 1977). C'est pourquoi, il est possible de cultiver certaines amibes libres dans un milieu nutritif axénique, c'est-à-dire en absence de microorganismes.

#### 1.3.4. Reproduction

Les amibes libres se reproduisent lorsqu'elles sont sous la forme trophozoïte et que les conditions de croissance sont optimales. Le temps de génération varie entre 8 et 24 h en fonction des genres, des espèces et des souches. Elles se reproduisent, comme d'autres organismes eucaryotes unicellulaires, de façon asexuée par division binaire donnant lieu à deux amibes filles génétiquement identiques (Byers, 1979). La division binaire est composée de trois grandes étapes : (i) l'interphase qui correspond à la réplication de l'ADN, (ii) la mitose qui est la division des chromosomes et (iii) la cytodierèse qui correspond à la division du cytoplasme.

#### **1.4. Distribution dans l'environnement**

Les amibes libres sont réparties de façon ubiquitaire dans l'environnement. Elles sont retrouvées aussi bien dans les milieux naturels qu'artificiels. Cette omniprésence dans l'environnement est facilitée par la forme kystique qui est résistante aux procédures de désinfection et à la dessiccation. La concentration en amibe libres dans ces différents milieux dépend de facteurs tels que l'hygrométrie, la température, le pH, la teneur en oxygène

dissous, la porosité, la salinité et la densité en microorganismes qui constituent leur alimentation.

#### 1.4.1. Environnements naturels

Les amibes libres sont retrouvées dans les sols, les milieux aqueux (lacs, rivières, canaux, mers), les poussières et l'air, mais également sur les plantes et certains animaux (amphibiens, poissons, reptiles et mammifères) (Dykova *et al.*, 1999 ; Marciano-Cabral et Cabral, 2003 ; Rivera *et al.*, 1987 ; Rodriguez-Zaragoza, 1994).

Les sols sont des systèmes biologiques dynamiques dans lesquels ce fait le recyclage de la matière organique. Les activités biologiques ont une influence sur la porosité et la concentration en oxygène. Les sols, dont la porosité est comprise entre 2 et 10  $\mu\text{m}$ , retiennent l'eau par capillarité ce qui forme un environnement favorable pour les amibes libres (Rodriguez-Zaragoza, 1994). Grâce à leur rôle de prédateur, les amibes libres participent à la régulation de la population microbienne, au maintien d'un haut niveau de minéralisation et au recyclage des nutriments dans le sol (Rodriguez-Zaragoza, 1994). Tous les genres d'amibes libres sont retrouvés dans le sol. Cependant, les plus fréquents sont : *Acanthamoeba* spp., *Naegleria gruberi* et *Hartmannella hyaline*.

Dans les milieux aqueux, la salinité joue un rôle important dans la distribution des amibes libres. En effet, dans les milieux marins, la forte salinité va discriminer certains genres comme *Naegleria*. D'autres genres, comme par exemple *Acanthamoeba*, sont capables de tolérer cette forte salinité. La plupart des amibes libres peuvent se développer dans les milieux d'eau douce. Par exemple, les genres *Vermamoeba*, *Hartmannella*, *Naegleria*, *Acanthamoeba* et *Vahlkampfia* sont fréquemment rencontrés dans ces milieux (Kyle et Noblet, 1986 ; Rodriguez-Zaragoza, 1994). Dans les milieux aqueux, les amibes libres adhèrent aux particules en suspension. Dans la colonne d'eau, de la matière organique est présente ce qui permet aux bactéries de se développer et aux amibes libres de se nourrir. L'épaisseur de la colonne d'eau joue donc un rôle limitant dans la croissance des amibes libres. D'autres facteurs influencent aussi le développement des amibes libres dans les milieux aqueux. Il s'agit du pH et de la température (Rodriguez-Zaragoza, 1994). Une



température comprise entre 10 et 30 °C et un pH aux alentours de la neutralité favorisent la croissance des amibes libres.

Les amibes libres sont également présentes dans l'air, sous forme de trophozoïtes et de kystes, ce qui permet une dissémination aérienne (Rodriguez-Zaragoza, 1994). Il est difficile de définir les conditions qui déterminent la distribution des amibes libres dans l'air. Cependant, certains critères tels que la topographie et les conditions sanitaires peuvent influencer la présence des amibes libres. Elles se retrouvent, dans l'air, via l'émission d'aérosols par des processus naturels tels que les embruns océaniques ou l'érosion des sols. En 1983, Lawande a démontré la présence d'amibes libres aéroportées par l'Harmattan, un vent sec chargé de sable soufflant au Nigéria. En exposant des géloses recouvertes d'*Escherichia coli* à ce vent, Lawande a isolé 38 souches d'amibes libres (Lawande, 1983). Les amibes libres présentes dans l'air proviennent également de l'émission d'aérosols par des activités anthropiques telles que l'industrie ou la circulation automobile. En 1994, Rodriguez-Zaragoza a montré que les principaux genres amibiens isolés dans l'atmosphère urbaine sont : *Vermamoeba/Hartmannella*, *Acanthamoeba* et *Vahlkampfia* (Rodriguez-Zaragoza, 1994).

Les amibes libres sont également associées aux plantes, aux reptiles, aux amphibiens et aux mammifères (Dykova *et al.*, 1999 ; Marciano-Cabral et Cabral, 2003). Certaines amibes libres, telles que *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris* et *Naegleria fowleri*, sont des pathogènes opportunistes de l'Homme.

#### 1.4.2. Environnements artificiels

Les amibes libres sont également capables de se développer dans des environnements artificiels. De nombreuses activités humaines offrent aux amibes libres de nouveaux biotopes de choix pour se développer. Il s'agit de milieux hydriques artificiels où les conditions de température, de protection et de nutrition sont optimales au développement des amibes libres. C'est le cas, par exemple, des eaux de baignades comme les piscines, les jacuzzis, les spas et les eaux thermales (Rivera *et al.*, 1993 ; Vesaluoma *et al.*, 1995). Les amibes libres sont également trouvées dans les usines de potabilisation (Thomas *et al.*, 2008), les réseaux de distribution d'eau potable et d'eau chaude sanitaire (Rohr *et al.*,

1998 ; Thomas *et al.*, 2006), les tours aéroréfrigérantes (TAR) (Srikanth et Berk, 1993), les systèmes de refroidissement des centrales nucléaires (Sykora *et al.*, 1983), le matériel médical, les humidificateurs, les aquariums...

La présence d'amibes libres dans les eaux de baignades a été plusieurs fois investiguée. En 1993, Rivera *et al.* ont effectué des prélèvements dans des piscines de Mexico City. Ils ont pu isoler 29 souches d'amibes libres dont une majorité appartenait au genre *Acanthamoeba*. Dans cette étude, ils n'ont retrouvé aucune amibe libre dans les eaux de piscines dont la teneur en chlore était supérieure à 5,31 mg.L<sup>-1</sup> (Rivera *et al.*, 1993). Deux ans plus tard, Vesaluoma *et al.* ont fait une étude microbiologique de l'eau des piscines et jacuzzis d'Helsinki. Sur 34 prélèvements effectués, 14 étaient positifs à la présence d'amibes libres. Ils ont montré qu'elles étaient présentes dans des eaux contenant jusqu'à 3,3 mg.L<sup>-1</sup> de chlore libre (Vesaluoma *et al.*, 1995). D'autres études ont montré la présence d'amibes libres dans les spas, les eaux thermales et les piscines thérapeutiques malgré une chloration appropriée. Parmi les amibes libres, isolées dans ces études, certaines présentaient un fort pouvoir pathogène (De Jonckheere, 1982 ; Scaglia *et al.*, 1983 ; Sukthana *et al.*, 2005). Une étude plus récente s'est intéressée à la présence d'amibes libres du genre *Acanthamoeba* dans les eaux de piscines de Porto Alegre. Dans cette étude, 20 % des prélèvements étaient positifs à la présence d'*Acanthamoeba* spp., et 38 % des souches isolées sont considérées comme potentiellement pathogènes pour l'Homme (Caumo *et al.*, 2009).

Les amibes libres sont également rencontrées dans les usines de potabilisation, les réseaux d'eau potable, les réseaux d'eau chaude sanitaire (RECS) et dans les eaux de consommation (eaux du robinet, eaux minérales, eaux de sources). En 1979, Dive *et al.* ont recherché la présence d'amibes libres dans 836 échantillons d'eau de consommation d'origines diverses et quelle que soit l'origine de l'eau de consommation, la moitié des prélèvements étaient positifs. Cependant, en fonction de l'origine de l'eau la concentration amibienne variait. La concentration en amibes était plus importante dans les eaux issues de sources que dans les eaux minérales. Dans les eaux gazeuses, la concentration en amibes libres était très faible en raison de la présence du CO<sub>2</sub> qui leur est néfaste (Dive *et al.*, 1979). En 1981, Rivera *et al.* ont trouvé la présence de différentes souches d'amibes libres dans des eaux minérales largement vendues au Mexique. Parmi ces souches, ils ont retrouvé des amibes libres appartenant aux genres *Acanthamoeba* et *Naegleria* qui sont potentiellement

pathogènes pour l'Homme, ce qui a eu pour conséquence d'engendrer une forte inquiétude de la population (Rivera *et al.*, 1981). Les amibes libres du genre *Acanthamoeba*, en raison de leur pouvoir pathogène, sont fréquemment recherchées dans les eaux du robinet. C'est le cas par exemple de deux études qui ont montré la présence d'*Acanthamoeba* spp. dans l'eau du robinet aux domiciles de patients atteints de kératites (Boost *et al.*, 2008 ; Kilvington *et al.*, 2004). Des études, de plus grande envergure, ont également démontré la présence d'*Acanthamoeba* spp. dans l'eau du robinet dans des zones métropolitaines du Mexique et des Etats-Unis (Bonilla-Lemus *et al.*, 2009 ; Marciano-Cabral *et al.*, 2010). Différentes études se sont également intéressées à la présence d'amibes libres dans (i) les eaux brutes utilisées pour la production d'eau potable, (ii) les usines de potabilisation, (iii) les réseaux de distribution d'eau potable et (iv) d'eau chaude sanitaire. En 1981, Jacquemin *et al.* ont étudié le réseau d'alimentation en eaux de Poitiers. Ils ont effectué 76 prélèvements aux différents points clés du réseau (eaux de sources, souterraines et de surfaces, stations de potabilisation et réseau de distribution). Ils ont retrouvés des amibes libres à chaque étape du réseau d'alimentation en eau. La majorité des amibes libres isolées appartenaient aux genres *Acanthamoeba*, *Vermamoeba/Hartmannella* (Jacquemin *et al.*, 1981). Des études plus récentes ont confirmées cela. En 2008, Loret *et al.* ont montré que les différentes eaux brutes utilisées pour la production d'eau potable contenaient des amibes libres qui ont été retrouvées à chaque étape du processus de potabilisation de l'eau (Loret *et al.*, 2008a et b). La même année Thomas *et al.* ont obtenu des résultats similaires. Ils ont isolé majoritairement les genres *Vermamoeba/Hartmannella* et *Echinamoeba* au sein de l'usine de traitement de l'eau et les genres *Acanthamoeba* et *Naegleria* dans les eaux de rivières et dans les unités de filtration à sable (Thomas *et al.*, 2008). Les amibes libres colonisent également les RECS. En 1998, Rohr *et al.* ont étudié la présence d'amibes libres dans plusieurs RECS hospitaliers qui étaient systématiquement colonisés par des légionelles. Ils ont montré que plus de la moitié des prélèvements effectués à divers points des RECS étaient positifs à la présence d'amibes libres. Ils ont montré que l'espèce prédominante dans les RECS est *V. vermiformis* (65 %) suivie d'*Echinamoeba* spp. (15 %), de *Saccamoeba* spp. (12 %) et *Vahlkampfia* spp. (9 %). Ils ont également trouvé une grande variété d'amibes libres (*Acanthamoeba* spp., *Naegleria* spp., *V. vermiformis*, *Vannella* spp....) dans les environnements humides des zones sanitaires hospitalières comme les carreaux des salles de bain et des douches ou les siphons (Rohr *et al.*, 1998). Des études ont également montré

que des amibes libres se rencontraient dans l'eau d'unités dentaires (Barbeau et Buhler, 2001 ; Trabelsi *et al.*, 2010).

Les amibes libres prolifèrent aussi dans les TAR, où elles sont généralement en association avec des bactéries pathogènes telle que *L. pneumophila* (Lasheras *et al.*, 2006 ; Srikanth et Berk, 1993). Ceci a été confirmé en 2006 par Berk *et al.* qui ont montré que l'occurrence d'amibes libres infectées par des bactéries pathogènes était 16 fois plus élevée dans les TAR que dans les milieux aqueux naturels (Berk *et al.*, 2006). Dans les épidémies de légionelloses, où la source avérée de contamination est une TAR, des amibes libres ont été systématiquement retrouvées dans ces dispositifs. Les amibes libres jouent donc un rôle dans la protection et la dissémination des légionelles dans l'environnement et représentent un environnement optimal pour la prolifération de ces microorganismes (Thomas *et al.*, 2006). D'autres études ont aussi montré que les amibes libres isolées de TAR sont plus résistantes aux traitements de désinfection que celles isolées d'environnements naturels (Srikanth et Berk, 1993 ; Sutherland et Berk, 1996).

Les systèmes de refroidissement des centrales nucléaires sont également des environnements privilégiés pour la prolifération des amibes libres. Ces effluents sont très contrôlés afin de s'assurer qu'il n'y ait pas de prolifération amibienne et en particulier celle de *Naegleria fowleri*, l'agent causal de la MEAP (Stevens *et al.*, 1977 ; Sykora *et al.*, 1983 ; Tyndall *et al.*, 1985 et 1989).

Pour conclure, les amibes libres prolifèrent dans les environnements hydriques artificiels. Les populations humaines étant de plus en plus exposées aux environnements artificiels, les amibes libres constituent à travers leur propre pouvoir pathogène et leur rôle de réservoir de bactéries pathogènes un risque de santé publique majeur.

### **1.5. Pathogénicité des amibes libres**

Certaines amibes libres comme celles appartenant au genre *Acanthamoeba* et aux espèces *Naegleria fowleri* et *Balamuthia mandrillaris* sont des pathogènes opportunistes de l'Homme. Ces amibes sont responsables d'atteintes du système nerveux, oculaires et cutanées.

### 1.5.1. Atteintes du système nerveux

#### 1.5.1.1. Encéphalite amibienne granulomateuse (EAG)

L'encéphalite amibienne granulomateuse (EAG) est une infection chronique du système nerveux central due à différentes espèces d'*Acanthamoeba* (*A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. culbertsoni*, *A. astronyxis*, *A. divionensis*, *A. rhyodes* et *A. healyi*) et à l'espèce *Balamuthia mandrillaris*. L'EAG est une infection rare (Tableau 3) mais mortelle dans 90 % des cas. Elle touche principalement des personnes immunodéprimées comme les séropositifs, les diabétiques, les personnes sous traitements immunosuppresseurs ou abusant de stéroïdes (Marciano-Cabral et Cabral, 2003 ; Martinez et Janitschke, 1985 ; Visvesvara *et al.*, 2007).

Tableau 3 : Nombre estimé d'EAG dans le monde.

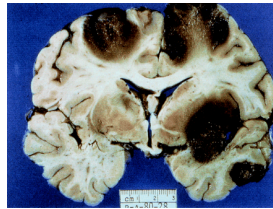
(Source : Schuster et Visvesvara, 2004)

| Espèce responsable de l'EAG    | Nombre de cas estimés | Période d'estimation |
|--------------------------------|-----------------------|----------------------|
| <i>Acanthamoeba</i> spp.       | ~ 200 cas             | 1960 à 2000          |
| <i>Balamuthia mandrillaris</i> | ~ 100 cas             | 1990 à 2000          |

La contamination s'effectue soit à partir de l'appareil respiratoire par inhalation de poussières ou d'aérosols contenant les amibes, soit à partir de lésions cutanées ou oculaires. Une fois dans l'organisme les amibes libres se propagent jusqu'à l'encéphale soit par migration le long des voies nerveuses olfactives ou optiques, soit par voie hématogène en traversant la barrière hémato-encéphalique (Martinez et Janitschke, 1985 ; Martinez, 1991 ; Martinez et Visvesvara, 1997). Après quelques semaines, voire des mois d'incubation, céphalées, fièvres, nausées, vomissements, raideur de nuque, convulsions et troubles du comportement apparaissent. Dans certains cas, les symptômes suivants sont aussi décrits : troubles du sommeil, photophobie, anorexie, perte de la vue et de l'ouïe. L'évolution s'effectue, le plus souvent, en quelques semaines ou mois par un coma et la mort.

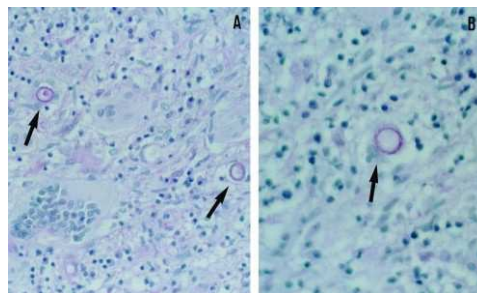
Il est difficile de diagnostiquer l'EAG en raison de sa rareté et de ses symptômes qui peuvent faire penser à d'autres types d'infections. Le diagnostic peut se faire par résonance magnétique ou par tomographie qui laissent voir des lésions cérébrales, mais, généralement,

le diagnostic est effectué par un examen post-mortem. Celui-ci montre que les hémisphères cérébraux sont les zones les plus touchées. Ainsi, des œdèmes, des zones hémorragiques et des zones nécrosées sont observables (Figure 10). Les examens histologiques et immuno-histochimiques confirment la présence de trophozoïtes et de kystes amibiens dans les tissus cérébraux. La figure 11 montre qu'il est possible de distinguer des granulomes tissulaires chroniques centrés par des kystes.



**Figure 10 :** Section des hémisphères cérébraux d'un patient décédé d'EAG.

(Source : Marciano-Cabral et Cabral, 2003)



**Figure 11 :** Kystes d'*Acanthamoeba* dans une biopsie cérébrale d'un patient décédé d'EAG.

(Source : Martinez *et al.*, 2000)

#### 1.5.1.2. Méningo-encéphalite amibienne primitive (MEAP)

La méningo-encéphalite amibienne primitive (MEAP) est une atteinte neurologique causée par l'espèce *Naegleria fowleri*. Au contraire de l'EAG, la MEAP touche aussi bien les personnes immuno-compétentes qu'immuno-déficientes. Cette maladie est rare, entre 1960 et 2000 seuls environ 200 cas ont été rapportés au niveau mondial (Schuster et Visvesvara, 2004). La majorité des cas est mortelle et, actuellement, seules une dizaine de guérisons ont été rapportées (Brown, 1992 ; Loschiavo *et al.*, 1993 ; Wang *et al.*, 1993).

La contamination se fait généralement par voie nasale par inhalation de gouttelettes contenant *N. fowleri* lors d'une baignade dans des eaux douces, chaudes (> 25 °C) et stagnantes (lacs, piscines, étangs). L'incubation est d'environ 7 j, puis il apparaît un

syndrome méningé fébrile accompagné de céphalées, nausées, vomissements, fièvre et d'un état de somnolence où à l'inverse d'hyper-agitation. La maladie évolue alors en 3 à 6 j vers un coma et la mort (Bard et Lambrozo, 1992, De Jonckheere *et al.*, 1975 ; Martinez et visvesvara, 1997). Il existe quelques traitements, mais ils restent très souvent inefficaces (Tiewcharoen *et al.*, 2002). A l'heure actuelle, la prévention reste la meilleure protection : éviter les baignades dans des eaux à risques, filtrer et chlorer les eaux de piscines.

### 1.5.2. Atteintes oculaires

Les amibes du genre *Acanthamoeba* peuvent causer des kératites qui sont des inflammations douloureuses de la cornée. Si le diagnostic et les traitements ne sont pas faits rapidement ces kératites peuvent aboutir à des ulcères cornéens et dans les cas les plus graves à la perte de l'œil (Seal *et al.*, 2003). Contrairement à l'EAG, les kératites amibiennes touchent de façon indifférenciée les personnes immuno-compétentes et immuno-déprimés. Un des facteurs de risque de la kératite amibienne est le port de lentilles de contact. En effet, 80 % des personnes atteints de kératite amibienne sont porteurs de lentilles de contact, les autres cas sont généralement liés à des traumatismes de l'œil (Chang et Soong, 1991 ; Khan, 2006 ; Niederkorn *et al.*, 1999 ; Sharma *et al.*, 1990 et 2000). Il y a eu, entre 1980 et 2000, plus de 3000 cas de kératites amibiennes qui ont été rapportés (Schuster et Visvesvara, 2004).

L'infection est due à l'adhésion et à la prolifération des trophozoïtes d'*Acanthamoeba* spp. au niveau de l'épithélium cornéen. Les trophozoïtes pénètrent alors l'épithélium et provoquent une névrite (inflammation du nerf) et une nécrose. Les trophozoïtes pénètrent ensuite dans le stroma et détruisent, grâce à la sécrétion de protéases, les fibres de collagène ce qui induit une chorioretinite (Kim *et al.*, 2006). Les symptômes les plus fréquents sont : rougeur, douleur, larmoiements, œdème des paupières et plus rarement photophobie. Ce type de kératite est caractérisé par l'apparition d'un abcès cornéen en forme d'anneau paracentral avec un centre clair (Figure 12) (Illingworth et Cook, 1998).



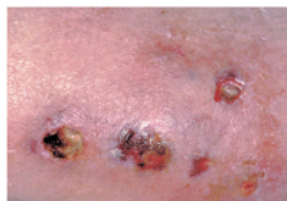
**Figure 12 :** Aspect de l'abcès cornéen en forme d'anneau causé par une kératite amibienne.

(Source : Illingworth et Cook, 1998)

Le diagnostic n'est pas toujours évident car les symptômes de cette kératite sont identiques à ceux rencontrés dans les kératites bactériennes, virales ou encore fongiques. Le diagnostic passe donc par la mise en évidence des amibes. Les kératites amibiennes sont difficiles à traiter en raison de la présence des kystes d'*Acanthamoeba* qui sont très résistants aux traitements de désinfection. Si l'infection est prise à temps, elle peut être soignée par des traitements chimiques. Dans les cas extrêmes, l'énucléation reste le dernier recours.

### 1.5.3. Atteintes cutanées

Les *Acanthamoeba* spp. peuvent aussi causer des amibiases cutanées. Elles touchent principalement les personnes immunodéprimées comme les patients atteints du SIDA ou de maladies immunologiques. Après une incubation discrète de durée variable, des nodules et des ulcères cutanés apparaissent (Figure 13) (Steinberg *et al.*, 2002). S'ils ne sont pas traités, ils peuvent se transformer en plaques érythémateuses et nécrosées (Figure 14). Ces infections peuvent constituer une porte d'entrée pour les *Acanthamoeba* spp. vers la circulation sanguine ce qui peut entraîner l'apparition de lésions à distance et des atteintes métastatique de l'encéphale (EAG).



**Figure 13 :** Nodules et ulcères cutanés causés par *Acanthamoeba* spp..

(Source : Steinberg *et al.*, 2002)





**Figure 14 :** Plaque nécrosée causée par *Acanthamoeba polyphaga*.

(Source : <http://health.usf.edu/medicine/internalmedicine/infectious/parasitology.htm> en ligne le 25/10/11)

Le diagnostic se fait obligatoirement par visualisation des trophozoïtes et/ou kystes amibiens car, à prime abord, ces infections sont imputables aux champignons, aux virus voire aux bactéries. Actuellement, il n'existe pas de traitements spécifiques.

### **1.6. Interaction des amibes libres avec des microorganismes pathogènes**

A travers leur rôle de prédateurs, les amibes libres interagissent dans l'environnement avec d'autres types de microorganismes. Elles se nourrissent par phagocytose de bactéries, de micro-algues, de champignons et de levures (*cf.* 1.3.3. Nutrition). Cependant, certains microorganismes ont mis en place des systèmes de défense pour éviter ou résister à la phagocytose amibienne (Greub et Raoult, 2004). Parmi ces microorganismes, certains sont pathogènes pour l'Homme. En 2009, il a été décrit que sur les 539 espèces bactériennes, reconnues par l'EPA (*Environmental Protection Agency*) comme étant pathogènes pour l'Homme et l'animal, 19,8 % étaient capables de survivre et ou/se multiplier en présence d'amibes libres (Thomas *et al.*, 2010). Les amibes libres sont donc un réservoir et un vecteur pour de nombreux microorganismes pathogènes pour l'Homme.

#### **1.6.1. Interaction avec les champignons**

Il a été montré à plusieurs reprises que les amibes libres peuvent héberger des champignons. C'est le cas de la levure *Cryptococcus neoformans*, qui est responsable de graves infections (méningo-encéphalite, pneumopathie, lésions cutanées) généralement chez les personnes atteintes de SIDA. En 2004, Malliaris *et al.* ont montré que cette levure

avait la capacité de se multiplier à l'intérieur ou en présence d'*A. castellanii* (Malliaris *et al.*, 2004). C'est également le cas du champignon *Histoplasma capsulatum* qui est responsable de l'histoplasmosse, une infection respiratoire. Il semblerait que, suite à leur passage à l'intérieur de l'amibe, leur pathogénicité soit augmentée (Steenbergen *et al.*, 2004).

#### 1.6.2. Interaction avec les protozoaires

Les amibes libres peuvent également interagir avec des protozoaires. C'est le cas de *Cryptosporidium parvum* qui est responsable de diarrhées appelées cryptosporidioses. Des études ont montré que les *Acanthamoeba* spp. sont capables d'internaliser jusqu'à 6 oocystes et de les éliminer dans l'environnement de façon lente. Elles auraient ainsi un rôle dans la dissémination de *C. parvum* dans l'environnement (Gomez-Couso *et al.*, 2007 ; Stott *et al.*, 2003). *Toxoplasma gondii*, l'agent causal de la toxoplasmose, est aussi capable de survivre sous forme d'oocystes pendant 15 j à l'intérieur d'*A. castellanii* (Winiecka-Krusnell *et al.*, 2009). Cependant, à l'inverse d'*H. capsulatum* (cf. 1.6.1. Interaction avec les champignons), le passage dans les amibes libres diminuerait la pathogénicité des oocystes (Winiecka-Krusnell *et al.*, 2009).

#### 1.6.3. Interaction avec des bactéries

Les amibes libres ont été reconnues à de maintes reprises pour interagir avec de nombreuses bactéries pathogènes. La découverte des endosymbiontes des amibes libres a été faite en 1956 par Drozanski (cf. 1.1. Historique ; Drozanski, 1956). Néanmoins, l'intérêt de la communauté scientifique envers l'infection des amibes libres par des bactéries pathogènes remonte réellement aux années 1980 avec l'émergence de *L. pneumophila*. Cette bactérie est responsable de deux types d'infection : la fièvre de Pontiac, qui est bénigne, et la légionellose ou maladie du légionnaire, qui est une grave infection du système respiratoire, mortelle dans environ 10 % des cas. Cette bactérie pathogène cause régulièrement des cas de légionelloses. Par exemple, en France, la maladie est à déclaration obligatoire depuis 1987. En 2012, 1298 cas ont été répertoriés par l'InVS (Institut de Veille Sanitaire) dont 130 se sont avérés mortels ([www.invs.fr](http://www.invs.fr)).

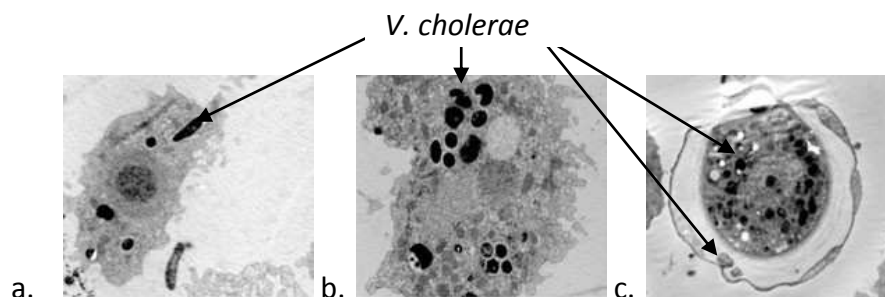
Suite à des épidémies de légionelloses des études ont montré l'association entre *L. pneumophila* et les amibes libres dans les RECS et les TAR. En effet, *L. pneumophila* est un

bacille gram négatif d'origine hydrotellurique qui est capable de coloniser de nombreux environnements artificiels (Berry *et al.*, 2006 ; Fliermans *et al.*, 1981 ; Sharma *et al.*, 2003). C'est Rowbotham, en 1980, qui a démontré pour la première fois que *L. pneumophila* pouvait se multiplier à l'intérieur des amibes du genre *Acanthamoeba* et *Naegleria* et causer leur lyse (Rowbotham, 1980). Depuis, à de nombreuses reprises, des amibes libres hébergeant *L. pneumophila* ont été isolées dans des réseaux d'eau hospitaliers et des TAR à l'origine d'épidémies de légionellose. Il a été démontré que *L. pneumophila* peut se multiplier dans plus de 13 espèces amibiennes appartenant principalement aux genres *Acanthamoeba*, *Vermamoeba/Hartmannella* et *Naegleria* (Fields, 1996 ; Philippe *et al.*, 2006). Les amibes jouent un rôle important dans la survie et la dissémination de *L. pneumophila* dans l'environnement. En effet, des études semblent montrer que les amibes libres sont le lieu de multiplication privilégié pour *L. pneumophila*. En 1998, Wadowsky *et al.* ont montré que les légionelles ne peuvent pas se multiplier dans l'eau en absence d'amibes (Wadowsky *et al.*, 1998). D'autres travaux de recherches ont également montré que les légionelles peuvent coloniser et se multiplier dans les biofilms uniquement en présence d'amibes libres (Declerk *et al.*, 2009 ; Kuiper *et al.*, 2004 ; Murga *et al.*, 2001). En plus de leur rôle dans la multiplication et la survie de *L. pneumophila*, les amibes libres jouent un rôle de protection des légionelles vis-à-vis des conditions environnementales défavorables comme les changements physiques (Biddick *et al.*, 1984 ; Chang, 1978), les produits chimiques (De Jonckheere et van de Voorde, 1976) et les traitements de désinfection (Greub et Raoult, 2004 ; Kilvington et Price, 1990). Par exemple, sous forme planctonique *L. pneumophila* est sensible à 3 min d'exposition à 2 mg.L<sup>-1</sup> de chlore alors que celles internalisées par *A. polyphaga* peuvent résister à une exposition de 18 h à 50 mg.L<sup>-1</sup> de chlore (Kilvington et Price, 1990). De plus, les bactéries s'étant développées à l'intérieur des amibes semblent morphologiquement et physiologiquement différentes que celles qui se sont développées dans un milieu nutritif. Elles ont acquis certaines caractéristiques comme une augmentation de la résistance aux biocides, à la chaleur et aux antibiotiques ainsi qu'une augmentation de leur pouvoir infectant (Greub et Raoult, 2003a et 2004).

D'autres espèces de bactéries pathogènes sont également capables de se multiplier et de lyser les amibes libres. Il s'agit des *Listeria* et en particulier de *Listeria monocytogenes* qui est responsable d'une maladie grave, la listériose. En 1990, Ly et Muller ont infecté des

amibes libres avec *L. monocytogenes*. Ils ont observé durant les premiers jours une multiplication des bactéries à l'intérieur des amibes. Après 8 j, ils ont vu que la majorité des amibes commençait à s'enkyster alors que d'autres étaient lysées libérant ainsi dans l'environnement les *L. monocytogenes*. Après 36 j, ils ont montré que quasiment toutes les amibes étaient enkystées et contenaient des bactéries. Cependant les *L. monocytogenes* n'étaient plus viables (Ly et Muller, 1990).

Certaines bactéries pathogènes pour l'Homme sont capables de se multiplier dans les amibes libres sans les lyser. C'est le cas de la bactérie gram négative *Vibrio cholerae* qui est l'agent causal du choléra. En 2005, Abd *et al.* ont observé que *V. cholerae* était capable de se multiplier à l'intérieur des amibes du genre *Acanthamoeba* et *Naegleria* et cela sans causer leur lyse. Dans les premières phases de l'infection, elles sont retrouvées dans des vacuoles répliquatives (Figure 15a) puis après 24 h elles se retrouvent libres dans le cytoplasme (Figure 15b). Elles peuvent également persister dans l'amibe lors du processus d'enkystement et se retrouver soit dans le cytoplasme soit entre les deux parois du kyste pour les *Acanthamoeba* spp. (Figure 15c) (Abd *et al.*, 2005).



**Figure 15 :** Trophozoïtes et kystes d'*Acanthamoeba castellanii* infectés par *Vibrio cholerae*.

- a. *V. cholerae* internalisée dans des vacuoles d'un trophozoïte
- b. *V. cholerae* libres dans le cytoplasme d'un trophozoïte
- c. *V. cholerae* internalisée dans le cytoplasme et entre les 2 parois du kyste

(Source : Abd *et al.*, 2005)

C'est également le cas de bactéries pathogènes appartenant au genre *Mycobacterium*. La première mycobactérie découverte comme capable de survivre dans les amibes libres est l'espèce *M. leprae* qui est responsable du choléra (Jadin, 1975). En 2008, Lahiri et Krahenbuhl ont montré que *M. leprae* était capable de survivre 3 j dans *A. castellanii* (Lahiri et Krahenbuhl, 2008). L'espèce *M. avium*, qui cause des infections

respiratoires chez les personnes immunodéprimées, est capable de survivre dans *A. castellanii* et *A. polyphaga* (Cirillo *et al.*, 1997 ; Whan *et al.*, 2006). En 2006, il a été montré que plus de 26 espèces de *Mycobacterium* sont capables de survivre dans les trophozoïtes et les kystes d'*A. polyphaga* et que le passage dans les amibes entraîne une augmentation de la résistance des *Mycobacterium* aux agents antimicrobiens et aux traitements chlorés (Adekambi *et al.*, 2006 ; Whan *et al.*, 2006). En 2007, Yu *et al.* ont montré que certaines mycobactéries peuvent se multiplier au sein des *Acanthamoeba* spp. sans affecter leur viabilité.

Tout comme *V. cholerae*, *Helicobacter pylori*, agents responsables d'ulcères gastriques (Greub et Raoult, 2004 ; Winiiecka-Krusnell *et al.*, 2002), et *Pseudomonas* spp., impliquées dans des infections nosocomiales (Marciano-cabral et Cabral, 2003), sont capables de se multiplier dans les amibes libres sans les lyser.

De nombreuses autres bactéries pathogènes pour l'Homme sont capables d'interagir avec les amibes libres. C'est le cas par exemple d'*Escherichia coli* (O157H7), de *Klebsiella pneumoniae*, de *Staphylococcus aureus* ou bien encore de *Yersinia pestis*.

D'autres bactéries, qui ne font actuellement pas partie de la liste des espèces bactériennes pathogènes pour l'Homme et l'animal par l'APE (Agence de Protection de l'Environnement), mais qui sont considérées comme de nouveaux pathogènes émergents sont capables d'interagir avec les amibes libres. C'est le cas, par exemple, de nouvelles bactéries apparentées aux *Chlamydiae* qui sont prénommées *Chlamydia-like* (Greub, 2009).

#### 1.6.4. Interaction avec les virus

Les amibes libres peuvent également héberger des virus. Elles sont par exemple connues pour abriter un des plus gros virus connus : le Mimivirus. Le Mimivirus peut engendrer chez l'Homme des infections respiratoires (La Scola, 2005 ; Raoult *et al.*, 2007). Il a été montré que le Mimivirus était capable de se développer dans les *Acanthamoeba* spp. (La Scola *et al.*, 2003). Le Mamavirus un virus relativement semblable, au génome encore plus grand, a été retrouvé dans une souche d'*A. castellanii* isolée d'un système de climatisation (La Scola *et al.*, 2008). D'autres virus géants comme le Marseillesvirus et

Lausannevirus ont également été retrouvés à l'intérieur d'amibes libres (Boyer *et al.*, 2009 ; Thomas *et al.*, 2011).

Des Coxsachievirus, et plus précisément le virus B3, a été retrouvé adsorbé à la surface et accumulé à l'intérieur d'amibes libres (Mattana *et al.*, 2006). La survie du virus semble indépendante des cycles réplicatifs et des cycles d'enkystement-désenkystement. Lors des interactions avec les macrophages humains les amibes libres infectées peuvent libérer le virus. Les amibes libres contribuent à la survie de ce virus mais également à la transmission du virus à l'Homme (Mattana *et al.*, 2006).

Il a été montré que les Echovirus se développent plus rapidement en présence d'amibes. Ces virus s'adsorbent à la surface des amibes libres qui jouent alors un rôle dans la dissémination du virus (Baron *et al.*, 1980 ; Danes et Cerva, 1981).

Les entérovirus peuvent également se fixer aux amibes libres. Cela leur permet de survivre plus longtemps dans l'environnement, notamment pendant les périodes froides et de se propager (Greub et Raoult, 2004).

Une autre étude a recherché par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) la présence d'adénovirus chez 236 souches d'amibes libres isolées dans des sources des îles Canaries. La présence d'adénovirus a été retrouvée dans 34 souches d'amibes. Ceci laisse imaginer que les amibes libres peuvent être un réservoir potentiel pour les adénovirus et faciliter leur transmission à l'Homme (Lorenzo-morales, 2007a).

## **2. Mécanismes de différenciation chez les amibes libres**

Comme mentionné précédemment, les amibes libres possèdent différents stades de différenciation. Elles ont au moins deux stades de développement : une forme végétative, nommée trophozoïte, et une forme de résistance, appelée kyste. Le passage de la forme trophozoïque à la forme kystique est nommé enkystement et le processus inverse est dénommé déenkystement. Le genre *Naegleria* possède également une forme flagellée qui ne sera pas abordée dans cette partie.

### **2.1. Enkystement**

Au cours de ce travail de doctorat, les changements cellulaires, biochimiques et moléculaires qui se produisent lors de l'enkystement des amibes libres ont fait l'objet d'une revue bibliographique publiée dans « Eukaryotic Cell ». L'article est présenté ci-après.

# Cellular, Biochemical, and Molecular Changes during Encystment of Free-Living Amoebae

Emilie Fouque,<sup>a,b</sup> Marie-Cécile Trouilhé,<sup>b</sup> Vincent Thomas,<sup>c</sup> Philippe Hartemann,<sup>d</sup> Marie-Hélène Rodier,<sup>a</sup> and Yann Héchard<sup>a</sup>

Université de Poitiers, CNRS UMR 7267, Laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions, Equipe Microbiologie de l'Eau, Poitiers, France<sup>a</sup>; Centre Scientifique et Technique du Bâtiment, Aquasim, Nantes, France<sup>b</sup>; STERIS SA R&D, Fontenay-aux-Roses, France<sup>c</sup>; and Département Environnement et Santé Publique, Faculté de Médecine, INSERM U954, Vandoeuvre les Nancy, France<sup>d</sup>

**Free-living amoebae are protozoa found in soil and water. Among them, some are pathogenic and many have been described as potential reservoirs of pathogenic bacteria. Their cell cycle is divided into at least two forms, the trophozoite and the cyst, and the differentiation process is named encystment. As cysts are more resistant to disinfection treatments than trophozoites, many studies focused on encystment, but until recently, little was known about cellular, biochemical, and molecular modifications operating during this process. Important signals and signaling pathways at play during encystment, as well as cell responses at the molecular level, have been described. This review summarizes our knowledge and focuses on new findings.**

Free-living amoebae (FLA) are protozoa commonly found in soil and water. Some of them are pathogenic (54) and can also harbor pathogenic bacteria (61). Indeed, FLA feed on bacteria by phagocytosis, but some bacteria can resist phagocytosis (23); among them, some, such as *Legionella pneumophila*, are even able to multiply within FLA (52). Thus, interaction between FLA and *L. pneumophila* is a major concern for public health (3, 32). FLA have developed a strategy in response to adverse conditions or stresses: they differentiate from trophozoites, the vegetative form, to cyst, the resting form. This differentiation is termed encystment (for a review, see references 44 and 66). Encystment of FLA occurs under various conditions, such as nutrient starvation and osmotic stress, and as a response to bacterial toxins (12, 18, 22, 27, 46). Cysts are particularly resistant to treatments and consequently play a critical role in survival and spreading of FLA and potential intracellular bacteria. Cysts and encystment of FLA have been studied for many years, mainly at the morphological and biochemical levels. More recently, cellular and molecular studies have provided a better understanding of the mechanisms of encystment, but these new findings have never been reviewed. The aim of this paper is to review these new findings.

## CYST WALL MORPHOLOGY OF FLA

The differentiation of trophozoites into cysts induces huge morphological changes (Fig. 1 and 2). Cysts are spherical and possess an outer layer, the cyst wall. However, the morphology of cyst walls depends on the genus and species and has been the basis for identification of FLA.

The cysts of *Acanthamoeba* have a double-layered wall. The ectocyst is the external layer, and the endocyst, which is formed after the ectocyst, is the internal fibrillar layer. These layers are composed of at least acid-insoluble proteins (45) and cellulose (62), but the exact composition is not well known. The structure of *Acanthamoeba* cysts has been well described by electron microscopy (5, 9). One to several holes named ostioles are present at the surface of the cyst wall. It has been proposed that excystment occurs through these ostioles after digestion of the opercula covering the ostioles (9).

Chávez-Munguía et al. suggest that cellulose is present in both layers of the cyst wall (9), while previous studies proposed that

cellulose is present only in the endocyst (30, 66). Recently, it has been shown that the ectocyst presented an irregular surface and that vesicles were found within its wall. Using quick-freeze fracture/deep etching with electron microscopy, it has been shown that the endocyst is thinner and more fibrillar than the ectocyst and resembles the cellulose structure in plant cell walls (29). Encystment has been demonstrated to correlate with development of biocide resistance, with increasing content in alkali-insoluble residues (cellulose) being associated with increasing resistance to most chemical agents (63). Recent studies demonstrated considerable variations in resistance to biocides of closely related *Acanthamoeba* isolates, suggesting that important variations exist between cyst wall compositions of these isolates (13).

Regarding *Naegleria* spp., there are reports with discrepant observations concerning the cyst wall structure, likely partly due to the fact that different strains and species were used. Electron microscopy studies reported that the cyst wall of *N. gruberi* consists of a double layer, with the ectocyst being irregular and approximately 25 nm thick and the endocyst appearing layered and 200 to 450 nm thick. They both join at ostioles that are closed by opercula as described for *Acanthamoeba* spp. (53). It has also been reported that the outer layer present in the cysts of *N. gruberi* is absent in *N. fowleri* and *N. jadini* (34). A recent analysis suggests that the *Naegleria* cyst wall is formed only as a single thick fibrillar layer with detached irregular thin loops that might have been confounded with a real ectocyst (8). The detailed composition of *Naegleria* sp. cyst walls remains unknown, but they are thought to contain chitin, since they are not stained with a cellulose-specific marker (30) but can be stained with calcofluor white M2R, indicating the presence of another kind of  $\beta$ -1-4-linked polysaccharide (8). It should be underlined that chitin is found in *Entamoeba* cysts (2).

To our knowledge, there is only one publication describing the composition of *Hartmannella* cyst walls. It seems that the major

Published ahead of print 24 February 2012

Address correspondence to Yann Héchard, yann.hechard@univ-poitiers.fr.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/EC.05301-11



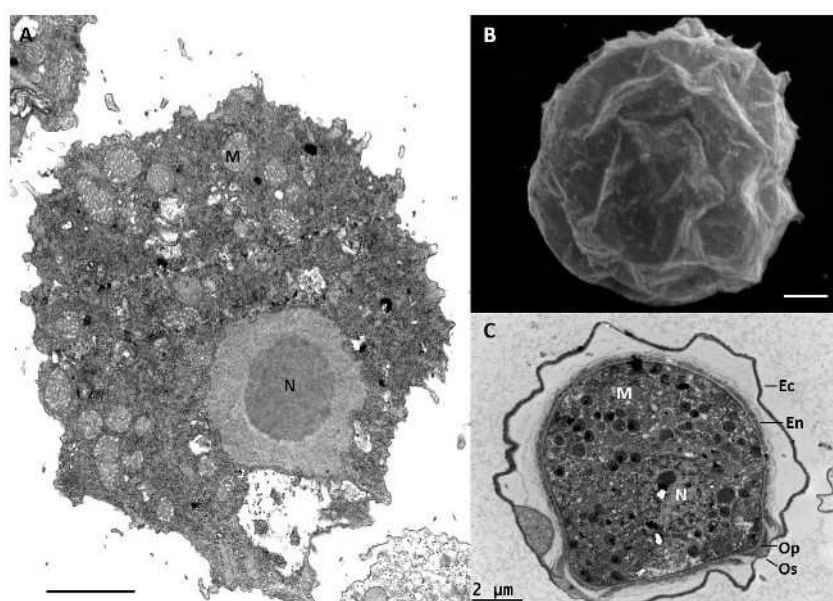


FIG 1 Electron microscopy of *Acanthamoeba* sp. (A) Transmission electron microscopy of a trophozoite. (B) Scanning electron microscopy of a cyst. (C) Transmission electron microscopy of a cyst. Ec, ectocyst; En, endocyst; M, mitochondria; N, nucleus; Op, operculum; Os, ostiole. Scale bars = 2  $\mu$ m.

components of the cyst wall are proteins with a glucose polymer present in low quantity (64). Such as for *Naegleria*, the cysts of *Hartmannella* spp. are not stained with a cellulose-specific marker, suggesting that there is no cellulose in the walls (30). A morphological study reported that the cyst wall of *Hartmannella vermiformis* is composed of a 50-nm-thick endocyst and a 110- to 140-nm-thick ectocyst consisting of multilayered filamentous material (58).

In *Balamuthia* spp., a third layer, named the mesocyst, has been described (35).

#### SIGNALS AND SIGNALING PATHWAYS

The signals inducing encystment of FLA are various. Starvation is a major signal for encystment in FLA (46, 50), and it also induces encystment or differentiation in other amoebae, such as *Entamoeba* and *Dictyostelium* spp. Osmotic stress also clearly induces

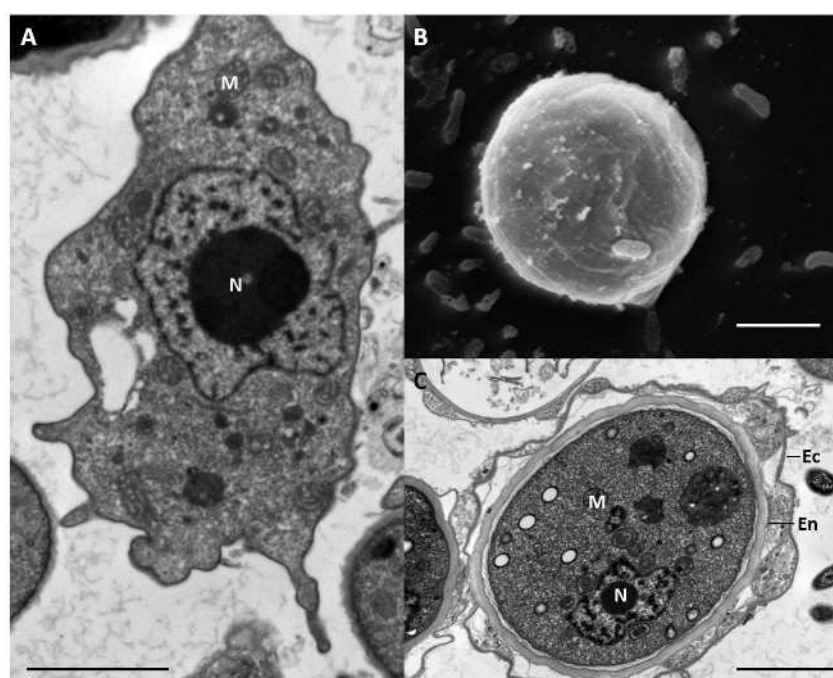


FIG 2 Electron microscopy of *Hartmannella* sp. (A) Transmission electron microscopy of a trophozoite. (B) Scanning electron microscopy of a cyst. (C) Transmission electron microscopy of a cyst. Ec, ectocyst; En, endocyst; M, mitochondria; N, nucleus. Scale bars = 2  $\mu$ m.

encystment of *Acanthamoeba*, and this is true for osmotic stress induced by various compounds like salts and glucose (6, 12, 18).

Also, the presence of intracellular bacteria could interfere with encystment (14). *Francisella tularensis* type A strains cause the rapid encystment of *Acanthamoeba castellanii* (21). Toxin-producing bacteria, such as *Pseudomonas aeruginosa*, can induce encystment in *Naegleria fowleri* and *Acanthamoeba castellanii* (22, 27).

Encystment is efficiently induced by magnesium ions and taurine in a nonnutrient medium (50). Magnesium and taurine induce cyclic AMP (cAMP) synthesis, with cAMP itself being able to induce encystment (49). cAMP induction could be due to activation of adenylate cyclase or inhibition of phosphodiesterase. An inhibitor of phosphodiesterase caused induction of encystment (49).

Encystment of *Acanthamoeba* is also induced by catecholamines (e.g., epinephrine and norepinephrine) and taurine (60, 65). The encystment induced by epinephrine is likely mediated by a receptor that activates cAMP synthesis (43). Again, there is a similar mechanism in *Entamoeba*, where a catecholamine-like molecule is produced in response to interaction with galactose-terminated ligands, like mucin. This catecholamine binds to an adrenergic-like receptor and induces cAMP synthesis and encystment of this amoeba (11, 20).

Recently, Siddiqui et al. have shown that galactose enhances *Balamuthia* encystment (57). These authors suggested that galactose might mediate its response via a galactose binding protein receptor, which has been previously described for *Balamuthia* (36).

Also, Akins and Byers reported earlier that a factor, named encystment-enhancing activity (EEA), secreted by *Acanthamoeba* is able to stimulate encystment (1). The nature of this factor is not described, but the authors suggest that it may be a modified nucleotide, because its activity was sensitive to snake venom phosphodiesterase. However, this factor should be different from cAMP, as cAMP phosphodiesterase was not active against EEA. It is interesting that EEA was produced in high-density cultures; thus, the authors speculated that this factor could act similarly to a quorum-sensing signaling molecule. As well, Eichinger hypothesized that catecholamines might be quorum-sensing molecules in *Entamoeba* (20), and actually, catecholamines are agonists of autoinducer-3, a quorum-sensing molecule described in some bacteria (59). It suggests that catecholamines might be involved in prokaryote-eukaryote communication. Our recent studies show that higher cell density led to higher rates of encystment in *Acanthamoeba*, suggesting that this process could be controlled by quorum sensing (E. Fouque, unpublished data).

Few signaling pathways have been proposed to be involved in encystment. In *Acanthamoeba*, farnesyl protein transferase (FPT III), an inhibitor of Ras farnesylation, reduced encystment (17). Ras is a small GTPase that could activate the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway. However, other inhibitors of the MAPK pathway (the p38 MAPK inhibitor SB203580 and the MEK inhibitor PD98059) were tested, but they did not show any effects on encystment. Together, these results suggest that the MAPK pathway might be involved in encystment but that the components of this pathway remain to be described. Also, the receptors mediating this pathway remain to be characterized. As cAMP has a direct impact on encystment, cAMP receptors are likely involved, but Ras might also be coupled to the tyrosine kinase family (RTK). In *Balamuthia*, tyrosine- and phosphatidylinositol 3-ki-

nase (PI3K)-mediated pathways are likely involved, since inhibitors reduce encystment (57). Deciphering the signaling pathways is of primary importance to understanding the mechanism of encystment in FLA, and one should keep in mind that different pathways could be triggered by different signals.

## THE CYTOSKELETON

As encystment is associated with morphological changes, it is obvious that cytoskeletal rearrangements might occur. An early publication described the control of actin synthesis during encystment (25). Transcription of actin genes was slightly repressed during early stage of encystment, but protein synthesis was highly reduced, suggesting a translational regulation. A recent study described that actin is partially degraded during the early stage of encystment (28).

An inhibitor of actin polymerization, cytochalasin D, and an inhibitor of Rho kinase, Y27632, repressed encystment of *Acanthamoeba*. Rho kinase is a small GTPase involved in regulation of actin polymerization (17). These results confirmed that cytoskeleton rearrangement is crucial for encystment. Lately, similar results have been obtained for *Balamuthia* (57), suggesting that actin control is likely important for encystment of various FLA.

At the protein level, the gelation factor was induced in cysts (4). This factor belongs to the filamin family and is involved in actin cross-linking to maintain cell shape. Conversely, actophorin, a protein from the ADP/cofilin family involved in the actin dynamic, is repressed in cysts (4). These results both suggest that actin turnover is reduced. Recently, three genes encoding proteins of the ADP/cofilin family of *Entamoeba invadens* have been studied. One of them was repressed during encystment, while the two others were induced during encystment (33).

## PROTEASES

Different proteases are likely involved in encystment and/or excystment of *Acanthamoeba*. One of them, a subtilisin-like serine protease, is clearly associated to encystment. The mRNA corresponding to this protein is induced during encystment (39, 40). The protein is also specifically detected in cysts, as shown by two-dimensional (2D) gel electrophoresis (4, 47). In addition, small interfering RNA (siRNA) experiments targeting the catalytic domain of serine proteases, as well as chemical inhibitors of serine proteases, efficiently reduced encystment in *Acanthamoeba* (16, 41). Altogether, these various works demonstrate that serine proteases, at least the subtilisin-like serine protease, are crucial for the differentiation into cysts. During differentiation, there is a need for protein turnover, which is completed via lysosomes or ubiquitin-proteasome systems. It is proposed that these proteases may mediate autophagic functions, as the protein associates with autophagosomes during encystment (16, 41). Reinforcing this hypothesis, a recent study showed that an autophagy protein was also involved in encystment. Indeed, this protein was induced in cysts, and repression of its synthesis by siRNA decreased encystment (42). Also, the presence of autolysosomes during encystment was visualized by electron microscopy (5).

Recently, another family of proteases, the cysteine proteases, was also reported to be involved in encystment. A study carefully followed by 2D gel electrophoresis the expression of proteins during encystment (28). The authors concluded that most of the changes occurred during the early stage of encystment. They also showed that specific inhibitors of cysteine proteases partially re-

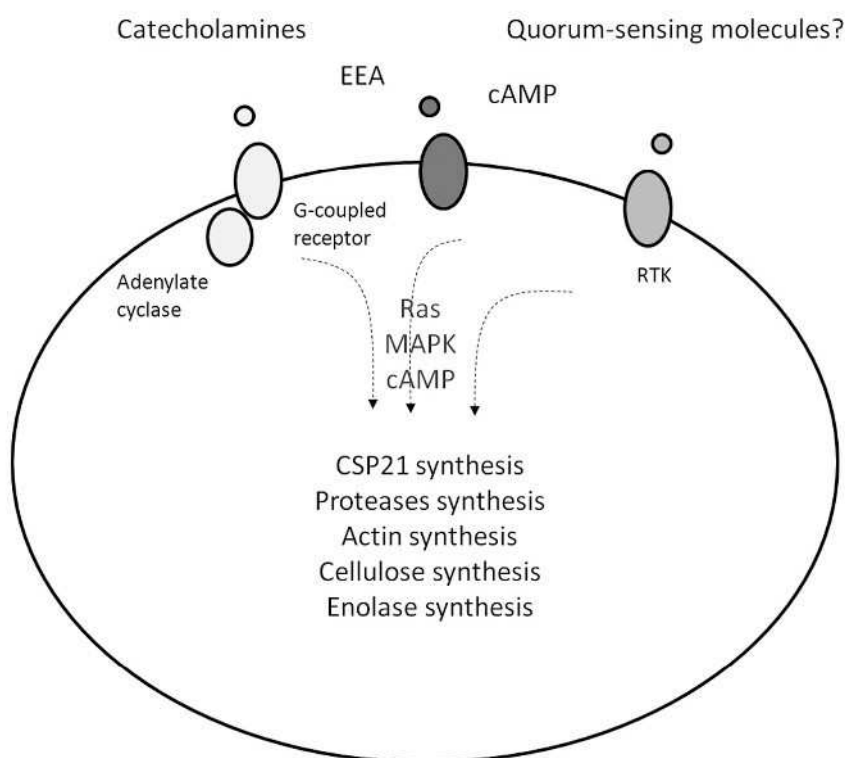


FIG 3 Signals, signaling pathways, and responses involved in the encystment of *Acanthamoeba*.

duce encystment. Cysteine proteases are also induced at the RNA level during encystment (38). In *Entamoeba*, a cysteine protease, induced during encystment, did not colocalize with autophagosomes, suggesting that it is not involved in autophagy (19).

#### THE CYST-SPECIFIC PROTEIN CSP21

The first described molecular change in FLA during encystment is the expression of CSP21 (cyst-specific protein of 21 kDa). This protein has been identified by SDS-PAGE analysis. CSP21 is hydrophilic and produced during early stages of encystment (24). Despite the fact that the precise cellular localization is not known, immunodetection results suggest that this protein is associated with cyst walls (24). Studies at the mRNA level have confirmed its early expression during the encystment process (10) and that this expression is specific for cysts (39). However, the role of this protein is not established yet.

#### CELL WALL SYNTHESIS

Pioneering works have demonstrated that during encystment, *Acanthamoeba* induces the incorporation of glucose into cellulose (50, 51) and that  $\beta$ -glucan synthetase activity is induced (48). The digestion of cyst walls could be achieved by proteases, cellulase, and chitinase. These enzymes are secreted by *Acanthamoeba* during excystment (26). Galactose and glucose were present in high levels in the cyst walls (17). During encystment, isocitrate dehydrogenase and isocitrate lyase were regulated, suggesting that lipids were degraded and that acetyl coenzyme A (acetyl-CoA) might be used for cellulose synthesis (37).

Cysts of *Acanthamoeba* are more resistant against treatments than trophozoites, likely because of their specific wall. As the walls are partly made of cellulose, it has been speculated that inhibition

of cellulose synthesis might induce sensitivity. One study has tested a cellulose synthesis inhibitor (2,6-dichlorobenzonitrile) and showed that this inhibitor blocks encystment and favors subsequent treatment (15). The authors logically claimed that the cellulose pathway is a novel target to improve *Acanthamoeba* treatment.

Another recent study has also targeted cellulose metabolism by inhibiting the glycogen phosphorylase (31). This enzyme is usually involved in glycogen hydrolysis to glucose, which may then serve in cellulose synthesis. The expression of glycogen phosphorylase was inhibited by siRNA methods, leading to a defect in encystment. The treated cells were able to synthesize only their ectocyst layer and not their endocyst layer. Northern blot analysis showed that the expression of glycogen phosphorylase occurred between 8 and 24 h after the induction of encystment.

Also, the expression of two enzymes involved in the glycolytic pathway (enolase and fructose bisphosphate aldolase) was modulated during encystment in different genera. Enolase is expressed during cyst formation in *Naegleria fowleri* (7) and in *Acanthamoeba* (4). It is likely that these enzymes might be related to cellulose synthesis (4). The induction of enolase in cysts confirmed a previous study conducted at the mRNA level in *Acanthamoeba* (39). Finally, enolase is also involved in differentiation of *Entamoeba histolytica* and was localized at the cyst wall, suggesting a role different from the one in the glycolytic pathway (55, 56).

#### CONCLUSION

Cysts of FLA are much more resistant to treatment than trophozoites and can survive for a long time in harsh conditions. They are particularly important for persistence and spreading of FLA, leading to potential health problems. Therefore, it is important to

study cyst formation in order to find new treatments to inhibit this process. In this paper, we reviewed major biochemical, molecular, and cellular modifications at work during encystment of FLA, but most of the studies have been dealing with *Acanthamoeba* as summarized in Fig. 3. However, the information is scarce, and we need to focus on several interesting points. First, the signals inducing encystment of FLA are globally well known (starvation and osmotic stress, etc.) even if some of them likely remain to be discovered. For example, we need to clarify if catecholamine is a global signal in every genus of FLA and if catecholamine could be produced by FLA, as it is the case for *Entamoeba invadens*. Second, there is still a huge lack of information regarding the signaling pathways involved in encystment. Little is known about the receptors inducing encystment, and although Ras, MAPK, and PI3K pathways were recently linked to encystment, there is no clear link between signals, these pathways, and the cellular response. For example, it is unclear which pathway is induced by cAMP, and no pathway has been completely described. Also, we still do not know if these signals use the same or different pathways to induce encystment. If there are independent pathways, we would need to block all of them to inhibit encystment. Third, we speculate that quorum-sensing molecules might be involved in encystment, as suggested by several hints. However, it remains to be confirmed and tested in various FLA. If this is true, inhibition of encystment by disturbing the quorum-sensing communication could be envisioned. Fourth, focusing on cellular response, actin, proteases, and cell wall synthesis are clearly regulated, but we can speculate that other molecules yet to be found are likely involved. Fifth, a growing interest deals with the role of intracellular bacteria that could interfere with the encystment process. Sixth, it is essential to study excystment, as this process has been studied less than encystment. Seventh, as most of the studies have been conducted on *Acanthamoeba*, there is a need to study more thoroughly other main genera of FLA, such as *Naegleria*, *Balamuthia*, and *Hartmannella*, because not all these genera are phylogenetically related.

With the aim of responding to these questions, modern tools should be used or developed. Future research should be focused on genomic and transcriptomic studies on the main genera to decipher in detail mechanisms of encystment. In particular, there is an urgent need of genome sequences in all major FLA genera, and most of all, we are convinced that transcriptomic studies, via RNA-Seq, should be the priority to get a whole picture of gene regulation during encystment. In order to manipulate gene expression, siRNA has been recently used, but there is a need to develop other tools for mutagenesis and stable transfection.

Eventually, these efforts should help to improve disinfection efficacy and limit health problems due to FLA themselves and/or intracellular pathogenic bacteria.

## REFERENCES

- Akins RA, Byers TJ. 1980. Differentiation promoting factors induced in *Acanthamoeba* by inhibitors of mitochondrial macromolecule synthesis. *Dev. Biol.* 78:126–140.
- Arroyo-Begovich A, Carabez-Trejo A. 1982. Location on chitin in the cyst wall of *Entamoeba invadens* with colloidal gold tracers. *J. Parasitol.* 68:253–258.
- Borella P, Guerrieri E, Marchesi I, Bondi M, Messi P. 2005. Water ecology of *Legionella* and protozoan: environmental and public health perspectives. *Biotechnol. Annu. Rev.* 11:355–380.
- Bouyer S, Rodier MH, Guillot A, Hechard Y. 2009. *Acanthamoeba castellanii*: proteins involved in actin dynamics, glycolysis, and proteolysis are regulated during encystation. *Exp. Parasitol.* 123:90–94.
- Bowers B, Korn ED. 1969. The fine structure of *Acanthamoeba castellanii* (Neff strain). II. Encystment. *J. Cell Biol.* 41:786–805.
- Byers TJ. 1979. Growth, reproduction, and differentiation in *Acanthamoeba*. *Int. Rev. Cytol.* 61:283–338.
- Chávez-Munguía B, et al. 2011. *Naegleria fowleri*: enolase is expressed during cyst differentiation. *J. Eukaryot. Microbiol.* 58:463–468.
- Chávez-Munguía B, et al. 2009. Ultrastructural study of the encystation and excystation processes in *Naegleria* sp. *J. Eukaryot. Microbiol.* 56:66–72.
- Chávez-Munguía B, et al. 2005. Ultrastructural study of encystation and excystation in *Acanthamoeba castellanii*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 52:153–158.
- Chen L, Orfeo T, Gilmartin G, Bateman E. 2004. Mechanism of cyst specific protein 21 mRNA induction during *Acanthamoeba* differentiation. *Biochim. Biophys. Acta* 1691:23–31.
- Coppi A, Merali S, Eichinger D. 2002. The enteric parasite *Entamoeba* uses an autocrine catecholamine system during differentiation into the infectious cyst stage. *J. Biol. Chem.* 277:8083–8090.
- Cordingley JS, Wills RA, Villemez CL. 1996. Osmolarity is an independent trigger of *Acanthamoeba castellanii* differentiation. *J. Cell Biochem.* 61:167–171.
- Coulon C, Collignon A, McDonnell G, Thomas V. 2010. Resistance of *Acanthamoeba* cysts to disinfection treatments used in health care settings. *J. Clin. Microbiol.* 48:2689–2697.
- de Moraes J, Alfieri SC. 2008. Growth, encystment, and survival, of *Acanthamoeba castellanii* grazing on different bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* 66:221–229.
- Dudley R, Alsam S, Khan NA. 2007. Cellulose biosynthesis pathway is a potential target in the improved treatment of *Acanthamoeba* keratitis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75:133–140.
- Dudley R, Alsam S, Khan NA. 2008. The role of proteases in the differentiation of *Acanthamoeba castellanii*. *FEMS Microbiol. Lett.* 286:9–15.
- Dudley R, Jarroll EL, Khan NA. 2009. Carbohydrate analysis of *Acanthamoeba castellanii*. *Exp. Parasitol.* 122:338–343.
- Dudley R, et al. 2005. *Acanthamoeba* isolates belonging to T1, T2, T3, T4 but not T7 encyst in response to increased osmolarity and cysts do not bind to human corneal epithelial cells. *Acta Trop.* 95:100–108.
- Ebert F, et al. 2008. An *Entamoeba* cysteine peptidase specifically expressed during encystation. *Parasitol. Int.* 57:521–524.
- Eichinger D. 2001. A role for a galactose lectin and its ligands during encystation of *Entamoeba*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 48:17–21.
- El-Etr SH, et al. 2009. *Francisella tularensis* type A strains cause the rapid encystment of *Acanthamoeba castellanii* and survive in amoebal cysts for three weeks postinfection. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:7488–7500.
- Fritzinger AE, Marciano-Cabral F. 2004. Modulation of a “CD59-like” protein in *Naegleria fowleri* amoebae by bacteria. *J. Eukaryot. Microbiol.* 51:522–528.
- Greub G, Raoult D. 2004. Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin. Microbiol. Rev.* 17:413–433.
- Hirukawa Y, Nakato H, Izumi S, Tsuruhara T, Tomino S. 1998. Structure and expression of a cyst specific protein of *Acanthamoeba castellanii*. *Biochim. Biophys. Acta* 1398:47–56.
- Jantzen H. 1981. Control of actin synthesis during the development of *Acanthamoeba castellanii*. *Dev. Biol.* 82:113–126.
- Kaushal DC, Shukla OP. 1976. Release of certain extracellular enzymes during excystment of axenically produced cysts of *Hartmannella culbertsoni*. *Indian J. Exp. Biol.* 14:498–499.
- Lee X, Reimann C, Greub G, Sufrin J, Croxatto A. 2012. The *Pseudomonas aeruginosa* toxin L-2-amino-4-methoxy-trans-3-butenoic acid inhibits growth and induces encystment in *Acanthamoeba castellanii*. *Microbes Infect.* 14:268–272.
- Leitsch D, et al. 2010. Major role for cysteine proteases during the early phase of *Acanthamoeba castellanii* encystment. *Eukaryot. Cell* 9:611–618.
- Lemgruber L, Lupetti P, De Souza W, Vommaro RC, da Rocha-Azevedo B. 2010. The fine structure of the *Acanthamoeba polyphaga* cyst wall. *FEMS Microbiol. Lett.* 305:170–176.
- Linder M, Winiecka-Krusnell J, Linder E. 2002. Use of recombinant cellulose-binding domains of *Trichoderma reesei* cellulase as a selective immunocytochemical marker for cellulose in protozoa. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:2503–2508.
- Lorenzo-Morales J, et al. 2008. Glycogen phosphorylase in *Acanthamoeba* spp.: determining the role of the enzyme during the encystment process using RNA interference. *Eukaryot. Cell* 7:509–517.

32. Loret JF, Greub G. 2010. Free-living amoebae: biological by-passes in water treatment. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 213:167–175.
33. Makioka A, Kumagai M, Hiranuka K, Kobayashi S, Takeuchi T. 2011. *Entamoeba invadens*: identification of ADF/cofilin and their expression analysis in relation to encystation and excystation. *Exp. Parasitol.* 127:195–201.
34. Marciano-Cabral F. 1988. Biology of *Naegleria* spp. *Microbiol. Rev.* 52:114–133.
35. Martínez AJ, Schuster FL, Visvesvara GS. 2001. *Balamuthia mandrillaris*: its pathogenic potential. *J. Eukaryot. Microbiol.* 2001(Suppl):6S–9S.
36. Matin A, Jeong SR, Stins M, Khan NA. 2007. Effects of human serum on *Balamuthia mandrillaris* interactions with human brain microvascular endothelial cells. *J. Med. Microbiol.* 56:30–35.
37. Mehdi H, Garg NK. 1987. Changes in the lipid composition and activities of isocitrate dehydrogenase and isocitrate lyase during encystation of *Acanthamoeba culbertsoni* strain A-1. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 81:633–636.
38. Moon EK, Chung DI, Hong Y, Kong HH. 2011. Expression levels of encystation mediating factors in fresh strain of *Acanthamoeba castellanii* cyst ESTs. *Exp. Parasitol.* 127:811–816.
39. Moon EK, Chung DI, Hong YC, Ahn TI, Kong HH. 2008. *Acanthamoeba castellanii*: gene profile of encystation by ESTs analysis and KOG assignment. *Exp. Parasitol.* 119:111–116.
40. Moon EK, Chung DI, Hong YC, Kong HH. 2007. Differentially expressed genes of *Acanthamoeba castellanii* during encystation. *Korean J. Parasitol.* 45:283–285.
41. Moon EK, Chung DI, Hong YC, Kong HH. 2008. Characterization of a serine proteinase mediating encystation of *Acanthamoeba*. *Eukaryot. Cell* 7:1513–1517.
42. Moon EK, Chung DI, Hong YC, Kong HH. 2009. Autophagy protein 8 mediating autophagosome in encysting *Acanthamoeba*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 168:43–48.
43. Murti CR. 1975. Molecular biology of amoebic encystment. *Indian J. Med. Res.* 63:757–767.
44. Murti CR, Shukla OP. 1984. Differentiation of pathogenic amoebae: encystation and excystation of *Acanthamoeba culbertsoni*—a model. *J. Biosci.* 6:475–489.
45. Neff RJ, Neff RH. 1969. The biochemistry of amoebic encystment. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 23:51–81.
46. Neff RJ, Ray SA, Benton WF, Wilborn M. 1964. Induction of synchronous encystment (differentiation) in *Acanthamoeba* sp. *Methods Cell Physiol.* 1:55–83.
47. Park J, Jeong Y, Ahn T. 2002. Changes in profiles of major proteins in encysting *Acanthamoeba castellanii*. *Korean J. Biol. Sci.* 6:341–347.
48. Potter JL, Weisman RA. 1971. Differentiation in *Acanthamoeba*: beta-glucan synthesis during encystment. *Biochim. Biophys. Acta* 237:65–74.
49. Raizada MK, Krishna Murti CR. 1972. Transformation of trophic *Hartmannella culbertsoni* into viable cysts of cyclic 3',5'-adenosine monophosphate. *J. Cell Biol.* 52:743–748.
50. Raizada MK, Murti CR. 1971. Changes in the activity of certain enzymes of *Hartmannella* (*Culbertson* strain A-1) during encystment. *J. Protozool.* 18:115–119.
51. Raizada MK, Murti CR. 1972. Synthesis of RNA, protein, cellulose, and mucopolysaccharide and changes in the chemical composition of *Hartmannella culbertsoni* during encystment under axenic conditions. *J. Protozool.* 19:691–695.
52. Rowbotham TJ. 1980. Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J. Clin. Pathol.* 33:1179–1183.
53. Schuster F. 1963. An electron microscope study of the amoeba-flagellate, *Naegleria gruberi* (Schardinger). II. The cyst stage. *J. Protozool.* 10:313–320.
54. Schuster FL, Visvesvara GS. 2004. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int. J. Parasitol.* 34:1001–1027.
55. Segovia-Gamboa NC, et al. 2010. *Entamoeba invadens*, encystation process and enolase. *Exp. Parasitol.* 125:63–69.
56. Segovia-Gamboa NC, et al. 2011. Differentiation of *Entamoeba histolytica*: a possible role for enolase. *Exp. Parasitol.* 129:65–71.
57. Siddiqui R, Jarroll EL, Khan NA. 2010. *Balamuthia mandrillaris*: role of galactose in encystment and identification of potential inhibitory targets. *Exp. Parasitol.* 126:22–27.
58. Smirnov AV, Michel R. 1999. New data on the cyst structure of *Hartmannella vermiformis* Page, 1967 (Lobosea, Gymnamoebia). *Protistology* 1:82–85.
59. Sperandio V, Torres AG, Jarvis B, Nataro JP, Kaper JB. 2003. Bacteria-host communication: the language of hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100:8951–8956.
60. Srivastava DK, Shukla OP. 1983. Encystment of *Acanthamoeba culbertsoni* by organic effectors. *Indian J. Exp. Biol.* 21:444–447.
61. Thomas V, McDonnell G, Denyer SP, Maillard JY. 2010. Free-living amoebae and their intracellular pathogenic microorganisms: risks for water quality. *FEMS Microbiol. Rev.* 34:231–259.
62. Tomlinson G, Jones EA. 1962. Isolation of cellulose from the cyst wall of a soil amoeba. *Biochim. Biophys. Acta* 63:194–200.
63. Turner NA, Russell AD, Furr JR, Lloyd D. 2000. Emergence of resistance to biocides during differentiation of *Acanthamoeba castellanii*. *J. Antimicrob. Chemother.* 46:27–34.
64. Upadhyay JM, Crow S, Cox A. 1984. The cyst wall composition of *Hartmannella glebae*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 175:424–428.
65. Verma AK, Raizada MK, Murti CR. 1974. Effect of bioamines on the cellular differentiation of *Hartmannella culbertsoni*. *Biochem. Pharmacol.* 23:57–63.
66. Weisman RA. 1976. Differentiation in *Acanthamoeba castellanii*. *Annu. Rev. Microbiol.* 30:189–219.

## 2.2. Désenkystement

Le désenkystement est le passage de l'amibe d'un statut de dormance, le kyste, vers un statut métaboliquement actif, le trophozoïte. Il existe peu d'information concernant ce processus, en particulier sur les facteurs induisant le désenkystement et les mécanismes moléculaires mis en jeu. La majorité des travaux de recherche sont des études morphologiques, structurales et ultrastructurales de ce processus de différenciation.

### 2.2.1. Induction

Les études s'intéressant aux facteurs pouvant déclenchés le désenkystement des amibes libres sont relativement anciennes. En 1977, Kaushal et Shukla ont testé l'effet d'extraits aqueux bactériens d'*Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea*, *Bacillus subtilis*... sur l'activation du désenkystement chez *Acanthamoeba culbertsoni*. Ils ont montré que ces extraits bactériens sont effectifs pour l'induction du désenkystement et que les facteurs, présents dans les extraits aqueux d'*E. coli* et déclenchant le désenkystement, sont stables à la chaleur, dialysables et de bas poids moléculaires. Ces deux auteurs ont également pu induire le désenkystement avec de la peptone, du protéose peptone, du tryptone et des fractions riches en acides aminés (tout particulièrement l'acide glutamique suivi de la sérine, la thréonine et l'alanine). Enfin, ils ont observé que les facteurs induisant le désenkystement doivent être présents en continu pour que le processus soit mené à terme (Kaushal et Shukla, 1977a, b et c).

Une étude menée sur *Naegleria gruberi*, une amibe libre largement présente dans les sols, a montré qu'une augmentation légère de la concentration en dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) dans l'environnement induit le désenkystement (Averner et Fluton, 1966). En effet, une légère augmentation de la teneur en CO<sub>2</sub> dans les sols indique la présence de bactéries et signale donc un environnement favorable au développement des amibes. Cette observation a été confirmée plus tard par Blackler et Sommerville qui ont montré qu'une pression partielle de CO<sub>2</sub> (pCO<sub>2</sub>) de 5 % et une température de 30 °C sont les conditions optimales pour le désenkystement de *N. gruberi*. Ils ont souligné le fait que le facteur induisant le désenkystement ne serait pas directement le CO<sub>2</sub> mais l'acide carbonique (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) qui se forme par solvatation du CO<sub>2</sub> dans l'eau (Blackler et Sommerville, 1988).

### 2.2.2. Changements morphologiques et structuraux

Plusieurs travaux de recherche se sont intéressés aux changements morphologiques et structuraux qui s'opèrent lors du désenkystement des amibes libres. Ces travaux ont été basés sur l'utilisation de différentes techniques de microscopie optique (fond clair, contraste de phase...) et microscopie électronique (microscopie électronique à balayage et microscopie électronique en transmission). La majorité des études a été menée sur le genre *Acanthamoeba* et en particulier l'espèce *A. castellanii*. Il existe aussi quelques données sur le genre *Naegleria*.

En 1971 Mattar et Byers ont observé par microscopie optique le désenkystement d'*A. castellanii*. Ils ont ainsi pu décrire et nommer les grandes étapes du processus de désenkystement qui sont détaillés dans la figure 16. Tout d'abord, le kyste mature est sphérique, entouré d'une paroi double couche (endokyste et ectokyste) et des granules lipidiques sont présents en bordure de l'amibe. Puis vient la phase d'activation du kyste, les granules lipidiques disparaissent et de larges globules apparaissent au centre de l'amibe. Suit l'étape de pré-émergence précoce où l'amibe se détache de l'endokyste formant ainsi un espace entre la cellule et la paroi. Durant cette étape une large vacuole apparaît au centre de l'amibe. Par la suite, l'étape de pré-émergence tardive où le cytoplasme bourgeonne et commence à traverser la paroi kystique. Enfin, au cours de la dernière étape, l'amibe est complètement émergée et la paroi du kyste est vide (Mattar et Byers, 1971). La figure 17 montre ces différentes étapes observées en microscopie optique.

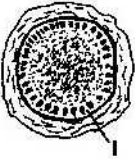
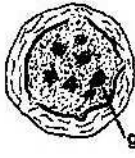
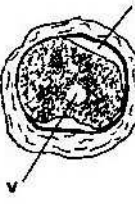
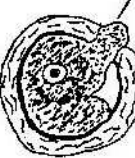
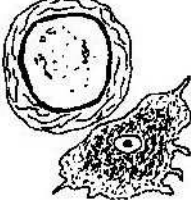
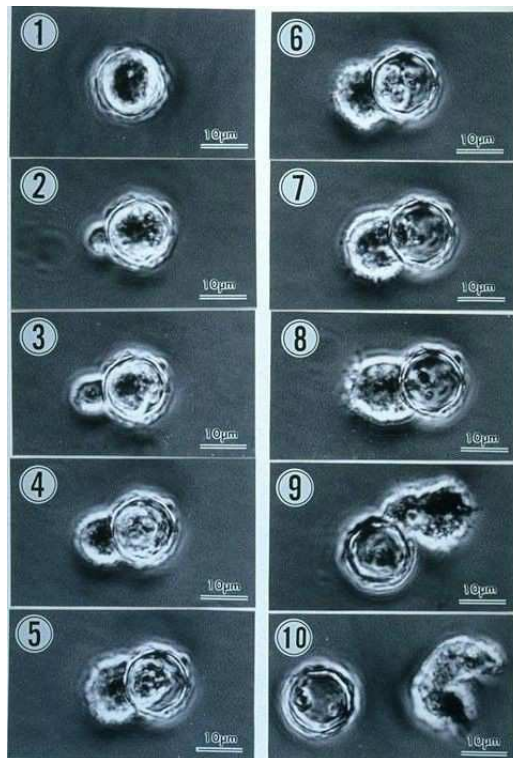
| Cyst stage  | Morphological description   | Staining reaction                        | Duration of stage                             |
|---|---|--|---|
|    | Spherical with a layer of lipid granules around the outer margin of the ameba ( <i>l</i> )                        | Pink cyst wall and yellowish brown ameba | Indefinite under appropriate conditions in EM |
|    | The granular layer disappears and larger globules ( <i>g</i> ) appear in the center of the ameba                  | Pink cyst wall and reddish brown ameba   | 0.5-4 hr after transfer of cysts to OGM       |
|    | The ameba detaches from the inner cyst wall forming a space ( <i>s</i> ) and a large central vacuole ( <i>v</i> ) | As above                                 | 4-8 hr  |
|   | The detachment of the ameba is more evident and a cytoplasmic bud ( <i>b</i> ) starts to penetrate the cyst wall  | As above                                 | 8-24 hr                                       |
|  | A trophozoite emerges leaving behind an empty cyst wall   | As above                                 | 3 min for emergence                           |

Figure 16 : Les étapes du désenkystement chez *A. castellanii*.

(Source : Mattar et Byers, 1971)

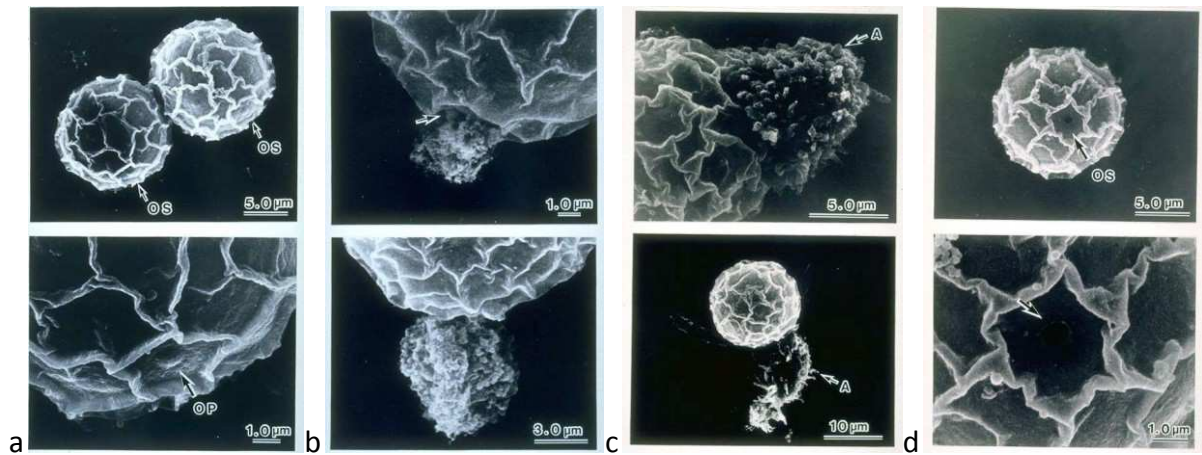




**Figure 17 :** Les étapes du désenkystement chez *Acanthamoeba* observées en microscopie optique.

1 : Kyste mature, 2-4 : Pré-émergence, 5-9 : Émergence, 10 : Trophozoïte et kyste vide (Source : <http://protist.i.hosei.ac.jp/PDB/Images/Sarcodina/acanth/03.html> En ligne le 21/08/13)

L'année suivante Chamber et Thompson ont suivi le désenkystement d'*A. castellanii* par microscopie électronique à balayage (MEB) et ont pu mettre en évidence sur la surface des kystes matures la présence d'ostioles identifiables par la présence d'un opercule délimité par une arête circulaire. Le premier signe de l'émergence, observé en MEB, est l'apparition d'un bourgeon cytoplasmique à travers un ostiole où l'opercule a été enlevé. Puis le trophozoïte sort entièrement à travers cet ostiole. Après l'étape d'émergence, le kyste vide est identique aux kystes matures à l'exception de l'ostiole qui est ouvert (Chamber et Thompson, 1972). Les différentes étapes du désenkystement observées en MEB sont présentées dans la figure 18.

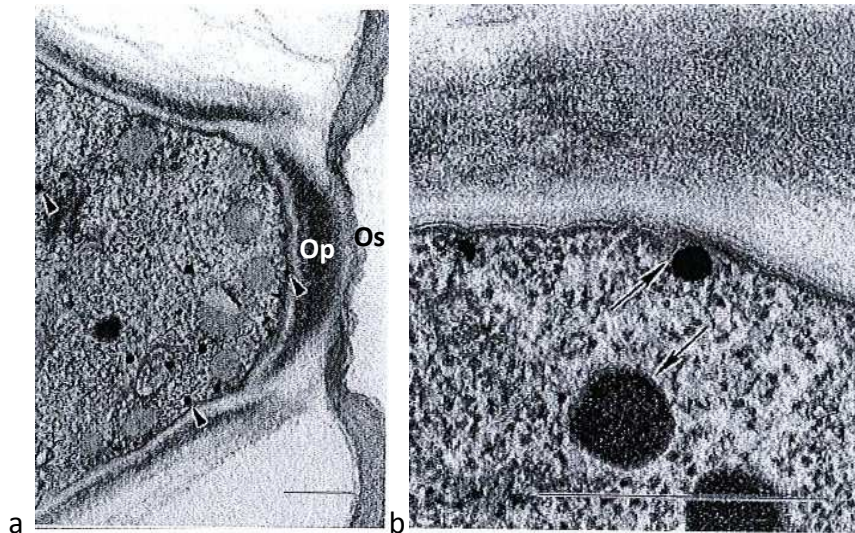


**Figure 18 :** Les étapes du désenkystement chez *Acanthamoeba* spp. observées en microscopie électronique à balayage.

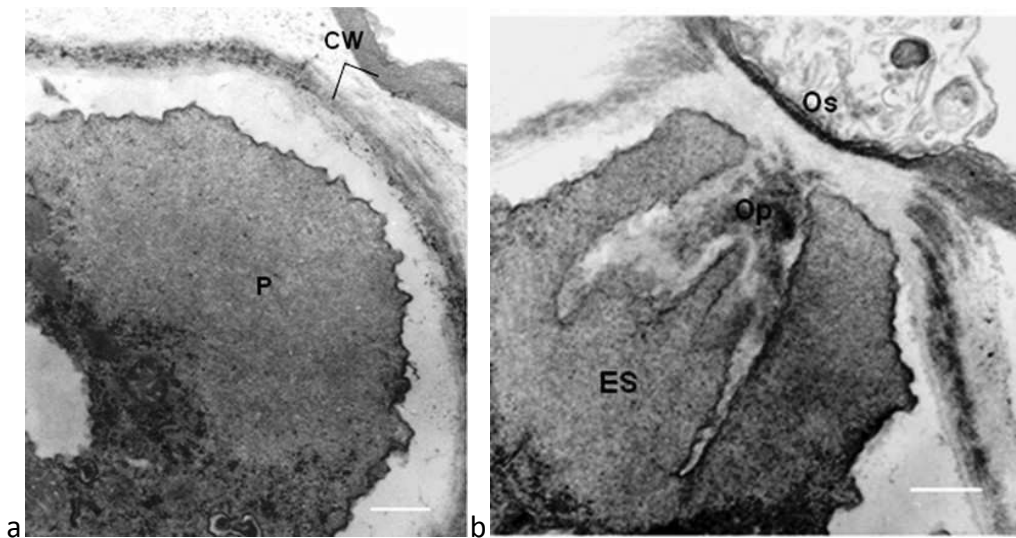
a : Kyste mature, b : Pré-émergence, c : Émergence du trophozoïte (A : Acanthopodes), d : kyste vide (OS : Ostiole)

(Source : <http://protist.i.hosei.ac.jp/PDB/Images/Sarcodina/acanth/03.html> En ligne le 21/08/13)

Puis, le désenkystement d'*A. castellanii* a été investigué à plusieurs reprises par des techniques de microscopie électronique à transmission (MET). C'est le cas de Chávez-Munguía *et al.* qui en 2005 puis en 2013 ont étudié l'ultrastructure d'*A. castellanii* durant les processus de différenciation. Pendant les premières étapes du désenkystement ils ont pu observer l'apparition en abondance dans le cytoplasme de petits granules denses de 30-50 nm de diamètre. Beaucoup d'entre eux sont localisés près de la membrane plasmique dans la région des ostioles (Figure 19). Dans un deuxième temps, dans les régions des ostioles, des projections cytoplasmiques avec soit un pseudopode (Figure 20a) soit des structures endocytiques qui encerclent l'opercule ont été observées (Figure 20b). L'amibe se déplace vers l'ostiole d'où elle finira par émerger (Chávez-Munguía *et al.*, 2005 et 2013).



**Figure 19 :** Petits granules denses observés lors du désenkystement d'*A. castellanii*. Ostiole (Os), opercule (Op), petits granules denses (flèches). (Source : Chávez-Munguía *et al.*, 2005)



**Figure 20 :** Pseudopode et structure endocytique observés dans la région de l'ostiole lors du désenkystement d'*A. castellanii*.

Pseudopode (P), paroi kystique (CW), ostiole (Os), opercule (Op), structure endocytique (ES)

(Source : Chávez-Munguía *et al.*, 2013)

Il existe également quelques publications faisant référence au processus de désenkystement chez le genre *Naegleria*. Le processus de désenkystement chez *Naegleria* est assez similaire à celui observé chez *Acanthamoeba*. Le kyste mature des *Naegleria* est sphérique, entouré d'une paroi qui semble être simple couche et présente plusieurs ostioles scellés par un opercule d'où émerge l'amibe durant le désenkystement (Chávez-Munguía *et al.*, 2009).

### 2.2.3. Mécanismes moléculaires

Actuellement il n'existe que très peu de données relatives aux mécanismes moléculaires impliqués dans le désenkystement des amibes libres. Quelques études se sont intéressées au contenu macromoléculaire (ADN, ARN et protéines) des amibes durant le désenkystement et sur l'effet d'inhibiteurs spécifiques des étapes de réplication de l'ADN, transcription de l'ADN en ARNm et traduction des ARNm en protéines. D'autres études se sont penchées sur les enzymes impliquées lors du désenkystement. L'ensemble des données est détaillé dans les paragraphes suivants.

En 1971, Mattar et Byers ont étudié le processus de désenkystement chez *A. castellanii* et ont testé l'effet de trois inhibiteurs sur le processus de désenkystement : l'hydroxyurée qui bloque la réplication de l'ADN, l'actinomycine D qui bloque la transcription de l'ADN en ARNm et la cycloheximide qui bloque la traduction des ARNm en protéines. L'hydroxyurée n'a pas d'effet sur le désenkystement d'*A. castellanii* ce qui est parfaitement logique avec les résultats publiés la même année par Rudick qui a montré que dès les premiers stades de l'enkystement la réplication de l'ADN est bloqué en phase G1 (Rudick, 1971). L'actinomycine D bloque le processus de désenkystement ce qui montre que la transcription est impliquée dans ce processus même si les auteurs ont pu mettre en évidence que la majorité des ARNm sont synthétisés avant l'induction du désenkystement. La cycloheximide bloque complètement le processus de désenkystement chez *A. castellanii* ce qui montre que la traduction est une étape indispensable au phénomène de désenkystement (Mattar et Byers, 1971).

En 1978 Kaushal et Shulka ont fait une étude similaire chez *A. culbertsoni*. Ils ont tout d'abord évalué la quantité de macromolécules (ADN, ARN et protéines) présente lors du processus du désenkystement (Figure 21). Ces données ont révélées que, durant le désenkystement, il y a une augmentation significative de la quantité de protéines, une augmentation marginale de la quantité des ARN et une très faible synthèse d'ADN. Ils ont également testé l'effet de deux inhibiteurs sur ce processus : l'actinomycine D et la mitomycine C qui est aussi un inhibiteur de la transcription. Ils ont montré que ces inhibiteurs ont très peu d'effets sur le désenkystement. Ceci suggère que la transcription n'est pas fortement impliquée dans le désenkystement, les ARNm codant pour les protéines

impliquées dans le désenkystement doivent déjà être présents dans le kyste avant l'induction du désenkystement. Ces résultats sont divergeant de ceux de Mattar et Byers qui ont montré que chez *A. castellanii*, même si la majorité des ARNm sont synthétisés avant l'étape d'induction du désenkystement, l'étape de transcription est nécessaire. Il semble exister des différences en fonction des espèces d'*Acanthamoeba*. Kaushal et Shulka ont également testé la cycloheximide qui bloque à 100 % le désenkystement ce qui confirme que la traduction est une étape clé du processus de désenkystement chez les *Acanthamoeba* spp. (Kaushal et Shulka, 1978a et b).

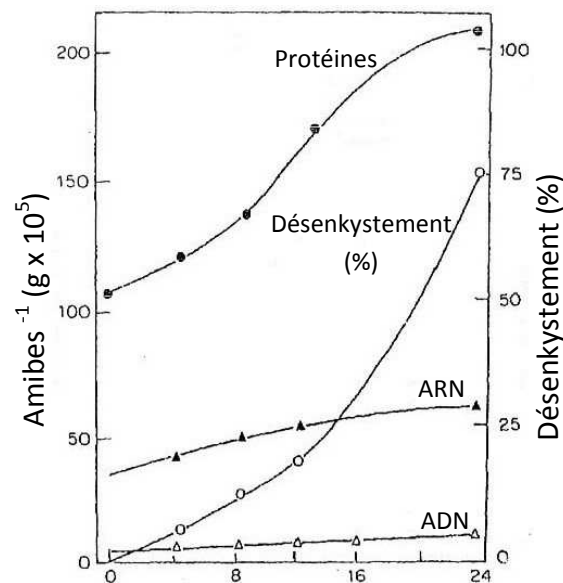


Figure 21 : Contenu macromoléculaire et désenkystement d'*A. culbertsoni*.

(Source : Kaushal et Shulka, 1978)

Chez *Naegleria gruberi* l'actinomycine D bloque le désenkystement, ce qui montre que chez cette espèce la transcription est nécessaire à ce processus (Blackler et Sommerville, 1988).

En 1976 Kaushal et Shukla ont montré que pendant le désenkystement d'*A. culbertsoni* il y a la synthèse de deux protéases, d'une cellulase et d'une chitinase. Ils ont montré que les deux protéases sont sécrétées durant les phases précoces du désenkystement alors que la cellulase et la chitinase sont libérées seulement après 48 h ce qui est concomitant avec l'apparition des kystes vides. La formation d'une ouverture dans la paroi kystique est une étape indispensable au processus de désenkystement et Neal (1960) a suggéré que le pore, par lequel l'amibe sort, est produit par l'action d'enzymes localisées ou

synthétisées au niveau de la membrane cellulaire. La sécrétion précoce des protéases par les kystes d'*A. culbertsoni* suggère qu'elles jouent un rôle important dans le désenkystement. La cellulase et la chitinase, quant à elles, sont libérées seulement après l'étape d'émergence et semblent être impliquées dans la dégradation des parois des kystes vides libérant ainsi des composés pouvant être utilisés pour la croissance cellulaire (Kaushal et Shukla, 1976).

Une étude beaucoup plus récente a montré qu'une famille particulière de protéase, les sérines protéases, sont impliquées dans le désenkystement d'*A. castellanii*. En effet Dudley *et al.* ont d'abord montré que le phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), un inhibiteur des sérines protéases, bloque le désenkystement. Ces auteurs ont ensuite testé l'effet de différents petits ARN interférents ou siRNA (*small interfering RNA*) spécifiques des sites catalytiques de plusieurs sérines protéases identifiées chez *A. castellanii* et ont obtenu, là aussi, une inhibition du désenkystement (Dudley *et al.*, 2008). Ceci montre que l'activité sérine protéase serait cruciale au processus de désenkystement chez *A. castellanii*.

### 2.3. Bilan

Cette synthèse bibliographique portant sur l'enkystement et le désenkystement chez les amibes libres met en évidence un réel manque d'information sur ces processus. La majorité des études porte sur les genres *Acanthamoeba* et *Naegleria* en raison de leur pouvoir pathogène. En revanche, il n'existe presque aucune publication faisant référence aux processus de différenciation chez le genre *Hartmannella* et les espèces *Vermamoeba vermiformis* et *Balamuthia mandrillaris*.

Etant donné que les kystes sont beaucoup plus résistants aux traitements de désinfection que les trophozoïtes la plupart des études s'est focalisée sur le processus d'enkystement. Avant 2000, la majorité des études portait sur les facteurs induisant l'enkystement et sur les modifications morphologiques et structurales qui s'opèrent lors du passage du trophozoïte au kyste. Depuis, les chercheurs essayent d'identifier et de comprendre les mécanismes moléculaires mis en jeu lors de l'enkystement.

Concernant le processus de désenkystement, il existe vraiment peu de données. La plupart des travaux de recherche porte sur les changements morphologiques et structuraux

observés lors du désenkystement. Les mécanismes moléculaires impliqués lors du désenkystement ne sont actuellement pas connus.

### **3. Résistance des amibes libres aux traitements de désinfection**

Depuis le début des années 1980, de nombreuses études ont été menées afin d'évaluer l'efficacité des procédés de désinfection vis-à-vis des amibes libres. Cependant, la majorité des travaux menés s'intéresse au genre *Acanthamoeba* qui est responsable de kératites. Ces travaux traitent de biocides utilisés dans le cadre de la désinfection des lentilles de contact. Il n'existe que peu de publications évaluant la résistances des amibes libres aux traitements de désinfection utilisés dans les RECS, les filières de production d'eau potable et les TAR (Loret et *al.*, 2005, 2008a et b ; Srikanth et Berk, 1993 ; Thomas et *al.*, 2004).

Chez les amibes, il est difficile d'évaluer de manière précise l'efficacité des biocides et de comparer les résultats de différentes études car actuellement il n'existe pas de méthode de référence standardisée comme cela est le cas chez certains virus et bactéries. Les méthodes et les souches utilisées diffèrent d'une étude à l'autre. Les milieux et conditions de culture des trophozoïtes, la façon d'enkyster les amibes, la préparation des kystes, l'âge des kystes ou bien encore la technique utilisée pour évaluer la viabilité des kystes après traitement varient selon les études ce qui rend très difficile la comparaison des résultats (Anger et Lally, 2008 ; Buck et *al.*, 2000 ; Hughes et *al.*, 2003a ; Pumidonming et *al.*, 2010). De plus, il a été démontré que l'effet d'un biocide peut varier en fonction de sa formulation (Johnston et *al.*, 2009).

Il existe deux grandes classes de traitements de désinfection : les traitements physiques d'une part et les traitements chimiques d'autre part. Les paragraphes suivants présentent un état de l'art exhaustif des connaissances actuelles sur l'efficacité des différents traitements de désinfection à l'égard des amibes libres.

#### **3.1. Traitements physiques**

##### **3.1.1. Traitements thermiques**

Il est reconnu que les amibes sont sensibles aux températures élevées (> 100 °C) et aux temps de contact prolongés utilisés pour la désinfection et la stérilisation dans de nombreuses applications. Ceci a été démontré, par exemple, pour la stérilisation du matériel chirurgical (Meisler et *al.*, 1985). Les hautes températures ont pour effet d'inactiver les



enzymes, de coaguler les protéines de structure et de bloquer la réplication de l'ADN ce qui entraîne la mort de la cellule. Les températures moins élevées ont une efficacité variable en fonction du genre et de l'espèce considérée et également en fonction de la forme sous laquelle se trouve l'amibe (trophozoïte ou kyste).

Pour le genre *Acanthamoeba* différentes études ont été menées. En 2000, Turner *et al.* ont montré que les trophozoïtes d'*A. castellanii* sont inactivés par une exposition de 30 min à une chaleur humide de 46 °C alors qu'une température de 56 °C est nécessaire pour inactiver les kystes (Turner *et al.*, 2000). En 2002, Aksozek *et al.*, ont démontré que les kystes d'*A. castellanii* ne résistent pas à 5 min à 65 °C (Aksozek *et al.*, 2002). Ces résultats sont divergents avec ceux obtenus par Ludwig *et al.* qui affirment qu'il est nécessaire d'exposer pendant 10 min à une chaleur humide de 80 °C les kystes d'*A. castellanii* et d'*A. polyphaga* pour pouvoir les inactiver (Ludwig *et al.*, 1986). En 2004, Storey *et al.* ont signalé que les kystes provenant de deux souches d'*Acanthamoeba* thermotolérantes, l'une isolée d'un patient atteint de kératite amibienne et l'autre isolée d'un geyser, sont résistants à une exposition de 10 min à une chaleur humide de 80 °C (Storey *et al.*, 2004).

Pour *Balamuthia mandrillaris*, seule représentante du genre *Balamuthia*, Siddiqui *et al.* ont étudié sa résistance aux conditions hostiles. Il semble que cette espèce soit très tolérante aux hautes températures. En effet, ces auteurs ont montré que les trophozoïtes et les kystes de *B. mandrillaris* étaient respectivement viables après une exposition de 60 min à 60 °C et de 60 min à 70 °C (Siddiqui *et al.*, 2008).

Les *Naegleria spp.* semblent moins résistantes à la température. En 1978, Chang a montré que les trophozoïtes de *Naegleria* résistent à 30, 10, 5, 1 et 0,5 min et les kystes à 120, 60, 30, 7 et 2,5 min à des températures respectives de 51, 55, 58, 63 et 65 °C (Chang, 1978).

Pour ce qui concerne l'espèce *Vermamoeba vermiformis*, Kutcha *et al.* ont constaté que seul 0,05 % des trophozoïtes et des kystes survivent après 30 min passées à 55 °C et que ni les trophozoïtes ni les kystes ne résistent à une exposition de 30 min à 60 °C (Kutcha *et al.*, 1993).

### 3.1.2. Filtration

Peu d'études se sont intéressées à l'efficacité des procédés de filtration pour l'élimination des amibes libres.

La première étude a été réalisée en 2001 par Hoffmann et Michel. Ils ont suivi la prévalence des amibes libres au cours du procédé de désinfection de l'eau dans six usines de potabilisation. Ils ont observé, après l'étape de floculation-sédimentation-filtration une réduction d'un facteur 10 à 100 fois de la concentration initiale en amibes (Hoffmann et Michel, 2001). En 2005, Jeong et Yu ont fait une étude similaire dans trois usines de traitement d'eau potable. Après l'étape de précipitation, ils ont retrouvé, dans les trois usines, la présence d'amibes libres. Après la première étape de filtration par sable, ils ont noté la présence d'amibes libres dans deux usines. Suite à la deuxième étape de filtration, réalisée avec un filtre à charbon actif, ils n'ont pas retrouvé d'amibes libres (Jeong et Yu, 2005). En 2008, Thomas *et al.* ont également investigué la présence d'amibes libres lors des différentes étapes du processus de potabilisation des eaux. Leurs résultats sont en adéquation avec les deux études précédentes. Ainsi, ils ont noté une diminution de 10 à 100 fois du nombre d'amibes libres après l'étape de filtration sur sable et ont également observé une diminution de la diversité amibienne suite à cette étape. Après l'étape de filtration sur charbon actif granulaire, ils n'ont plus détecté la présence d'amibes libres (Thomas *et al.*, 2008).

Les procédés de filtration semblent donc efficaces pour l'élimination des amibes libres au cours du traitement des eaux pour leur potabilisation.

### 3.1.3. Irradiation

#### 3.1.3.1. Ultraviolets (UV)

Les radiations UV sont largement utilisées pour la désinfection de l'eau et ont une action létale sur les microorganismes grâce à la formation de dimères de thymine dans l'ADN qui bloquent la réplication. Les radiations UV ont également un effet sur les ARN et les enzymes.

Comparées à d'autres protozoaires, comme *Cryptosporidium parvum*, il existe moins de données sur l'efficacité des radiations UV à l'encontre des amibes libres. En 2006, Hijnen *et al.* ont publié une revue sur la résistance aux radiations UV de différents virus, bactéries, kystes et ookystes de protozoaires. Il en ressort que les virus, les spores de bactéries et les kystes d'*Acanthamoeba* sont les plus résistants aux radiations UV (Hijnen *et al.*, 2006). En 2003, Maya *et al.* ont évalué la résistance des bactéries et des amibes aux traitements par radiations UV. Ils ont montré que l'inactivation des amibes requiert des doses plus élevées en radiations que celle des bactéries. Ils ont démontré que pour avoir une réduction de 2  $\log_{10}$  des concentrations en amibes, il fallait les exposer à des radiations de  $60 \text{ mJ.cm}^{-2}$ . Dans cette étude, ils ont également comparé la résistance des trophozoïtes et des kystes et ont montré que les trophozoïtes sont sensibles aux radiations UV alors que les kystes y sont très résistants (Maya *et al.*, 2003).

Plusieurs études se sont intéressées à la résistance des kystes d'*Acanthamoeba spp.* aux radiations UV. Siddiqui *et al.* ont étudié les kystes d'*A. castellanii* et ont démontré qu'ils sont résistants à une exposition aux UV-B de  $800 \text{ mJ.cm}^{-2}$  (Siddiqui *et al.*, 2008). La même année, Loret *et al.* ont montré que pour obtenir une réduction de 4  $\log_{10}$  de la concentration en kystes chez *A. polyphaga* une exposition à des radiations UV de  $40 \text{ mJ.cm}^{-2}$  était nécessaire (Loret *et al.*, 2008b). Lonnen *et al.* ont évalué l'efficacité des traitements par irradiation solaire (SODIS) et par photo-catalyse solaire ( $\text{TiO}_2$ ) chez *A. polyphaga*. Ils ont constaté que les trophozoïtes sont sensibles à ces traitements alors que les kystes ne le sont pas (Lonnen *et al.*, 2005). Une autre étude a montré que les kystes d'*A. polyphaga* sont résistants au traitement par irradiation solaire ( $85 \text{ mJ.s}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ ) (Heaselgrave *et al.*, 2006). Cependant, Heaselgrave *et al.* ont montré qu'en associant ce traitement par irradiation solaire avec une augmentation de la température de l'eau il y avait une diminution de la viabilité. Après 6 h de traitement à des températures de 45 et 50 °C, ils ont constaté respectivement une réduction de 1,2 et 3,6  $\log_{10}$ . Après 4 h de traitement à 55 °C, ils ont observé une réduction de 3,3  $\log_{10}$  (Heaselgrave *et al.*, 2006).

*B. mandrillaris* est résistante à une exposition aux UV-B de  $200 \text{ mJ.cm}^{-2}$ . Cette espèce est plus sensible aux radiations UV-B qu'*A. polyphaga* (Siddiqui *et al.*, 2008).

Concernant le genre *Naegleria*, une seule publication relate leur résistance aux radiations UV (Hillebrandt et Müller, 1991). Elle montre que 61 % des kystes de *N. gruberi* sont encore viables après une exposition aux UV de  $21,6 \text{ mJ.cm}^{-2}$ . Les auteurs ont également démontré, qu'en traitant les amibes avec des inhibiteurs des mécanismes de réparation de l'ADN, l'efficacité des radiations UV est augmentée. Ceci témoigne de la présence de mécanismes efficaces de réparation de l'ADN chez les *Naegleria* (Hillebrandt et Müller, 1991).

Il n'existe, actuellement, aucune publication faisant mention de la résistance aux radiations UV des amibes appartenant aux genres *Vermaoeba* et *Hartmannella*.

### 3.1.3.2. Rayons gamma

Les radiations gamma sont utilisées dans de nombreux procédés de désinfection et de stérilisation. Elles sont utilisées dans différents secteurs d'activité tels que l'agroalimentaire, le pharmaceutique ou bien encore le médical. Les radiations gamma sont des sources hautement énergétiques, capables de pénétrer facilement dans la cellule et de créer des dommages au niveau de l'ADN et de la structure moléculaire entraînant la mort de la cellule (McDonnell, 2007).

Une seule étude a été menée sur la résistance des amibes libres aux radiations gamma. Cette étude a été réalisée par Aksozek *et al.* et souligne que les kystes d'*A. castellanii* sont résistants à une exposition aux radiations gamma de l'ordre de 2,5 kGy (Aksozek *et al.*, 2002). A titre d'exemple, les kystes de *Giardia lamblia*, un autre protozoaire, sont sensibles à une exposition dix fois plus faible (Sundermann et Estridge, 2010). Ceci suggère que les amibes du genre *Acanthamoeba* ont des mécanismes de réparation de l'ADN très efficaces.

### 3.1.3.3. Rayons X

Les rayons X, comme les radiations gamma, sont hautement énergétiques et ont un fort pouvoir pénétrant dans les cellules. A haute dose, ils sont capables de modifier la structure moléculaire de la cellule et d'endommager l'ADN. L'utilisation des rayons X est largement répandue en médecine pour la radiographie et la radiothérapie. Cependant, ils ne sont que peu utilisés dans les processus de désinfection.

Seule une étude s'est intéressée à la résistance des amibes libres aux rayons X. Cette étude a été réalisée sur des kystes de *N. gruberi* et les auteurs ont montré qu'ils étaient très résistants aux rayons X comparés à d'autres protozoaires (Hillebrandt et Müller, 1991). En effet après une exposition à 17,4 kGy, 60 % des kystes de *N. gruberi* sont toujours viables, alors que chez *Dictyostelium discoideum* seul 50 % des kystes sont viables après une exposition de 2 kGy (Deering, 1968). Ceci suggère que, comme les amibes du genre *Acanthamoeba*, les amibes du genre *Naegleria* ont des mécanismes de réparation de l'ADN très efficaces.

#### 3.1.3.4. Micro-ondes

Les micro-ondes sont capables de mettre en mouvement les molécules d'eau contenue dans les cellules, et de créer ainsi de la chaleur. Hiti *et al.* se sont intéressés à l'effet de ces ondes sur les trophozoïtes et les kystes de différentes espèces d'*Acanthamoeba*. Ils ont montré que les trophozoïtes et les kystes d'*Acanthamoeba* spp. sont très sensibles à ces ondes et qu'ils ne résistent pas à 3 min d'exposition aux micro-ondes (2450 MHz, 600 W) (Hiti *et al.*, 2001).

#### 3.1.4. Très basses températures

Les très basses températures peuvent avoir un effet létal sur certains microorganismes qui est dû à une déstructuration causée par la congélation de l'eau contenue dans la cellule. La congélation de l'eau dans la cellule entraîne une perturbation de la perméabilité due à la solidification des lipides membranaires et une augmentation de la pression osmotique dans la cellule. Enfin, elles peuvent entraîner un écrasement ou une perforation de la cellule liée à l'action mécanique des cristaux de glace.

Deux travaux de recherche, l'un *in vitro* (Matoba *et al.*, 1989) et l'autre à l'échelle clinique (Meisler *et al.*, 1986), se sont intéressés à la résistance d'*Acanthamoeba* spp. à plusieurs cycles rapides de congélation à -100 °C. Ces travaux ont montré que les trophozoïtes d'*Acanthamoeba* spp. sont sensibles à la cryothérapie alors que les kystes y sont résistants.

Certains auteurs se sont également interrogés sur la résistance des amibes libres à des cycles répétés de congélation-décongélation. Ils ont montré que ces cycles ont peu

d'effet sur les kystes de *B. mandrillaris* (5 cycles de -80 °C à 37 °C) (Siddiqui *et al.*, 2008) et sur les kystes d'*A. castellanii* (5 cycles de -160 °C à 45 °C) (Aksozek *et al.*, 2002).

### 3.1.5. Arcs pulsés électriques

Les arcs pulsés électriques sont capables de détruire les barrières membranaires des bactéries et des levures (Schrive, 2005). Ceci est dû d'une part, à la polarisation des cellules et d'autre part, aux ondes de choc produites par les arcs. Une étude a été menée sur la résistance des trophozoïtes de *N. lovaniensis* aux arcs pulsés électriques. Elle a montré que les trophozoïtes  $\gamma$  sont sensibles (Vernhes *et al.*, 2002). Cependant, aucune information n'existe sur la résistance des kystes aux arcs pulsés électriques.

## **3.2. Traitements chimiques**

### 3.2.1. Halogènes

Le chlore, le brome et l'iode sont des composés halogénés largement utilisés pour la désinfection. Ces composés, une fois dissous dans l'eau, libèrent des espèces réactives qui possèdent un fort pouvoir biocide. Actuellement leur mode d'action n'est pas entièrement connu. Il semblerait, cependant, que le phénomène d'oxydation soit prépondérant (McDonnell, 2007). Ces composés sont largement utilisés dans le domaine médical et pour la désinfection de l'eau et des surfaces. L'efficacité des composés halogénés varie en fonction de plusieurs paramètres comme la teneur en matières organiques et inorganiques et les caractéristiques physico-chimiques de l'eau. Par exemple, pour le chlore, la forme HOCl, qui est l'espèce la plus biocide, est la plus active pour des valeurs de pH comprises entre 4 et 7. La température influence aussi l'efficacité de ces composés halogénés, les températures froides entraînant une diminution de l'activité biocide.

#### 3.2.1.1. Chlore et ses composés

Le chlore peut être utilisé sous différentes formes pour la désinfection : sous forme de gaz, le dichlore ( $\text{Cl}_2$ ), sous forme anhydre avec l'hypochlorite de sodium ( $\text{NaClO}$ ) qui est également trouvé en solution aqueuse communément appelée « eau de javel », ou sous forme de composés inorganiques comme la monochloramine.

✓ Le chlore (Cl<sub>2</sub> et NaClO)

De nombreuses études se sont intéressées à la résistance des amibes libres aux traitements chlorés. La plupart des études ont été réalisées *in vitro*, il en ressort que le chlore à une efficacité variable en fonction de la forme de différenciation de l'amibe (trophozoïte ou kyste) et en fonction du genre et de l'espèce. Les paragraphes qui suivent recensent quelques-uns de ces travaux.

Chez *Acanthamoeba* spp., plusieurs études *in vitro* ont été menées et certaines font référence à la résistance des trophozoïtes aux traitements chlorés. En 1980, Cursons *et al.* ont étudié la résistance des trophozoïtes d'*A. castellanii* et d'*A. culbertsoni* aux traitements chlorés. Ils ont montré qu'une exposition des trophozoïtes d'*A. castellanii* et d'*A. culbertsoni* à des concentrations en chlore respectivement de 1,02 mg.L<sup>-1</sup> et 1,25 mg.L<sup>-1</sup> pendant 30 min permettait d'inactiver la totalité des cellules (Cursons *et al.*, 1980). Une autre étude a mesuré la concentration en chlore minimale qui permet d'inactiver les trophozoïtes d'*Acanthamoeba* spp. et a déterminé qu'une exposition pendant 8 h à une concentration de 1 mg.L<sup>-1</sup> est nécessaire (Critchley et Bentham, 2009). Une étude récente a montré qu'en exposant les trophozoïtes d'*A. castellanii* pendant 30 s à 5 mg.L<sup>-1</sup> 99,9 % des cellules perdent leur cultivabilité (Mogoa *et al.*, 2010). Cependant, seulement 90 % des cellules sont perméabilisées ce qui suggère que 10 % des trophozoïtes sont viables mais non cultivables après traitement. Les auteurs ont également souligné une diminution de la taille des cellules et une augmentation du niveau de thiol intracellulaire. Mogoa *et al.* ont aussi étudié les changements structuraux induits par le chlore par microscopie électronique. Ainsi, ils ont observé une condensation des cellules, la disparition des pseudopodes et des modifications dans les organelles telles que le noyau et les mitochondries (Mogoa *et al.*, 2010). Les travaux conduits par Howard et Inglis ont montré des résultats divergents par rapport aux précédents (Howard et Inglis, 2005). Dans cette étude, les trophozoïtes d'*A. astronyxis* ont été traités à des concentrations en chlore beaucoup plus élevées (10, 20, 50 et 100 mg.L<sup>-1</sup> pendant 30 min). Après chaque traitement, même si une forte diminution de la survie a été notée, des trophozoïtes viables ont été énumérés (Howard et Inglis, 2005). L'étude de Garcia *et al.* s'est intéressée à la résistance des trophozoïtes d'*A. polyphaga*, infectés ou non par *L. pneumophila*, à l'hypochlorite de sodium. Les traitements à des concentrations inférieures ou égales à 128 mg.L<sup>-1</sup> pendant 22 ou 46 h n'ont aucun effet sur les trophozoïtes

d'*A. polyphaga*. Les traitements à 256 mg.L<sup>-1</sup> montrent une réduction supérieure à 80 % de la viabilité des trophozoïtes non-infectés et comprise entre 7 et 40 % pour ceux infectés. Ces mêmes auteurs ont observé que pour tuer 50 % des trophozoïtes infectés, une concentration en NaOCl de 512 mg.L<sup>-1</sup> est nécessaire. Ceci montre que les trophozoïtes d'*A. polyphaga* infectés par *L. pneumophila* sont plus résistants à l'hypochlorite de sodium que les trophozoïtes non infectés. Les *L. pneumophila* qui ont séjournées dans les amibes sont également plus résistantes à l'hypochlorite de sodium que celles cultivées en absence d'amibes. Ceci laisse sous-entendre une protection réciproque envers l'hypochlorite de sodium entre *A. polyphaga* et *L. pneumophila* (Garcia *et al.*, 2007).

Plusieurs études ont montré que les kystes d'*Acanthamoeba* spp. sont très résistants aux traitements chlorés. En 1976, De Jonckheere et van de Voorde ont montré que les kystes d'*Acanthamoeba* spp. sont résistants à une exposition de 4 mg.L<sup>-1</sup> pendant 3 h. Dans cette étude, les kystes provenant d'une souche d'*A. culbertsoni* ont résisté à une exposition de 40 mg.L<sup>-1</sup> pendant 3 h (De Jonckheere et van de Voorde, 1976). Une autre étude a mesuré la concentration en chlore minimale qui permet d'inactiver les kystes d'*Acanthamoeba* spp. et a abouti à une concentration de 5 mg.L<sup>-1</sup> pour une exposition de 8 h (Critchley et Bentham, 2009). Storey *et al.* ont, quant à eux, montré que les kystes d'*Acanthamoeba* spp. résistent à une exposition à 100 mg.L<sup>-1</sup> pendant 10 min (Storey *et al.*, 2004). D'autres études se sont intéressées à la résistance aux traitements chlorés des kystes d'*A. polyphaga* infectés par des bactéries résistantes à la phagocytose amibienne. En 1990, Kilvington et Price ont infecté des trophozoïtes d'*A. polyphaga* avec *L. pneumophila*. Par la suite, ils ont mis les trophozoïtes dans du tampon d'enkystement et ont effectué différents traitements chlorés. Il en ressort que les kystes d'*A. polyphaga* infectés ou non sont résistants à une exposition au chlore de 50 mg.L<sup>-1</sup> pendant 18 h. Ils ont également démontré qu'après ce traitement chloré les *L. pneumophila* contenues dans les kystes sont viables et cultivables (Kilvington et Price, 1990). En 2006, Adékambi *et al.* ont réalisé le même type d'expérimentation avec des bactéries appartenant au genre *Mycobacterium* qui sont également résistantes à la phagocytose amibienne. Ils ont montré que les kystes d'*A. polyphaga* infectés ou non résistent à une exposition au chlore de 15 mg.L<sup>-1</sup> pendant 24 h. Comme précédemment les *Mycobacterium* spp. issues des kystes d'*A. polyphaga* traités au chlore sont viables et cultivables (Adékambi *et al.*, 2006). Les kystes d'*A. polyphaga*, en plus d'être très résistants aux traitements chlorés, protègent les bactéries intracellulaires de ces traitements auxquels



elles sont sensibles quand elles sont sous forme planctonique. Une autre étude s'est intéressée à la résistance des kystes d'*Acanthamoeba* spp. à l'hypochlorite de sodium (Coulon *et al.*, 2010). Dans cette étude les auteurs ont traité les kystes de diverses souches d'*Acanthamoeba* avec différentes concentrations en hypochlorite de sodium et plusieurs temps de contact. Pour une exposition de 30 min à  $250 \text{ mg.L}^{-1}$ , les kystes de certaines souches d'*Acanthamoeba* sont encore viables alors que d'autres sont totalement inactivés, ce qui montre que la résistance des kystes à l'hypochlorite de sodium varie en fonction des souches. Cependant pour une exposition de 10 min à  $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ , l'ensemble des kystes est inactivé (Coulon *et al.*, 2010).

Plusieurs études *in vitro* ont été menées sur le genre *Naegleria*. En 1980, Cursons *et al.* ont étudié la résistance des trophozoïtes de *Naegleria* spp. aux traitements chlorés. Il en ressort que les trophozoïtes de *Naegleria* spp. sont sensibles à une exposition au chlore de  $0,79 \text{ mg.L}^{-1}$  pendant 30 min. Ainsi, les trophozoïtes de *Naegleria* spp. sont plus sensibles aux traitements chlorés que les trophozoïtes d'*Acanthamoeba* spp. (Cursons *et al.*, 1980). En ce qui concerne les kystes de *N. fowleri* et *N. gruberi*, De Jonckheere et van de Voorde ont montré qu'une exposition à  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de chlore pendant respectivement 1 h et 3 h suffit pour les inactiver (De Jonckheere et Van de Voorde, 1976). Chang, quant à lui, a montré que les kystes de *Naegleria* spp. sont inactivés par des expositions de 5 à 30 min à des concentrations en chlore de  $1 \text{ à } 7 \text{ mg.L}^{-1}$  (Chang, 1978). Les kystes de *Naegleria* spp. sont beaucoup moins résistants aux traitements chlorés que les kystes d'*Acanthamoeba* spp..

Pour l'espèce *B. mandrillaris* une seule publication fait référence à sa résistance aux traitements chlorés. Elle a montré que les kystes de *B. mandrillaris* sont résistants à une exposition de  $25 \text{ mg.L}^{-1}$  de chlore pendant 1 h (Siddiqui *et al.*, 2008). Ces kystes sont beaucoup plus résistants au chlore que ceux de *Naegleria* spp..

Comme pour *B. mandrillaris*, peu de publications traitent spécifiquement de la résistance au chlore de *Vermamoeba vermiformis* et *Hartmannella* spp.. Kutcha *et al.* ont comparé la résistance des trophozoïtes et des kystes de *V. vermiformis* aux traitements chlorés. Ils ont tout d'abord traité les trophozoïtes et les kystes avec  $2 \text{ mg.L}^{-1}$  de chlore pendant 30 min. Après ce traitement, seuls 7 % des trophozoïtes étaient viables alors que 49 % des kystes l'étaient. A  $4 \text{ mg.L}^{-1}$  de chlore, aussi bien pour les trophozoïtes que les

kystes, seuls 0,1 % des cellules sont viables et à  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  les trophozoïtes comme les kystes sont inactivés (Kutchka *et al.*, 1993). L'étude de Critchley et Bentham a permis d'observer que les expositions des trophozoïtes et des kystes de *V. vermiformis* à des concentrations en chlore respectivement de  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  et  $5 \text{ mg.L}^{-1}$  pendant 8 h sont les conditions minimales permettant d'inactiver ces cellules (Critchley et Bentham, 2009). Les trophozoïtes et les kystes de *V. vermiformis* semblent plus résistants aux traitements chlorés que ceux de *Naegleria* spp.. Par contre les kystes de *V. vermiformis* sont plus sensibles aux traitements chlorés que les kystes d'*Acanthamoeba* spp. et les kystes de *B. mandrillaris*.

Concernant le genre *Vahlkampfia*, une seule publication traite de sa résistance aux traitements chlorés. Dans cette étude les auteurs ont mesuré la concentration en chlore minimale qui permet d'inactiver les trophozoïtes et les kystes de *Vahlkampfia* spp.. Ainsi, il faut exposer pendant 8 h les trophozoïtes à une concentration de  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  et les kystes à une concentration de  $2 \text{ mg.L}^{-1}$  pour les inactiver totalement (Critchley et Bentham, 2009).

D'autres études ont été réalisées sur des bancs d'essais simulant des réseaux d'eau domestiques à échelle réelle. En 2004, Thomas *et al.* ont traité en continu pendant trois mois un banc d'essai avec une concentration en chlore de  $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ , communément retrouvée dans les réseaux de distribution d'eau. Tout au long de l'expérimentation, ils ont retrouvé des amibes libres dans leurs prélèvements, ce qui prouve qu'elles sont résistantes aux traitements chlorés classiques (Thomas *et al.*, 2004). En 2005, Loret *et al.* ont traité un banc d'essai similaire avec une concentration en chlore de  $2 \text{ mg.L}^{-1}$  en continu pendant trois mois et ont fait un suivi de la population d'amibes libres dans l'eau circulant dans les boucles et dans le biofilm. Au bout des trois mois, ils ont observé dans l'eau une réduction de  $2,8 \log_{10}$  de la concentration en amibes. Au niveau du biofilm, il n'y a pas eu de changement dans la concentration amibienne mais il faut noter que la concentration initiale en amibes y était faible (entre 10 et 50 kystes par  $\text{cm}^2$ ) (Loret *et al.*, 2005). Les concentrations en chlore traditionnellement utilisées dans les réseaux d'eau permettent de limiter le nombre d'amibes libres dans l'eau circulante mais ne les éliminent pas.

Le comportement des trophozoïtes et des kystes des amibes libres vis-à-vis d'un traitement au chlore est résumé dans le tableau 4. Les données regroupées dans ce tableau sont issues des travaux cités dans les paragraphes précédents.

Tableau 4 : Résumé du comportement des amibes libres vis-à-vis des traitements chlorés.

| Genre / espèce                 | Forme       | Niveau de résistance |
|--------------------------------|-------------|----------------------|
| <i>Acanthamoeba</i> spp.       | Trophozoïte | +                    |
|                                | Kyste       | +++                  |
| <i>Balamuthia mandrillaris</i> | Kyste       | +++                  |
| <i>Naegleria</i> spp.          | Trophozoïte | +                    |
|                                | Kyste       | ++                   |
| <i>Vermamoeba vermiformis</i>  | Trophozoïte | +                    |
|                                | Kyste       | ++                   |
| <i>Vahlkampfia</i> spp.        | Trophozoïte | +                    |
|                                | Kyste       | ++                   |
| Amibes libres*                 |             | +++                  |

Forte résistance : +++ ; Résistance modérée : ++ ; Faible résistance

\*Etudes réalisées sur banc d'essais

✓ La monochloramine (NH<sub>2</sub>Cl)

Plusieurs études ont été réalisées *in vitro* pour évaluer la portée anti-amibienne de la monochloramine. En 2005, Howard et Inglis ont traité les trophozoïtes d'*A. astronyxis* avec des concentrations élevées en monochloramine (10, 20, 50 et 100 mg.L<sup>-1</sup> pendant 30 min). Après chaque traitement, même si une forte diminution de la survie a été notée, des trophozoïtes viables ont été observés (Howard et Inglis, 2005). En 2003, Ercken *et al.* ont évalué la résistance à la monochloramine des kystes de *N. lovaniensis* et ont montré que pour éliminer 90 % des kystes des expositions à des concentrations en monochloramine de 1,97 mg.L<sup>-1</sup> et de 3,94 mg.L<sup>-1</sup> étaient respectivement nécessaires pour des températures de 35 °C et de 15 °C/25 °C. Pour inactiver la totalité des kystes, les auteurs ont montré qu'il faut exposer les cultures à des concentrations de 3,94 mg.L<sup>-1</sup> et de 7,89 mg.L<sup>-1</sup> à des températures respectives de 35 °C et 15 °C/25 °C (Ercken *et al.*, 2003). Ainsi, il apparaît que plus la température est élevée plus l'action de la monochloramine est accrue sur les kystes de *N. lovaniensis*.

Deux études ont été réalisées sur des bancs d'essais reproduisant des réseaux d'eau domestiques à échelle réelle et ont montré une inefficacité de ce traitement vis-à-vis de l'élimination des amibes libres. En 2004, Thomas *et al.* ont traité en continu pendant trois mois un banc d'essais avec une concentration en monochloramine de 0,5 mg.L<sup>-1</sup>. Ils ont retrouvé tout au long de l'expérimentation la même concentration en amibes libres dans leurs prélèvements d'eau (Thomas *et al.*, 2004). En 2005, Loret *et al.* ont traité un banc d'essai similaire en continu pendant trois mois avec une concentration en monochloramine plus élevée (2 mg.L<sup>-1</sup>). Ils ont fait un suivi de la population d'amibes libres dans l'eau circulant dans les boucles et dans le biofilm. Au bout des trois mois, ils n'ont observé aucune réduction de la concentration en amibes libres, aussi bien dans l'eau que dans le biofilm (Loret *et al.*, 2005).

### 3.2.1.3. Brome

Le brome est utilisé comme alternative au chlore pour désinfecter l'eau dans les piscines et les stations thermales. Il est également utilisé pour contrôler le développement des microorganismes dans les processus industriels. Peu de publications font état de la réponse des amibes libres au brome.

En 1976, De Jonckheere et Van de Voorde ont comparé la résistance des kystes d'*A. culbertsoni* et de *N. fowleri* au brome. Pour cela, ils ont incubé les kystes pendant 24 h à des concentrations comprises entre 0,4 et 1 mg.L<sup>-1</sup>. A ces concentrations le brome n'a eu aucun effet sur la viabilité des kystes d'*A. culbertsoni* et de *N. fowleri*. En 2009, Critchley et Bentham ont comparé la résistance au brome des trophozoïtes et des kystes d'*Acanthamoeba* spp., de *V. vermiformis* et de *Vahlkampfia* spp. et ont mesuré la concentration minimale en brome qui permet d'inactiver totalement les trophozoïtes et les kystes de chaque genre amibien. La durée d'exposition a été de 8 h et les auteurs ont observé que pour inactiver respectivement les trophozoïtes et les kystes d'*Acanthamoeba* spp. des doses de brome de 5 mg.L<sup>-1</sup> et de 10 mg.L<sup>-1</sup> ont été nécessaires. De la même façon, ces valeurs sont de 1 mg.L<sup>-1</sup> et de 5 mg.L<sup>-1</sup> pour *V. vermiformis* et de 1 mg.L<sup>-1</sup> et de 2 mg.L<sup>-1</sup> chez *Vahlkampfia* spp.. En résumé, les *Acanthamoeba* spp. sont plus résistantes au brome que *V. vermiformis* et que *Vahlkampfia* spp. (Critchley et Bentham, 2009).

#### 3.2.1.4. Iode et les iodophores

L'iode et les iodophores (complexe formé d'iode et d'une molécule organique) comme la povidone iodée sont utilisés comme antiseptique et comme désinfectant principalement dans le domaine médical.

En 1976, De Jonckheere et Van de Voorde ont comparé la résistance des kystes d'*A. culbertsoni* et de *N. fowleri* à l'iode et à un iodophore. Après 24 h d'incubation, les résultats ont montré que pour des concentrations d'iode et d'iodophore comprises entre 2 et 5 mg.L<sup>-1</sup>, les kystes d'*A. culbertsoni* sont plus résistants que ceux de *N. fowleri* (De Jonckheere et Van de Voorde, 1976). Deux ans plus tard, Chang a montré qu'une exposition de 12,5 min à 3,5 mg.L<sup>-1</sup> d'iode inactive les kystes de *N. gruberi* (Chang, 1978). Des études plus récentes se sont intéressées à l'effet de la povidone iodée sur la survie des amibes libres. En 1998, Gatti *et al.* ont testé l'effet de la povidone iodée sur les trophozoïtes et les kystes de différentes espèces et souches d'*Acanthamoeba*. Pour cela ils ont utilisé une solution commerciale, la bétadine®, diluée dans de l'eau. Ils ont montré que la povidone iodée a un effet variable en fonction des espèces et des souches considérées. Les trophozoïtes les plus sensibles et les plus résistants sont respectivement inactivés par des concentrations de 0,031-0,125 % et de 2,5-5 %. Quant aux kystes, selon l'espèce et la souche considérées, l'inactivation est obtenue pour des concentrations comprises entre 0,25 et 10 % (Gatti *et al.*, 1998). En 2010, Martin-Navarro *et al.* ont étudié la sensibilité des trophozoïtes de trois souches cliniques d'*Acanthamoeba* à la povidone iodée et à la povidone iodée formulée (Bioclen FR One Step®). Ils ont mesuré la concentration nécessaire pour inhiber 50 % des trophozoïtes. Pour cela, des concentrations respectivement comprises entre 90 et 370 mg.L<sup>-1</sup> et 60 et 195 mg.L<sup>-1</sup> ont été enregistrées pour la povidone iodée non formulée et pour la povidone iodée formulée (Martin-Navarro *et al.*, 2010). En fonction des souches, il existe donc une variabilité de la résistance des trophozoïtes à la povidone iodée. La formulation associée joue également un rôle dans l'efficacité de la povidone iodée.

#### 3.2.2. Biocides cationiques

Les biocides cationiques sont des molécules chargées positivement qui créent des liaisons électrostatiques avec les sites négatifs des membranes cellulaires. Cela provoque une altération de la paroi de la cellule entraînant la fuite des éléments cytoplasmiques et

une inactivation de certaines enzymes provoquant la mort des cellules (Gilbert et Moore, 2005). Les biocides cationiques sont répandus, ils se retrouvent dans les pansements, les savons antimicrobiens, les bains de bouche, les produits capillaires ou encore dans les désinfectants de surface (McDonnell, 2007). Les biocides cationiques les plus répandus sont les biguanides et les ammoniums quaternaires (QACs). Les principales biguanides sont la chlorhexidine (CHG), le polyaminopropyl biguanide (PAPB) et le polyhexaméthylène biguanide (PHMB). Les biguanides sont utilisées dans le cadre de traitement de kératites amibiennes causées par *Acanthamoeba* spp.. Elles sont également utilisées, en prévention, à plus faible concentration, dans les produits pour lentilles de contact. Les ammoniums quaternaires sont plutôt utilisés comme désinfectants de surface et comme conservateurs ; c'est pourquoi l'effet des QACs sur les amibes libres est peu étudié.

### 3.2.2.1. Biguanides

#### ✓ La chlorhexidine (CHG)

Plusieurs études se sont intéressées à la résistance des *Acanthamoeba* spp. aux solutions de nettoyage des lentilles de contact contenant de la chlorhexidine (CHG). Une première étude a été réalisée en 1989, elle s'est intéressée à la résistance des trophozoïtes et des kystes d'*A. polyphaga*. Les trophozoïtes d'*A. polyphaga* sont sensibles à une solution de lentilles de contact contenant de la CHG, une exposition de 4 h suffit à les inactiver. Cependant, les kystes sont bien plus résistants, même après 2 j d'incubation les kystes sont encore viables (Penley *et al.*, 1989). En 1990, Silvano *et al.* ont réalisé une étude similaire sur les trophozoïtes et les kystes d'*A. polyphaga* et *A. castellanii*. Ils ont montré que les solutions de lentilles de contact contenant de la CHG sont efficaces envers les trophozoïtes. En ce qui concerne les kystes, ils ont eu des résultats divergents avec ceux de Penley *et al.* et ont montré que ceux-ci sont sensibles à la CHG même avec un temps d'exposition court. Ces auteurs ont également montré que la résistance à la CHG est fonction des espèces. En effet, l'inactivation des kystes d'*A. polyphaga* requiert un temps d'exposition plus long que celle des kystes d'*A. castellanii* (Silvano *et al.*, 1990). En 1991, une autre étude réalisée sur *A. culbertsoni* a montré que les kystes résistent à une solution de lentilles de contact contenant de la CHG (Connor *et al.*, 1991). Hugo *et al.*, quant à eux, ont montré que les kystes d'*A. castellanii* sont sensibles à des solutions de lentilles de contact contenant 0,005

ou 0,006 % de CHG. Après une exposition de 45 s aux solutions contenant 0,005 et 0,006 % de CHG, 67 % et 6 % des kystes sont respectivement viables. Pour les deux solutions, après 4 h d'exposition, tous les kystes sont inactivés (Hugo *et al.*, 1991). Ainsi, il apparaît que l'efficacité de la CHG envers les kystes d'*Acanthamoeba* spp. varie d'une étude à l'autre. Ces résultats divergents peuvent s'expliquer par des différences de formulation et de temps de contact. En 1989, Brandt *et al.* ont testé l'efficacité de quatre solutions pour lentilles de contact contenant toutes 0,005 % de CHG, 0,001 % de thimerosal (composé chimique organo-mercuriel) et 0,1 % d'EDTA envers les kystes d'*A. castellanii*, *A. polyphaga* et *A. culbertsoni*. Dans la première solution, l'ensemble des kystes a survécu pendant deux semaines. Pour la deuxième, les kystes d'*A. castellanii* et *A. culbertsoni* ont résisté 1 j et ceux d'*A. polyphaga* 3 j. Pour les troisième et quatrième solutions, les kystes d'*A. castellanii* et *A. culbertsoni* peuvent survivre 3 j et ceux d'*A. polyphaga* 6 j. Brandt *et al.* ont alors testé une cinquième solution qui contenait 0,005 % de CHG et 0,001 % de thimerosal. Dans cette solution, les kystes provenant des trois espèces sont restés viables pendant 3 j. Ainsi, il ressort de cette étude que la formulation de la solution de lentilles de contact joue donc sur l'efficacité de la CHG et qu'il existe des variations de résistance en fonction des espèces. En effet, les kystes provenant d'*A. polyphaga* semblent plus résistants à la CHG que ceux d'*A. castellanii* et *A. culbertsoni* (Brandt *et al.*, 1989). Dix ans plus tard, Johnston *et al.* ont testé l'efficacité d'une solution pour lentilles de contact contenant 0,003 % de CHG gluconate et 0,0005 % de polyaminopropyl biguanide (PAPB) sur les kystes d'*A. castellanii*, *A. polyphaga* et *A. hatchetti*. D'après leurs résultats, cette solution semble être inefficace envers les kystes provenant des trois espèces (Johnston *et al.*, 2009). Hugo *et al.* ont montré que les kystes d'*Acanthamoeba* spp. pouvaient survivre jusqu'à deux semaines dans une solution contenant 0,005 % de CHG (Hugo *et al.*, 1991). Une autre étude a testé l'efficacité d'une solution contenant 0,0075 % de CHG et 0,0025 % de thimerosal sur les trophozoïtes et kystes d'*A. castellanii* (Zanetti *et al.*, 1995). Cette solution, quant à elle, semble très efficace pour l'élimination d'*A. castellanii*. Les trophozoïtes et les kystes sont respectivement inactivés après 3 h et 9 h (Zanetti *et al.*, 1995). L'évaluation de l'efficacité de la CHG a également été menée sur des kystes d'*Acanthamoeba* spp. isolées à partir de patients atteints de kératite. Ainsi, Kim et Hahn ont défini que les concentrations minimales de CHG nécessaires pour inactiver les kystes d'*Acanthamoeba* spp. en 8 et 48 h d'incubation sont

respectivement comprises entre 0,00047 % - 0,00177 % et 0,00032 % - 0,0012 % (Kim et Hahn, 1999).

✓ Le polyaminopropyl biguanide (PAPB)

En 1990 et 1991, Silvany *et al.* ont réalisé des études sur la résistance des trophozoïtes et des kystes d'*A. polyphaga* et *A. castellanii* à des solutions pour lentilles de contact contenant du polyaminopropyl biguanide (PAPB). Ils ont montré que les solutions contenant 0,00005 % de PAPB sont inefficaces pour l'élimination des *Acanthamoeba* spp. alors que celles en contenant 0,0015 % semblent l'être (Silvany *et al.*, 1990 et 1991). En 1994, Burger *et al.* ont obtenu des résultats similaires en testant l'efficacité de différentes concentrations en PAPB (de 0,00045 % à 0,009 %) sur les kystes d'*A. polyphaga* et *A. castellanii*. Ils ont déterminé le temps d'exposition au PAPB nécessaire pour inactiver la totalité des kystes. Pour les kystes d'*A. castellanii* les solutions contenant 0,0004 % et 0,0009 % sont inefficaces, même après 24 h d'exposition. A des concentrations de 0,00225 %, 0,0045 % et 0,009 % 3 h, 18 min et 6 min sont respectivement nécessaires pour inactiver les kystes d'*A. castellanii*. Pour les kystes d'*A. polyphaga*, les solutions contenant 0,00045 %, 0,0009 % et 0,00225 %, sont inefficaces même après 24 h d'exposition. A des concentrations de 0,0045 % et 0,009 %, l'inactivation des kystes d'*A. polyphaga* est respectivement obtenue au bout de 1 h et 12 min. Ainsi les kystes d'*A. polyphaga* semblent plus résistants au PAPB que ceux d'*A. castellanii*. C'est pourquoi, il est important de tester l'efficacité de ces biocides sur différentes espèces et souches amibiennes afin de s'assurer au mieux de leur efficacité (Burger *et al.*, 1994). Niszl et Markus ont également montré qu'une concentration de 0,00005 % de PAPB est inefficace pour éliminer les kystes de différentes souches d'*Acanthamoeba* même après 7 j d'incubation (Niszl et Markus, 1998). Zanetti *et al.* (1995) ont aussi évalué l'efficacité d'une solution pour lentilles de contact contenant du PAPB (0,000025 %) sur les trophozoïtes et les kystes d'*A. castellanii*. Ils ont démontré que cette solution est complètement inefficace pour l'élimination d'*A. castellanii*. Cependant, cette solution utilisée à des concentrations plus élevées s'est avérée efficace pour l'élimination des *Acanthamoeba* spp. (Burger *et al.*, 1994 ; Niszl et Markus, 1998 ; Silvany *et al.*, 1990 et 1991 ; Zanetti *et al.*, 1995). Une étude plus récente a confirmé que les kystes d'*A. castellanii*, *A. polyphaga* et *A. hatchetti* sont résistants à une incubation de 24 h dans des solutions pour lentilles de contact contenant 0,0001 % de PAPB (Johnston *et al.*, 2009).



## ✓ Le polyhexaméthylène biguanide (PHMB)

En 1989 et 1990, deux études ont soulevé le fait que les solutions pour lentilles de contact contenant du PHMB sont inefficaces pour l'élimination des kystes d'*Acanthamoeba* spp. même après 24 h d'incubation (Davies *et al.*, 1990 ; Penley *et al.*, 1989). Par la suite, d'autres études ont montré que les kystes d'*Acanthamoeba* spp. sont résistants à des solutions pour lentilles de contact contenant 0,0001 % de PHMB même après une semaine d'exposition (Barker *et al.*, 1992 ; Johnston *et al.*, 2009 ; Niszl et Markus 1998). Deux études ont défini la concentration minimale en PHMB nécessaire pour éliminer les trophozoïtes et les kystes de souches d'*Acanthamoeba* spp. isolées de patients atteints de kératites. Ainsi, Elder *et al.* ont montré que pour éliminer les trophozoïtes d'*Acanthamoeba* spp. une exposition pendant 48 h à des concentrations comprises entre 0,000049 % et 0,00039 % de PHMB est nécessaire (moyenne de 0,00013 %). La même gamme de concentration (avec une moyenne de 0,00022 %) permet d'inactiver les kystes (Elder *et al.*, 1994). La seconde étude menée par Kim et Hahn a montré que pour inactiver les kystes d'*Acanthamoeba* spp., il faut les exposer à des concentrations comprises entre 0,000117 % et 0,000468 % et entre 0,000442 % et 0,00125 % pour des incubations respectives de 48 et 8 h (Kim et Hahn, 1999). Ces résultats mettent en évidence qu'une solution pour lentilles de contact à 0,0001 % de PHMB est inefficace pour l'élimination des *Acanthamoeba* spp. responsables de kératites. En 2002, Aksozek *et al.* ont montré qu'une concentration plus élevée (0,02 % de PHMB pendant 24 h) est efficace pour éliminer les kystes d'*A. castellanii* (Aksozek *et al.*, 2002). Le PHMB peut être également utilisé pour le traitement des kératites amibiennes. Cependant, une étude clinique a montré que sur 10 patients atteints de kératite amibienne seuls 8 sont guéris avec un traitement à 0,02 % de PHMB (Elder *et al.*, 1994).

## ✓ Conclusion

Pour conclure les basses concentrations en biguanide utilisées dans les solutions pour lentilles de contact s'avèrent inefficaces pour l'élimination des kystes d'*Acanthamoeba* spp.. Ceci est problématique et peut être à l'origine d'épidémies de kératites. Cela a été le cas aux Etats-Unis en 2007 où une épidémie de kératites a été reliée à l'utilisation d'une solution pour la désinfection des lentilles de contact contenant 0,0001 % de PHMB (Verani *et al.*, 2009). L'efficacité des biguanides envers les *Acanthamoeba* spp. est bien documentée mais,

à l'heure actuelle, il n'existe aucune donnée sur l'efficacité des biguanides à l'encontre des autres genres amibiens.

### 3.2.2.2. Composés d'ammonium quaternaire (QACs)

Les composés d'ammonium quaternaire (QACs) sont utilisés dans certaines solutions pour les lentilles de contact. Comme pour les biguanides, ces composés sont retrouvés à de faibles concentrations (de 0,00055 % à 0,001 %). Plusieurs études ont montré qu'à ces concentrations les QACs sont inefficaces pour l'élimination des trophozoïtes et des kystes d'*A. castellanii*, *A. polyphaga* et *A. culbertsoni* (Buck *et al.*, 1998 ; Connor *et al.*, 1991 ; Davies *et al.*, 1990 ; Silvary *et al.*, 1990 et 1991 ; Zanetti *et al.*, 1995). A une concentration plus élevée de 0,04 %, le chlorure de benzalkonium (QAC) est efficace pour éliminer les trophozoïtes et les kystes d'*A. castellanii* et *A. polyphaga* (Khunkitti *et al.*, 1996 ; Silvary *et al.*, 1991 ; Zanetti *et al.*, 1995). Des concentrations plus faibles (de 0,003 % à 0,004 %) se sont avérées inefficaces contre les kystes d'*Acanthamoeba* spp. (Connor *et al.*, 1991 ; Hugo *et al.*, 1991 ; Penley *et al.*, 1989) bien que Turner *et al.* aient démontré que la concentration minimale en chlorure de benzalkonium efficace contre les kystes d'*A. castellanii* est de 0,004 % (Turner *et al.*, 2000 ).

Les QAC sont également utilisés dans certains produits pour le traitement des eaux de piscine et des TAR. En 1980, Cursons *et al.* ont montré qu'un produit, utilisé pour traiter des eaux de piscine est efficace, à la dose recommandée par le fournisseur, pour éliminer les trophozoïtes d'*Acanthamoeba* spp. et *Naegleria* spp.. Cependant, l'efficacité de ce produit envers les kystes n'a pas été vérifiée (Cursons *et al.*, 1980). En 1993, Srikanth et Berk ont testé l'efficacité d'un produit de traitement des TAR à base de QAC sur *A. hatchetti*. L'efficacité à une concentration de 0,0156 % (conseillée par le fournisseur) a été avérée pour éliminer les trophozoïtes mais non testée vis-à-vis des kystes (Srikanth et Berk, 1993).

### 3.2.3. Agents oxydants

Les agents oxydants sont très largement utilisés comme biocides. Parmi eux se trouvent principalement l'ozone, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de chlore et l'acide péracétique. Ces produits libèrent des molécules actives capables de réagir avec la surface des cellules et qui sont potentiellement capables de pénétrer la cellule, causant des

dommages irréversibles à l'origine de l'inactivation des microorganismes. Les agents oxydants sont employés dans presque tous les domaines qui demandent un contrôle de la flore microbienne. Ils sont largement utilisés dans les traitements de l'eau potable, l'antisepsie, la désinfection des surfaces et la stérilisation de matériel (McDonnell, 2007).

#### 3.2.3.1. Ozone (O<sub>3</sub>)

L'ozone (O<sub>3</sub>) est l'un des agents oxydants les plus puissants. Il est principalement utilisé dans le traitement d'un volume limité d'eau circulante. Le taux de désintégration de l'ozone est fortement influencé par la présence de matière organique dans l'eau. Un niveau élevé de matière organique rend difficile le maintien d'une quantité d'ozone résiduel nécessaire à l'obtention d'une désinfection efficace (von Gunten, 2003). L'activité de l'ozone est également dépendante de la température : les faibles températures diminuent de manière importante l'activité de l'ozone.

*In vitro*, il a été démontré qu'une exposition continue de 0,4 à 0,5 mg.L<sup>-1</sup> d'ozone inactive rapidement (quelques minutes) les kystes de l'ensemble des souches de *Naegleria* et d'*Acanthamoeba* testées à l'exception d'*A. polyphaga* CCAP 1501/3a (Langlais et Perrine, 1986 ; Wickramanayake *et al.*, 1984). Les effets de l'ozone sur les kystes d'*A. polyphaga* ont été confirmés par Loret *et al.* qui ont démontré que l'ozone est inefficace pour éliminer ces kystes même après une exposition de 2 h (Loret *et al.*, 2008a).

Plusieurs études réalisées dans des usines de traitement d'eau potable et sur des banc d'essais ont montré que les traitements à l'ozone permettent de réduire considérablement le nombre d'amibes libres, mais ne permettent pas de les éliminer complètement (Loret *et al.*, 2005 ; Thomas *et al.*, 2008). De plus, d'autres études ont montré que le manque d'activité résiduelle de l'ozone est responsable du redéveloppement des amibes dans l'eau traitée (Grillot et Ambroise-Thomas, 1980 ; Thomas *et al.*, 2004).

#### 3.2.3.2. Peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Les formulations à base de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) sont très fréquemment utilisées dans les solutions de désinfection des lentilles de contact. C'est pourquoi leur efficacité sur les trophozoïtes et les kystes d'*Acanthamoeba* spp. est bien documentée. Il

n'existe pas de publications faisant référence à la résistance des autres genres d'amibes libres au peroxyde d'hydrogène.

La littérature renseigne largement l'efficacité d' $\text{H}_2\text{O}_2$  envers *Acanthamoeba* spp. et montre qu'elle dépend de la formulation associée et du temps de contact. En 1986, Ludwig *et al.* ont testé l'efficacité sur les trophozoïtes et les kystes d'*A. castellanii* et *A. polyphaga* d'une solution pour les lentilles de contact contenant 3 % d' $\text{H}_2\text{O}_2$  et ont appliqué un temps de contact de 30 min conseillé par le fournisseur. Ce court temps d'exposition ne permet pas d'éliminer les trophozoïtes et les kystes d'*Acanthamoeba* spp. (Ludwig *et al.*, 1986). En 1995, Zanetti *et al.* ont également testé l'efficacité d'une solution pour la désinfection des lentilles de contact contenant 3 % d' $\text{H}_2\text{O}_2$  sur les trophozoïtes et les kystes d'*A. castellanii*. Les résultats suggèrent qu'un temps de contact de 30 min est suffisant pour inactiver les trophozoïtes mais inefficace vis-à-vis des kystes (Zanetti *et al.*, 1995). En effet, pour inactiver les kystes des temps de contact plus long sont nécessaires. En 1989, Brandt *et al.* ont testé l'efficacité d'une solution pour des lentilles de contact contenant 3 % d' $\text{H}_2\text{O}_2$  envers les kystes d'*A. castellanii*, *A. polyphaga* et *A. culbertsoni* et ont déterminé que les kystes des trois espèces survivent à 6 h d'exposition. Au-delà de ce temps, les kystes sont totalement inactivés (Brandt *et al.*, 1989). En 1990, Davies *et al.* ont testé l'efficacité, sur les kystes d'*A. castellanii* et *A. polyphaga*, de deux solutions désinfectantes de lentilles de contact contenant 3 % d' $\text{H}_2\text{O}_2$ . L'une des solutions présente une bonne activité contre les kystes en permettant de les inactiver en 8 h. La seconde, quant à elle, est peu efficace : après 24 h d'exposition 79 % des kystes sont encore viables (Davies *et al.*, 1990). La formulation des solutions pour la désinfection des lentilles de contact joue donc sur l'efficacité du  $\text{H}_2\text{O}_2$ . En 2002, Aksozek *et al.* ont testé l'efficacité d'une solution pour des lentilles de contact formulée contenant 3 % d' $\text{H}_2\text{O}_2$  et d'une solution non-formulée d' $\text{H}_2\text{O}_2$  sur les kystes d'*A. castellanii*. Après un temps de contact de 4 h, les kystes sont inactivés par la solution formulée uniquement (Aksozek *et al.*, 2002). Une étude a montré que l'efficacité envers les kystes d'une solution à 3 % d' $\text{H}_2\text{O}_2$  peut être augmentée en ajoutant du iodure de potassium ou d'autres peroxydases (Hughes *et al.*, 2003b). Un autre travail a montré qu'un traitement de 6 h sur les kystes d'*A. polyphaga* avec de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  à 0,4 % ou du nitrite acidifié à  $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  est inefficace (réduction inférieure à  $1 \log_{10}$ ), par contre une combinaison des deux entraîne une réduction de  $4 \log_{10}$  après seulement 1 h d'exposition (Heaselgrave *et al.*, 2010). En 2009, Johnston *et al.* ont testé l'efficacité de deux solutions désinfectantes contenant 3 %

d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur les kystes d'*A. castellanii*, *A. polyphaga* et *A. hatchetti*. L'une des solutions est inefficace même après une incubation de 24 h. L'autre inactive les kystes d'*A. castellanii* et *A. polyphaga* en 8 h d'exposition, et les kystes d'*A. hatchetti* en 24 h (Johnston *et al.*, 2009). Ceci montre que l'efficacité du peroxyde d'hydrogène varie également en fonction des espèces et des souches d'*Acanthamoeba*.

L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peut également être utilisé comme un désinfectant de surface. Dans ce cas aussi, la formulation associée influe sur l'efficacité de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Une étude récente a montré que des expositions de courtes durées à une solution non-formulée d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 7,5 % a une efficacité limitée sur les kystes d'*Acanthamoeba* spp. alors qu'une solution formulée avec une concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 2 % a une très bonne efficacité après seulement 10 min d'exposition (Coulon *et al.*, 2010).

L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peut aussi être utilisé sous forme gazeuse pour la stérilisation de matériel médical. D'après une étude récente, sous forme gazeuse, l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est efficace pour éliminer les kystes d'*A. castellanii* et *A. polyphaga* (Thomas et McDonnell, 2008).

### 3.2.3.3. Dioxyde de chlore (ClO<sub>2</sub>)

Le dioxyde de chlore (ClO<sub>2</sub>) est un agent oxydant puissant, il est couramment utilisé pour le traitement de l'eau potable ou sous forme de gaz pour les chambres de fumigation (McDonnell, 2007).

En 1980, Cursons *et al.* ont testé dans l'eau l'efficacité du ClO<sub>2</sub> sur les trophozoïtes d'*Acanthamoeba* spp. et *Naegleria* spp. et ont montré que ce désinfectant est efficace après 30 min d'exposition à des concentrations de 2 mg.L<sup>-1</sup> pour les *Naegleria* spp. et de 3 mg.L<sup>-1</sup> pour les *Acanthamoeba* spp. (Cursons *et al.*, 1980). Concernant les kystes, une bonne efficacité a été reportée contre les kystes de *N. gruberi*, avec une exposition à 5,5 mg.min.L<sup>-1</sup> 99 % des kystes sont inactivés (Chen *et al.*, 1985). Au contraire, Loret *et al.* ont constaté que les kystes d'*A. polyphaga* sont résistants à une exposition de 60 min à une concentration de 5 mg.L<sup>-1</sup> (Loret *et al.*, 2008a).

D'autres études ont été menées sur des bancs d'essais simulant des réseaux de distribution d'eau potable traités en continu pendant trois mois avec 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de ClO<sub>2</sub>

(Loret *et al.*, 2005 ; Thomas *et al.*, 2004). Cette concentration entraîne une réduction du nombre d'amibes libres dans le réseau mais ne permet pas une élimination complète.

#### 3.2.3.4. Acide péracétique (PAA)

L'acide péracétique (PAA) est très actif et présente une activité biocide rapide envers divers microorganismes à de faibles concentrations (McDonnell, 2007). Il est largement utilisé comme désinfectant de surfaces dans l'industrie agroalimentaire et pour la désinfection du matériel médical.

L'étude de Greub et Raoult a comparé l'efficacité du PAA non formulé et d'un produit commercial formulé à base de PAA sur les trophozoïtes et les kystes d'*Acanthamoeba* spp. et *Naegleria* spp.. Il s'avère que le PAA non formulé permet d'inactiver les trophozoïtes d'*Acanthamoeba* spp. et *Naegleria* spp. avec une exposition de 2 h à une concentration de 15 mg.L<sup>-1</sup> alors qu'une incubation de 18 h à 150 mg.L<sup>-1</sup> est nécessaire pour inactiver les kystes d'*Acanthamoeba* spp.. Le produit commercial, quant à lui, inactive les trophozoïtes en 30 min mais est inefficace pour éliminer les kystes d'*A. polyphaga* même après une exposition de 24 h (Greub et Raoult, 2003b). Une autre étude a montré que le PAA est efficace pour éliminer les kystes de *N. lovansensis* après une exposition de 1 h à une concentration de 5,3 mg.L<sup>-1</sup> (Ercken *et al.*, 2003). Les kystes d'*Acanthamoeba* spp. semblent plus résistants au PAA que ceux de *Naegleria* spp.. En 2010, Coulon *et al.* ont testé l'efficacité, sur les kystes d'*Acanthamoeba* spp., d'une solution non-formulée et d'une solution commerciale formulée à 2 g.L<sup>-1</sup> de PAA. Après 10 min d'exposition à la solution formulée, l'ensemble des kystes d'*Acanthamoeba* spp. est inactivé, alors que, pour la solution non-formulée certains kystes ont résisté (Coulon *et al.*, 2010). Ceci montre que l'activité du PAA dépend de la formulation associée.

#### 3.2.4. Alcools

Les alcools sont des composés organiques dont l'un des carbones est lié à un groupement hydroxyle (-OH). L'éthanol, l'isopropanol et le n-propanol sont très souvent utilisés comme antiseptiques et désinfectants. La majeure partie de leur activité biocide est due à la formation de liaisons avec les protéines. Ces liaisons entraînent la perte de la structure et de la fonction des protéines et induisent une coagulation conduisant à la mort

des cellules (McDonnell, 2007). La concentration optimale d'utilisation de l'alcool pour la désinfection est de 60 %-70 %, au-delà les protéines extracellulaires sont coagulées ce qui empêche la pénétration de l'alcool à l'intérieur de la cellule (McDonnell, 2007). Il n'existe que peu de données sur la résistance des amibes libres aux alcools.

En 1989 et 1991, deux études ont vérifié l'efficacité, sur les trophozoïtes et les kystes d'*Acanthamoeba* spp., d'une solution pour la désinfection des lentilles de contact contenant 20 % d'isopropanol (Connor *et al.*, 1991 ; Penley *et al.*, 1989). Les auteurs ont montré que cette solution est efficace et qu'elle élimine en quelques heures les trophozoïtes et les kystes d'*A. castellanii*, *A. polyphaga* et *A. culbertsoni*. En 2002, Aksozek *et al.* ont confirmé qu'une solution d'isopropanol à 20 % permet d'inactiver les kystes d'*A. castellanii* en 6 h d'exposition (Aksozek *et al.*, 2002).

Une autre étude a démontré que l'éthanol à 70 % a une bonne efficacité envers *Acanthamoeba* spp. (Coulon *et al.*, 2010). Pour une exposition de 10 min, les trophozoïtes sont inactivés et la concentration des kystes réduite de plus de 4 log<sub>10</sub>.

### 3.2.5. Aldéhydes

Les aldéhydes sont des composés organiques qui possèdent une fonction –CHO. Parmi les aldéhydes trois sont fréquemment utilisés comme désinfectants : le glutaraldéhyde, l'orthophthalaldéhyde (OPA) et le formaldéhyde généralement appelé formol quand il se trouve en solution aqueuse (McDonnell, 2007). Il existe peu de travaux de recherche faisant mention de l'efficacité des aldéhydes sur les amibes libres.

En 2003, Greub et Raoult ont testé l'efficacité d'une solution commerciale formulée contenant 2 % de glutaraldéhyde sur *A. polyphaga*. Ils ont montré qu'une large proportion des trophozoïtes est encore viable après 30 min à 3 h d'exposition (Greub et Raoult, 2003b). Une étude plus récente a montré que des solutions à 2 % de glutaraldéhyde, formulées ou pas, ne sont pas efficaces pour éliminer les trophozoïtes et les kystes d'*Acanthamoeba* spp. avec des temps de contact respectifs de 10 min et de 10 à 30 min (Coulon *et al.*, 2010). Dans cette même étude, les auteurs ont obtenu, avec plusieurs souches, un résultat surprenant en observant que les trophozoïtes étaient moins sensibles au glutaraldéhyde que les kystes. Coulon *et al.* émettent alors l'hypothèse que le glutaraldéhyde agirait sur les kystes par

liaison avec la structure de la paroi kystique ce qui empêcherait le désenkystement de l'amibe sans pour autant la tuer. Selon ce même raisonnement, les auteurs suggèrent que la résistance des trophozoïtes au traitement pourrait être liée à une structure différente de la paroi cellulaire ou à l'existence d'une voie de détoxification active.

L'orthophthalaldéhyde (OPA), quant à lui, est efficace pour éliminer les trophozoïtes et les kystes d'*Acanthamoeba* spp.. Des solutions, formulées ou non, d'OPA à 0,55 % inactivent les trophozoïtes en 10 min et les kystes en 20 min voire 30 min pour les plus résistants (Coulon *et al.*, 2010).

Tiewchaloren et Junnu se sont intéressés à la résistance des trophozoïtes de *Naegleria* spp. au formol et ont prouvé que ces cellules survivent à une exposition d'1 h à 37 °C dans une solution de formol à 0,05 % et qu'elles sont inactivées dans une solution de formol à 0,1 % (Tiewchaloren et Junnu, 1999). En ce qui concerne les *Acanthamoeba* spp., une étude a montré que les kystes sont sensibles à une exposition de 30 min à une solution de formol à 10 % (Aksozek *et al.*, 2002).

### 3.2.6. Amidines

Les amidines sont des composés organiques, dérivés des oxoacides, qui possèdent une fonction  $C(=NH)NH_2$ . Les diamidines sont utilisées comme désinfectants et comme antiseptiques. Les plus utilisées dans la désinfection sont la propamidine et l'hexamidine.

Différentes études ont montré que les diamidines sont efficaces pour l'inactivation des trophozoïtes d'amibes libres, par contre, elles n'ont qu'une efficacité très limitée sur les kystes (Gray *et al.*, 1996 ; Kim et Hahn, 1999 ; Osato *et al.*, 1991 ; Perrine *et al.*, 1995). En 1995, Perrine *et al.* ont étudié l'efficacité biocide de différentes solutions de diamidines (propamidine, butamidine, pentamidine...) à 0,1 % sur les trophozoïtes et les kystes d'*A. polyphaga*. Il en ressort que les trophozoïtes d'*A. polyphaga* sont sensibles aux diamidines et qu'ils survivent entre 2 et 9 h en fonction de la diamidine considérée et de la souche d'*A. polyphaga*. En revanche, les kystes d'*A. polyphaga* résistent entre 1 et 7 j. Parmi les diamidines testées par Perrine *et al.* (1995), l'octamidine est celle qui présente la meilleure efficacité. En effet les trophozoïtes d'*A. polyphaga* peuvent survivre 2 h dans une solution à 0,1 % d'octamidine contre 4 à 5 h dans une solution à 0,1 % d'hexamidine et 7 à



9 h dans une solution à 0,1 % de propamidine. Les kystes, quant à eux, peuvent survivre respectivement 1 j, 3 j et entre 6 et 7 j pour des solutions à 0,1 % d'octamidine, d'hexamidine et de propamidine (Perrine *et al.*, 1995). En 1999, Kim et Hanh ont observé qu'une exposition de 8 h à des solutions d'hexamidine n'avait pas d'effet sur les kystes d'*Acanthamoeba* spp. et qu'une incubation de 48 h à des concentrations comprises entre 0,006 et 0,05 % en fonction des souches, permettait de les inactiver (Kim et Hahn, 1999). Il semble que les souches d'*Acanthamoeba* spp. testées par Kim et Hahn (1999) sont plus sensibles à l'hexamidine que les souches d'*A. polyphaga* testées par Perrine *et al.* (1995). Wysesbeek *et al.*, quant à eux, ont testé l'efficacité d'une solution pour la désinfection des lentilles de contact contenant 0,0001 % de propamidine isethionate sur les trophozoïtes et les kystes d'*Acanthamoeba* spp.. Ils ont montré que cette très faible concentration en diamidine est inefficace aussi bien envers les trophozoïtes que les kystes (Wysesbeek *et al.*, 2000).

### 3.2.7. Isothiazolones

Les isothiazolones ou isothiazolinones sont une famille de biocide composée à partir d'un hétérocycle, le 1,2-thiazol-3-one. Ils sont principalement utilisés pour la désinfection des TAR.

En 1992, Barker *et al.* ont voulu déterminer l'efficacité de deux dérivés d'isothiazolone, le benzisothiazolone (BIT) et le 5-chloro-*N*-methyl-isothiazolone (CMIT) sur les trophozoïtes d'*A. polyphaga*. Ces trophozoïtes ont été traités pendant 5 j soit avec une concentration en BIT de 0,0005 % (le fournisseur conseillant une concentration de 0,0008 %) soit avec une concentration en CMIT de 0,001 % (une concentration de 0,0016 % est recommandée par le fournisseur). Les auteurs ont observé en présence des deux composés, par microscopie optique, un arrondissement des cellules et un arrêt de la multiplication cellulaire. Ils ont ensuite remis les trophozoïtes traités dans du milieu de culture en absence du composé et ont observé si les trophozoïtes se remettent à se multiplier. Les trophozoïtes traités avec le BIT se multiplient à nouveau alors que ceux traités avec le CMIT ne se multiplient pas. Le BIT est donc inefficace, à cette concentration, pour l'élimination des amibes. Le CMIT, quant à lui, permet d'inactiver les trophozoïtes (Barker *et al.*, 1992). Dans

cette étude les auteurs n'ont à aucun moment fait référence à l'efficacité du BIT et du CMIT à l'encontre des kystes d'*A. polyphaga*.

Deux autres études se sont intéressées à l'efficacité sur *A. hatchetti* d'un produit commercial pour la désinfection de TAR à base d'un dérivé d'isothiazolone, le 5-chloro-2-méthyl-4-isothiazolin-3-one (Srikanth et Berk, 1993 ; Sutherland et Berk, 1996). Ces travaux ont montré que les concentrations recommandées par le fournisseur (entre 0,0035 % et 0,0219 %) permettent d'inactiver les trophozoïtes mais pas les kystes. En effet, des kystes viables ont été retrouvés après 24 h d'exposition avec une concentration en isothiazolone de 1,5625 % (plus de 70 fois plus concentrée que la valeur haute conseillée par le fournisseur) (Sutherland et Berk, 1996). Srikanth et Berk ont également démontré qu'une faible concentration en isothiazolone induit une multiplication plus rapide d'*A. hatchetti* que celle observée en absence du biocide (Srikanth et Berk, 1993).

Une étude plus récente a examiné l'efficacité de deux isothiazolones (2-méthyl-4-isothiazolin-3-one et 5-chloro-2-méthyl-4-isothiazolin-3-one) sur les trophozoïtes et les kystes de trois genres amibiens : *Acanthamoeba*, *Vermamoeba* et *Vahlkampfia* (Critchley et Bentham, 2009). Dans cette étude, les auteurs ont exposé les trophozoïtes et les kystes à une concentration de 0,015 % d'isothiazolones pendant différents temps de contact. Les trophozoïtes provenant des trois genres sont inactivés après une exposition de 2 h à une température de 25 °C et 30 °C et après une exposition de 4 h à une température de 35 °C. Les kystes de *Vahlkampfia* sont inactivés après 8 h d'exposition alors que les kystes d'*Acanthamoeba* et *V. vermiformis* ne sont pas inactivés. Ainsi les kystes de *Vahlkampfia* sont plus sensibles aux isothiazolones que les kystes d'*Acanthamoeba* et *V. vermiformis*.

### 3.2.8. Ionisation cuivre-argent

L'ionisation cuivre-argent est produite par électrolyse, c'est-à-dire qu'un courant électrique est créé à travers le système cuivre-argent ce qui induit la formation d'ions chargés positivement de cuivre et d'argent. Les ions cuivre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) vont interagir avec les membranes des microorganismes qui sont chargées négativement ce qui permet la création d'une entrée dans la cellule pour les ions argent ( $\text{Ag}^+$ ). Les ions  $\text{Ag}^+$  pénètrent alors dans la cellule et interagissent avec les protéines cellulaires, les enzymes respiratoires et les acides

nucléiques ce qui provoque un arrêt de la croissance et de la division cellulaire. L'ionisation cuivre-argent est utilisée pour le traitement de l'eau.

En 1995, Cassells *et al.* ont évalué l'efficacité de l'ionisation cuivre-argent envers les trophozoïtes de *N. fowleri* en utilisant des ratios de 0,4 : 0,04 à 0,8 : 0,08 mg.L<sup>-1</sup> et une exposition de 72 h. Ce traitement n'a pas eu d'effet sur les trophozoïtes de *N. fowleri* (Cassells *et al.*, 1995). En 2000, Rohr *et al.* ont testé l'efficacité de l'ionisation cuivre-argent sur les trophozoïtes de *V. vermiformis* en les exposant pendant 24 h à des ratios de 0,1 : 0,01 à 0,5 : 0,05 mg.L<sup>-1</sup>. Ce traitement n'a pas permis d'inactiver les trophozoïtes de *V. vermiformis* (Rohr *et al.*, 2000).

D'autres études ont été menées sur des bancs d'essais de réseau de distribution d'eau potable. Dans ces études, les auteurs ont traité le banc d'essais en continu pendant 3 mois avec un ratio soit de 0,5 : 0,01 mg.L<sup>-1</sup> soit de 0,8 : 0,02 mg.L<sup>-1</sup>. Ces traitements n'ont eu aucun effet sur la population d'amibes libres présentes dans le banc d'essais (Loret *et al.*, 2005 ; Thomas *et al.*, 2004).

### 3.3. Bilan

Cette étude bibliographique, montre que le comportement des *Acanthamoeba* spp. vis-à-vis des biocides, et plus particulièrement ceux présents dans les solutions de nettoyage des lentilles de contact, est bien documentée en comparaison aux autres amibes libres. Ceci s'explique par le fait que les *Acanthamoeba* spp. sont responsables de kératites, leur élimination représente donc un enjeu sanitaire. Par contre, il n'existe que peu d'études qui ont fait mention de la résistance des amibes libres aux biocides utilisés dans le traitement de l'eau (production d'eau potable, RECS, TAR, eaux de piscines...). En raison de leur prévalence dans les environnements artificiels aquatiques et leur rôle de réservoir pour de nombreux microorganismes pathogènes, il est indispensable, à l'avenir, de mieux connaître la résistance des amibes libres aux traitements de désinfection utilisés dans les installations liées aux activités anthropiques.

Pour l'ensemble des espèces d'amibes libres il est apparu que, à l'exception du glutaraldéhyde (*cf.* 3.2.5. Les aldéhydes), les trophozoïtes sont plus sensibles aux traitements physiques et chimiques que les kystes. Cette différence est vraisemblablement due à la

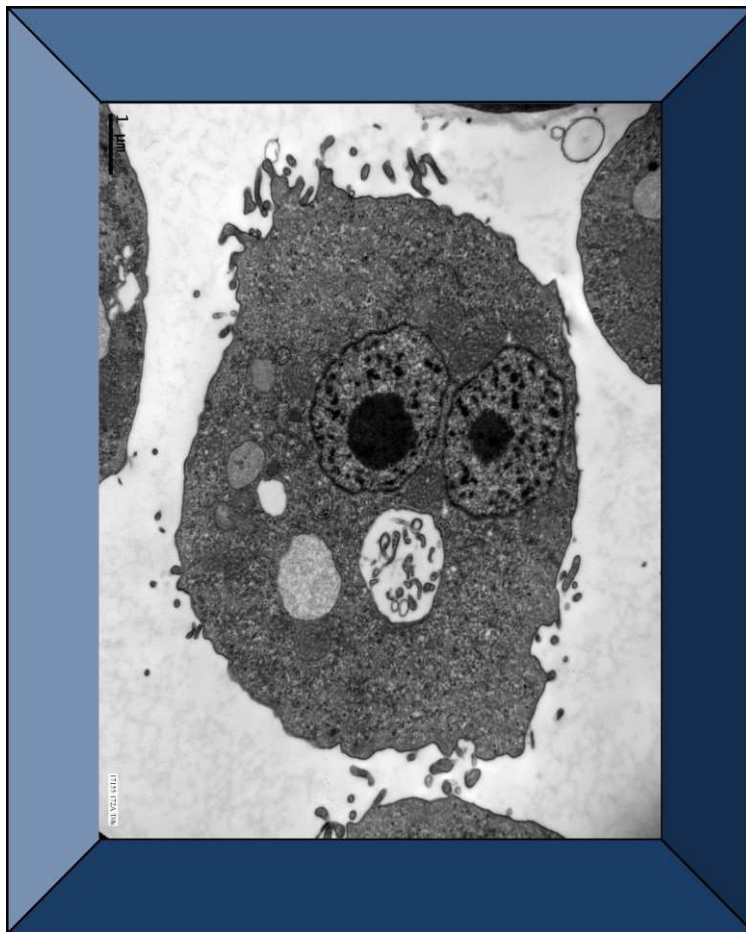
composition de la paroi kystique. D'importantes variations de la résistance aux traitements ont été observées entre les différents genres amibiens. Il en ressort que les kystes d'*Acanthamoeba* spp. et de *Balamuthia mandrillaris* sont plus résistants aux biocides que les kystes de *V. vermiformis*, *Naegleria* spp. et *Vahlkampfia* spp.. Ceci est peut être dû à la structure de la paroi kystique (les parois kystiques des *Acanthamoeba* spp. et de *Balamuthia mandrillaris* ont respectivement deux et trois couches, cf. 1.2.1.2.) et/ou aux compositions différentes de la paroi des kystes. En effet, en fonction des genres amibiens la composition de la paroi kystique diffère. Par exemple, la paroi des kystes d'*Acanthamoeba* spp. est riche en cellulose alors que les kystes de *Naegleria* spp. et de *Vermamoeba/Hartmannella* en sont dépourvus (Linder *et al.*, 2002).

Concernant les traitements physiques, les amibes libres sont très résistantes aux irradiations de type UV, rayons gamma et rayons X ce qui montre que les amibes libres possèdent des mécanismes de réparation de l'ADN très efficaces. Par contre, elles sont très sensibles aux micro-ondes. Les amibes libres sont insensibles à la cryothérapie et aux cycles répétés de congélation-décongélation. Elles présentent une sensibilité moyenne aux traitements thermiques, mais l'efficacité des hautes températures pour l'élimination des amibes libres varie énormément en fonction des genres et des espèces. En effet, les *Naegleria* spp. sont très sensibles aux traitements thermiques alors que les *Acanthamoeba* spp. y sont beaucoup plus résistantes. Il existe aussi des variations au niveau des souches, par exemple chez les *Acanthamoeba* spp., il y a des souches thermotolérantes qui peuvent survivre à des températures de 80 °C. Cependant, les traitements thermiques restent parmi les traitements physiques les plus efficaces pour l'élimination des amibes libres.

Concernant les traitements chimiques, les amibes libres sont très résistantes aux traitements halogénés (le chlore et ses composés, le brome, l'iode et les iodophores), au dioxyde de chlore qui est un agent oxydant, au glutaraldéhyde et à l'ionisation cuivre-argent. Elles possèdent une résistance modérée aux autres agents oxydants (ozone, peroxyde d'hydrogène et acide péracétique), aux biocides cationiques (biguanides et composés d'ammonium quaternaire), à certains aldéhydes (orthophtalaldéhyde et formaldéhyde), aux amidines et aux isothiazolones. Cependant, l'efficacité de ces composés varie énormément en fonction de la concentration du composé, du temps de contact, de la formulation associée et bien évidemment de la souche amibienne considérée. Les alcools de type

éthanol et isopropanol sont très efficaces pour l'élimination des amibes libres. Ils peuvent être utilisés comme désinfectant de surfaces mais ne peuvent pas intervenir dans les procédés de traitement d'eau.

## CHAPITRE II : Démarche scientifique et objectifs



**CHAPITRE II : Démarche scientifique et objectifs**

Les amibes libres sont largement répandues dans l'environnement, elles colonisent également les milieux aquatiques liés aux activités anthropiques comme les usines de potabilisation (Hoffmann et Michel, 2001 ; Thomas *et al.*, 2006), les réseaux de distribution d'eau (Kilvington *et al.*, 2004 ; Thomas *et al.*, 2006), les TAR (Srikanth et Berck, 1993) et les systèmes de refroidissement des centrales nucléaires (Stevens *et al.*, 1977 ; Sykora *et al.*, 1983). Certains genres ou espèces d'amibes libres sont potentiellement pathogènes pour l'Homme mais en tant que telles, elles ne sont pas considérées comme un problème majeur de santé publique. Cependant, il est maintenant bien établi que les amibes libres jouent un rôle de réservoir pour les microorganismes et en particulier les bactéries pathogènes comme *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium* spp. (Greub et Raoult, 2004 ; Thomas *et al.* 2010). Par exemple, *L. pneumophila* est responsable de la plupart des épidémies de légionellose qui est une maladie mortelle dans 10 % des cas. La majorité de ces épidémies sont liées aux RECS et TAR contaminés par *L. pneumophila* qui est associée aux amibes libres (Fields *et al.*, 2002). Les amibes libres protègent *Legionella* spp. des conditions hostiles et favorisent leur dissémination dans l'environnement (Greub et Raoult, 2004). Il a aussi été montré que les *Legionella* spp. qui ont séjourné dans les amibes libres sont plus résistantes aux traitements de désinfection et plus virulentes (Kilvington et Price, 1990). Ainsi, le contrôle des amibes libres dans les environnements artificiels représente un enjeu sanitaire important. Cependant, les amibes libres ont la capacité de passer d'une forme métaboliquement active (trophozoïte) à une forme de résistance, le kyste, lorsque les conditions sont défavorables. Les kystes permettent aux amibes libres de résister aux conditions environnementales défavorables et leurs offrent également une résistance aux traitements de désinfection. L'enkystement constitue donc une étape clé dans la survie et la résistance des amibes libres aux conditions hostiles. Dans le but de contrôler les amibes libres dans les environnements artificiels (RECS, TAR...), et, de ce fait, prévenir les risques sanitaires, une meilleure compréhension des processus de différenciation et de la résistance des kystes aux traitements de désinfection est nécessaire.

Dans les milieux artificiels comme les usines de potabilisation, les réseaux de distribution d'eau potable, les RECS et les TAR, plusieurs études semblent montrer que

l'espèce *Vermamoeba vermiformis* est l'amibe libre prédominante (Buse *et al.*, 2013 ; Jacquemin *et al.*, 1981 ; Loret *et al.*, 2008a et b ; Ovrusky *et al.*, 2013 ; Rohr *et al.*, 1998 ; Thomas *et al.*, 2006 et 2008). Son rôle de réservoir de bactéries pathogènes est maintenant bien établi (Fields *et al.*, 1990 ; Horn *et al.*, 2000 ; Santic *et al.*, 2011) et sa relation avec *L. pneumophila* est bien documentée (Abu Kwaik *et al.*, 1994 et 1996 ; Fields *et al.*, 1990 ; Venkataraman *et al.*, 1997 et 1998 ; Venkataraman et Abu Kwaik, 2000). Cependant, il n'existe que peu de données relatives aux processus de différenciation chez *V. vermiformis* et à la résistance des kystes aux traitements de désinfection. La plupart des études menées sur les amibes libres traitent des *Acanthamoeba* spp. et *Naegleria fowleri* en raison de leur pouvoir pathogène pour l'Homme. L'espèce *V. vermiformis* n'est pas directement pathogène pour l'Homme, même si elle est considérée par certains auteurs comme un colonisateur opportuniste associé aux méningo-encéphalites (Centeno *et al.*, 1996) et aux kératites (Aitken *et al.*, 1996 ; Inouet *et al.*, 1998 ; Lorenzo-Morales *et al.*, 2007b). Ceci peut expliquer le manque de recherches sur cette espèce. Le travail de doctorat présenté dans ce manuscrit a donc pour ambition de faire avancer l'état des connaissances sur *V. vermiformis*.

*V. vermiformis*, qui était classé jusqu'en 2011 dans le genre *Hartmannella* (Smirnov *et al.*, 2011), a été décrite pour la première fois en 1967 par Page qui l'a décrite à deux nouvelles reprises en 1974 et 1986. Cet auteur a alimenté les données morphologiques et structurales des trophozoïtes et des kystes grâce à des techniques de microscopie. Plus récemment, Smirnov et Michel (1999) ont étudié la structure du kyste de *V. vermiformis* par MET. En 2005, Dykova *et al.* ont également décrit la structure de kystes immatures de deux souches de *V. vermiformis* isolées de poissons. Mais, au début de la thèse, il n'existait aucun travail de recherche faisant état des changements morphologiques et structuraux qui s'opèrent lors des processus de différenciation chez *V. vermiformis*. Nous avons donc décidé, dans un premier temps, d'investiguer les changements morphologiques et structuraux qui s'opèrent lors de l'enkystement et du désenkystement. Pour cela nous avons choisi d'utiliser différentes techniques de microscopie optique (contraste de phase, confocale) et de microscopie électronique (MEB et MET).

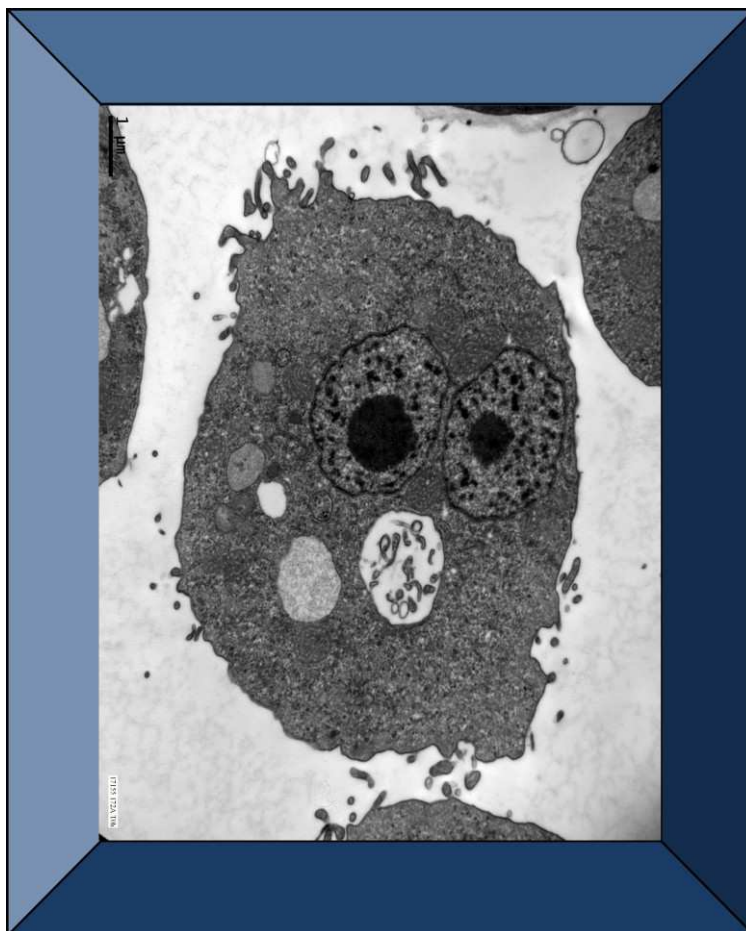
Dans un deuxième temps, nous avons étudié plus particulièrement l'enkystement de *V. vermiformis*. Avant nos travaux, il n'existait aucune publication faisant référence aux signaux induisant l'enkystement et aux mécanismes moléculaires mis en jeu lors de ce



processus chez *V. vermiformis*. Nous avons donc évalué l'effet de différents facteurs sur ce processus. D'abord, nous avons testé l'effet de trois conditions environnementales : la température, le pH et la pression osmotique, sur l'enkystement de *V. vermiformis*. Puis nous avons testé l'effet de la concentration cellulaire sur ce processus.

Dans un troisième et dernier temps, nous avons étudié la résistance des kystes de *V. vermiformis* aux traitements de désinfection. Notre choix s'est porté sur les traitements de désinfection utilisés dans les RECS car ils représentent l'une des sources souvent incriminée lors des épidémies de légionellose. En France, la circulaire du 22 avril 2002 (DGS/SD7A/DHOS/EA n°2002/243) donne les directives à suivre (fonctionnement hydraulique, température à maintenir aux différents points du réseau, lutte contre l'entartrage et la corrosion) et les traitements de désinfection utilisables pour la désinfection des RECS afin de prévenir le risque légionelles. En se référant à cette circulaire, nous avons choisi d'évaluer la résistance des kystes de *V. vermiformis* à trois traitements fréquemment utilisés dans les RECS : les traitements chlorés, les chocs thermiques et les traitements à l'acide péracétique couplé au peroxyde d'hydrogène. Cependant, il a déjà été montré dans la littérature que les biocides classiques sont parfois inefficaces pour éliminer totalement les amibes libres des RECS (Rohr *et al.*, 1998). C'est pourquoi, il est nécessaire de développer de nouveaux traitements. Dans cette optique, nous avons voulu tester un traitement innovant en utilisant des enzymes pour désactiver les kystes de *V. vermiformis*. Notre choix s'est porté sur les protéases car il a été montré que les composants majeurs de la paroi des kystes d'*Hartmannella glabrae*, une amibe libre proche de *V. vermiformis*, sont des protéines (Upadhyay *et al.*, 1984). Nous avons sélectionné, comme protéase, la subtilisine qui a été récemment identifiée pour son activité antifouling sur les biofilms marins (Leroy *et al.*, 2008a et b).

## CHAPITRE III : Matériel et méthodes



## CHAPITRE III : Matériel et méthodes

### 1. Microorganismes

#### 1.1. Souches ambiennes

##### 1.1.1. Souches de *Vermamoeba vermiformis*

Plusieurs souches de *Vermamoeba vermiformis* ont été utilisées. La première est la souche de référence *V. vermiformis* ATCC 50237 provenant de l'*American Type Culture Collection* (ATCC). Elle a été isolée d'une tour aérorefrigérante d'un hôpital du Dakota du sud (Etats-Unis). Cette souche a été axénisée, c'est-à-dire purifiée de tous microorganismes, même symbiotiques. Elle peut être cultivée en milieu nutritif liquide de type PYNFH modifié (*Peptone - Yeast - Nucleic acid - Folic acid - Hemin*) également appelé ATCC 1034. La deuxième est la souche environnementale *V. vermiformis* 172A (la séquence du gène codant pour l'ARNr 18s est identique au n° d'accèsion : M95168) isolée d'un réseau d'eau hospitalier (Lausanne, Suisse), il s'agit de la souche 2 décrite dans la publication de Thomas et al. (2006). Cette souche a été axénisée et est cultivable en milieu nutritif liquide PYNFH modifié. Les autres souches de *V. vermiformis* utilisées sont des souches environnementales isolées d'eaux de rivières ou de RECS hospitaliers par la société STERIS. Il s'agit des souches : *V. vermiformis* 736 (n° d'accèsion de la séquence du gène codant pour l'ARNr 18s : DQ123623.2), *V. vermiformis* SNF1 (n° d'accèsion de la séquence du gène codant pour l'ARNr 18s : EU137741.1), *V. vermiformis* 03/5 (la séquence du gène codant pour l'ARNr 18s est identique au n° d'accèsion : M95168.1) et *V. vermiformis* DV10 (aucune séquence déposée). Ces souches n'ont pas été axénisées et sont seulement cultivables sur des géloses recouvertes de bactéries mortes ou vivantes.

##### 1.1.2. Souches d'*Acanthamoeba*

Deux souches d'*Acanthamoeba* ont été utilisées. La première est la souche de référence *A. castellanii* ATCC 30234, il s'agit d'une souche de référence dérivée de la souche ATCC 30010 qui a été isolée en 1957 d'un sol provenant de la ville de Pacific Grove en Californie (Etats-Unis). La deuxième est la souche *Acanthamoeba* sp. ApCHUV (n° d'accèsion de la séquence du gène codant pour l'ARNr 18s : GU459320) isolée d'un RECS hospitalier par la société STERIS. Ces deux souches sont axénisées et sont cultivables en milieu nutritif liquide PYG (*Peptone-Yeast extract-Glucose*).

Le tableau 5 récapitule les données concernant les souches d'amibes.

Tableau 5 : Tableau de synthèse des souches amibiennes et milieux de culture.

| Genre               | Espèce             | Souche     | Axénisée | Milieu de culture liquide | Milieu de culture solide |
|---------------------|--------------------|------------|----------|---------------------------|--------------------------|
| <i>Vermamoeba</i>   | <i>vermiformis</i> | ATCC 50237 | Oui      | PYNFH modifié             | NNA- <i>E. coli</i>      |
| <i>Vermamoeba</i>   | <i>vermiformis</i> | 172A       | Oui      | PYNFH modifié             | NNA- <i>E. coli</i>      |
| <i>Vermamoeba</i>   | <i>vermiformis</i> | 736        | Non      | Non                       | NNA- <i>E. coli</i>      |
| <i>Vermamoeba</i>   | <i>vermiformis</i> | SNF1       | Non      | Non                       | NNA- <i>E. coli</i>      |
| <i>Vermamoeba</i>   | <i>vermiformis</i> | 03/5       | Non      | Non                       | NNA- <i>E. coli</i>      |
| <i>Vermamoeba</i>   | <i>vermiformis</i> | DV10       | Non      | Non                       | NNA- <i>E. coli</i>      |
| <i>Acanthamoeba</i> | <i>castellanii</i> | ATCC 30234 | Oui      | PYG                       | NNA- <i>E. coli</i>      |
| <i>Acanthamoeba</i> | sp.                | ApCHUV     | Oui      | PYG                       | NNA- <i>E. coli</i>      |

### 1.2. Souche bactérienne

Les amibes peuvent être cultivées sur des géloses NNA (*Non Nutrient Agar*) recouvertes de bactéries mortes ou vivantes. Dans cette optique, la souche d'*Escherichia coli* XL1 a été sélectionnée car elle n'est pas résistante à la phagocytose amibienne et est facilement cultivable. Cette souche a été cultivée en milieu nutritif liquide LB (*Luria Bertani*).

### 1.3. Cryoconservation

Les différentes souches d'amibes ont été cryoconservées sous la forme kystique afin de les stocker sur de longues durées tout en préservant au mieux les cellules. Pour cela, les amibes ont été mises à enkyster soit dans du milieu d'enkystement Neff (*cf.* II.2.1.1.1.) soit sur des géloses NNA-*E. coli* (*cf.* II.2.1.1.1.). Les kystes ont ensuite été récupérés par grattage et mis en suspension dans du tampon phosphate (pH = 7, 50 mmol.L<sup>-1</sup>). Les kystes ont été cryoconservés dans une solution de DMSO (diméthylsulfoxyde) à 7 %. Pour cela, le DMSO a été mis à solidifier sur un lit de glace, puis, il a été dilué avec du tampon phosphate (pH = 7, 50 mmol.L<sup>-1</sup>) afin d'obtenir une solution de DMSO à 14 %. Les kystes en suspension ont ensuite été mélangés avec la solution de DMSO afin d'obtenir une concentration finale en

DMSO de 7 %. Après 30 min d'incubation à température ambiante, les kystes ont été placés à -80 °C.

La souche d'*E. coli* XL1 a été conservée à -20 °C. Pour cela, les cellules ont été centrifugées 10 min à 5000 g, remises en suspension dans une solution contenant 15 % de glycérol et 75 % de sérum de veau fœtal puis ont été stockées à -20 °C.

## **2. Milieux de culture**

### **2.1. Milieux nutritifs pour la culture des amibes**

Les souches de *V. vermiformis* axénisées ont été cultivées durant 3 j à 28 °C dans du milieu nutritif liquide PYNFH modifié contenu dans des flacons de culture cellulaire. La composition du milieu PYNFH modifié est la suivante : pH = 6,5, bacto-peptone 1 %, extrait de levure 1 %, ARN de torula de type VI 0,1 %, acide folique 33  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , hémine 1,5  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  3,6  $\text{mmol.L}^{-1}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  26  $\text{mmol.L}^{-1}$ , sérum de veau fœtal 10 %.

Les souches de *V. vermiformis* non axénisées ont été cultivées sur des géloses NNA (agar 15  $\text{g.L}^{-1}$ ) recouvertes après solidification de 1,5 mL de suspension d'*E. coli* XL1 qui a été cultivée pendant 12 h dans du milieu LB (*cf.* II.1.2.2.). Les géloses ont été séchées et conservées à 4 °C avant utilisation.

Les souches d'*Acanthamoeba* ont été cultivées durant 3 j à 28 °C dans du milieu nutritif liquide PYG contenu dans des flacons de culture cellulaire. La composition du milieu PYG est la suivante : pH = 6,5, protéose peptone 2 %, extrait de levure 0,1 %, glucose 0,1  $\text{mol.L}^{-1}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  4  $\text{mmol.L}^{-1}$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,4  $\text{mmol.L}^{-1}$ , sodium citrate dihydrate 3,4  $\text{mmol.L}^{-1}$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2,5  $\text{mmol.L}^{-1}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2,5  $\text{mmol.L}^{-1}$ ,  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  à 0,5  $\text{mmol.L}^{-1}$ .

### **2.2. Milieu nutritif pour la culture d'*E. coli***

La souche d'*Escherichia coli* XL1 blue a été cultivée dans du milieu liquide LB (tryptone 1 %, extrait levure 0,5 %, NaCl 0,17  $\text{mol.L}^{-1}$ ) à 37 °C sous agitation (200 rpm).

### **3. Enkystement et déenkystement des amibes**

#### **3.1. Enkystement des amibes**

##### **3.1.1. Enkystement en milieu liquide Neff**

Après 3 j de culture dans le milieu liquide PYNFH modifié ou PYG, les souches d'amibes axéniques ont été suspendues par grattage puis ont été centrifugées 7 min à 500 g. Le culot a été lavé à deux reprises dans du milieu d'enkystement liquide Neff (pH = 8,8, KCl 0,1 mol.L<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub> 8 mmol.L<sup>-1</sup>, CaCl<sub>2</sub> 0,4 mmol.L<sup>-1</sup>, Tris (2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol) 20 mmol.L<sup>-1</sup>, NaHCO<sub>3</sub> 1 mmol.L<sup>-1</sup>). Les amibes ont ensuite été suspendues dans du milieu d'enkystement Neff où la concentration cellulaire a été ajustée à 5.10<sup>5</sup> cellules.mL<sup>-1</sup> par dénombrement direct sur cellule de numération (*cf.* II.3.1.1.) et ont été incubées à 28 °C dans des flacons de culture cellulaire.

Afin de générer un stock de kystes utilisables pour les traitements, les amibes ont été enkystées pendant 7 j à 28 °C. Les kystes matures ont ensuite été récupérés par grattage, centrifugés pendant 7 min à 1000 g et remis en suspension dans du tampon phosphate (pH = 7, 50 mmol.L<sup>-1</sup>). Les kystes ainsi produits ont pu être conservés pendant 14 j à 4 °C pour utilisation.

##### **3.1.2. Enkystement sur gélose NNA-*E. coli***

Les souches non axéniques d'amibes ont été mises à enkyster sur des géloses NNA-*E. coli*. Après recouvrement de la gélose par la culture d'amibe et visualisation des kystes par microscopie photonique, les kystes ont été prélevés par grattage.

#### **3.2. Déenkystement des amibes**

Les souches axéniques d'amibes ont été déenkystées par incubation dans un milieu nutritif liquide. Pour cela, les kystes ont été centrifugés à 1000 g pendant 7 min et mis en suspension dans du milieu nutritif liquide de type PYNFH modifié pour les souches de *V. vermiformis* et de type PYG pour les souches d'*Acanthamoeba*. Les amibes ont ensuite été incubées à 28 °C dans des flacons de culture cellulaire.

### 3.3. Dénombrement et mesure du taux d'enkystement

#### 3.3.1. Dénombrement total des amibes

Le nombre total d'amibes dans un échantillon a été estimé par comptage direct sur des cellules de numération. Pour cela, l'échantillon à dénombrer a été centrifugé (7 min à 500 g) puis mis en suspension dans du tampon phosphate (pH = 7, 50 mmol.L<sup>-1</sup>) afin d'éliminer toutes traces de milieu de culture ou de milieu d'enkystement. Le nombre total d'amibes a été calculé à deux reprises à l'aide de cellules de numération Fast-Read 102®. Pour cela, 7 µL d'échantillon ont été déposés sur les grilles de numération qui contiennent 10 grands carreaux de 0,1 µL subdivisés en 16 secteurs. Le nombre d'amibes a été dénombré sur au moins 4 grands carreaux pour les échantillons concentrés et sur l'intégralité de la cellule de numération pour les échantillons les plus dilués.

#### 3.3.2. Dénombrement des kystes matures

Afin de dénombrer les kystes matures dans un échantillon, il convient d'éliminer les trophozoïtes et les kystes immatures. Pour cela, un traitement avec une solution de SDS (dodécylsulfate de sodium) de concentration finale à 0,5 % a été appliqué à chaque échantillon. A cette concentration, la solution de SDS lyse les trophozoïtes et les kystes immatures alors que les kystes matures y résistent, grâce à leur paroi protectrice. Cependant, comme ce réactif précipite en présence du milieu d'enkystement, les échantillons ont été préalablement centrifugés (7 min à 500 g) et mis en suspension dans du tampon phosphate (pH = 7, 50 mmol.L<sup>-1</sup>). Le nombre de kystes matures a alors été dénombré à deux reprises avec les cellules de numération Fast-Read 102®. Le nombre de kystes matures par mL a été calculé en tenant compte du facteur de dilution induit par l'incorporation de la solution de SDS.

#### 3.3.3. Mesure du taux d'enkystement

Il a été possible de mesurer le taux d'enkystement dans un échantillon donné. Pour cela il a suffi de dénombrer le nombre total d'amibes dans l'échantillon et le nombre de kystes matures. Le taux d'enkystement a été ensuite calculé par la formule suivante :

$$\text{Taux d'enkystement}(\%) = \frac{\text{Nombre de kystes matures} \times 100}{\text{Nombre total d'amibes}}$$

La figure 22 reprend les différentes étapes nécessaires à la mesure du taux d'enkystement.

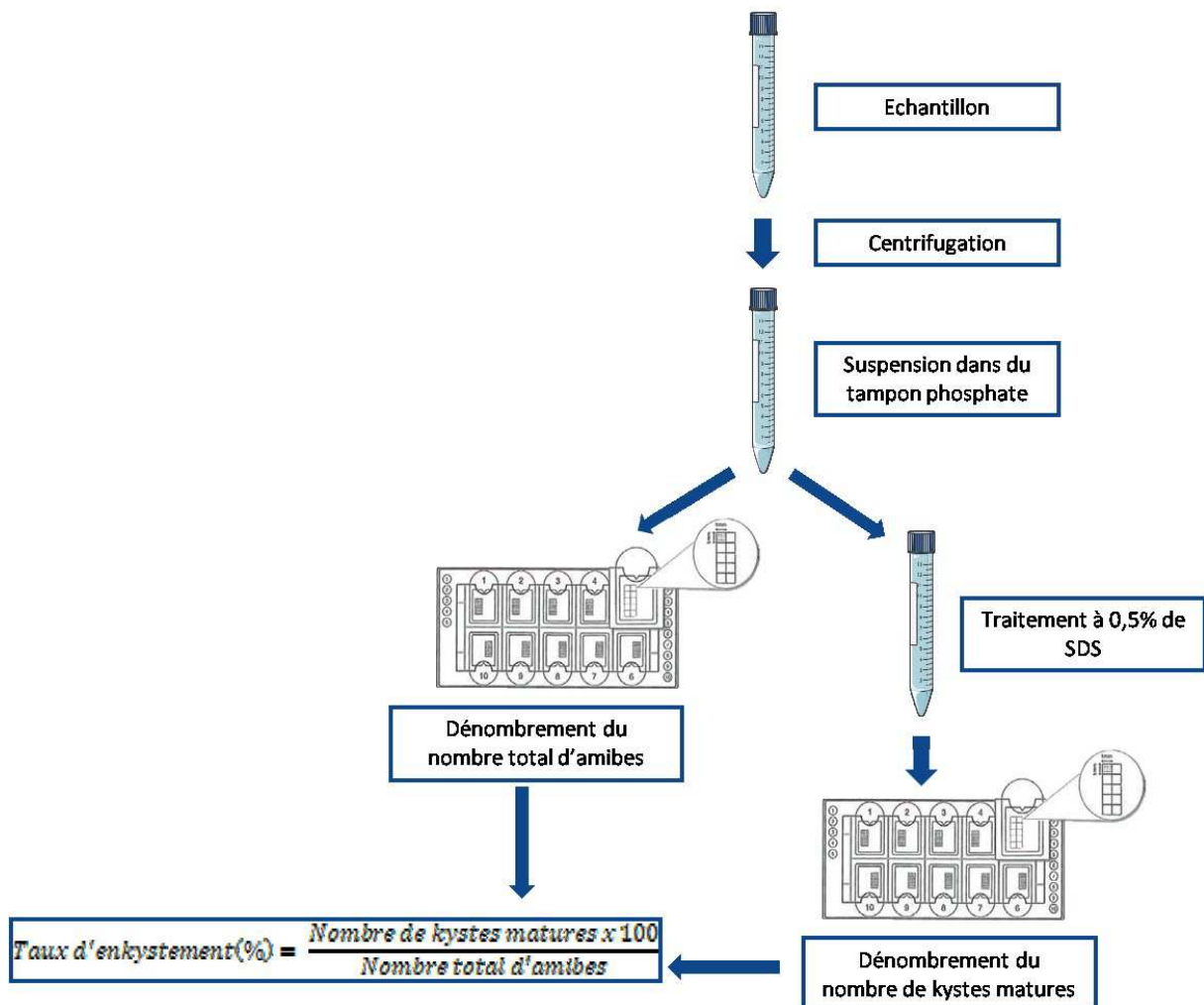


Figure 22 : Mesure du taux d'enkystement.

### 3.4. Estimation de la viabilité

La viabilité des amibes a été estimée par une méthode statistique appelée méthode du Nombre le Plus Probable (NPP). Elle permet d'estimer la concentration des microorganismes cultivables présents dans un échantillon. Pour cela, une série de dilutions allant d'un facteur de  $10^0$  à  $10^{-7}$  de l'échantillon à analyser a été réalisée dans du tampon phosphate (pH = 7,  $50 \text{ mmol.L}^{-1}$ ). Chaque dilution a fait l'objet d'un ensemencement en triplicata sur des géloses NNA-*E. coli* (cf. II.1.2.1.). Après 2 semaines d'incubation à température ambiante, la présence ou l'absence de croissance amibienne a été notée pour chacune des boîtes ensemencées. Cette croissance est caractérisée par la présence d'un halo



de croissance au niveau de l'ensemencement, et de trophozoïtes observables en microscopie photonique inversée. Il a ainsi été obtenu un chiffre allant de 0 à 3 pour chacune des dilutions selon le nombre de boîtes présentant une croissance amibienne. Ces résultats ont été reportés dans un programme de calcul (en ligne le 25/06/13, [http://www.wiwiss.fu-berlin.de/institute/iso/mitarbeiter/wilrich/MPN\\_ver2.xls](http://www.wiwiss.fu-berlin.de/institute/iso/mitarbeiter/wilrich/MPN_ver2.xls)) qui est basé sur les tables de McGrady et qui donne la concentration de l'échantillon en amibes viables.mL<sup>-1</sup>. La méthode NPP utilisée est schématisée dans la figure 23.

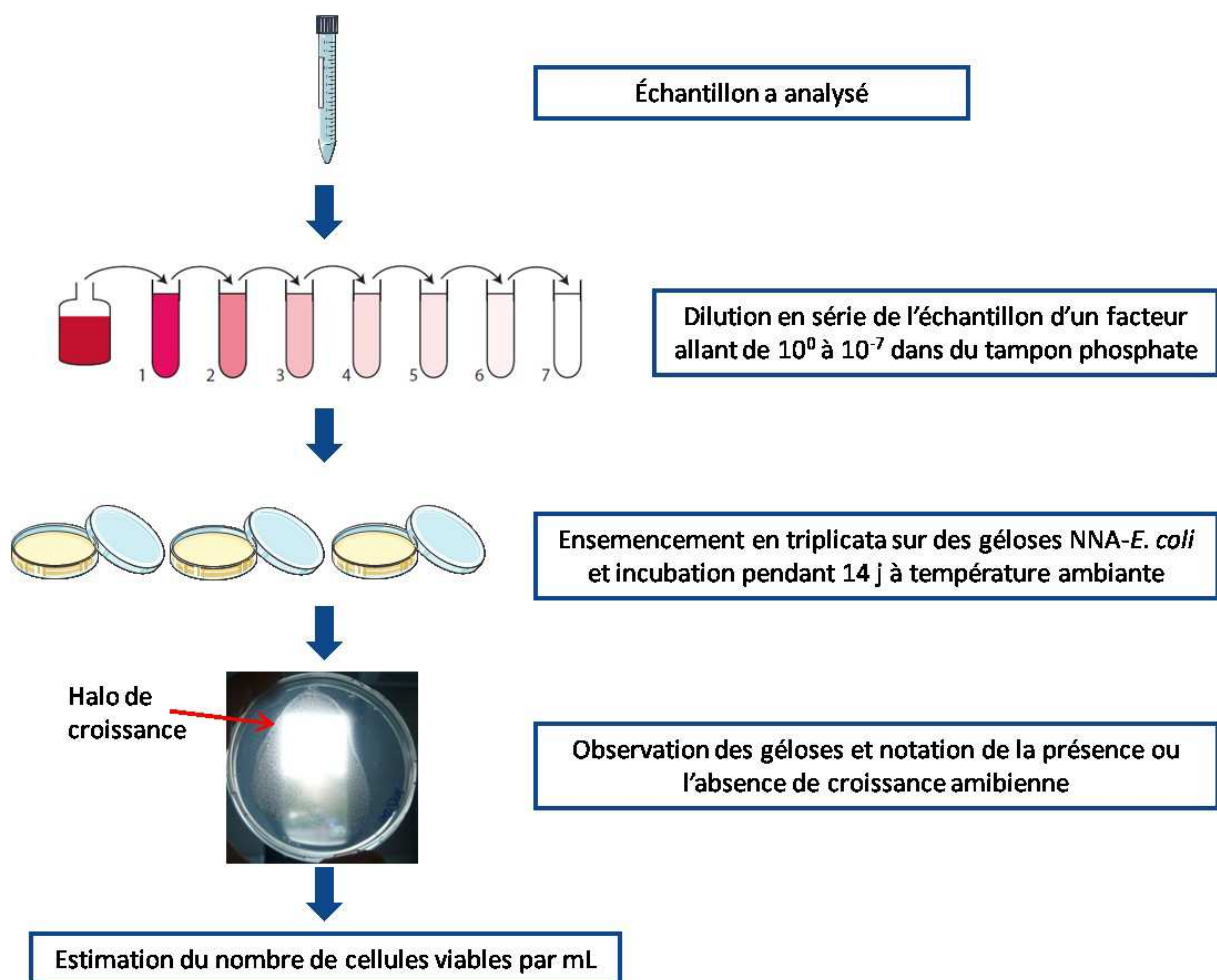


Figure 23 : Estimation de la viabilité des amibes libres.

#### **4. Traitements des kystes d'amibe**

Les traitements ont été réalisés à partir de stocks de kystes matures conservées à 4 °C (cf. II.2.1.1.1.). Pour chaque essai de traitement la concentration en kystes a été ajustée à  $5 \cdot 10^5$  cellules.mL<sup>-1</sup> dans du tampon phosphate (pH = 7, 50 mmol.L<sup>-1</sup>) par dénombrement direct sur cellule de numération (cf. II.3.1.1.).

#### 4.1. Traitements chlorés

Les traitements chlorés ont été réalisés avec une solution commerciale d'hypochlorite de sodium à 13 % de chlore actif (Acros Organics). Le chlore étant instable, il a été nécessaire de doser régulièrement la concentration en chlore libre de cette solution. Ce dosage a été réalisé par la méthode titrimétrique à la *N,N*-diéthylphénylène-1,4 diamine décrite dans la norme internationale NF EN ISO 7393. A partir de cette solution commerciale une solution à  $1 \text{ g.L}^{-1}$  de chlore libre a été préparée extemporanément dans de l'eau ultrapure stérile, il s'agit de la solution mère qui a été utilisée pour le traitement des kystes.

La suspension de kyste a été répartie dans des tubes de 15 mL, puis traitée à différentes concentrations en chlore et différents temps de contacts : 2,5 ; 5 et  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  pendant 10, 30 et 60 min et  $15 \text{ mg.L}^{-1}$  pendant 10 min à 28 °C. A la fin du temps de contact sélectionné, la réaction a été neutralisée par un ajout en excès d'une solution de thiosulfate de sodium à  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  (ajout de  $0,28 \mu\text{L}$  de thiosulfate de sodium à  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  pour neutraliser  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  de chlore dans 1 ml d'échantillon). Pour chaque concentration en chlore testée, un échantillon témoin a été introduit. Il a subi les mêmes conditions que l'échantillon traité, seule la solution de chlore a été remplacée par de l'eau ultrapure stérile ce qui permet de conserver la même concentration cellulaire et également de s'assurer que le thiosulfate de sodium n'est pas nocif pour les kystes.

#### 4.2. Traitements thermiques

La suspension de kystes a été répartie dans des flasques de culture cellulaire de  $25 \text{ cm}^2$  qui ont été incubés à différentes températures et temps d'incubation dans des étuves à chaleur sèche. Quatre températures et deux temps d'incubation ont été appliqués : 50, 55, 60 et 70 °C pendant 30 et 60 min. Le témoin quant à lui a été incubé à 28 °C.

#### 4.3. Traitements à l'acide péracétique couplé au peroxyde d'hydrogène

Les traitements à base d'acide péracétique couplé au peroxyde d'hydrogène ont été réalisés avec une solution commerciale, le Ferrocid 8591, fournie par BKG Water Solutions. Ce réactif est composé de 4,5 % (m/m) d'acide péracétique ( $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_3$ ) et 26,7 % (m/m) de peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), la concentration de ce réactif est exprimée en équivalent

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Une solution à 100 g.L<sup>-1</sup> équivalent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a été préparée extemporanément dans de l'eau ultrapure stérile, il s'agit de la solution mère qui a été utilisée pour le traitement des kystes.

La suspension de kyste a été répartie dans des tubes de 15 mL, puis traitée à différentes concentrations en acide péracétique couplé au peroxyde d'hydrogène et différents temps de contacts : 0,1 ; 0,5 et 1 g.L<sup>-1</sup> équivalent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pendant 30 et 60 min à 28 °C. Sept minutes avant la fin du temps de contact sélectionné, les kystes ont été centrifugés pendant 7 min à 1000 g. Le surnageant a été éliminé et les kystes ont été suspendus pendant 5 min dans 5 mL de bouillon Dey-Engley (référence D3435, Fluka Analytical) additionné de 0,02 % de catalase (numéro CAS : 9001-05-2) afin de neutraliser les désinfectants. Les kystes ont ensuite été centrifugés pendant 7 min à 1000 g et suspendus dans du tampon phosphate (pH = 7 ; 50 mmol.L<sup>-1</sup>). Pour chaque concentration en Ferrocid 8591 testée, un tube témoin comprenant le même volume en eau ultrapure stérile que celui de la solution de Ferrocid 8591 a été réalisé. Puis l'échantillon témoin a subi les mêmes étapes de centrifugation et neutralisation.

#### 4.4. Traitements aux protéases

Les traitements aux protéases ont été réalisés avec une solution commerciale de subtilisine (NS81220), une protéase isolée chez *Bacillus licheniformis* et fournie par Novozymes. La concentration de cette solution est de 2,625 U.mL<sup>-1</sup>, elle a été utilisée pour les traitements sans dilution préalable.

La suspension de kyste a été répartie dans des tubes de 15 mL, les tubes ont ensuite été centrifugés pendant 7 min à 1000 g. Puis, une partie du surnageant a été éliminée et remplacée par la solution de subtilisine à 2,625 U.mL<sup>-1</sup> afin d'obtenir des concentrations finales en subtilisine de 0,625 ; 1,25 et 2,5 U.mL<sup>-1</sup>. Ces suspensions ont alors été incubées dans des flasques de 25 cm<sup>2</sup> pendant 24 h à 37 °C afin d'avoir une activité optimale de l'enzyme. Le témoin a été simplement incubé 24 h à 37 °C.

## **5. Microscopie photonique et électronique**

### **5.1. Microscopie photonique**

#### **5.1.1. Microscopie à contraste de phase**

Deux microscopes à contraste de phase ont été utilisés : un microscope inversé (CKX41, Olympus) et un microscope droit (BX51, Olympus). Le microscope inversé, muni de trois objectifs (x10, x20 et x40), permettait d'observer directement les populations d'amibes dans les flasques de culture cellulaire, les microplaques et sur les géloses NNA-*E. coli*. Cependant, pour faire des prises de vue plus nettes et à plus fort grossissement un microscope droit équipé d'un objectif à immersion x100 a été utilisé. L'échantillon à observer était alors déposé entre lame et lamelle.

#### **5.1.2. Microscopie confocale**

Un microscope confocal inversé à disque rotatif de type Revolution/Andor a été utilisé pour faire une acquisition de signaux en transmission au cours du temps. Pour cela les amibes étaient placées dans une boîte de pétri à fond de verre qui permet l'observation au microscope confocal. Puis une acquisition en transmission a été faite toute les 30 ou 60 s pendant plusieurs heures sur différentes positions de la boîte de pétri. Ces acquisitions ont été réalisées à l'aide d'un objectif x 20. Grâce aux images générées sur chacune des positions de la boîte de pétri, des films ont été montés avec 15 images par seconde. Les expérimentations de microscopie confocale ont été réalisées au sein de la plateforme de microscopie ImageUP de l'Université de Poitiers.

### **5.2. Microscopie électronique**

Les expérimentations de microscopie électronique à balayage et à transmission ont été réalisées au sein de l'unité de Pathologie Ultrastructurale et Expérimentale du service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques du CHU de Poitiers.

#### **5.2.1. Microscopie électronique à balayage (MEB)**

Pour les expérimentations de MEB les amibes ont été cultivées, enkystées ou déenkystées soit dans des flacons de culture cellulaire soit directement sur des lamelles en verre qui permettent l'observation au microscope électronique à balayage.

Les amibes, présentes dans les flacons de culture cellulaire, ont été détachées du support par grattage puis centrifugées 7 min à 500 g. Le surnageant a été éliminé et le culot a été remis en suspension dans une solution de glutaraldéhyde à 3 % préparée avec du tampon phosphate avec une concentration finale de  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  et un pH de 7,2. La fixation au glutaraldéhyde a été faite pendant 2 h à  $4^\circ\text{C}$ . Au bout de ce temps, les cellules ont été lavées trois fois avec du tampon phosphate ( $\text{pH} = 7$ ,  $50 \text{ mmol.L}^{-1}$ ), puis déposées sur des lamelles en verre préalablement polyislinées pour permettre l'adhésion des cellules.

Les amibes qui ont été cultivées, enkystées ou déenkystées directement sur des lamelles en verre étaient adhérentes ce qui a permis de faire une fixation directe sur les lamelles. Pour cela, le milieu dans lequel baignait les lamelles a été éliminé et remplacé par une solution de glutaraldéhyde à 3 % préparée dans du tampon phosphate ( $\text{pH} = 7,2$  ;  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ). La fixation a été faite à  $4^\circ\text{C}$  pendant 2 h, puis les lamelles ont été rincées trois fois avec du tampon phosphate ( $\text{pH} = 7$ ,  $50 \text{ mmol.L}^{-1}$ ).

Après l'étape de fixation au glutaraldéhyde, les cellules ont été déshydratées dans des bains successifs de concentrations croissantes en acétone. Pour cela, les lamelles en verre ont été immergées : deux fois pendant 1 min, 5 min et 10 min dans des bains d'acétone à 50 %, 70 % et 90 % respectivement. Pour finir, une immersion de 5 min dans de l'acétone pur a été réalisée. Après déshydratation, les cellules ont été desséchées par contournement du point critique du dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ). Cette étape a été réalisée dans un appareil à point critique (BAL-TEC CPD 030). Suite aux étapes de déshydratation et de dessiccation, les lamelles ont été collées sur des plots métalliques à l'aide d'un ruban adhésif conducteur. Les échantillons ont été ensuite métallisés grâce à un métalliseur à pulvérisation cathodique avec une source Or (BAL-TEC SCD 005).

L'observation des échantillons a été faite avec un microscope électronique à balayage JEOL JSM-840 équipé ou non d'une caméra. Lorsque le microscope électronique à balayage n'était pas équipé d'une caméra les photographies étaient prises sur pellicules argentiques.

La figure 24 reprend les grandes étapes de la préparation des échantillons pour l'observation en MEB.

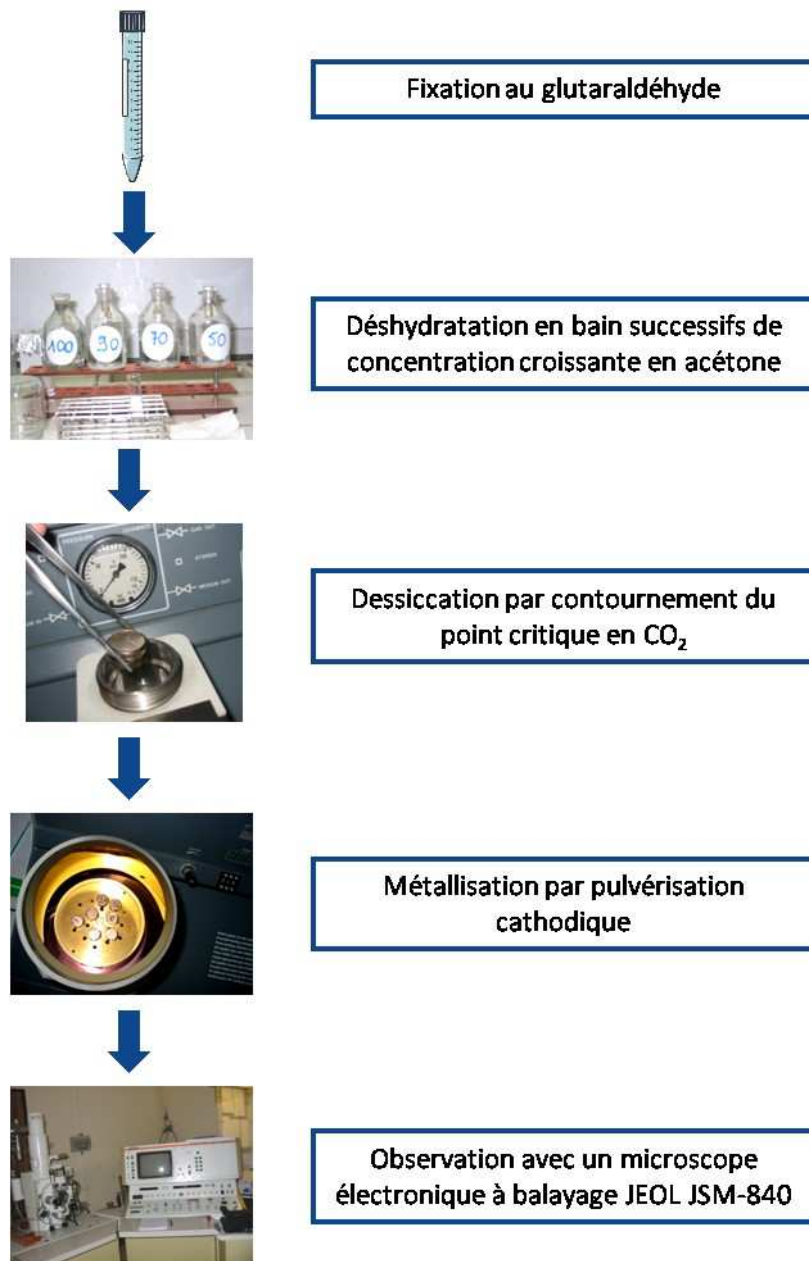


Figure 24 : Préparation des échantillons pour l'observation en microscopie électronique à balayage.

### 5.2.2. Microscopie électronique à transmission (MET)

Pour la MET les amibes ont été cultivées, enkystées ou déenkystées dans des flacons de culture cellulaire, puis fixées au glutaraldéhyde avec le même protocole tel que utilisé en MEB (*cf.* II.5.2.1.). Les cellules ont ensuite été lavées trois fois avec du tampon phosphate ( $\text{pH} = 7$ ,  $50 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) puis post-fixées au tetroxyde d'osmium. Pour cela, les cellules ont été centrifugées 7 min à 500 g puis remises en suspension dans d'une solution de tetroxyde

d'osmium à 1 % pendant 1 h à 4 °C. Après 1 h de post-fixation, les cellules ont été lavées une fois dans du tampon phosphate (pH = 7, 50 mmol.L<sup>-1</sup>).

Afin de pouvoir déshydrater et inclure facilement les culots cellulaires, il a été nécessaire de faire un pré-enrobage en agar. Pour cela, les cellules ont été centrifugées 7 min à 500 g puis le surnageant a été retiré et remplacé par de l'agar liquide, de type HistoGel™, préalablement réchauffé. Après homogénéisation, les cellules ont été centrifugées 10 min à 1000 g puis recouvertes de tampon phosphate (pH = 7, 50 mmol.L<sup>-1</sup>) froid avant d'être placées à 4 °C jusqu'à solidification du bloc de gélose. Le bloc de gélose contenant le culot cellulaire, plus facile à manipuler, a alors été déshydraté dans des bains successifs de concentration croissante en acétone. Pour cela, les blocs ont été immergés : deux fois 1 min, 5 min et 15 min dans des bains d'acétone à 50 %, à 70 % et à 90 % respectivement. Pour finir, quatre immersion de 15 min chacune dans de l'acétone pur ont été réalisées. Les culots cellulaires ont été alors inclus dans une résine époxy et hydrophobe, l'araldite. Pour cela, les culots cellulaires ont été placés tout d'abord pendant 3 h dans un mélange : 50 % acétone / 50 % résine puis pendant un minimum 12 h dans de la résine pure. Les culots cellulaires ont été ensuite coulés dans des gélules en gélatine et enrobés de résine puis polymérisés à 60 °C pendant 24 h.

Une fois les blocs polymérisés, les culots cellulaires ont été dégagés à l'aide d'un pyramitome puis des coupes semifines de 1 µm d'épaisseur ont été coupées avec un microtome équipé d'un couteau de verre. Les coupes semifines ont été déposées sur des lames de verre, colorées avec une solution de bleu de toluidine fortement alcaline et fixées par dépôt de la lame sur une plaque chauffante à 80 °C. Les lames ont été observées en microscopie photonique afin de sélectionner les zones à examiner en microscopie électronique à transmission. Les zones d'intérêt étant sélectionnées, des coupes ultrafines de 60 nm d'épaisseur ont alors été coupées avec un ultramicrotome équipé d'un couteau en diamant. Les coupes ultrafines ont été récupérées avec des grilles puis contrastées avec deux sels de métaux lourds : l'acétate d'uranyle et les sels de plomb. Les grilles ont d'abord été contrastées par immersion pendant 1 min dans une solution d'acétate d'uranyle à 4 % en solution alcoolique à 70 %. Puis, elles ont été rincées et contrastées avec des sels de plomb selon la méthode de Reynolds (Reynolds, 1963).

L'observation des coupes a été faite avec un microscope électronique à transmission JEOL 1010 équipé d'une caméra.

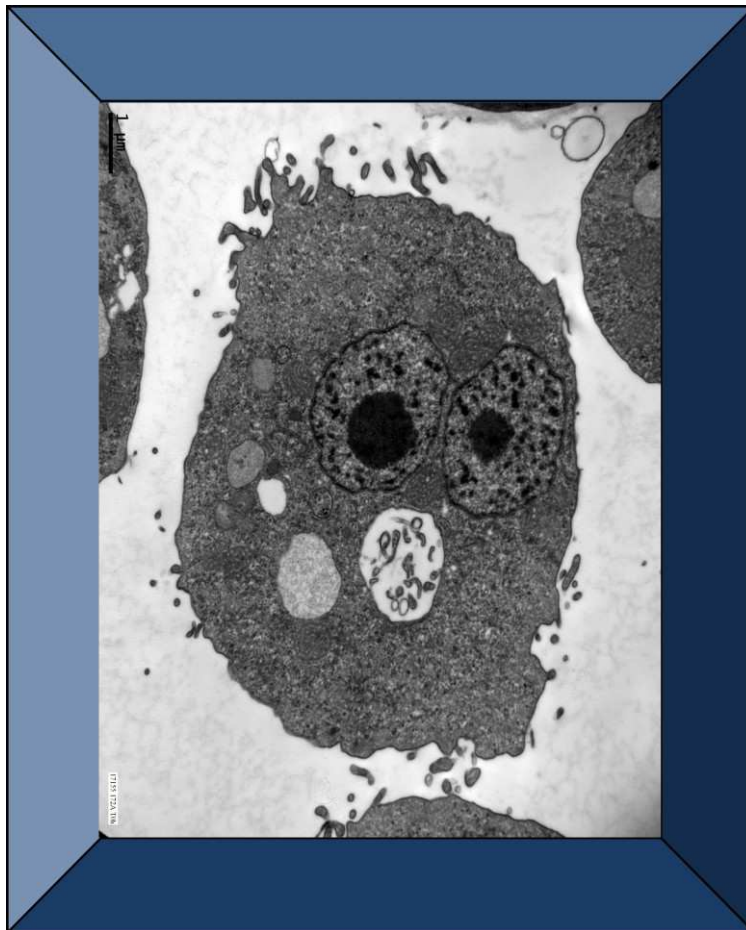
La figure 25 reprend les grandes étapes de la préparation des échantillons pour l'observation en MET.





Figure 25 : Préparation des échantillons pour l'observation en microscopie électronique à transmission.

# CHAPITRE IV : Etude morphologique et ultrastructurale des processus d'enkystement et de désenkystement chez *V. vermiformis*



## CHAPITRE IV : Etude morphologique et ultrastructurale des processus d'enkystement et de désenkystement chez *V. vermiformis*

L'enkystement est une étape clé dans la résistance des amibes libres aux conditions défavorables rencontrées dans les environnements naturels et artificiels. Dans l'optique de contrôler les amibes libres dans les environnements artificiels comme les RECS et les TAR où elles peuvent causer des risques sanitaires, une meilleure compréhension des processus de différenciation est nécessaire. La plupart des études, portant sur ces processus, a été réalisée chez les genres *Acanthamoeba* et *Naegleria* en raison de leur pouvoir pathogène pour l'Homme. Malgré la haute prévalence de *V. vermiformis* dans les environnements artificiels et son rôle de réservoir de bactéries pathogènes bien établi, les processus de différenciation n'ont été que très peu étudiés chez cette espèce. Il existe quelques descriptions morphologiques et structurales des trophozoïtes et des kystes réalisées en microscopie optique et MET (Page, 1967, 1974 et 1986 ; Smirnov et Michel, 1999). En 2005, Dykova *et al.* ont également étudié la structure de kystes immatures de souches de *V. vermiformis* isolées de poissons. Mais, au début de la thèse, il n'existait aucune donnée concernant les changements morphologiques et ultrastructuraux qui s'opèrent lors de l'enkystement et du désenkystement de *V. vermiformis*. Nous avons donc décidé d'étudier grâce à des techniques de microscopie optique et de microscopie électronique les processus de différenciation chez *V. vermiformis*.

Dans un premier temps, il a été nécessaire de sélectionner les souches de *V. vermiformis* à étudier, de définir le milieu d'enkystement le plus approprié pour induire l'enkystement chez *V. vermiformis* et de choisir les techniques de microscopie les plus adaptées à notre étude.

### **1. Choix et mise en place des techniques**

Le premier point important a été le choix des souches de *V. vermiformis*. Nous avons à notre disposition une souche de référence (ATCC 50237) et plusieurs souches environnementales isolées de rivières et de réseaux de distribution d'eau. Plusieurs critères sont entrés en jeu dans le choix des souches. Le premier est qu'elles soient axéniques, c'est-à-dire exemptes de tous microorganismes mêmes symbiotiques. En effet, la présence de microorganismes intracellulaires pourrait interférer avec les processus d'enkystement et de

désenkystement. Le deuxième critère est qu'elles soient cultivables en milieu nutritif liquide afin de faciliter les expérimentations. Seules deux souches de *V. vermiformis*, disponibles au laboratoire, répondaient à ces critères (cf. III.1.1.1. Souches de *Vermamoeba vermiformis*) : la souche de référence *V. vermiformis* ATCC 50237 et la souche environnementale *V. vermiformis* 172A. L'étude des processus de différenciation a donc été réalisée sur ces deux souches.

Le deuxième point important a été de sélectionner un protocole permettant d'induire l'enkystement de *V. vermiformis*. Au début de la thèse, il n'existait que très peu de données concernant les facteurs induisant l'enkystement de *V. vermiformis*. Nous nous sommes donc basé sur les travaux de recherche menés chez *Acanthamoeba*, où les facteurs induisant l'enkystement sont plutôt bien connus. Chez *Acanthamoeba*, il est bien établi que le facteur majeur induisant l'enkystement est la déplétion nutritive (Byers, 1979 ; Neff *et al.*, 1964). L'enkystement d'*Acanthamoeba* peut donc être induit dans différents milieux comme les géloses NNA recouvertes ou non de bactéries, le tampon phosphate salin ou encore les milieux dit « d'enkystement » (Aqeel *et al.*, 2013 ; Neff *et al.*, 1964). Chez *Acanthamoeba*, il est également possible d'induire l'enkystement par un stress osmotique dû à un ajout de sels ou de glucose au milieu de culture ou au milieu d'enkystement (Aqeel *et al.*, 2013 ; Cordingley *et al.*, 1996 ; Khunkitti *et al.*, 1998). Selon le milieu utilisé, l'enkystement d'*Acanthamoeba* est plus ou moins rapide et plus ou moins synchrone. Dans le but de réaliser une chronologie claire des différents changements morphologiques et ultrastructuraux qui s'opèrent lors de l'enkystement de *V. vermiformis*, il est nécessaire d'avoir un enkystement le plus synchrone possible. Chez *Acanthamoeba*, le milieu d'enkystement Neff permet un enkystement rapide et synchrone des cellules, il dure entre 16 et 24 h dans ce milieu (Hughes *et al.*, 2003a ; Neff *et al.*, 1964). Nous avons donc choisi d'utiliser ce milieu pour induire l'enkystement de *V. vermiformis*. De plus, ne sachant pas si l'enkystement de *V. vermiformis* pouvait être induit par un stress osmotique, un milieu non nutritif nous semblait la meilleure option. Nous l'avons également sélectionné car il s'agit d'un milieu liquide ce qui permet d'obtenir des cellules exemptes de débris de gélose ou de bactéries, qui pourraient interférer lors des diverses préparations techniques. Le protocole d'enkystement de *V. vermiformis* est détaillé dans la partie III.3.1.1. Enkystement en milieu liquide Neff. Pour induire le désenkystement de *V. vermiformis*, notre choix s'est porté sur le milieu nutritif PYNFH modifié, il s'agit du milieu de culture utilisé classiquement pour le

développement de *V. vermiformis* et des amibes appartenant au genre *Hartmannella*. Le protocole de désenkystement est précisé dans la partie II.3.2. Désenkystement des amibes.

Le troisième point important a été de sélectionner les techniques de microscopie les plus adaptées pour l'étude des processus de différenciation chez *V. vermiformis*. La première approche a été de suivre l'enkystement et le désenkystement au cours du temps de façon dynamique. Pour cela, nous avons utilisé un microscope confocal inversé à disque rotatif pour faire une acquisition des signaux en transmission au cours du temps. Les acquisitions ont été faites toutes les 30 s pendant plusieurs heures (jusqu'à 24 h pour le désenkystement). A partir de ces signaux, des vidéos ont été réalisées afin de suivre, de façon dynamique, les processus de différenciation chez *V. vermiformis*. Nous avons également utilisé des microscopes à contraste de phase qui permettent d'observer les cellules vivantes sans coloration préalable. Puis nous nous sommes servis des techniques de MEB et MET. La MEB nous a permis d'obtenir des images en haute résolution de la surface des cellules. Elle a été utilisée pour étudier la structure des trophozoïtes et des kystes ainsi que le processus de désenkystement chez *V. vermiformis*. La MET, quant à elle, donne accès à l'acquisition d'images en haute résolution de cellules en coupes ultrafines. Cette technique a permis d'une part de définir l'ultrastructure des trophozoïtes et des kystes et d'autre part d'étudier les changements ultrastructuraux qui s'opèrent lors de l'enkystement et du désenkystement de *V. vermiformis*. Les différents protocoles utilisés sont détaillés dans la partie III.5. Microscopie photonique et électronique.

## **2. Résultats et discussion**

Ce travail de recherche fait l'objet d'un article scientifique. La version présentée dans ce manuscrit est un document de travail qui sera finalisé avant la date de soutenance. Il sera soumis dans le journal « Eukaryotic cell ».

### **2.1. Article « Dynamic study of the encystment and excystment of *Vermamoeba vermiformis* revealed original traits »**

**Dynamic study of the encystment and excystment of *Vermamoeba vermiformis* revealed original traits.**

**Emilie FOUQUE, Marina YEFIMOVA, Marie-Cécile TROUILHÉ, Nathalie QUELLARD, Béatrice FERNANDEZ, Marie-Hélène RODIER, Vincent THOMAS, Philippe HUMEAU, Yann HÉCHARD**

**Key-words:** Encystment, Excystment, Free-living amoeba, Scanning electron microscopy, Transmission electron microscopy, *Vermamoeba vermiformis*

## **INTRODUCTION**

Free-living amoebae (FLA) are protozoa widely distributed in the environment and isolated from water, soil, air, compost and sediments (Rodriguez-Zaragoza, 1994). FLA also colonize aquatic environment related to human activities such as water treatment plants (Thomas *et al.*, 2008), water distribution networks (Thomas *et al.*, 2006), cooling towers (Srikanth and Berk, 1993), cooling systems of nuclear power plants (Sykora *et al.*, 1983) and hot water networks (Rohr *et al.* 1998). Even if FLA are not considered to constitute a major threat for human health, those belonging to *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris* and *Naegleria fowleri* are responsible for severe brain pathologies (Marciano-Cabral and Cabral, 2003; Schuster and Visvesvara, 2004). FLA are mainly encountered in biofilms and feed by grazing on microorganisms. Importantly, some pathogenic bacteria like *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Mycobacterium* spp. resist to amoebic phagocytosis (Greub and Raoult, 2004). Thus, it is recognized that FLA (trophozoite or cyst forms) act as reservoirs of pathogenic bacteria, resulting in protection from hostile conditions and promoting bacterial dissemination in the environment (Greub and Raoult, 2004; Horn *et al.*, 2000; Santic *et al.*, 2011; Thomas *et al.*, 2010). FLA have two stages of development: a vegetative form named trophozoite and a dormant form named cyst, this differentiation is called encystment, for a review see Fouque *et al.* (2012). Encystment occurs when environmental conditions become unfavorable such as nutrient starvation or osmotic stress (Cordingley *et al.*, 1996; Neff *et al.*, 1964). Encystment induces extensive morphological changes: FLA become spherical and a cyst wall is formed, leading to increase resistance of cysts to treatments and harsh conditions.

The species *Vermamoeba vermiformis* which has been classified, until 2011, in the genus *Hartmannella* (Smirnov *et al.*, 2011) is predominant in hot water systems (Buse *et al.*, 2013; Jacquemin *et al.*, 1981; Loret *et al.*, 2008a and b; Ovrusky *et al.*, 2013; Rohr *et al.*, 1998;

Thomas *et al.*, 2006 and 2008). A little scientific concern is given to *V. vermiformis* mainly because it is not directly pathogenic for humans, even if it is considered by some authors as an opportunistic colonizer associated with meningoencephalitis (Centeno *et al.*, 1996) or keratitis (Aitken *et al.*, 1996; Inouet *et al.*, 1998; Lorenzo-Morales *et al.*, 2007). However, it is well recognized that *V. vermiformis* act as a reservoir of pathogenic bacteria (Horn *et al.*, 2000; Santic *et al.*, 2011) such as *L. pneumophila*. The relation between *V. vermiformis* and *L. pneumophila* is well documented (Abu Kwaik *et al.*, 1994 and 1996; Fields *et al.*, 1990; Venkataraman *et al.*, 1997 and 1998; Venkataraman and Abu Kwaik, 2000). In addition, it was demonstrated that the majority of legionellosis outbreaks were linked to hot water networks or cooling towers contaminated by *L. pneumophila* associated to FLA including *V. vermiformis* (Fields *et al.*, 2002; Kuiper *et al.*, 2004). The management of *V. vermiformis* in artificial environments is therefore a first health public issue in the control of *Legionella* spp. risk. However *V. vermiformis* may be resistant to disinfection treatments due to the cyst resistant form. The resistance of *V. vermiformis* cysts to disinfection treatments is poorly documented (Critchley and Bentham, 2008; Kutcha *et al.*, 1993). Few studies showed that conventional disinfection treatments are often inefficient to fully inactivate FLA in cooling towers and hot water systems (Rohr *et al.*, 1998; Srikanth and Berk, 1993). However, it is generally shown that trophozoites are more sensitive to disinfection treatments than cysts. This is why it is important to better understand the processes of differentiation of FLA.

Morphological and ultrastructural changes that occur during encystment and excystment processes have been well studied on FLA belonging the genus *Acanthamoeba* and *Naegleria* (Bowers and Korn, 1969; Chavez-Mungia *et al.*; 2005, 2009 and 2013; Pasternak *et al.*, 1970). On the contrary only few studies on the trophozoites and cyst forms of *V. vermiformis* are available to date. The strain was first described in 1967 by Page then revisited twice in 1974 and 1986 by the same author. Later, the more detailed study of *V. vermiformis* trophozoites and cysts forms was undertaken by Smirnoff and Michel (1999) and Dykova *et al* (2005). The studies documented a double-layer wall of *V. vermiformis* cysts along with close apposition of separation of endocyst and ectocyst. However, the systemic study of ultrastructural changes that occurs during the processes of differentiation of *V. vermiformis* has been never performed. Thus our aim was to undertake a comparative step-by-step analysis of *V. vermiformis* differentiation, using two strains of amoeba on the light, confocal-video-microscopy and electron microscopy levels.

## MATERIALS AND METHODS

### Amoebal strains

Two strains of *Vermamoeba vermiformis* were used in this study: *V. vermiformis* Page ATCC 50237, a reference strain isolated from a hospital cooling tower in South Dakota (USA); and *V. vermiformis* 172A, referenced as *H. vermiformis* strain 2, an environmental strain from a hospital water network (Lausanne, Switzerland) (Thomas *et al.* 2006).

Two strains of *Acanthamoeba* sp. were used in this study: *A. castellanii* ATCC 30234, a reference strain derived from *A. castellanii* ATCC 30011, and *Acanthamoeba* sp. ApCHUV (referenced as *Acanthamoeba* sp. 4) an environmental strain isolated from a hospital water network and used by Coulon *et al.* (2010).

### Cultivation

The *V. vermiformis* strains were grown axenically in 15 mL of modified PYNFH medium (pH = 6.5, 1 % bacto-peptone, 1 % yeast extract, 0.1 % RNA of torula yeast type VI, 33  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  folic acid, 1.5  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  hemin, 3.6  $\text{mmol.L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 26  $\text{mmol.L}^{-1}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10 % fetal bovine serum), in a 75  $\text{cm}^2$  tissue culture flask at 28 °C. Every 3-5 days of culture, the strains were subcultured. The strains of *Acanthamoeba* sp. were grown axenically in the same way in PYG medium (pH = 6,5, 2 % proteose peptone, 0.1 % yeast extract, 0.1  $\text{mol.L}^{-1}$  glucose, 4  $\text{mmol.L}^{-1}$   $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,4  $\text{mmol.L}^{-1}$   $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 3,4  $\text{mmol.L}^{-1}$  sodium citrate dihydrate, 2,5  $\text{mmol.L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 2,5  $\text{mmol.L}^{-1}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5  $\text{mmol.L}^{-1}$   $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ).

### Encystment

Encystment was performed using Neff's encystment medium (pH= 8.8, 0.1  $\text{mol.L}^{-1}$  KCl, 8  $\text{mmol.L}^{-1}$   $\text{MgSO}_4$ , 0.4  $\text{mmol.L}^{-1}$   $\text{CaCl}_2$ , 20  $\text{mmol.L}^{-1}$  Tris (2-amino-2-hydroxymethyl-1.3-propanediol),  $\text{NaHCO}_3$  1  $\text{mmol.L}^{-1}$ ). Trophozoites (3 days old) were harvested by centrifugation (500 x g for 7 min), washed twice in encystment medium and suspended in 15 mL of encystment medium at approximately  $5 \times 10^5$  trophozoites. $\text{mL}^{-1}$ . Then trophozoites were incubated in 75  $\text{cm}^2$  tissue culture flasks at 28 °C.

### Excystment

Excystment was performed by incubation in nutritive liquid medium. For that, the cysts (7 days old) were harvested by centrifugation (1000 x g for 7 min), suspended in modified



PYNFH medium for *V. vermiformis* or PYG medium for *Acanthamoeba* sp. and incubated at 28 °C in 75 cm<sup>2</sup> tissue culture flasks.

### **Light microscopy**

An inverted confocal microscope with rotary disk (Revolution/Andor; Olympus IX81-ZDC) was used for time-lapse studies. Generally, recording lasted 24 h; the pictures were taken every 30 s, and then assembled using FluoView software so that the 1 second of resulted movies contained 15 pictures.

### **Scanning electron microscopy**

Samples were fixed for 2 h at 4 °C with 3 % glutaraldehyde in phosphate buffer (pH = 7.2, 0.1 mol.L<sup>-1</sup>). After, the cells were rinsed in phosphate buffer (pH = 7.2, 0.1 mol.L<sup>-1</sup>). Then the cells were dehydrated in graded acetone series (50 % 2 x 1 min, 70 % 2 x 5 min, 90 % 2 x 10 min and 100 % 1 x 5 min) and dried by bypassing the critical point of CO<sub>2</sub> (BAL-TEC CPD 030). Finally the samples were metalized by cathode sputter with gold (BAL-TEC SCD 005). The samples were observed using JEOL JSM-840 scanning electron microscope.

### **Transmission electron microscopy**

Samples were fixed for 2 h at 4 °C with 3 % glutaraldehyde in phosphate buffer (pH = 7.2, 0.1 mol.L<sup>-1</sup>). The cells were rinsed three times in phosphate buffer (pH = 7.2, 0.1 mol.L<sup>-1</sup>) and post-fixed for 1 h at 4 °C with 1 % osmium tetroxyde in the same buffer. Then the cells were rinsed in phosphate buffer and pre-embedded in HistoGel™. After, the samples were dehydrated in graded acetone series (50 % 2 x 1 min, 70 % 2 x 5 min, 90 % 2 x 15 min and 100 % 4 x 15 min). Then the samples were embedded in hydrophobic and epoxy resin (araldite) and polymerized to 60 °C for 24 h. Sections of 60 nm thickness were cut on an ultramicrotome, and sections were stained 1 min with a alcoholic solution (70 %) of 4 % uranyl acetate. Finally the sections were rinsed in phosphate buffer and stained with lead salts according to the Reynolds' technique (1963). The samples were observed using JEOL 1010 transmission electron microscope.

## **RESULTS**

### **Structural studies of trophozoites**

Differentiation (encystment and excystment) of *V. vermiformis* has been poorly studied. Although this genus is a major FLA in water and may harbor pathogenic bacteria. The

dynamic study of encystment (until 7 days) of two strains was followed by electronic microscopy and time lapse microscopy.

In order to compare encystment to a control, we first performed studies on trophozoites. Both *V. vermiformis* strains were identical in regard to their shape, morphology and behavior (Fig. 1). Our data are in good agreement with previous studies (Dykova *et al.*, 1987; Page, 1987, Smirnov and Michel, 1999). Trophozoites present an elongate cylindrical motile form and moved owing to the pseudopods that protrude laterally onward the direction of movement. By SEM analysis both *V. vermiformis* surface and pseudopods appeared smooth (Fig. 1A-B) in contrast to spine-like ones from *Acanthamoeba*. In some cases outward opened cup-like forms were observed on the surface of trophozoite of *V. vermiformis* (Fig. 1B)

The TEM pictures (Fig. 1C-D) confirmed previous observation that *V. vermiformis* are mononuclear; the nucleus contains a central, dense and homogenous nucleolus along with dense granular material, distributed in the caryoplasm (Fig. 1). Numerous mitochondria with tubular cristae, homogenously distributed in *V. vermiformis* cytoplasm, were observed (Fig. 1F), as well as contractile vacuoles and digestive vacuoles. Interestingly, in some cases the cytoplasm from pseudopods exhibited a fibrillar appearance (Fig. 1E).

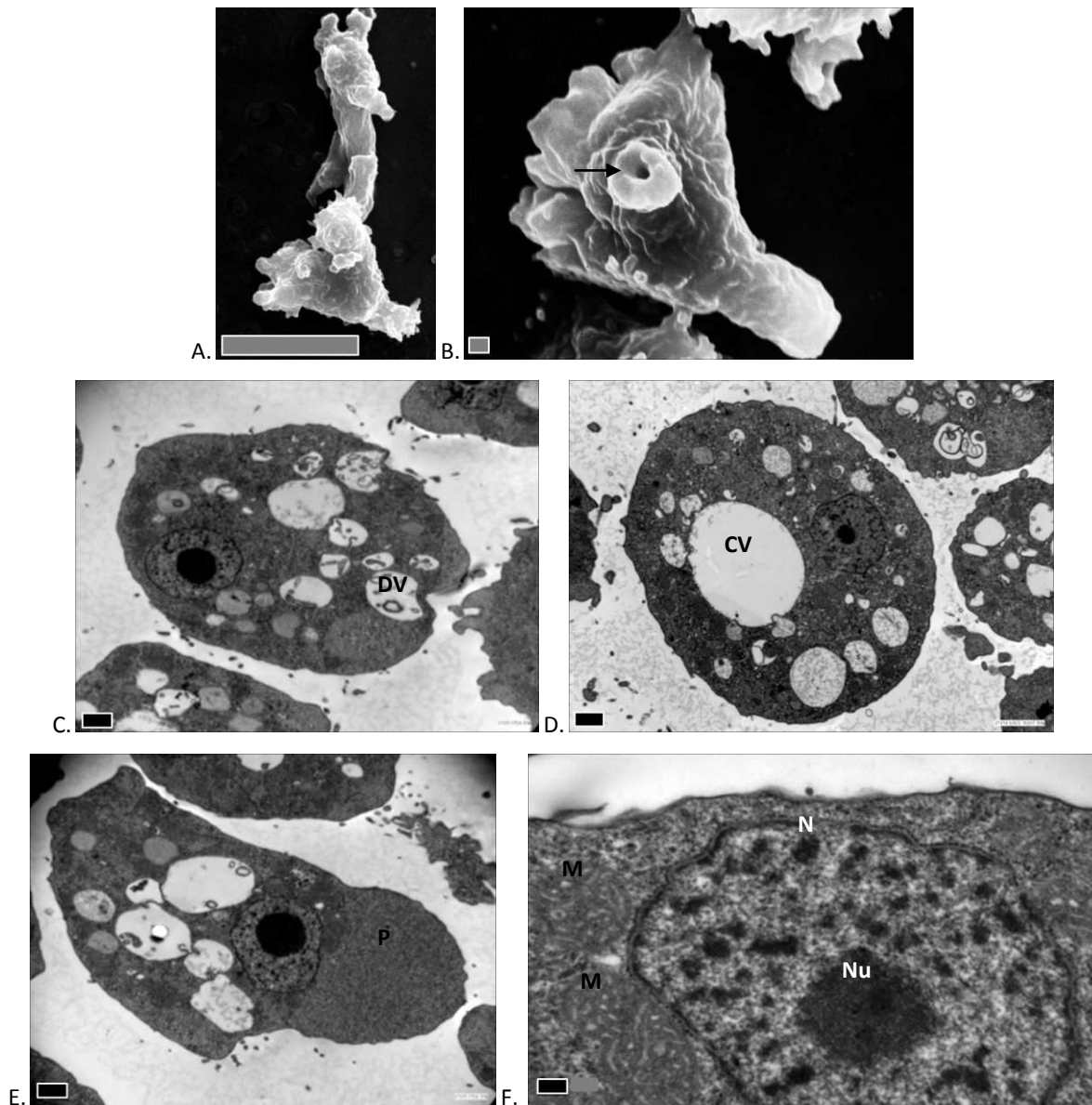


Figure 1: Trophozoites forms of *V. vermiformis* in SEM and TEM, A-B. Trophozoites of *V. vermiformis* 172A, arrow marks cup-like form (Scale bars: 10 and 1  $\mu\text{m}$ ), C. Trophozoite of *V. vermiformis* 172A with numerous digestive vacuoles (DV) (Scale bar: 1  $\mu\text{m}$ ), D. Trophozoite of *V. vermiformis* ATCC 50237 with contractile vacuole (CV) (Scale bar: 1  $\mu\text{m}$ ), E. Trophozoite of *V. vermiformis* 172A with pseudopod (P) (Scale bar: 1  $\mu\text{m}$ ), F. Nucleus (N) with central homogenous nucleolus (Nu) and mitochondria (M) with tubular cristae of *V. vermiformis* 172A (Scale bar: 0.2  $\mu\text{m}$ ).

### Motile forms are involved in clustering of cysts

The follow up of the encystment process by electronic and time-lapse microscopy showed that encystment of *V. vermiformis* was synchronous and fast. Indeed, the majority of cells were encysted after 9 h in our conditions, for both strains (Movies online resource 1 and 2). After immobilization, cells became spherical and often formed clusters. Remarkably, a little

part of cells stayed under motile form, moved actively from cluster to cluster and appeared to be involved in the clusters formation (Movie online resource 3).

#### **Cyst wall is composed of two layers**

Significant modifications of *V. vermiformis* structure occurred after 3h. By this time cells became spherical, volume decreased as well as the number of contractile and digestive vacuoles (Fig. 2A-B). The formation of cyst wall was carried out between 6 to 9 hours of encystment. Cyst wall formation started with a gradual transformation of cyst membrane, which became fibrillar and reached 250-400 nm in mature cyst (Fig. 2E). Remarkably, this process was accompanied with the emergence of numerous 100-200 nm vesicles in the vicinity of cyst membrane; the vesicles seemed to release the fibrillar material in the pericellular space (Fig. 2C-D), suggesting their participation in cyst wall formation. By 9 h mature cyst wall is composed of two layers, endocyst and ectocyst, which were closely apposed (Fig. 2E); wall maturation defines final volume of cyst (6-10  $\mu\text{m}$  in diameter).

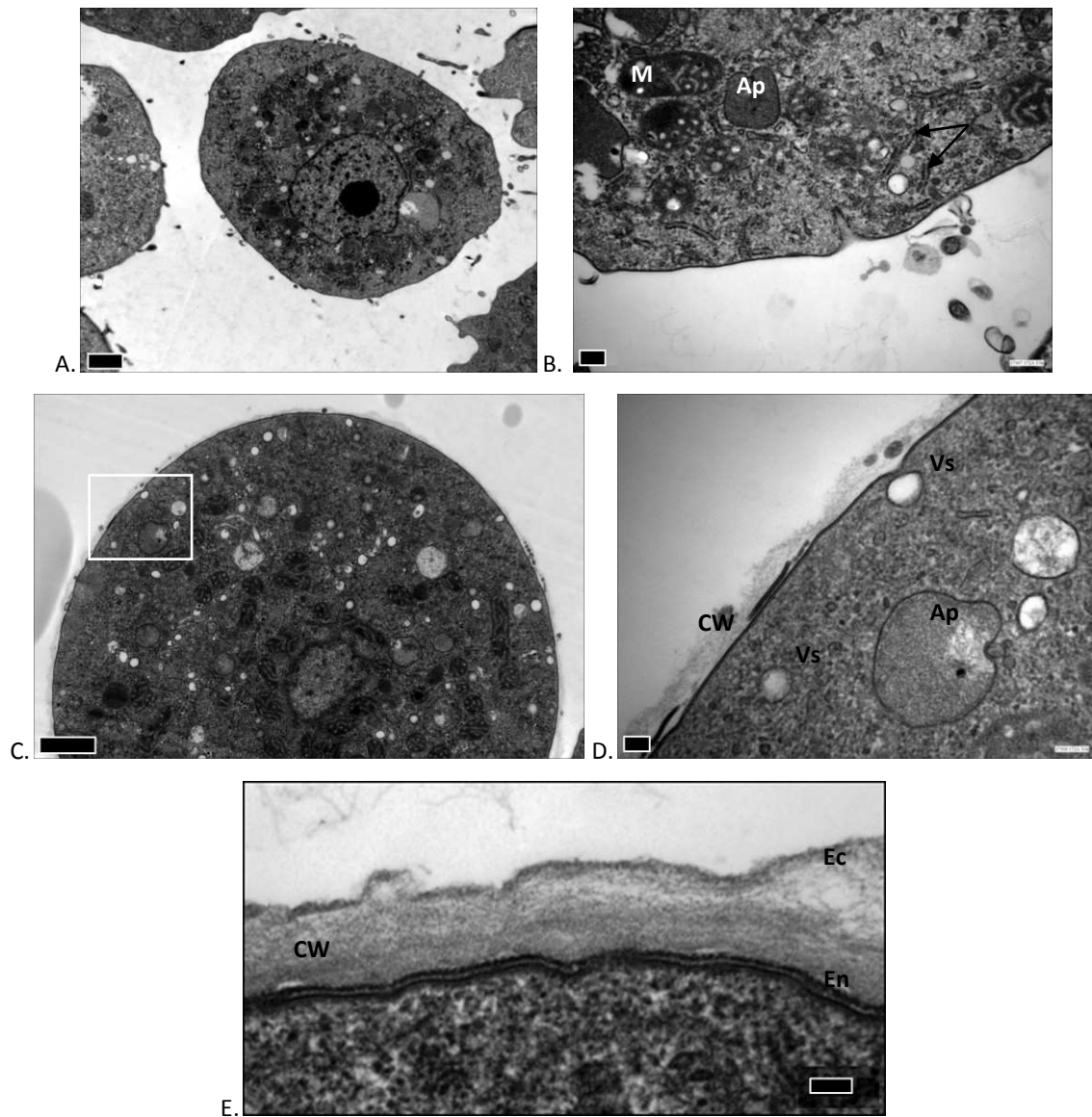


Figure 2: Cyst wall formation; **A-B: *V. vermiformis* 172A after 3 h in Neff's encystment medium** (Scale bars: 1 and 0.2  $\mu\text{m}$ ) Ap: autophagosome, M: mitochondria and arrows mark RER; **C-D: *V. vermiformis* 172A after 6 h in Neff's encystment medium** (Scale bars: 1  $\mu\text{m}$  and 100 nm) Immature cyst wall (CW) and vesicle containing cyst wall components (Vs); **E: *V. vermiformis* 172A after 9 h in Neff's encystment medium** (Scale bars: 100 nm)  
Mature cyst wall (CW) composed of two layers, the endocyst (En) and the ectocyst (Ec)

### Autophagy is likely active during encystment

In addition to that on the morphological level the strong signs of autophagy activation are observed. Indeed, by this time, cell cytoplasm contained both mature and immature autophagy-related compartments (Fig. 3A), among them being crescent-shaped double membranes (phagophore-like), double-membrane limited autophagosomes filled with cytoplasmic material, and mature single-membrane limited autophagolysosomes (400 and 600 nm). The number of autophagy-related structures and their size increased overtime; in

some cases the diameter of autophagosomes reached 1  $\mu\text{m}$ . Interestingly, during encystment, very particular vesicles arose in cell cytoplasm (Fig. 3B-C). They were about 300 nm diameter and were specific of cyst form. They have been detected a few times and were named Ribosome-like covered vesicles (RV).

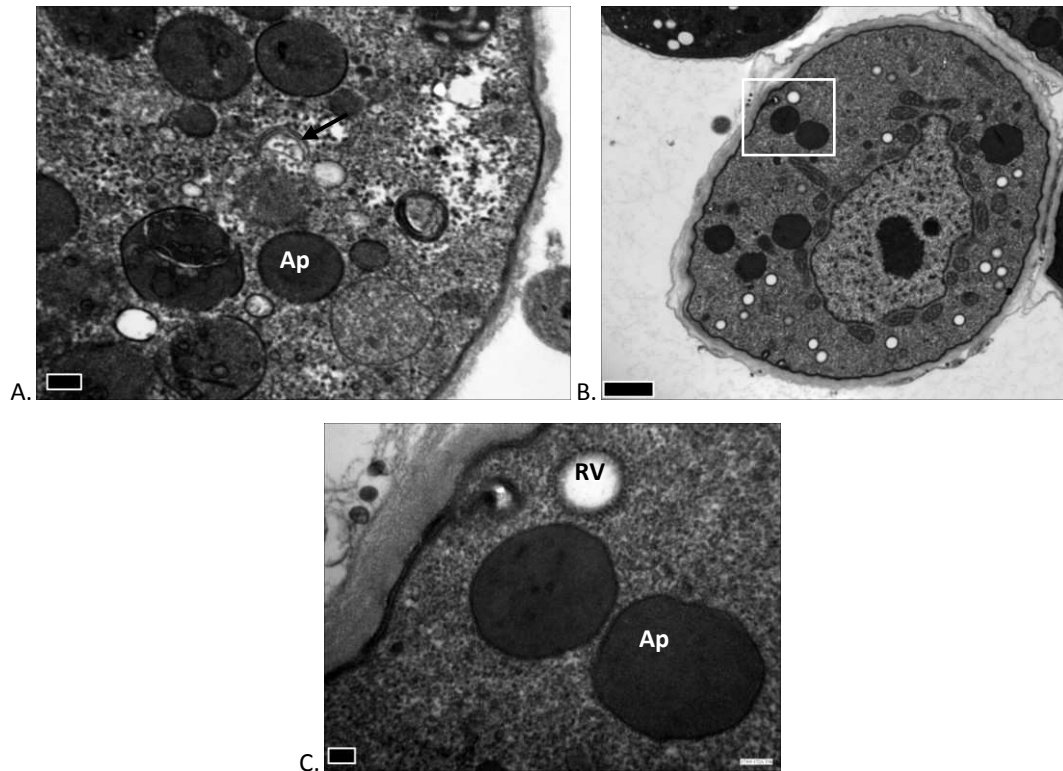


Figure 3: Autophagy is likely active during encystment; **A: *V. vermiformis* 172A after 6 h in Neff's encystment medium** (Scale bar: 200 nm) Autophagy process, autophagosomes (Ap) and arrow marks phagophore-like; **B-C: *V. vermiformis* 172A after 9 h in Neff's encystment medium** (Scale bars: 1  $\mu\text{m}$  and 100 nm) Presence of particular structure named Ribosome-like covered vesicles (RV).

### Mitochondria rearranged around the nucleus

Concomitantly with the formation of cyst wall a strong re-organisation of cytoplasmic organelles occurred. It was heralded by the translocation of mitochondria inward the cell center; by 9 h of encystment all mitochondria become concentrated around the nucleus (Fig. 4). Deposits of glycogen were observed; their density and occurrence increased overtime (Fig. 5).

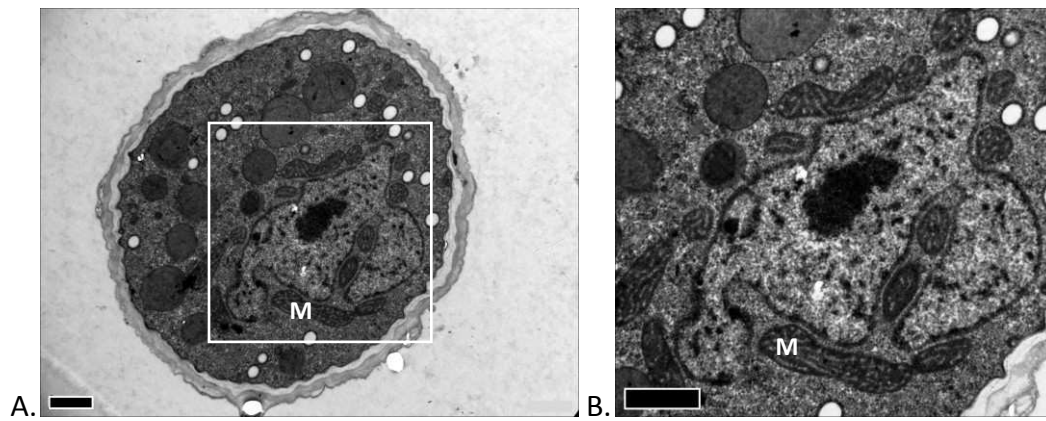


Figure 4: Mitochondria (M) rearranged around the nucleus, *V. vermiformis* 172A after 9 h in Neff's encystment medium (Scale bars: 1  $\mu$ m)

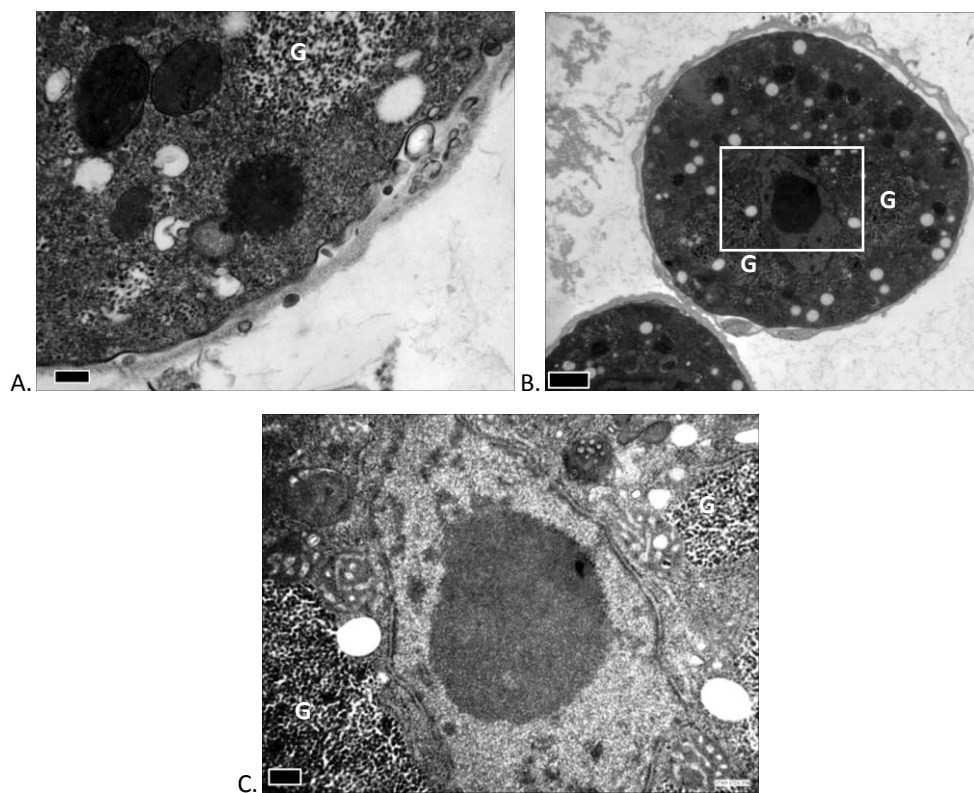


Figure 5: Glycogen (G) deposits formation, **A: *V. vermiformis* 172A after 6 h in Neff's encystment medium** (Scale bar: 200 nm); **B-C: *V. vermiformis* 172A after 9 h in Neff's encystment medium** (Scale bars: 1  $\mu$ m and 200 nm)

**No ostioles were observed**

Cysts of *Acanthamoeba* have ostioles, closed by operculum, from which they emerge during excystment. These structures are easily viewed by TEM. In contrast to *Acanthamoeba*, no ostioles were observed the surface of mature cysts of *V. vermiformis* by TEM (Fig. 6A-B). By SEM analysis, cysts looks smooth comparing with one of cyst of *Acanthamoeba* sp. ApCHUV

(Fig. 6C). The cysts of *V. vermiformis* are devoid of ostioles unlike *Acanthamoeba* cysts. (Fig. 6D-E).

After acquiring such structure, the cysts retained it overtime at all stages studied (24 h and 7 days; data not shown).

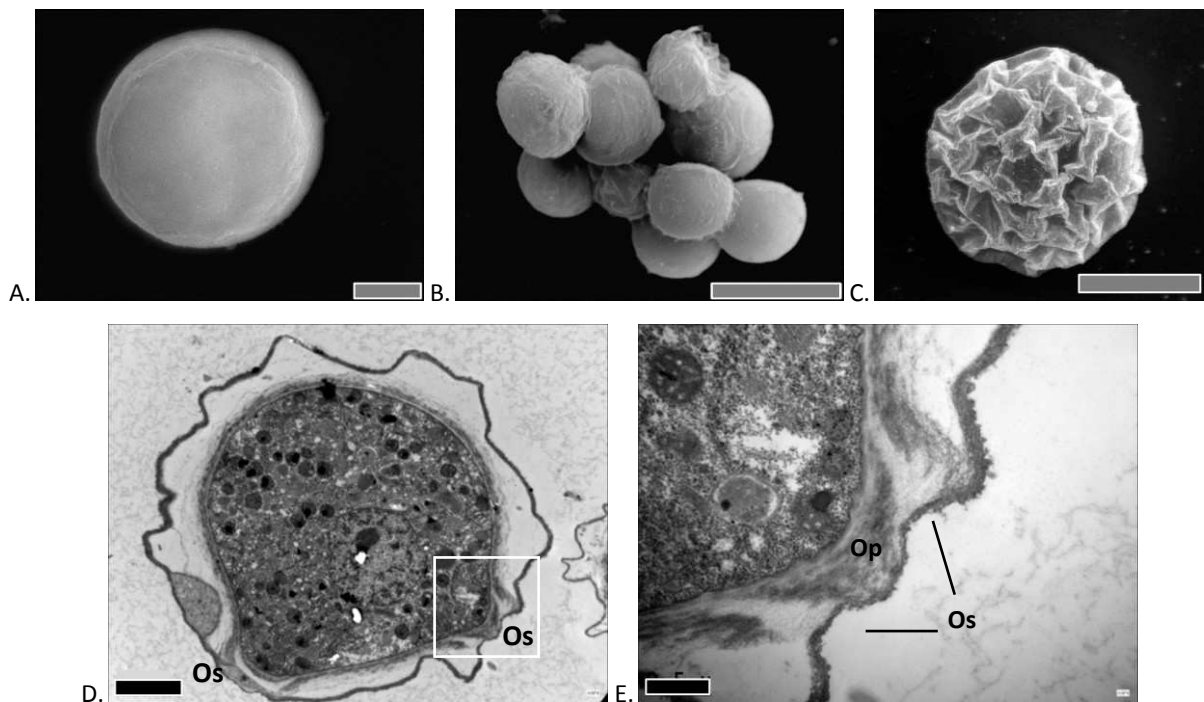


Figure 6: Mature cysts of *V. vermiformis* and *Acanthamoeba* sp. in SEM and TEM; A-B Cysts of *V. vermiformis* ATCC 50237 with smooth surface (Scale bars: 2 and 20  $\mu\text{m}$ ); C Cyst of *Acanthamoeba* sp. ApCHUV with irregular surface (Scale bar: 10  $\mu\text{m}$ ); D-E Cyst of *Acanthamoeba* sp. ApCHUV with two ostioles (Os) closed by operculum (Op) (Scale bar: 2 and 0.5  $\mu\text{m}$ ).

### **Trophozoites move in and exit from cyst wall during excystment.**

The excystment of *V. vermiformis* had never been studied before. To close this gap, we perform video microscopy and electronic microscopy on cysts which were incubated PYNFH medium to trigger excystment. The movies 4 and 5 (Movies online resource 4 and 5) shows the excystment of the reference strain 50237. Comparing to encystment process, excystment lasts longer and seems to be less synchronous. The first trophozoites appeared after approximately 9 h in modified PYNFH medium (Movie online resource 5). The principal steps that occur during excystment are as follows: (1) first the trophozoites were moving inside the cysts; (2) then trophozoites generate one or several cytoplasmic projections protruding the cyst wall; (3) finally the trophozoites liberated from the cyst wall that remains empty (Movie online resource 5). We documented excystment steps 2 and 3 by SEM. The



figure 6 shows the *V. vermiformis* cysts protruding protuberances (step2) (Fig. 7A) and two trophozoites emerging through the cyst wall (step3) (Fig. 7B). Empty cyst remaining in the nutritive medium after trophozoite liberation were observed (Fig 7C).

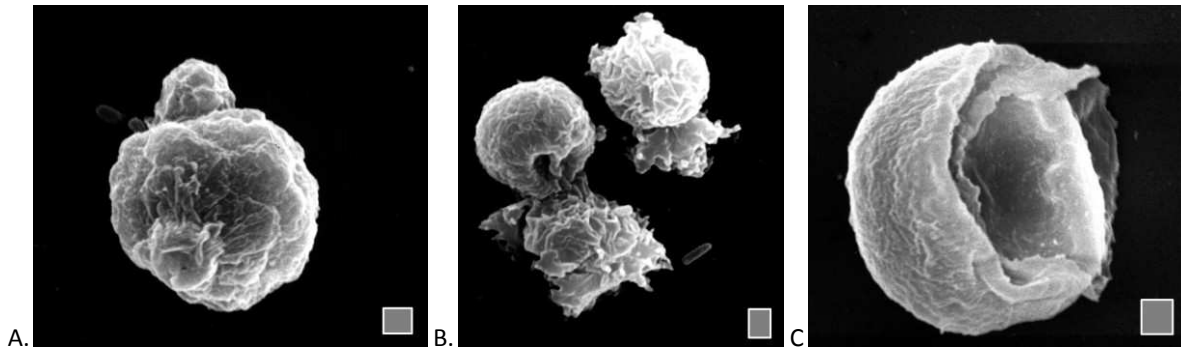


Figure 7: Excystment in modified PYNFH medium of *V. vermiformis* 172A in SEM, A. Cyst with protuberance, B. Emergence of trophozoites, C. Cyst wall empty (Scale bar: 1  $\mu\text{m}$ ).

#### **Trophozoites likely digest cyst wall during excystment.**

As mentioned before, *V. vermiformis* cysts are devoid of ostioles, so that of particular interest was to explore the process of trophozoite liberation from dense cyst wall. The early steps of excystment resulting in cyst wall permeabilisation are present in the figures 8A-D. As established by TEM, ultrastructural changes resulting in trophozoite liberation started after 6-9 h of cysts incubation in nutritive medium. As the hallmark of process triggering was the apparition of large vacuole filled with lysosomes and partly digested material (Fig. 8A-C). These vacuoles moved towards the cyst wall and seemed to release their content into the pericellular space (Fig. 8A-D), thus contributing to cyst wall permeabilisation. 9-24 h after beginning of excystment, the cyst walls seemed partially digested (Fig. 8G-I). The gradual digestion of cyst wall occurred concomitantly with the detachment of cells from the cyst wall, the degradation of glycogen deposits, and the release of first trophozoites in the medium (Fig. 8E-F). Remarkably, the quantity of autophagosomes and RV that was prominent at the early stages of excystment (6-9h) decreased markedly during process progression. Indeed, recently emerged trophozoites exhibited a typical structure, so that their cytoplasm presented digestive and contractile vacuoles and mitochondria homogeneously distributed, but contained neither dense autophagosomes nor RV (Fig. 8H).

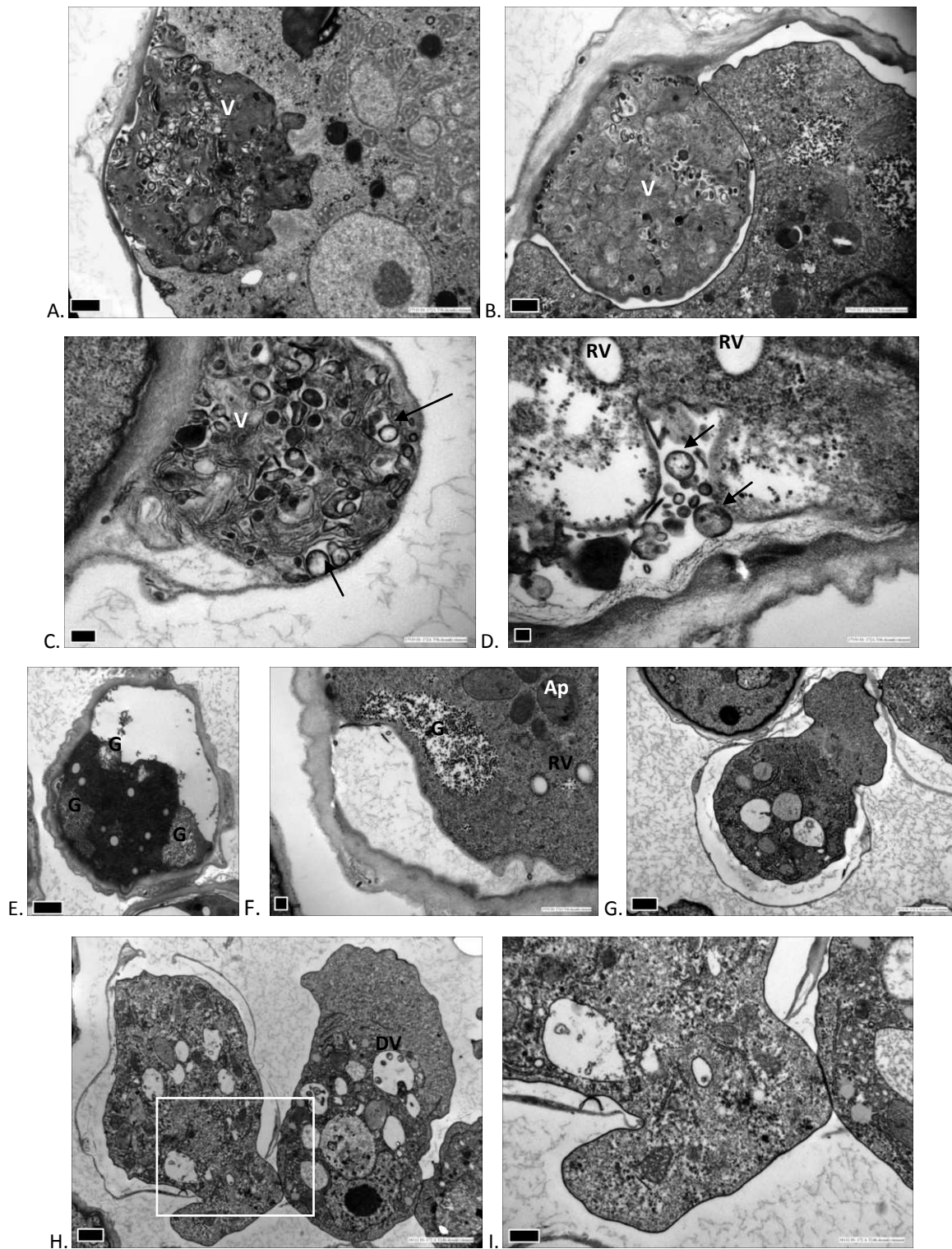


Figure 8: Excystation in modified PYNFH medium of *V. vermiformis* 172A in TEM; **A-F *V. vermiformis* 172A after 6-9 h in modified PYNFH**; A-D Large vacuoles (V) filled with lysosomes (arrows) and partly digested material (RV: ribosome-like covered vesicles) (Scale bars: 0.5  $\mu$ m, 0.5  $\mu$ m, 200 nm and 100 nm); E-F Detachment of cells from the cyst wall and degradation of glycogen deposits (G) (Ap: autophagosomes, RV: ribosome-like covered vesicles) (Scale bars: 1  $\mu$ m and 0.2  $\mu$ m); **G-I *V. vermiformis* 172A after 9-24 h in modified PYNFH**; Emergence of trophozoites and recently emerged trophozoite (DV: digestive vacuole) (Scale bar: 1  $\mu$ m, 1  $\mu$ m and 0.5  $\mu$ m).

## DISCUSSION

*Vermamoeba vermiformis* is a FLA frequently found in natural and artificial environments (Buse *et al.*, 2013; Ovrusky *et al.*, 2013; Rodriguez-Zaragoza, 1994; Rohr *et al.*, 1998). They are a reservoir for pathogenic bacteria such as *Legionella pneumophila* (Fields *et al.*, 1990). The management of *V. vermiformis* in artificial environments is therefore a health issue. However, *V. vermiformis* may be resistant to disinfection treatments due to its encystment ability; indeed cysts are more resistant to disinfectants than trophozoites (ref). Therefore it is important to better understand the processes of encystment and excystment of *V. vermiformis*. The present study investigated the morphological and ultrastructural changes that occur during the processes of differentiation of *V. vermiformis* by using various light and electron microscopy techniques.

First, we studied the morphology and structure of trophozoites by contrast phase microscopy, SEM and MET. The shape and morphology of *V. vermiformis* trophozoites were similar to previous descriptions (Dykova *et al.*, 1987; Page, 1986 Smirnov and Michel, 1999). However several differences were observed in comparison with Page's observations (1967, 1974 and 1986). The motile trophozoites of our strains were longer than the ones described by Page (1985), and in the same range as those described by Dykova *et al.* (2005). Our observations showed that the cell surface of *V. vermiformis* trophozoites was very smooth; there were no spine-like pseudopods such as acanthopodia in the genus *Acanthamoeba* (Marciano-Cabral and Cabral, 2003).

Then, we investigated the morphological and ultrastructural changes occurring during the encystment of *V. vermiformis*. Our results showed that the encystment of *V. vermiformis* was fast and synchronous. It took approximately 9 h, which was faster than the encystment of *Acanthamoeba* (16 to 24 h) in similar experimental conditions (Hughes *et al.*; 2003; Neff *et al.*, 1964). During encystment of *V. vermiformis* aggregates of cysts appeared, as noticed within *Acanthamoeba* by Coulon *et al.* (2010). We observed that a little part of cells seemed to participate to the formation of these aggregates of cysts. This observation suggests the existence of inter-amoebic communication mechanisms corresponding to a primitive social behavior in *V. vermiformis*. The aggregates of cysts could promote the survival, the resistance and the dissemination of *V. vermiformis* within the environment. During encystment the cyst wall was synthesized due to the release of fibrillar material into the

pericellular space. This material was content in 100-200 nm vesicles which were also observed in *V. vermiformis* cyst by Smirnov and Michel (1999) who named these structures « cyst-forming caps ». During the encystment of *Acanthamoeba* and *Naegleria* (Chavez-Mungia *et al.*, 2005 and 2009), the cyst wall component was also dispatched in pericellular space by vesicles; but the aspect, density and size of vesicles were different than what was observed in *V. vermiformis*.

In our strains the cyst wall was composed of two layers called endocyst and ectocyst which could be closely apposed or partially separated. In the strain studied by Smirnov and Michel (1999) endocyst and ectocyst were clearly separated. They suggested that the separation or apposition of these layers depended on the strain. Nevertheless, in 2005, Dykova *et al.* observed the both types of cysts wall in the same clonal culture what tended to corroborate our observations.

Interestingly, during encystment of *V. vermiformis* we observed that mitochondria gathered around the nucleus. In immature cysts presented by Dykova *et al.* (2005), the mitochondria were also close to the nucleus. In mature cysts the mitochondria fully surrounded the nucleus which has been described in previous studies (Page, 1986; Smirnov and Michel, 1999) and was mentioned by Dykova *et al.* (2005). In the literature, it has been suggested that this behavior indicates the high-energy requirements of nuclear processes, as shorter distance favors energy transfer (Dzeja *et al.*, 2002). As encystment is a huge differentiation process it is conceivable that many modifications take place in the nucleus.

In our two strains of *V. vermiformis*, we observed two specific vesicular structures within the cysts which were not present in trophozoites: (i) dense and homogenous autophagosomes and (ii) ribosome-like covered vesicles. The same structures were noticeable in the pictures of the mature cysts obtained by Page (1986) and Dykova *et al.* (2005), but they did not comment on them. Smirnov and Michel (1999) observed and mentioned these structures in mature cysts of *V. vermiformis*. The homogenous and dense autophagosomes characterized by a double membrane and the ribosomes-like covered vesicles were respectively called “dense bodies” and “RER-covered vesicles” by Smirnov and Michel (1999). Vesicles similar to “RER-covered vesicles” were also observed in *Dictyostellium* mutants for autophagy and described as “large vesicles with empty lumina” (Otto *et al.*, 2004). These vesicles might

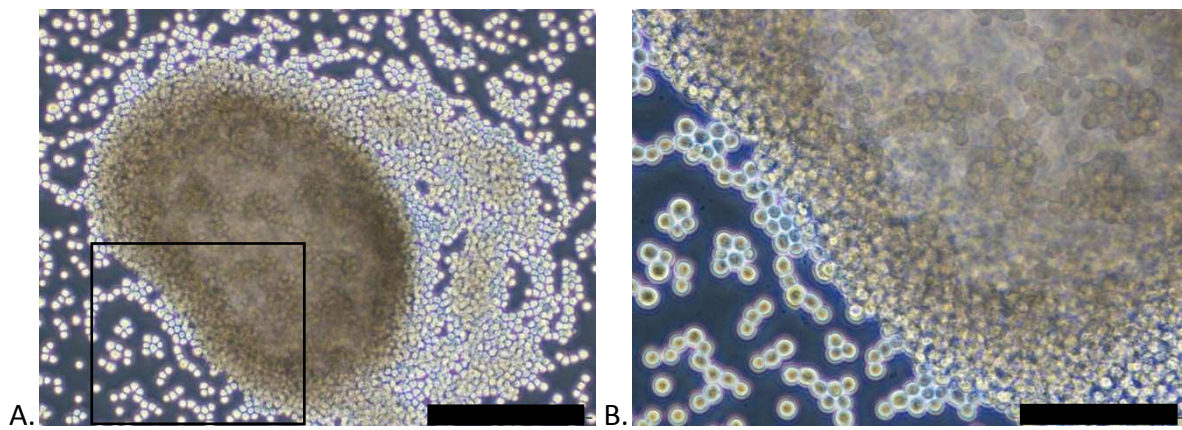
therefore be related to the autophagic process. These vesicles are of particular interest as they are not observed in *Acanthamoeba*.

For the first time the process of excystment in *V. vermiformis* was investigated. The excystment of *V. vermiformis* seemed less synchronous than the encystment. This observation is in accordance with the results of Chambers and Thompson (1974) who showed an asynchronous excystment in *Acanthamoeba*. In our study, some trophozoites appeared after 9 h of incubation in nutritive medium. This time was much lower than the data recorded in the literature concerning kinetics of excystment in nutritive medium. Thus, Mattar and Byers (1971) showed that excystment of *Acanthamoeba* took place over a period of 12.5 h to 36 h. Similarly, Kaushal and Shukla (1977) reported that excystment of *A. culbertsoni* could take up to 48 h. The morphological and ultrastructural changes occurring during the excystment of *V. vermiformis* were very different than the one of these observed within *Acanthamoeba* and *Naegleria* (Chavez-Mungia *et al.*, 2005, 2009 and 2013). No ostioles were observed in *V. vermiformis* cysts on the contrary to *Acanthamoeba* and *Naegleria* (Chavez-Mungia *et al.*, 2005, 2009 and 2013). It seems that trophozoites differentiated into the cyst wall and digested this wall to exit.

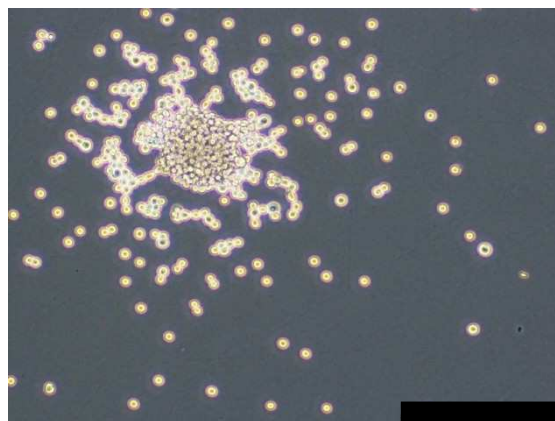
The present study provides the basis knowledge of encystment and excystment processes of *V. vermiformis*. In the future, it would be of importance to study the factors inducing and influencing these processes and the molecular mechanisms involved. It would also be interesting to explore the mechanisms of inter-amoebic communication and to develop the idea of a social structure in *V. vermiformis*.

## 2.2. Illustrations complémentaires

Nous avons vu que lors de l'enkystement de *V. vermiformis* il y avait formation d'agrégats de kystes. La formation de ces agrégats a été observée aussi bien dans un enkystement en milieu liquide (Neff) que dans un enkystement sur géloses NNA-*E. coli*. La taille de ces agrégats est très variable, mais sont parfois visibles à l'œil nu. En effet, ils peuvent atteindre plus de 0,7 mm comme le montre la figure 26. Même lorsque *V. vermiformis* était en faible concentration cellulaire ( $1.10^4$  amibes.mL<sup>-1</sup>), il y avait, lors de l'enkystement, formation d'agrégats de kystes (Figure 27).



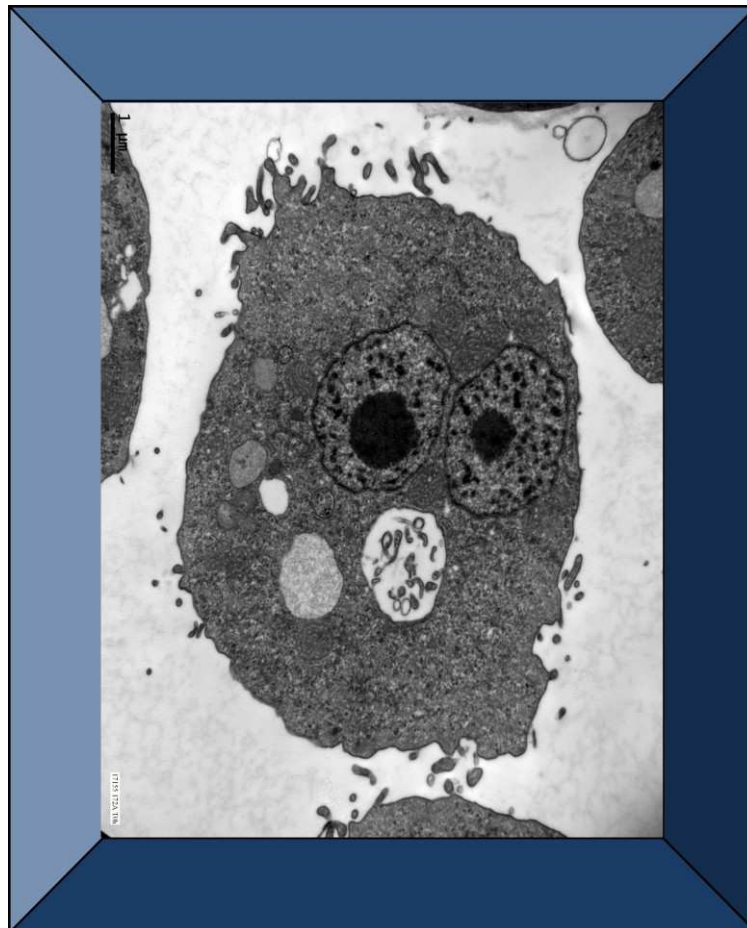
**Figure 26 :** Formation des agrégats de kystes de *V. vermiformis* (ATCC 50237) en milieu d'enkystement Neff.  
(Barre d'échelle : 200 et 100  $\mu$ m)



**Figure 27 :** Formation des agrégats de kystes de *V. vermiformis* (ATCC 50237) en milieu d'enkystement Neff à faible concentration cellulaire  
(Barre d'échelle : 200  $\mu$ m)



CHAPITRE V : Effet des conditions  
environnementales et de la concentration  
cellulaire sur l'enkystement de *V. vermiformis*





## CHAPITRE V : Effet des conditions environnementales et de la concentration cellulaire sur l'enkystement de *V. vermiformis*

Au début de la thèse, il n'existait aucun travail de recherche faisant référence aux signaux induisant l'enkystement, aux facteurs l'influençant et aux mécanismes moléculaires mis en jeu lors de ce processus chez *V. vermiformis*. En effet, la grande majorité des études, portant sur l'enkystement des amibes libres, a été menée chez le genre *Acanthamoeba* en raison de son pouvoir pathogène pour l'Homme (cf. 1.2.1. Enkystement).

L'enkystement constitue une étape clé dans la résistance des amibes libres aux traitements de désinfection. En effet, plusieurs études ont montré que la forme végétative, le trophozoïte, est plus sensible aux traitements de désinfection que la forme kystique (Critchley et Bentham, 2009 ; Turner *et al.*, 2000). Ce qui peut expliquer, en partie, l'inefficacité à l'encontre des amibes libres des traitements conventionnels utilisés dans les milieux artificiels comme les RECS et les TAR (Loret *et al.*, 2005 ; Rohr *et al.*, 1998 ; Thomas *et al.*, 2004). Il semble donc important de connaître l'influence de différents facteurs sur le processus d'enkystement.

En complément de l'étude morphologique et structurale présentée dans le chapitre précédent, nous avons choisi d'étudier l'influence de certaines conditions environnementales sur l'enkystement de *V. vermiformis*. Pour cela, trois facteurs physico-chimiques ont été sélectionnés : la température, le pH et la pression osmotique. Par la suite, l'effet de la concentration cellulaire sur ce processus a également été investigué.

Afin de mener à bien ces travaux, il a été nécessaire de sélectionner les souches de *V. vermiformis*, de mettre en place un protocole permettant de mesurer le taux d'enkystement chez cette espèce et également un protocole précis pour chaque type de facteur à tester.

### **1. Choix et mise en place des techniques**

Premièrement nous avons dû sélectionner les souches de *V. vermiformis* à étudier. Nous avons décidé de travailler avec les mêmes souches que celles utilisées dans l'étude des processus de différenciation (cf. Chapitre IV). Il s'agit de la souche de référence

*V. vermiformis* ATCC 50237 et de la souche environnementale *V. vermiformis* 172A. L'ensemble des expérimentations a donc été réalisé sur ces deux souches.

Afin d'évaluer l'effet des conditions environnementales et de la concentration cellulaire sur l'enkystement de ces deux souches de *V. vermiformis*, il a nécessaire, dans un deuxième temps, de mettre en place une méthode permettant de mesurer le taux d'enkystement chez cette espèce.

### **1.1. Mesure du taux d'enkystement chez *V. vermiformis***

Nous avons voulu utiliser, tout d'abord, la cytométrie en flux pour mesurer le taux d'enkystement dans les populations de *V. vermiformis*.

#### 1.1.1. Utilisation de la cytométrie en flux

La cytométrie en flux permet de dénombrer à haute vitesse un grand nombre de cellules et de mesurer simultanément certains caractères morphologiques et physiologiques. Les cellules sont analysées individuellement de façon qualitative et quantitative selon leur taille, leur granulométrie et leur fluorescence (acquise ou naturelle) en réponse à une stimulation optique. Cette technique a déjà été utilisée pour distinguer les trophozoïtes et les kystes dans des populations d'*Acanthamoeba* sp. (Connell *et al.*, 2001 ; Imayasu *et al.*, 2013). Cette technique a déjà été développée et utilisée, au sein du laboratoire d'Ecologie et de Biologie des Interactions (UMR 7267) afin de mesurer le taux d'enkystement dans les populations d'*Acanthamoeba* sp.. Dans ce genre, il est possible de distinguer grossièrement les trophozoïtes des kystes grâce à la taille et la granulométrie relative des cellules. Mais, pour mesurer plus précisément le taux d'enkystement, il est nécessaire d'utiliser des marqueurs fluorescents qui se fixent spécifiquement à la paroi des kystes riche en cellulose (Blanton et Villemez, 1978 ; Tomlinson et Jones, 1962). Dans ce cas, il est possible d'utiliser deux types de fluorophores : le rouge Congo qui marque spécifiquement la cellulose et le calcofluor blanc qui marque spécifiquement la cellulose et la chitine. La figure 28 présente des kystes d'*Acanthamoeba* sp. marqués au rouge Congo et au calcofluor blanc.

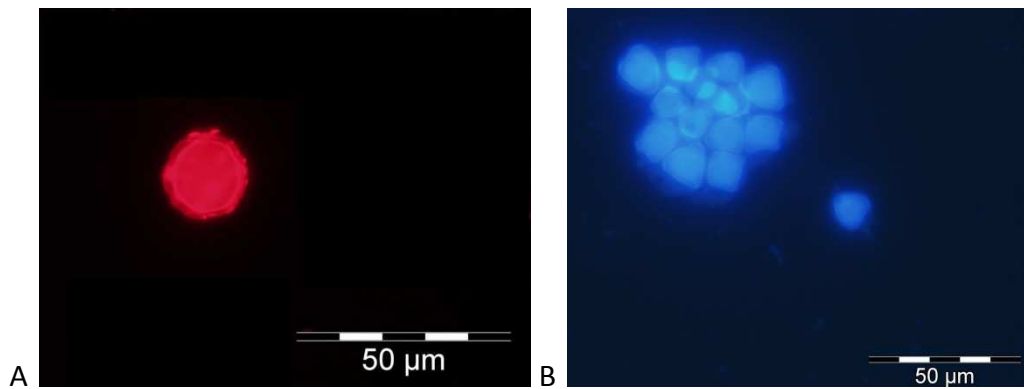


Figure 28 : Kystes d'*Acanthamoeba* sp. marqués au rouge Congo (A) et au calcofluor blanc (B)

Ainsi, nous avons essayé d'utiliser une approche similaire pour mesurer le taux d'enkystement chez *V. vermiformis*. Nous avons tout d'abord tenté de distinguer les trophozoïtes des kystes grâce aux facteurs taille et granulométrie relative, mais ces deux critères n'ont pas été suffisants pour distinguer les deux formes de *V. vermiformis*. Nous avons alors essayé de trouver un marqueur spécifique de la paroi des kystes de *V. vermiformis*. Cependant, au début de la thèse, il n'existait aucune publication faisant référence à la composition de la paroi des kystes de *V. vermiformis*. Les seules informations disponibles faisaient référence à une absence de cellulose dans la paroi des kystes de *V. vermiformis* (Linder *et al.*, 2002) et à la présence importante de protéines chez *Hartmannella glabrae*, une amibe proche de *V. vermiformis* (Upadhyay *et al.*, 1984). Nous avons alors testé divers types de colorants utilisés en mycologie, microbiologie et biologie végétale : le rouge congo, le calcofluor blanc, la double coloration au carmin-aluné et vert d'iode, le bleu de coomassie, la rhodamine B... mais aucun des colorants testés n'a permis de marquer spécifiquement la paroi des kystes de *V. vermiformis*. Nous avons donc dû envisager une autre approche pour mesurer le taux d'enkystement chez cette espèce. Nous avons alors choisi d'utiliser le dénombrement direct sur cellules de numération pour mesurer le taux d'enkystement.

### 1.1.2. Mesure du taux d'enkystement par dénombrement direct

Il a été choisi d'utiliser le dénombrement direct sur cellule de numération, type Fast-Read®, pour mesurer le taux d'enkystement chez *V. vermiformis*.

Lors de l'enkystement, les amibes peuvent se retrouver à différents stades de différenciation : trophozoïtes, kystes immatures et kystes matures. Il n'est pas toujours aisé

de distinguer les kystes immatures de ceux matures, la mesure direct du taux d'enkystement sur cellule de numération est donc difficile. Pour pallier ce problème, la stratégie mise en place a été de dénombrer, dans un premier temps, le nombre total d'amibes (trophozoïtes, kystes immatures et kystes), dans l'échantillon puis, dans un deuxième temps, de dénombrer uniquement les kystes matures. Pour cela, il a été nécessaire d'identifier un réactif permettant de lyser seulement les trophozoïtes et les kystes immatures. Chez *Acanthamoeba*, il a déjà été montré qu'une concentration en SDS de 0,5 % lyse les trophozoïtes et les kystes immatures alors que les kystes matures y sont insensibles (Coulon *et al.*, 2010 ; Dudley *et al.*, 2005). Nous avons donc testé différentes concentration en SDS pour lyser spécifiquement les trophozoïtes et les kystes immatures de *V. vermiformis*. Il s'est avéré qu'une concentration de 0,5 % de SDS permet, comme chez *Acanthamoeba*, de lyser les trophozoïtes et les kystes immatures alors que les kystes matures sont intacts. Pour mesurer le taux d'enkystement, il suffisait alors d'énumérer le nombre total d'amibes dans l'échantillon, puis de traiter l'échantillon avec une concentration finale en SDS de 0,5 % et enfin de dénombrer le nombre de kystes matures de l'échantillon. Le taux d'enkystement était alors calculé par la formule suivante :

$$\text{Taux d'enkystement}(\%) = \frac{\text{Nombre de kystes matures} \times 100}{\text{Nombre total d'amibes}}$$

Durant la mise en place de la technique, nous nous sommes aperçu qu'en mettant en contact le milieu d'enkystement Neff avec le SDS il y avait la formation d'un précipité rendant difficile le dénombrement. C'est pourquoi, avant de mesurer le taux d'enkystement dans un échantillon, nous avons rajouté une étape de centrifugation et de suspension des cellules dans un tampon phosphate (pH = 7, 50 mmol.L<sup>-1</sup>) qui lui, ne précipite pas en présence de SDS.

Le protocole utilisé pour mesurer le taux d'enkystement chez *V. vermiformis* est décrit dans la partie III.3.3. Dénombrement et mesure du taux d'enkystement.

## **1.2. Définition des conditions expérimentales pour l'étude de l'effet des conditions environnementales et de la concentration cellulaire sur l'enkystement**

Pour les mêmes raisons que celles évoquées dans le chapitre IV nous avons décidé d'induire l'enkystement de *V. vermiformis* dans le milieu d'enkystement Neff (*cf.* IV.1. Choix

et mise en place des techniques). Afin de tester l'effet des conditions environnementales sur l'enkystement nous avons incubé les amibes dans le milieu d'enkystement Neff, modifié ou non, dans différentes conditions. Pour l'ensemble des essais, dans les différentes conditions environnementales testées, nous avons choisit d'ajuster la concentration cellulaire à  $5.10^5$  amibes.mL<sup>-1</sup>. Les conditions suivantes ont été choisies :

- effet de la température. Nous avons sélectionné quatre températures : 4 °C, 25 °C, 37 °C et 50 °C la température minimale de l'eau dans les RECS.

- effet du pH. Pour cela, nous avons modifié le pH du milieu d'enkystement Neff. Nous avons testé une gamme de pH s'étalant d'un pH 5 à un pH 9.

- effet de la pression. Pour cela, nous avons fait varier la concentration en KCl dans le milieu d'enkystement Neff afin d'en modifier la pression osmotique. Nous avons testé une large gamme de concentrations en KCl comprises entre 0 et 0,5 mol.L<sup>-1</sup>, sachant que la concentration classique en KCl du milieu d'enkystement Neff est de 0,1 mol.L<sup>-1</sup>.

- effet de la concentration cellulaire. Nous avons choisi de tester l'effet de trois concentrations cellulaires :  $1.10^4$ ,  $1.10^5$  et  $1.10^6$  amibes.mL<sup>-1</sup>. Nous n'avons pas pu tester de concentration cellulaire plus faible car pour obtenir un dénombrement précis et représentatif sur cellule de numération il faut un nombre relativement élevé de cellules. La concentration maximum testée a été de  $1.10^6$  amibes.mL<sup>-1</sup>, elle correspond approximativement à la concentration cellulaire dans les cultures confluentes de *V. vermiformis* dans le milieu nutritif PYNFH modifié.

Au préalable, nous avons dû déterminer les temps d'incubation après lesquels le taux d'enkystement dans les populations de *V. vermiformis* a été mesuré. Pour cela, nous avons réalisé, pour les deux souches sélectionnées (ATCC 50237 et 172A), des cinétiques d'enkystement dans le tampon d'enkystement Neff à 25 °C. Nous avons mesuré le taux d'enkystement toutes les trois heures jusqu'à obtention d'un enkystement maximal. A partir des résultats obtenus, nous avons retenu les temps de 6 h et de 9 h. (cf. V.2.1. Article).

Les protocoles utilisés pour l'étude de l'effet des conditions environnementales et de la concentration cellulaire sur l'enkystement de *V. vermiformis* sont schématisés dans les

figures suivantes (Figures 29 et 30) et décrits dans le paragraphe III.3.1.1. Enkystement en milieu liquide.

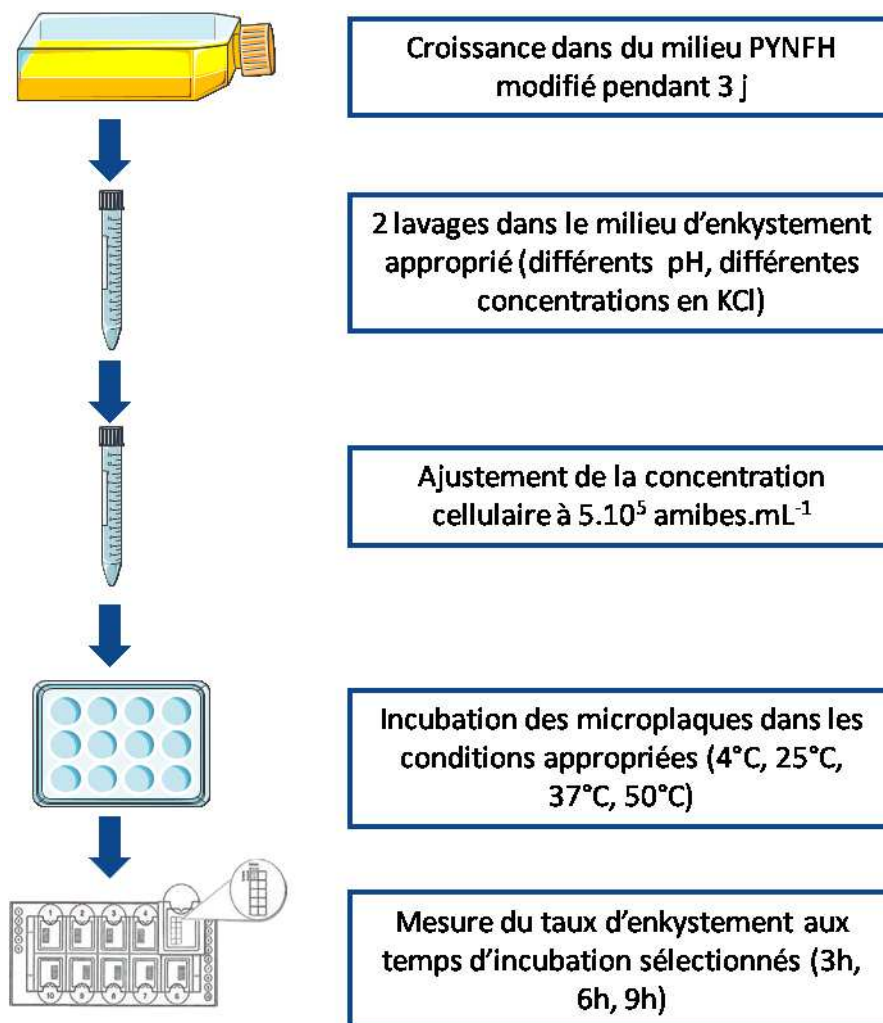


Figure 29 : Protocole d'enkystement de *V. vermiformis* dans différentes conditions de température, pH et pression osmotique.

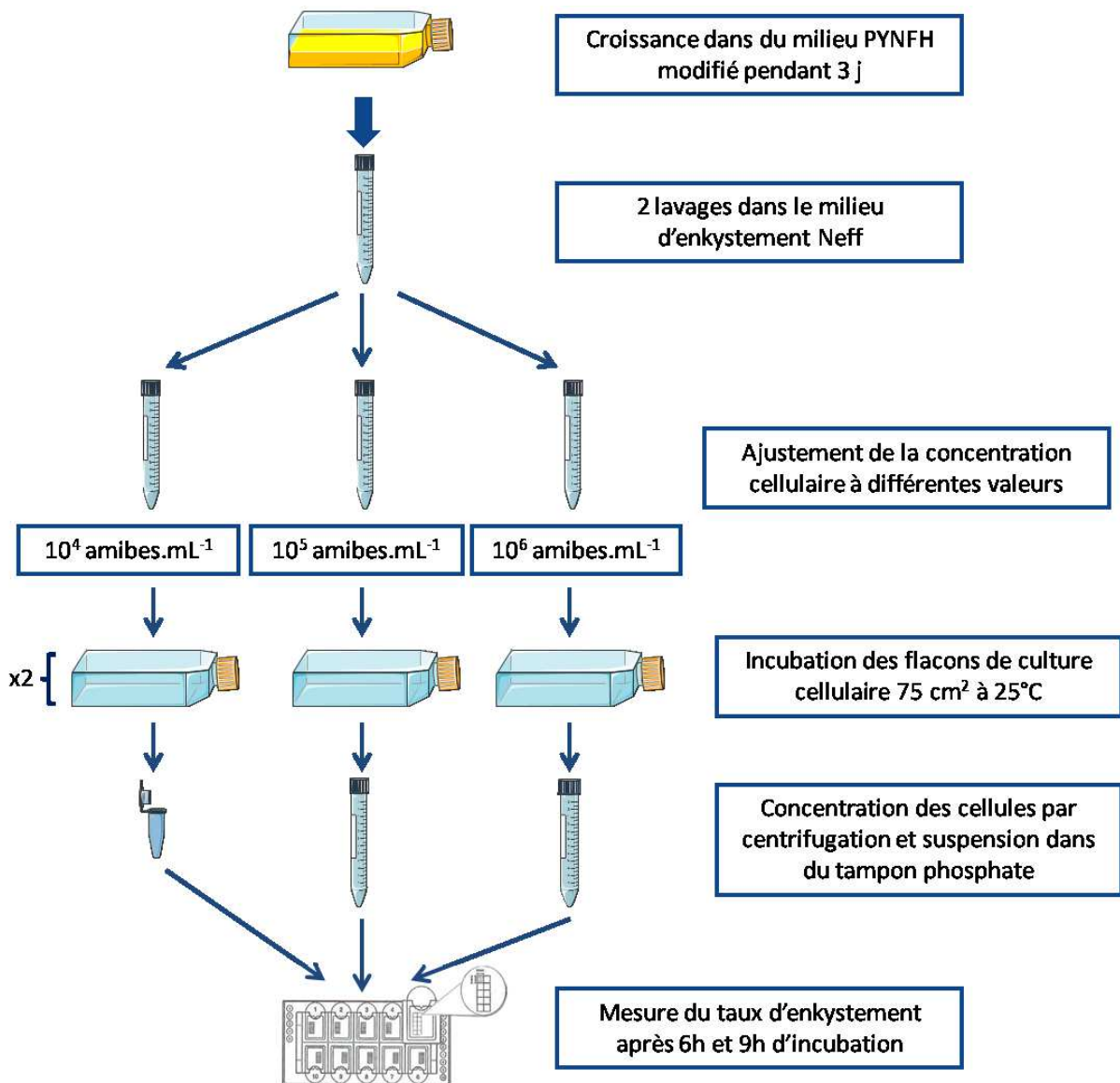


Figure 30 : Protocole d'enkystement de *V. vermiformis* à différentes concentrations cellulaires.

## **2. Résultats et discussion**

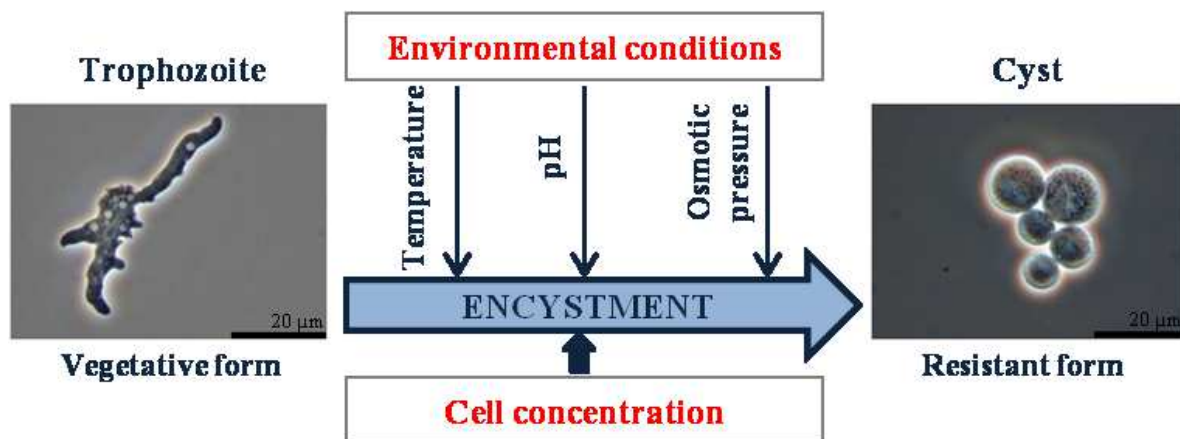
Ce travail de recherche à fait l'objet d'un article scientifique qui a été soumis en octobre 2013 dans le journal « Parasitology Research ». Le manuscrit de l'article, ainsi que des résultats complémentaires sont présentés ci-après.

### **2.1. Article « Encystment of *Vermamoeba (Hartmannella) vermiformis*: effects of environmental conditions and cell concentration »**

Encystment of *Vermamoeba (Hartmannella) vermiformis*: effects of environmental conditions and cell concentration.

Emilie FOUQUE, Marie-Cécile TROUILHÉ, Vincent THOMAS, Philippe HUMEAU, Yann HÉCHARD

Graphical abstract:



**Abstract:**

*Vermamoeba vermiformis* is a free-living amoeba (FLA) which is widely distributed in the environment. It is known to colonize water systems and to be a reservoir of pathogenic bacteria, such as *Legionella pneumophila*. For these reasons the control of *V. vermiformis* represents an important health issue. However, FLA may be resistant to disinfection treatments due to the process of encystment. Thereby, it is important to better understand factors influencing this process. In this aim, we investigated the effect of temperature, pH, osmotic pressure and cell concentration on the encystment of two *V. vermiformis* strains. Encystment was quite fast, with a 100 % encystment rate being observed after 9 h of incubation. For the two strains, an optimal encystment was obtained at 25 and 37 °C. Concerning pH and osmotic pressure, there were different effects on the encystment according to the tested strains. For the reference strain (ATCC 50237), the patterns of encystment were similar for pH comprised between 5 and 9 and for KCl concentrations ranging from 0.05 to 0.2 mol.L<sup>-1</sup>. For the environmental strain (172A) an optimal encystment was obtained for basic pH (8 and 9) and for a concentration in KCl of 0.1 mol.L<sup>-1</sup>. The results also clearly demonstrated that the encystment rate increased with cell concentration, suggesting that there is an inter-amoebal communication. The present study establish for



the first time environmental conditions favoring encystment and would lay the foundations to better control the encystment of *V. vermiformis*.

**Key words:** *Amoeba*; *Hartmannella*; *Vermamoeba*; cyst; encystment; water

## 1. INTRODUCTION

Free-living amoebae (FLA) are protozoa widely distributed in the environment and isolated from water, soil, air, compost and sediments (Rodriguez-Zaragoza, 1994). FLA also colonize aquatic environment related to human activities, such as water treatment plants (Thomas, et al., 2008), water distribution networks (Thomas, et al., 2006) and cooling towers (Srikanth and Berk, 1993, Sykora, et al., 1983). Even if FLA are not considered as a major threat for human health, those belonging to *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris* and *Naegleria fowleri* can potentially be responsible for severe brain pathologies (Marciano-Cabral and Cabral, 2003, Visvesvara, et al., 2007). The genus *Acanthamoeba* is also responsible for many cases of keratitis (Visvesvara, et al., 2007). FLA are mainly encountered in biofilms where they feed by grazing on microorganisms. Importantly, several pathogenic bacterial species like *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Mycobacterium* spp. resist the amoebal phagocytosis (Greub and Raoult, 2004). Thus, it is recognized that FLA act as reservoirs of pathogenic bacteria, resulting in protection from hostile conditions and promoting bacterial dissemination in the environment (Greub and Raoult, 2004, Santic, et al., 2011, Thomas, et al., 2010).

The *Vermamoeba vermiformis* species, which has been classified until 2011 in the *Hartmannella* genus (Smirnov, et al., 2011), is predominant in hot water systems (Buse, et al., 2013, Rohr, et al., 1998, Thomas, et al., 2006, Thomas, et al., 2008). A little scientific concern is given to *V. vermiformis* likely because it is not directly pathogenic for humans, even if it was found associated to others microorganisms in several cases of meningoencephalitis (Centeno, et al., 1996) and keratitis (Aitken, et al., 1996, Lorenzo-Morales, et al., 2007). However, it is well recognized that *V. vermiformis* acts as a reservoir of pathogenic bacteria, such as *L. pneumophila* and *Francisella tularensis* (Donlan, et al., 2005, Fields, et al., 1990, Santic, et al., 2011).

FLA have two stages of development: a vegetative form, named trophozoite, and a dormant form, named cyst. The differentiation process is called encystment, for a review see (Fouque, et al., 2012). Encystment induces extensive morphological changes: FLA become spherical

and a cyst wall is formed, leading from increasing the resistance of FLA to treatments and harsh conditions (Critchley and Bentham, 2009, Dupuy, et al., 2013, Khunkitti, et al., 1998). The morphology of cyst wall depends on the genus and the species; it is simple, double or triple layer and can present holes named ostioles. Triggering and the process of encystment were mainly studied on the genus *Acanthamoeba* due to its pathogenicity for human. Encystment of *Acanthamoeba* occurs when environmental conditions become unfavorable such as nutrient starvation or osmotic stress (Byers, 1979, Neff, et al., 1964, Weisman, 1976). Neff *et al.* (1964) observed, in *Acanthamoeba*, that basic pH and temperature in the 30 to 32 °C range promoted the encystment of *Acanthamoeba*. To our knowledge, the environmental conditions triggering encystment of *V. vermiformis* have never been described. In the present study, we evaluated the effects of temperature, pH, osmotic pressure and cell concentration on the encystment of two strains of *V. vermiformis*.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1. Amoebal strains

Two strains of *Vermamoeba vermiformis* were used in this study: *V. vermiformis* Page ATCC 50237, a reference strain isolated from a hospital cooling tower in South Dakota (USA), and *V. vermiformis* 172A, an environmental strain isolated from a hospital water network (Lausanne, Switzerland) by Thomas *et al.* 2006 where it was referenced as *H. vermiformis* strain 2.

### 2.2. Cultivation

The two strains of *V. vermiformis* were grown axenically in 15 mL of modified PYNFH medium (pH = 6.5, 1 % bacto-peptone, 1 % yeast extract, 0.1 % RNA of torula yeast type VI, 33  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  folic acid, 1.5  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  hemin, 3.6  $\text{mmol.L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 26  $\text{mmol.L}^{-1}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10 % fetal bovine serum), in a 75  $\text{cm}^2$  tissue culture flask at 28 °C. Every 3-5 days of culture, the strains were subcultured.

### 2.3. Kinetic of encystment prior to testing

Kinetics of encystment were performed using Neff's encystment medium (pH = 8.8, 0.1  $\text{mol.L}^{-1}$  KCl, 8  $\text{mmol.L}^{-1}$   $\text{MgSO}_4$ , 0.4  $\text{mmol.L}^{-1}$   $\text{CaCl}_2$ , 20  $\text{mmol.L}^{-1}$  Tris (2-amino-2-hydroxymethyl-1.3-propanediol),  $\text{NaHCO}_3$  1  $\text{mmol.L}^{-1}$ ). After 3 days of cultivation, the cells were harvested by centrifugation (500 x g for 7 min), washed twice in encystment medium and suspended in encystment medium at  $5 \times 10^5$  trophozoites. $\text{mL}^{-1}$ . The cell concentration

was estimated by enumeration in counting chamber (Fast-Read 102<sup>®</sup>, Biosigma). Then trophozoites were incubated in 12 well-cell-culture microplates (1 mL per well) at 25 °C. Encystment rates were measured every three hours until 100 % of encystment was obtained. These kinetics were performed in three independent replicates.

#### **2.4. Environmental conditions**

In order to evaluate the influence of environmental conditions (temperature, pH and osmotic pressure) on the process of encystment in *V. vermiformis*, tests were performed following the same conditions as described for kinetics of encystment. Encystment rates were calculated after 6 h and 9 h (according to the results of kinetics) of incubation at each condition. To estimate the effect of the various considered parameters, changes were applied to the above described conditions. The influence of temperature was tested by incubating microplates at four different temperatures: 4, 25, 37 and 50 °C. The effects of pH and osmotic pressure were tested by adjusting pH and KCl concentrations of the Neff's medium respectively. This modified medium was then used to wash and suspend cells. The pH tested values were as follows: 5, 6, 7, 8 and 9. The KCl applied concentrations were: 0, 0.05, 0.1, 0.2 and 0.5 mol.L<sup>-1</sup>. Each test was performed in three independent replicates.

#### **2.5. Cell concentration tests**

Cell concentration tests were performed from trophozoites using Neff's encystment medium. Cultures of 3 days old were harvested by centrifugation (500 x g for 7 min), then the cells were washed twice in encystment medium and suspended in same medium at several cell concentrations: 1 x 10<sup>4</sup>, 1 x 10<sup>5</sup>, 1 x 10<sup>6</sup> trophozoites.mL<sup>-1</sup>. The cell concentration was estimated by enumeration in counting chamber (Fast-Read 102<sup>®</sup>, Biosigma). Then trophozoites were incubated in 75 cm<sup>2</sup> tissue culture flask at 25 °C. Before measuring encystment rates, cells were concentrated, for tests with 1 x 10<sup>4</sup>, 1 x 10<sup>5</sup> cells.mL<sup>-1</sup>, in order not to be in limiting conditions. Encystment rates were measured after two times of incubation: 6 and 9 h (according to the results of kinetics). These tests were performed in three independent replicates.

#### **2.6. Measure of the encystment rate**

Cells were harvested by centrifugation (500 x g for 7 min) to eliminate the encystment medium and suspended in phosphate buffer (50 mmol.L<sup>-1</sup>, pH= 7). The total number of

amoebae (trophozoites, immature cysts and cysts) was enumerated using a Fast-read 102<sup>®</sup> (Biosigma) counting chamber. Then the cells were treated with 0.5 % of sodium dodecyl sulfate (SDS) to lyse trophozoites and immature cyts. Finally the number of mature cysts was enumerated. Encystment rate was calculated by the following formula: (Number of mature cysts x 100)/Number total of amoebae.

## 2.7. Light microscopy

An upright microscope (Olympus BX51) with phase contrast equipped with camera (Olympus DP20-5E Microscope digital camera) was used for pictures. An inverted confocal microscope with rotary disk (Revolution/Andor; Olympus IX81-ZDC) was used for time-lapse studies. The pictures were taken every 30 s during 11 h. The pictures were assembled (15 pictures by second) using FluoView software.

## 2. RESULTS

### 2.1. Kinetic of encystment

The encystment of *V. vermiformis* has been very little studied, so there is no reference medium to induce the encystment. It is well established that the major factor inducing the encystment of FLA is the starvation (Byers, 1979; Weisman, 1976). Therefore we chose to induce the encystment of *V. vermiformis* in liquid medium without nutriments. We selected the Neff's encystment medium because it allows quick and synchronous encystment in *Acanthamoeba* (Neff, 1964). In order to estimate the speed of encystment, we conducted kinetic studies on two strains: *V. vermiformis* 50237 and 172A. For this purpose, the strains were incubated in Neff's encystment medium and the encystment rates were measured every three hours. After 3 h of incubation in Neff's encystment medium, the cells of the two strains were not encysted (Fig. 1). After 6 h of incubation, 56 % and 37 % of cells of strains 50237 and 172A were encysted respectively. After 9 h in Neff's encystment medium, the two strains were encysted at approximately 100 %. Consequently, for evaluate the effect of environmental conditions and cell concentration on the encystment of *V. vermiformis*, the encystment rates were measured after 6 and 9 h of incubation in the selected condition. In addition, time lapse microscopy illustrates the encystment process (Video 1). This video represents 11h of encystment. It confirms that encystment was rapid. After 6 hours most cells were encysted, forming immature then mature cysts. The immature cysts are generally larger than mature cysts and the cyst wall synthesis is not completed. Several cells remained

active, very mobile and had a vermiform shape. The video gives evidence that there were frequent cellular interactions during encystment.

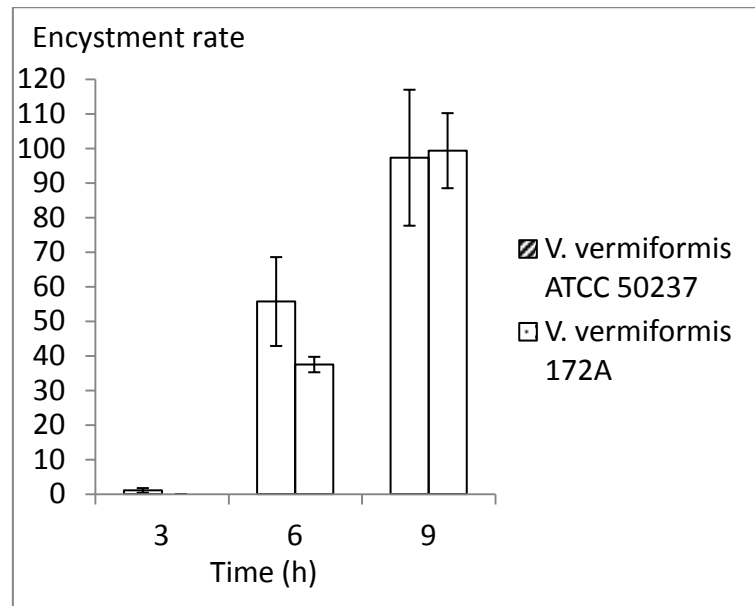


Figure 1: Kinetic of *Vermamoeba vermiformis* encystment.

## 2.2. Effect of temperature

Temperature is well known to control encystment in *Acanthamoeba*. For each *V. vermiformis* strain (50237 and 172A), the effect of temperature on the encystment rate was evaluated after 6 h and 9 h at 4, 25, 37 and 50 °C. The two strains had similar behavior with respect to temperature (Fig. 2). The encystment rates at 25 and 37 °C were comprised between 40 and 55 % after 6 h and were maximal after 9 h. On the contrary, at 4 °C and 50°C, encystment was almost fully inhibited (less than 7 %) (Fig. 2). A microscopic observation showed that at 4°C the trophozoites lost their locomotive form and appeared spherical, immobile and presented a simple plasma membrane (Fig. 3C). At 50 °C the trophozoites were lysed (Fig. 3D).

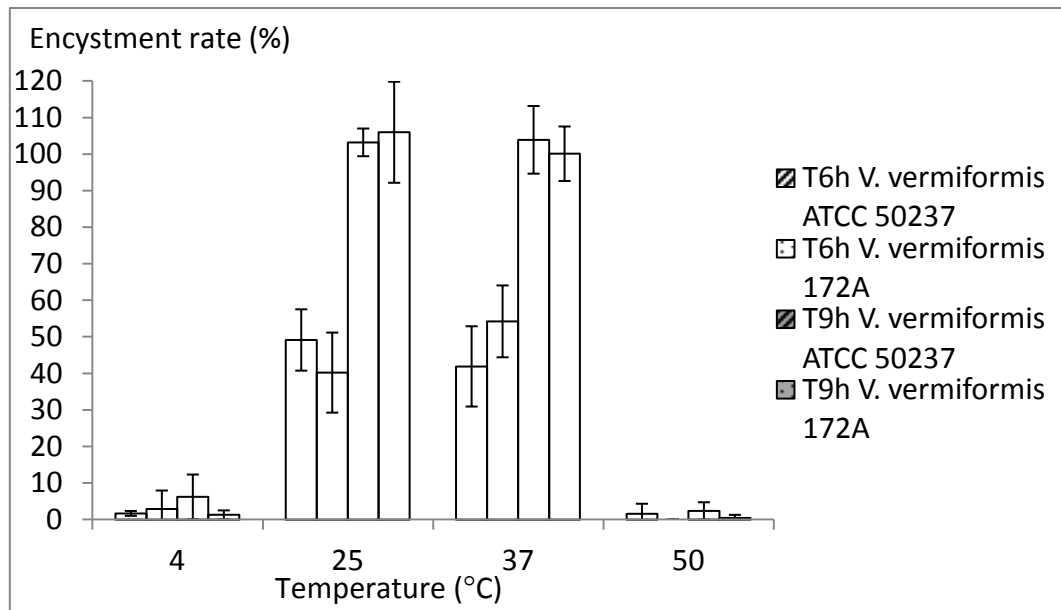


Figure 2: Effect of temperature on the encystment rate of *Vermamoeba vermiformis*.

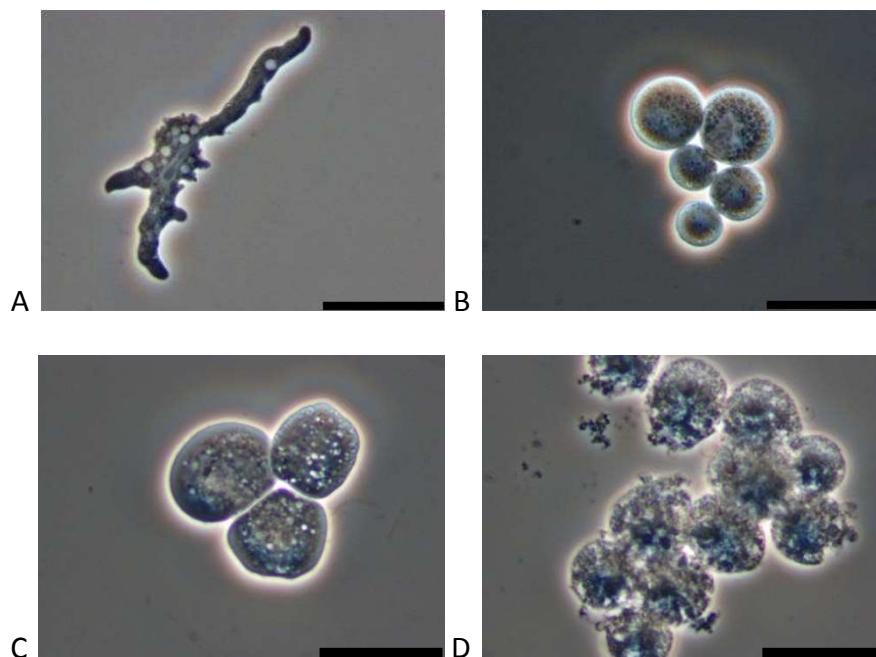


Figure 3: Microscopic observations of the temperature effect on the encystment of *Vermamoeba vermiformis*. (A) Trophozoite cultivated in the nutritive medium PYNFH modified (B) Cysts after 9 h in Neff's encystment medium at 25 °C (C) Cells after 9 h in Neff's encystment medium at 4 °C (D) Cells after 9 h in Neff's encystment medium at 50 °C. Scale bar: 20  $\mu\text{m}$

### 2.3. Effect of pH

pH, like temperature, has been shown to control *Acanthamoeba* encystment. For *V. vermiformis* (50237 and 172A), the effect of pH was evaluated after 6 h and 9 h of

incubation in Neff's encystment medium, adjusted at various pH (5, 6, 7, 8 and 9). The results show that the two strains had different behavior with respect to pH (Fig. 4). The encystment of the strain 50237 was not influenced by pH between 5 and 9. After 6 h, the rates of encystment were between 53 and 66 %, and after 9 h the encystment rates were maximal. In contrast, the encystment of the strain 172A seemed to be slightly influenced by the pH. For the basic pH of 8 and 9, the encystment rates were maximal while at pH 5 to 7 the encystment rates were around 80% after 9h. Thus, it appeared that the encystment of strain 172A was favored at basic pH.

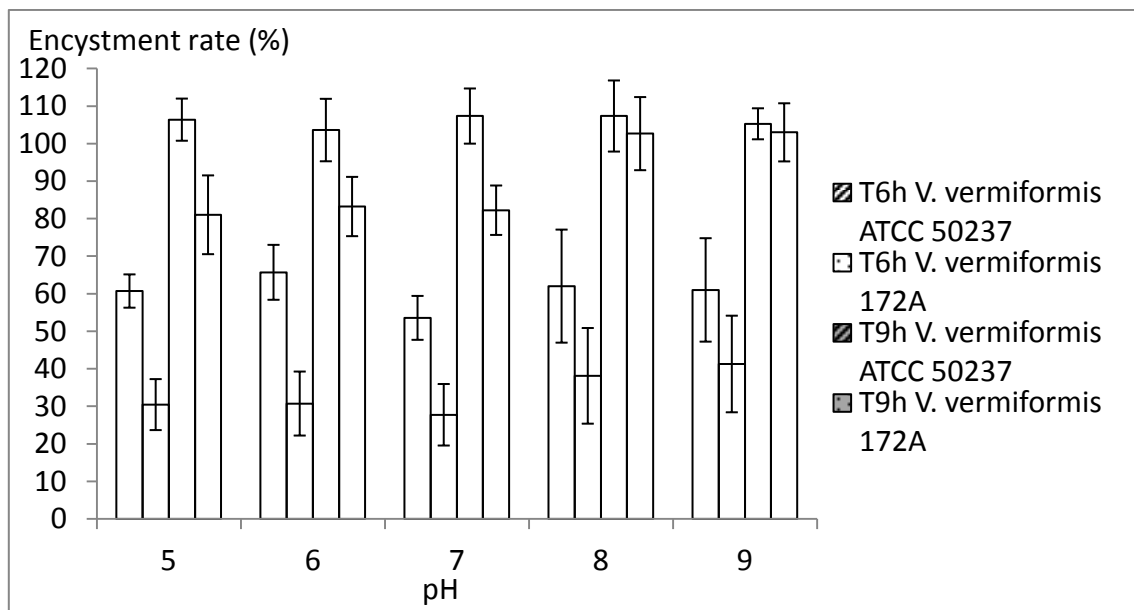


Figure 4: Effect of pH on the encystment rate of *Vermamoeba vermiformis*.

#### 2.4. Effect of Osmotic pressure

Osmotic pressure is known to be a triggering signal for *Acanthamoeba* encystment. The effect of osmotic pressure on the *V. vermiformis* encystment rate was evaluated by modifying KCl concentration (0, 0.05, 0.1, 0.2 and 0.5 mol.L<sup>-1</sup>) of the Neff's encystment medium. The conventional concentration is 0.1mol.L<sup>-1</sup>. The results illustrate that in the absence of KCl, or when KCl concentration was too high (0.5 mol.L<sup>-1</sup>), there was no encystment (Fig. 5). For intermediate KCl concentrations (0.05 to 0.2), the two strains displayed different behavior. The encystment rates were not affected for the 50237 strain while the optimal concentration for the 172A strain was 0.1 mol.L<sup>-1</sup> of KCl. For the 50237 strain, the encystment rate was comprised between 93 and 100 % after 9 h. For the strain 172A, the encystment rate changed with KCl concentration. At 0.05 mol.L<sup>-1</sup> of KCl, the encystment rate was 67 % after 9 h. At 0.1 mol.L<sup>-1</sup> of KCl, the encystment rate was 105 %

after 9 h. And, at  $0.2 \text{ mol.L}^{-1}$  of KCl, the encystment rate was only 46 % after 9 h. These results show that the strain 172A was more sensitive to osmotic pressure than the strain 50237. Microscopic observations illustrated the effect of osmotic pressure (Fig. 6). In absence of KCl cells swelled and finished by lyse (Fig. 6C). Indeed, the solute concentration of the encystment medium was lower than that of the cytosol which leading to a water inlet in the cell. At the opposite, at  $0.5 \text{ mol.L}^{-1}$  in KCl, cells appeared to shrink due to a water outlet of cells (Fig. 6D) thereby inhibiting the encystment process.

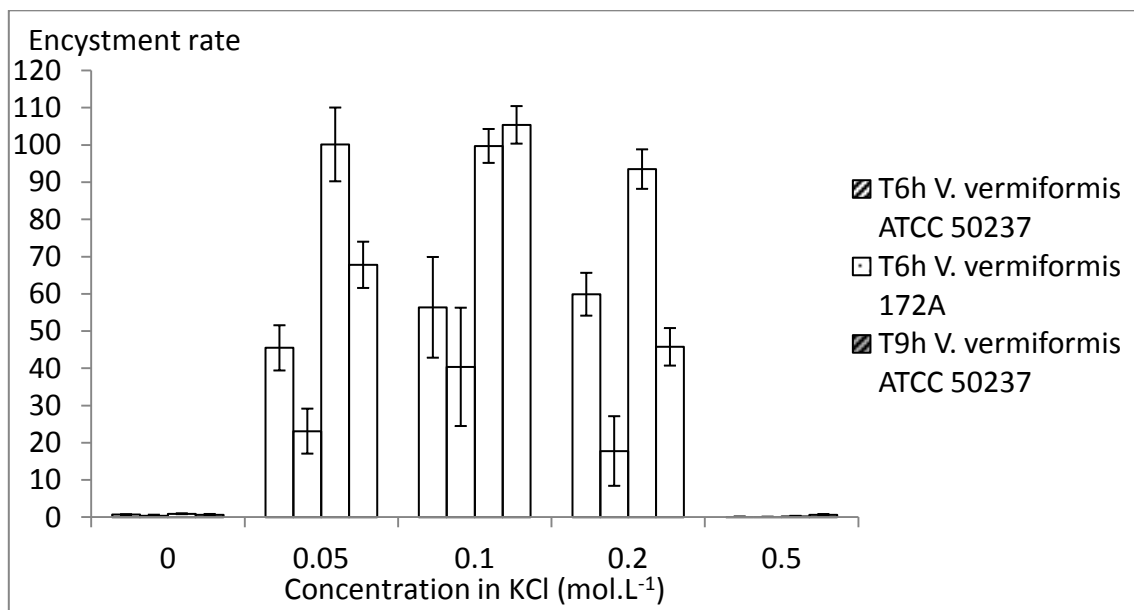


Figure 5: Effect of osmotic pressure on the encystment rate of *Vermamoeba vermiformis*.



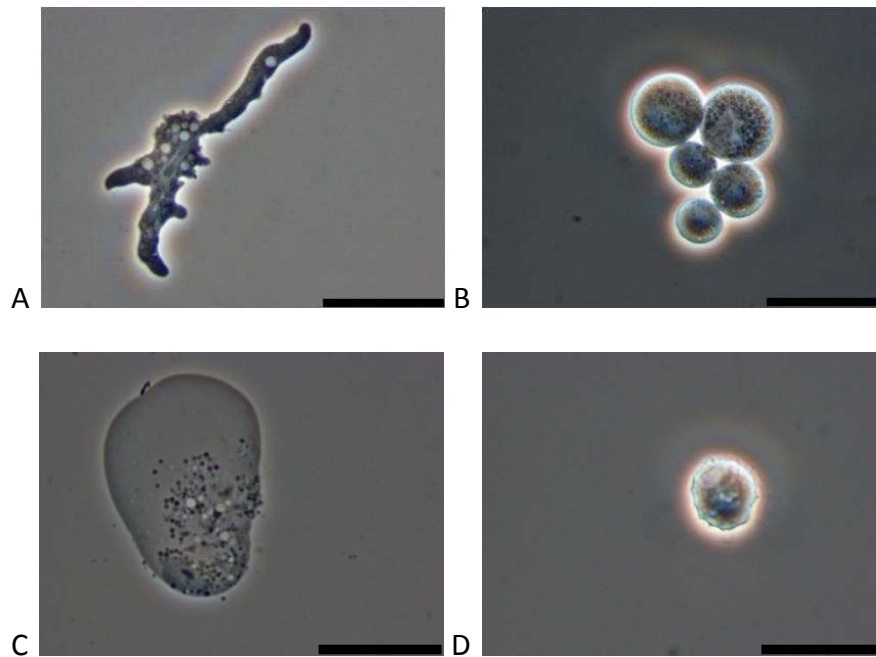


Figure 6: Microscopic observations of the osmotic pressure effect on the encystment of *Vermamoeba vermiformis*. (A) Trophozoite cultivated in the nutritive medium PYNFH modified (B) Cysts after 9 h in Neff's encystment medium ( $0.1 \text{ mol.L}^{-1}$  of KCl) (C) Cell after 9 h in Neff's encystment medium without KCl (D) Cell after 9 h in Neff's encystment with  $0.5 \text{ mol.L}^{-1}$  of KCl. Scale bar:  $20 \mu\text{m}$ .

### 2.5. Effect of cell concentration

Personal observations suggested that cellular concentration may influence encystment rate. However, it has never been demonstrated in FLA. To test this hypothesis, we chose to compare three different cell concentrations:  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$  and  $1 \times 10^6 \text{ cells.mL}^{-1}$ . The results clearly demonstrated that the encystment rate increased with cell concentration, in both strains (Fig. 7). After 9 h of incubation, the encystment rates were between 40 and 50% at  $10^4 \text{ cells.mL}^{-1}$ , between 55 and 80% at  $10^5 \text{ cells.mL}^{-1}$  and around 100% at  $10^6 \text{ cells.mL}^{-1}$ . After 6 h, we observed a similar trend.

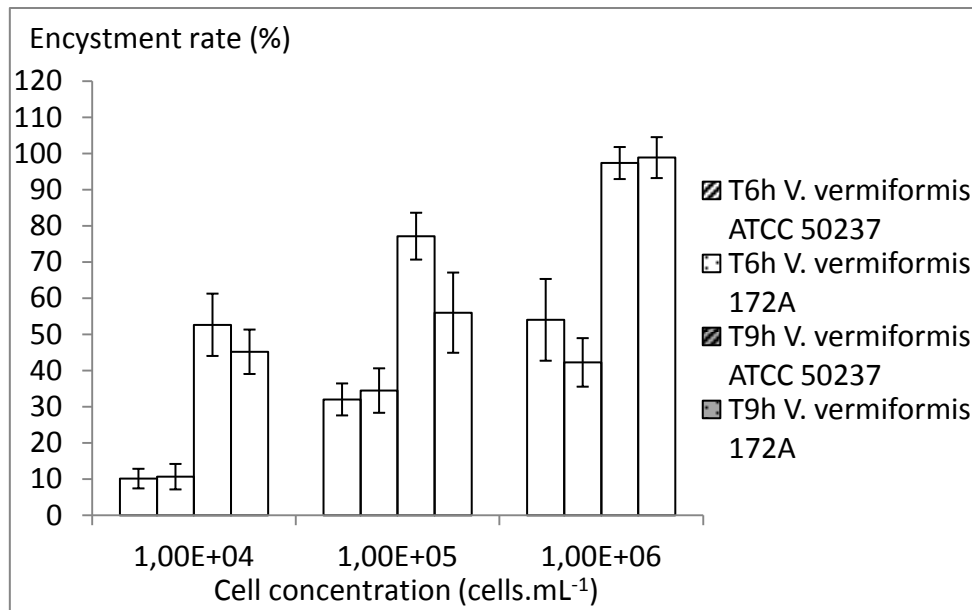


Figure 7: Effect of cell concentration on the encystment rate of *Vermamoeba vermiformis*.

#### 4. DISCUSSION

*V. vermiformis* is a FLA frequently found in water networks (Buse, et al., 2013, Rohr, et al., 1998) and it is recognized for its role of reservoir for *L. pneumophila* and other pathogenic bacteria (Fields, et al., 1990, Thomas, et al., 2010). Besides, the cyst form of *V. vermiformis* is partly resistant to treatment in water networks. There are currently very few data in the literature on the encystment of *V. vermiformis*. Having no basis for comparison on *V. vermiformis* we compared our results with data obtained on the genus *Acanthamoeba*. The present study investigated the effect of temperature, pH, osmotic pressure and cell concentration on the encystment of *V. vermiformis*.

*V. vermiformis* encystment was conducted in the Neff's encystment medium because it allows quick and synchronous encystment in *Acanthamoeba* (Neff, et al., 1964). The kinetic of encystment showed that the two strains were totally encysted after 9 h. The encystment of *V. vermiformis* was quite fast and efficient. The encystment was faster than the one of *Acanthamoeba*, which takes at least 16 h in the same medium (Hughes, et al., 2003, Neff, et al., 1964).

The variation of temperature on the encystment of the two strains of *V. vermiformis* showed that the encystment rate was maximal at 25 and 37°C. In *Acanthamoeba*, Neff *et al.* (1964) showed that encystment was faster in the 30 to 32 °C range in Neff's encystment medium. In 2013, Aqeel *et al.* showed that the effect of temperature varied depending on the medium

used for the encystment (Aqeel, et al., 2013). They have proposed, as an explanation, that the tested media provided different triggers (starvation, higher osmotic pressure, low temperature) that may act in synergy to stimulate encystment. In our study, *V. vermiformis* did not encyst at 4 °C, likely due to the biostatic effects of low temperature. In *Acanthamoeba*, Neff et al. (1964) showed that at 15 °C the encystment was limited. At 50 °C, there was no encystment since most of the *V. vermiformis* cells were lysed. In *Acanthamoeba*, the higher temperature that allowed encystment in Neff's medium was 40 °C (Neff, et al., 1964).

We also tested the effect of pH comprised between 5 and 9 on the encystment of *V. vermiformis*. Interestingly, the two strains had different behavior with respect to pH. The encystment of the 50237 strain was not influenced by the range of pH tested while the encystment of the 172A strain was favored by basic pH (8 and 9). Neff et al. showed that the encystment of *Acanthamoeba* was favored by basic pH comprised between 8.6 and 9; at neutral pH the encystment was slower (Neff, et al., 1964). Recently, different results suggested that optimal pH for encystment depended to the used medium (Aqeel, et al., 2013).

The study of osmotic pressure on the encystment of *V. vermiformis*, was assessed by modifying KCl concentration in the Neff's encystment medium. In the absence of KCl, or when KCl concentration was too high (0.5 mol.L<sup>-1</sup>), there was no encystment in *V. vermiformis* and the cells swelled or shrank, respectively. Considering intermediate KCl concentrations (0.05 to 0.2 mol.L<sup>-1</sup>), the two strains of *V. vermiformis* displayed different behaviors. The encystment rates were not affected for the 50237 strain while the 172A strain was more sensitive to the osmotic pressure. In *Acanthamoeba* the optimal encystment rate was also obtained in the range of 0.05 to 0.2 mol.L<sup>-1</sup> of KCl (Neff, et al., 1964). In 1978, Lasman and Shafran investigated the effect of MgCl<sub>2</sub> on the encystment of *A. palestinensis* (Lasman and Shafran, 1978). They obtained an optimal encystment in the range of 0.05 to 0.08 mol.L<sup>-1</sup> of MgCl<sub>2</sub>. They showed also that for a concentration of 0.16 mol.L<sup>-1</sup> of MgCl<sub>2</sub>, the majority of cells died. In 1996, Cordingley et al. induced the encystment of *A. castellanii* by adding NaCl (0,125 mol.L<sup>-1</sup>) or glucose (7.5 %) to nutritive medium. All together these results indicate that *V. vermiformis*, as well as *Acanthamoeba*, better encyst at moderate osmotic pressure (around 0.20 Osm/L).

Finally, we tested the effect of cellular concentration on the encystment because previous personal observations suggested it may influence encystment rate. The results clearly demonstrated that the encystment rate increased with cell concentration and suggested that there is an inter-amoebal communication. In bacteria, there is a coordinated response of a population in case of high concentration of cells named quorum sensing (Miller and Bassler, 2001). This is based on production of a “pheromone” which concentration increases with cells concentration. In 1980, Akins and Byers reported that a factor, named encystment-enhancing activity (EEA), secreted by *Acanthamoeba* in high-density culture, was able to stimulate encystment (Akins and Byers, 1980). The nature of this factor was not described, but the authors suggested that it may be a modified nucleotide. They speculated that EEA acted similarly to a quorum-sensing signaling molecule. In 2001, Eichinger hypothesized that catecholamines might be quorum-sensing molecules, he suggested that they might be involved in prokaryote-eukaryote communication (Eichinger, 2001). In *Acanthamoeba*, the encystment is induced by catecholamine (epinephrine and norepinephrine) and is likely mediated by an adrenergic-like receptor that activates cyclic AMP (cAMP) synthesis (Murti, 1975, Srivastava and Shukla, 1983). But it is necessary to clarify if catecholamine is a global signal in every genus of FLA and if catecholamine could be produced by FLA, as it is the case for *Entamoeba invadens* (Coppi, et al., 2002). Alternatively, it could be hypothesized that high cell concentration could favor direct communication via cell contact.

In conclusion, our results show that in Neff's encystment medium, the encystment of *V. vermiformis* was rapid, completed in 9 h. An optimal encystment was obtained at 25 and 37 °C. Concerning the pH and osmotic pressure, there were different effects on the encystment according the strains of *V. vermiformis* tested. However, higher encystment rate were obtained at basic pH (8-9) and moderate osmotic pressure (concentration in KCl of 0.1 mol.L<sup>-1</sup>). Also, the results clearly demonstrate, for the first time, that the encystment rate increased with cell concentration, which suggests that there is an inter-amoebal communication. Further research needs to be conducted to identify triggers and molecular mechanisms involved in the process of *V. vermiformis* encystment. This would finally lead to better prevent and manage health risks linked to FLA encystment within water systems.

## 2.2. Résultats complémentaires

Nous avons également voulu tester l'effet de différents inhibiteurs sur l'enkystement de *V. vermiformis* afin de visualiser certains mécanismes moléculaires mis en jeu lors de ce processus. Nous avons choisi de tester l'effet de quatre inhibiteurs très différents.

Nous avons tout d'abord voulu tester l'effet d'un inhibiteur des protéines ERK (*Extracellular signal-regulated kinases*), qui font parties de la famille des MAP (*Mitogen-activated protein*) kinases, sur l'enkystement de *V. vermiformis*. Les MAP kinases interviennent dans la réponse cellulaire à un large éventail de stimuli, comme des stimuli mitogènes, le stress osmotique, les chocs thermiques... Elles régulent également la prolifération, l'expression génique, la différenciation, la mitose, la survie cellulaire et l'apoptose chez les cellules eucaryotes. Chez *Acanthamoeba*, il a été montré que la FPT III (*Farnesyl protein transferase*), un inhibiteur de la farnésylation Ras, réduisait l'enkystement (Dudley *et al.*, 2009). Les protéines Ras sont des petites GTPases qui permettent l'activation de la voie des MAP kinases. Cependant, les auteurs ont testé d'autres inhibiteurs de la voie des MAP kinases (l'inhibiteur SB0203580 de la p38 MAPK et l'inhibiteur PD98059 des MEK) qui n'ont eu aucun effet sur l'enkystement d'*Acanthamoeba*. Ces résultats suggèrent que la voie des MAP kinases peut être impliquée dans l'enkystement mais que les constituants de cette voie restent à décrire.

Nous avons également décidé de tester l'effet du LY 294002, un inhibiteur des protéines PI3K (*Phosphatidylinositide 3-kinase*), sur l'enkystement de *V. vermiformis*. Les PI3K sont des kinases impliquées dans les fonctions cellulaires comme la croissance cellulaire, la prolifération, la différenciation, la mobilité, la survie et le trafic intracellulaire chez les cellules eucaryotes. Dans la littérature, il a été montré que cet inhibiteur (LY 294002) réduit significativement l'enkystement chez *Balamuthia mandrillaris* (Siddiqui *et al.*, 2010).

Puis nous avons choisi de tester l'effet de la cytochalasine D, un inhibiteur de la polymérisation des filaments d'actine, sur l'enkystement de *V. vermiformis*. Durant l'enkystement des amibes libres, il s'opère d'importants changements morphologiques au cours desquels des réarrangements du cytosquelette peuvent se produire. Une publication, datant du début des années 1980, a décrit le contrôle de la synthèse d'actine durant

l'enkystement d'*Acanthamoeba* (Jantzen, 1981). Des travaux plus récents ont montré que la cytochalasine D réprime l'enkystement chez *Acanthamoeba* et *Balamuthia mandrillaris* (Dudley *et al.*, 2009 ; Siddiqui *et al.*, 2010).

Enfin, nous avons voulu tester l'effet d'un inhibiteur de la glycogène phosphorylase (n° CAS : 648926-15-2) sur l'enkystement de *V. vermiformis*. La glycogène phosphorylase est la première enzyme qui intervient lors de la dégradation du glycogène en glucose qui peut servir à la synthèse de la cellulose, un des composants de la paroi des kystes d'*Acanthamoeba*. Il a été montré, chez *Acanthamoeba*, que l'inhibition de l'expression de la glycogène phosphorylase par des petits ARN interférants (siRNA) induisait un enkystement défaillant. Les cellules traitées avec ces petits ARN interférents étaient capables de synthétiser seulement l'ectokyste, et pas l'endokyste qui contient la cellulose (Lorenzo-Morales *et al.*, 2008).

La particularité de ces quatre inhibiteurs est qu'ils ne sont pas solubles dans l'eau mais uniquement dans des solvants organiques tels que le DMSO. Nous avons donc introduit à nos expérimentations deux témoins : l'un contenant uniquement le milieu d'enkystement Neff et l'autre contenant le milieu d'enkystement Neff additionné de la même concentration en DMSO que celle introduite par l'ajout des inhibiteurs aux échantillons traités. Un profil d'enkystement similaire a été obtenu entre les échantillons traités avec les inhibiteurs et ceux traités avec le milieu d'enkystement additionné du DMSO. Par contre les profils d'enkystement étaient différents entre les deux témoins, l'enkystement était plus rapide en présence de DMSO. Il semblerait donc que le DMSO soit un fort signal d'enkystement, il induirait un enkystement plus rapide qu'une seule déplétion nutritive. Chez *Acanthamoeba*, une étude récente a montré que les solvants organiques (DMSO, acétone et méthanol), en faible concentration, induisent une réponse cellulaire immédiate qui conduit à la formation rapide de pseudokystes (Kliescikova *et al.*, 2011a). A première vue, cette réaction peut apparaître comme une forme accélérée et incomplète de l'enkystement. Mais, en réalité, il semblerait que la formation des pseudokystes et des kystes soient deux réactions de défense distinctes qui sont activées par des conditions environnementales différentes (Kliescikova *et al.*, 2011a). La formation des pseudokystes permettrait de protéger les *Acanthamoeba* des changements brusques de l'environnement car c'est un processus plus rapide que l'enkystement qui nécessite approximativement entre 16 et 24 h (Hughes *et al.*,

2003a ; Köhler *et al.*, 2008 ; Lloyd *et al.*, 2001 ; Neff, 1964). Au sein de notre laboratoire nous avons également observé, chez *Acanthamoeba*, l'induction de pseudokystes en présence de solvants organiques (Figure 31). Il a aussi été démontré que le propylène glycol, qui est un diol, induit la formation rapide des pseudokystes chez *Acanthamoeba* (Kliescikova *et al.*, 2011b).

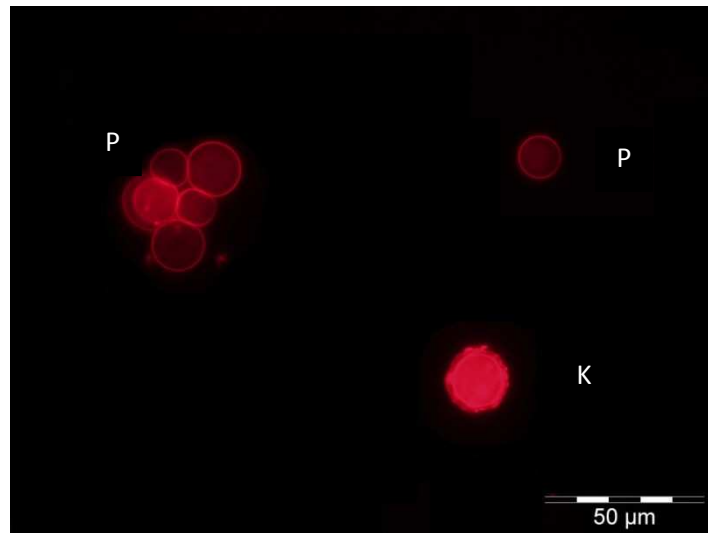
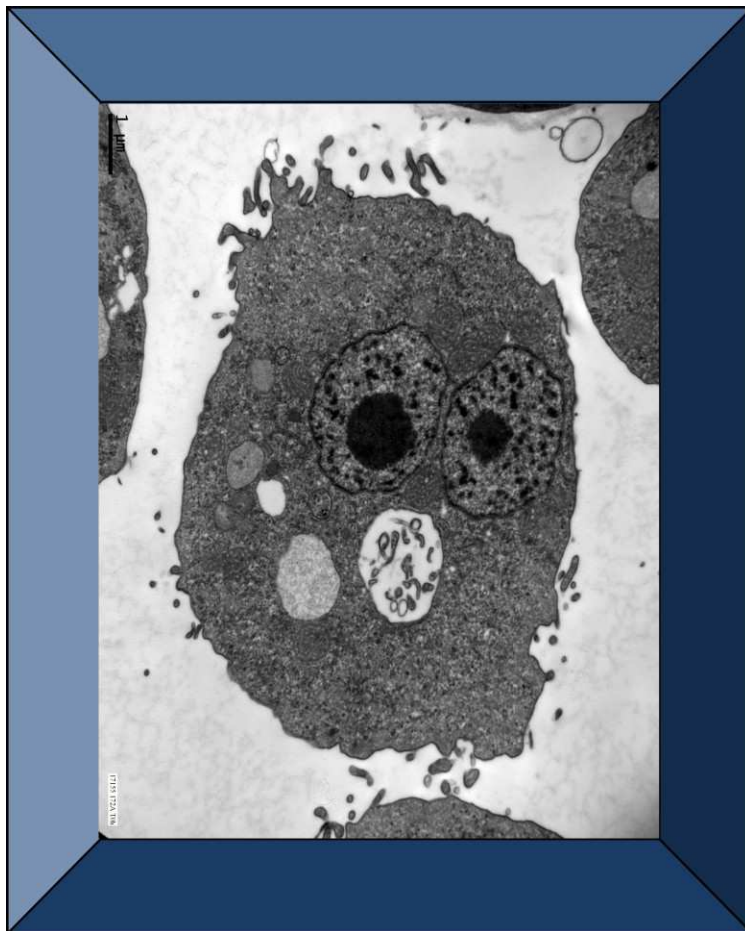


Figure 31 : Kyste (K) et pseudokystes (P) d'*Acanthamoeba* marqués au rouge Congo

En raison de l'effet du DMSO sur l'enkystement, il a été impossible de conclure sur l'influence des différents inhibiteurs sur l'enkystement de *V. vermiformis*. Il faudrait vérifier si les inhibiteurs peuvent être solubilisés dans un autre solvant organique (acétone, méthanol, éthanol, chloroforme...) et s'assurer que celui-ci n'a pas d'effet sur l'enkystement de *V. vermiformis*. Il est également possible d'envisager de réduire les concentrations en solvant organique à une valeur qui n'affecte pas le processus d'enkystement. Il faudrait donc déterminer quelle est la concentration maximale en solvant organique qui n'influe pas sur l'enkystement de *V. vermiformis*. Cependant, il a été montré que chez *Acanthamoeba* l'acétone et le méthanol induisent la formation rapide de pseudokystes. Il est donc imaginable d'utiliser d'autres types d'inhibiteurs, solubles dans l'eau, ou bien d'utiliser une approche différente comme l'utilisation d'ARN interférents.

## CHAPITRE VI : Etude de la résistance des kystes de *V. vermiformis* aux traitements de désinfection conventionnels et aux protéases





**CHAPITRE VI : Etude de la résistance des kystes de *V. vermiformis* aux traitements de désinfection conventionnels et aux protéases**

Au début de la thèse, il n'existait que peu de données relatives à la résistance des kystes de *V. vermiformis* aux traitements de désinfection conventionnels bien que des études aient montré que cette amibe libre avait la capacité de coloniser les RECS et d'abriter des bactéries pathogènes telles que *Legionella pneumophila* responsable de la majorité des cas de légionellose. Nous nous sommes donc intéressés au comportement des kystes de *V. vermiformis* vis-à-vis des traitements de désinfection classiquement appliqués dans les RECS, souvent incriminés lors des épidémies de légionellose (Fields *et al.*, 1990 et 2002). Dès 1987, la légionellose est devenue, en France, une maladie à déclaration obligatoire et, depuis 1997, il existe des circulaires relatives à la surveillance et à la prévention du risque légionelles dans les RECS. Ces documents sont régulièrement révisés et, la circulaire actuellement en vigueur date du 22 avril 2002 (DGS/SD7A/DHOS/EA n°2002/243). Cette circulaire donne les directives à suivre pour prévenir la contamination du RECS par les légionelles, à savoir un bon fonctionnement hydraulique afin d'éviter la stagnation de l'eau, le contrôle de la température à chaque point du réseau et les moyens de lutte contre l'entartrage et la corrosion. Elle donne également les procédures et traitements de désinfection utilisables pour la prévention (traitement en continu) ou la décontamination (traitement choc) dans le cas d'un RECS infecté (Tableau 6).

**Tableau 6 :** Ensemble des traitements autorisés en France pour désinfecter les RECS.

Source : Maîtrise du risque de développement des légionelles dans les RECS (Guide technique CSTB, Correc *et al.* 2012)

| Produits  | Utilisation en traitement continu  | Utilisation en traitement discontinu <sup>a</sup>     | Utilisation en traitement choc curatif <sup>b</sup>  |
|---|--|---|--|
| Composés chlorés générant des hypochlorites (hypochlorite de sodium ou de calcium, chlore gazeux, hypochlorite de calcium)  | 1 mg/L de chlore libre   | 10 mg/L de chlore libre pendant 8 h                   | 100 mg/L de chlore libre pendant 1 h ou 15 mg/L de chlore libre pendant 24 h ou 50 mg/L de chlore libre pendant 12 h |
| Dichloro-isocyanurates (de sodium ou de sodium hydratés)  | Non  | 10 mg/L en équivalent chlore libre pendant 8 h        | 100 mg/L de chlore libre pendant 1 h ou 15 mg/L de chlore libre pendant 24 h ou 50 mg/L de chlore libre pendant 12 h |
| Dioxyde de chlore   | 1 mg/L de chlore libre   | Non   | Non  |
| Peroxyde d'hydrogène mélangé avec de l'argent   | Non  | 100 à 1 000 mg/L de peroxyde d'hydrogène <sup>c</sup> |  |
| Acide peracétique en mélange avec du peroxyde d'hydrogène   | Non  | Non   | 1 000 ppm en équivalent H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> pendant 2 h  |
| Soude   | Non  | pH > 12 au moins 1 h <sup>d</sup>                     |  |
| PROCÉDÉS  |  |   |  |
| Choc thermique  | 60/50 °C dans le réseau et inférieur à 50 °C dans les pièces de toilette | Traitement discontinu : 70 °C pendant 30 min          |  |
| Filtration membranaire seuil de coupure 0,2 µm  | Oui  | Non   | Non  |
| <small>a: Les modalités de désinfection préconisées pour les traitements discontinus n'ont été validées que pour de petits réseaux, et les retours d'expériences ne permettent pas de les valider actuellement pour les réseaux de taille plus importante.<br/>                     b: Les concentrations de désinfectants sont données à titre indicatif. Il faut s'assurer au préalable de la tenue des matériaux avec les types et les doses de désinfectants utilisés.<br/>                     c: Pour un temps de contact fonction de la concentration et pouvant aller jusqu'à 12 heures.<br/>                     d: Cependant des précautions doivent être prises pour la tenue des matériaux. Cette solution doit être envisagée en dernier ressort et avec de grandes précautions eu égard au risque encouru par le personnel.</small> |  |   |  |

*NB : la filtration membranaire est utilisée uniquement au point d'usage.*

En se référant à cette circulaire nous avons sélectionné trois types de traitement : (i) les traitements chlorés qui peuvent être utilisés en traitement continu, discontinu ou en choc curatif ; (ii) les chocs thermiques, et (iii) l'acide peracétique couplé au peroxyde d'hydrogène utilisable uniquement en choc curatif. La résistance des kystes de *V. vermiformis* à ces trois types de traitement a donc été évaluée à l'échelle du laboratoire.

Cependant, il a déjà été montré dans la littérature que les traitements de désinfection classiques sont souvent insuffisants pour éliminer les amibes libres des RECS (Rohr *et al.*, 1998), c'est pourquoi il est essentiel de développer de nouveaux traitements. Nous avons choisi comme approche de tester l'efficacité de traitements enzymatiques pour inactiver les kystes de *V. vermiformis*. Ainsi, nous avons sélectionné les protéases car il a été montré que les

composants majeurs de la paroi des kystes d'amibes d'*Hartmannella glebae*, une amibe libre proche de *V. vermiformis*, sont des protéines (Upadhyay *et al.*, 1984).

Il a été nécessaire de mettre en place un protocole précis pour chaque type de traitement ainsi qu'un protocole permettant d'estimer la viabilité des kystes de *V. vermiformis*. Ces différents points sont présentés dans les paragraphes qui suivent.

## **1. Choix et mise en place des techniques**

Dans un premier temps, il a été indispensable de définir, pour l'ensemble des traitements, plusieurs points importants comme le choix des souches, la méthode de production des kystes, la méthode d'estimation de la viabilité des kystes...

### **1.1. Définition des conditions expérimentales pour l'ensemble des traitements**

Le premier point a été le choix des souches de *V. vermiformis*. Nous avons sélectionné les mêmes souches que celles utilisées précédemment : la souche de référence *V. vermiformis* ATCC 50237 et la souche environnementale *V. vermiformis* 172A. L'ensemble des traitements a donc été réalisé sur les kystes de ces deux souches.

Le deuxième point a été la sélection de la méthode de production des stocks de kystes. Comme précédemment, nous avons utilisé le milieu d'enkystement Neff pour produire nos stocks de kystes. La méthode de production des stocks de kystes employée est détaillée dans la partie III.3.1.1.1. Enkystement classique dans le milieu Neff.

Le troisième point a été le choix de la méthode d'estimation de la viabilité des kystes. Notre choix s'est porté sur la technique du Nombre le plus probable (NPP) car il s'agit, actuellement, de la méthode la plus employée pour estimer la viabilité des amibes libres. La technique du NPP peut être réalisée, soit en milieu nutritif liquide, soit sur des géloses NNA recouvertes de bactéries mortes ou vivantes. Nous avons décidé de réaliser la technique du NPP sur des géloses NNA-*E. coli* car il s'agit d'un milieu optimal pour la croissance amibienne. Le

protocole utilisé pour l'estimation de la viabilité des kystes est décrit dans le paragraphe III.3.4. Estimation de la viabilité.

Enfin, nous avons décidé de réaliser tous nos traitements en triplicata, sur des suspensions de kystes à une concentration de  $5.10^5$  kystes.mL<sup>-1</sup> et d'exprimer nos résultats en log<sub>10</sub> d'abattement entre le témoin et l'échantillon traité.

Dans un deuxième temps, il a été nécessaire de définir, pour chaque type de traitement, plusieurs critères importants comme les concentrations en réactif à appliquer, les temps de contact, les méthodes de neutralisation des réactifs...

## **1.2. Définition des conditions expérimentales propres à chaque traitement**

### 1.2.1. Traitements chlorés

Pour la désinfection des RECS, le chlore peut être utilisé sous différentes formes : chlore gazeux (Cl<sub>2</sub>), hypochlorite de sodium (NaOCl) ou hypochlorite de calcium (Ca(ClO)<sub>2</sub>). Nous avons choisi d'utiliser le chlore sous forme d'hypochlorite de sodium en solution car il est largement employé sous cette forme et est facilement manipulable. Cependant, les solutions de NaOCl sont instables. Nous avons donc vérifié régulièrement la concentration en chlore libre à l'aide de la méthode titrimétrique à la *N,N*-diéthylphénylène-1,4 diamine (NF EN ISO 7393-1).

Ensuite, il a été nécessaire de déterminer les concentrations en chlore libre et les temps de contact à appliquer pour nos traitements. Dans les RECS, le chlore peut être utilisé pour les traitements continus avec une concentration de 1 mg.L<sup>-1</sup> et les traitements discontinus avec une concentration de 10 mg.L<sup>-1</sup> pendant 8 h. Il peut également être utilisé pour les chocs curatifs où la concentration en chlore libre et le temps de contact sont choisis en fonction du matériau constitutif du RECS (100 mg.L<sup>-1</sup> pendant 1 h, 50 mg.L<sup>-1</sup> pendant 12 h ou 15 mg.L<sup>-1</sup>) (*cf.* Tableau 6). En se basant sur ces données et celles présentes dans la littérature, nous avons sélectionné plusieurs concentrations en chlore libre : 2,5 ; 5 ; 10 et 15 mg.L<sup>-1</sup>, et plusieurs temps de contact : 10, 30 et 60 min.

Enfin, nous avons choisi d'utiliser le thiosulfate de sodium ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) pour neutraliser l'effet biocide du chlore après que le temps de contact sélectionné a été atteint.

Le protocole utilisé pour les traitements chlorés est schématisé dans la figure suivante (Figure 32) et décrit dans le paragraphe III.4.1. Traitements chlorés.

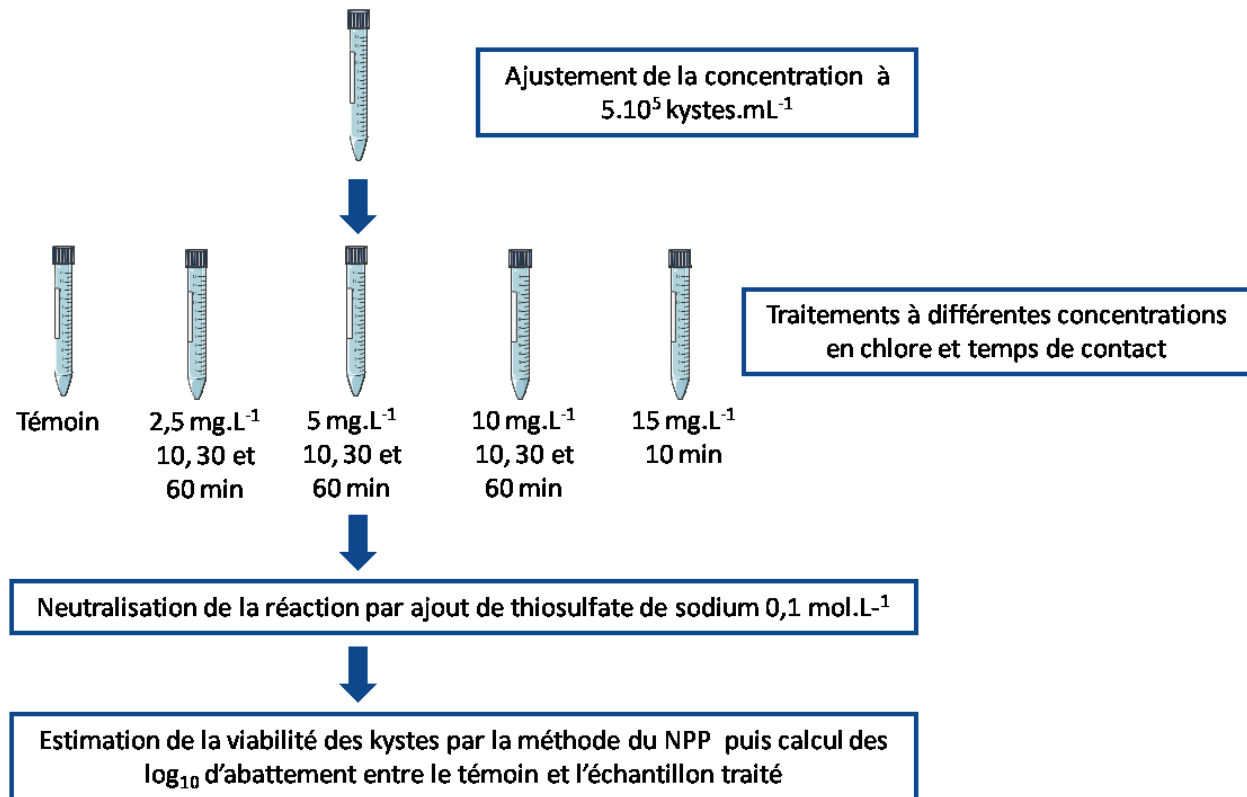


Figure 32 : Protocole de traitement des kystes de *V. vermiformis* au chlore.

### 1.2.2. Traitements thermiques

En France, la température des RECS doit être maintenue à différentes valeurs en fonction du point du réseau. A la sortie des réservoirs d'eau chaude, la température doit être supérieure à 55 °C et, en tout point du réseau, elle doit être supérieure à 50 °C. La température à maintenir au niveau des robinets dépend du type de pièce, en effet, dans les salles de bain la température est limitée à 50 °C pour éviter les risques de brûlure et dans les autres types de pièce elle est limitée à 60 °C. Les chocs thermiques peuvent également être utilisés pour le traitement discontinu des RECS (cf. Tableau 6). Ils consistent à élever la température à 70°C

pendant 30 min. En tenant compte de toutes ces données et celles présentes dans la littérature, nous avons sélectionné plusieurs températures : 50, 55, 60 et 70 °C, et plusieurs temps de contact : 30 et 60 min.

Le protocole utilisé pour les chocs thermiques est résumé dans la figure suivante (Figure 33) et détaillé dans le paragraphe III.4.2. Traitements thermiques.

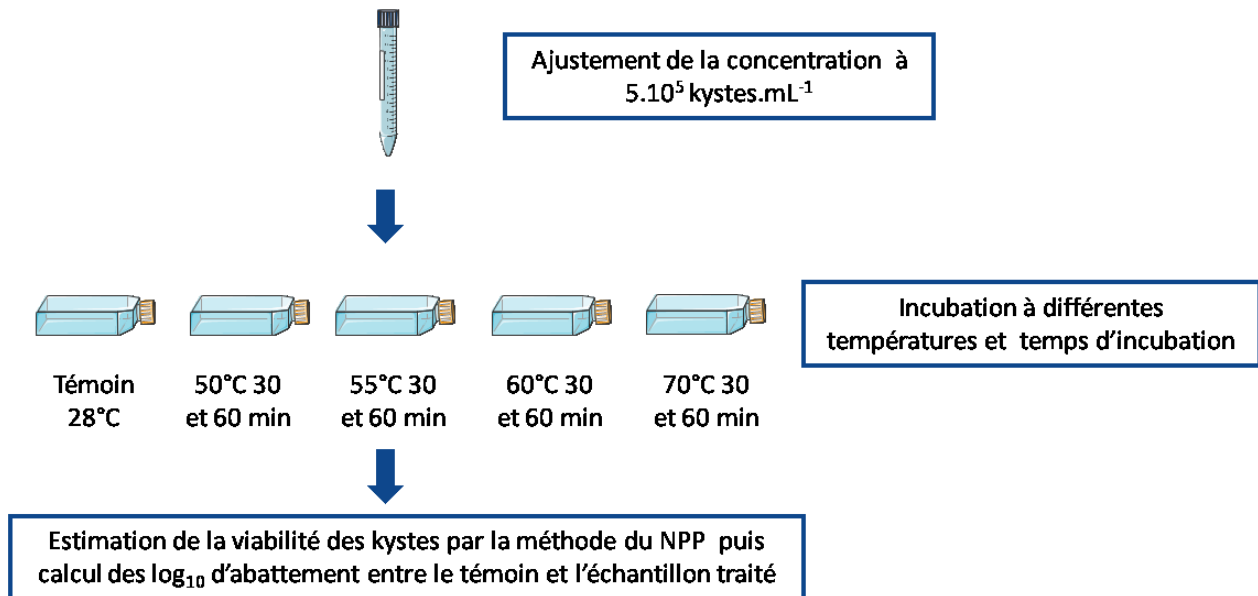


Figure 33 : Protocole de traitement des kystes de *V. vermiformis* par chocs thermiques.

### 1.2.3. Traitements à l'acide péraécétique couplé au peroxyde d'hydrogène

Pour le traitement curatif des RECS contaminés par les légionelles, il est possible d'utiliser l'acide péraécétique couplé au peroxyde d'hydrogène. Il n'existe qu'une seule procédure, elle consiste à traiter le RECS avec 1000 ppm ou mg.L<sup>-1</sup> en équivalent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pendant 2 h (cf. Tableau 6). En se basant sur cette procédure ainsi que sur les premiers essais de traitements réalisés pour la validation de la méthode (non présentés ici), nous avons choisi plusieurs concentrations en équivalent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : 0,1 ; 0,5 et 1 g.L<sup>-1</sup> et deux temps de contact : 30 et 60 min.

Il a également été nécessaire de déterminer une technique pour neutraliser l'effet biocide de l'acide péraécétique et du peroxyde d'hydrogène après le temps de contact

sélectionné atteint. Nous avons choisi d'utiliser le bouillon neutralisant Dey-Engley, qui a déjà été validé chez *Acanthamoeba castellanii* par Buck et Rosenthal (1996) auquel nous avons additionné 0,02 % de catalase qui catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en dioxygène selon la réaction suivante :  $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$ .

Le protocole utilisé pour les traitements à l'acide péracétique couplé au peroxyde d'hydrogène est schématisé dans la figure suivante (Figure 34) et décrit dans le paragraphe III.4.3. Traitements à l'acide péracétique couplé au peroxyde d'hydrogène.

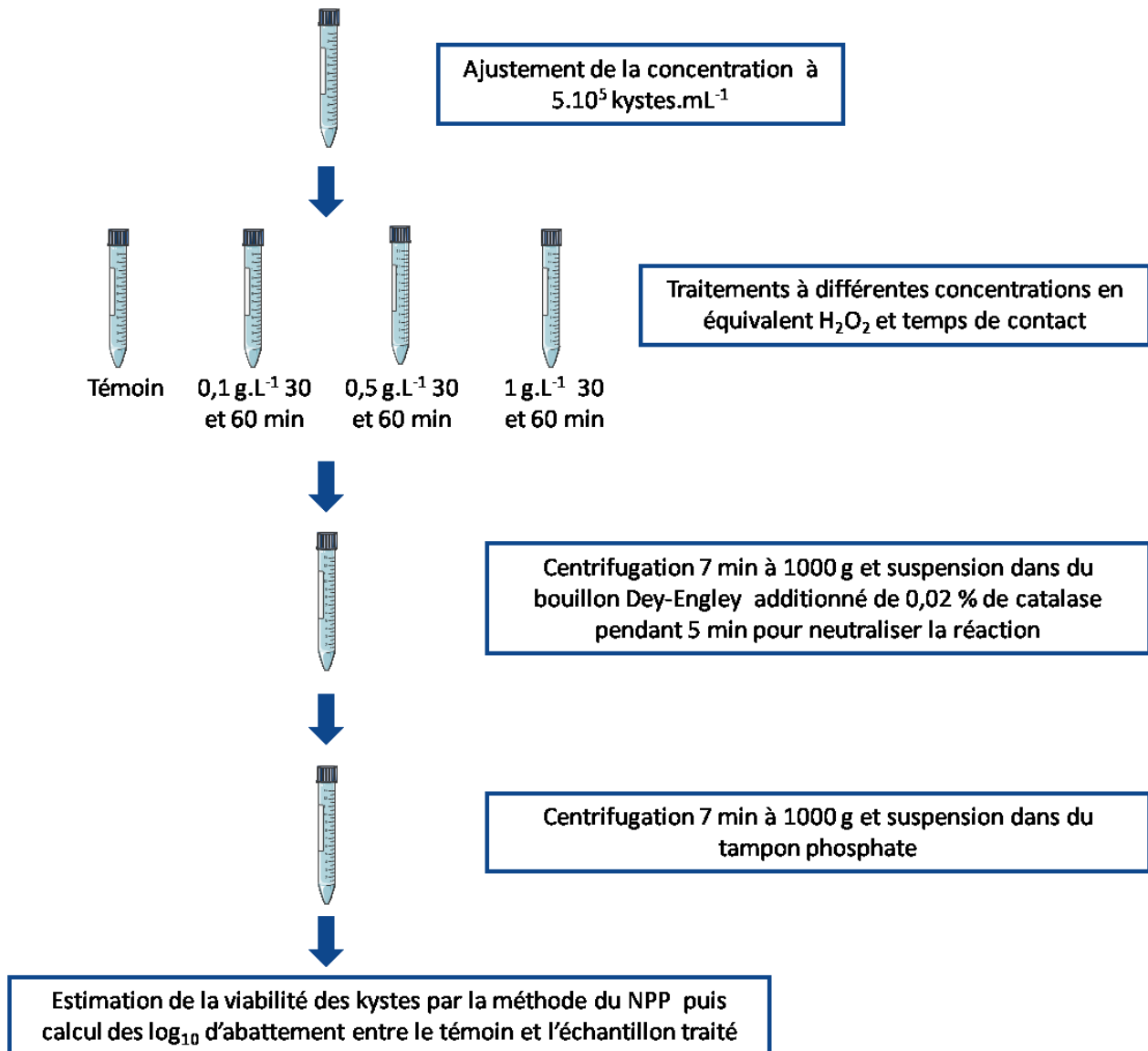


Figure 34 : Protocole de traitement des kystes de *V. vermiformis* à l'acide péraétique couplé au peroxyde d'hydrogène.

#### 1.2.4. Traitements aux protéases

Nous avons également testé un traitement innovant à base de protéases pour inactiver les kystes de *V. vermiformis*. Parmi les protéases, nous avons opté pour la subtilisine car il s'agit d'une protéase non-sélective et qui présente une activité protéolytique importante. Par exemple, la subtilisine a été récemment identifiée pour sa forte activité antifouling sur les biofilms marins (Leroy *et al.*, 2008a et b). Nous avons sélectionné trois concentrations en



subtilisine : 0,625 ; 1,25 et 2,5 U.mL<sup>-1</sup>. Les kystes ont été incubés pendant 24 h en présence de subtilisine à 37 °C pour permettre une activité optimale de l'enzyme.

Le protocole utilisé pour les traitements à la subtilisine est résumé dans la figure suivante (Figure 35) et détaillé dans le paragraphe III.4.4. Traitements aux protéases.

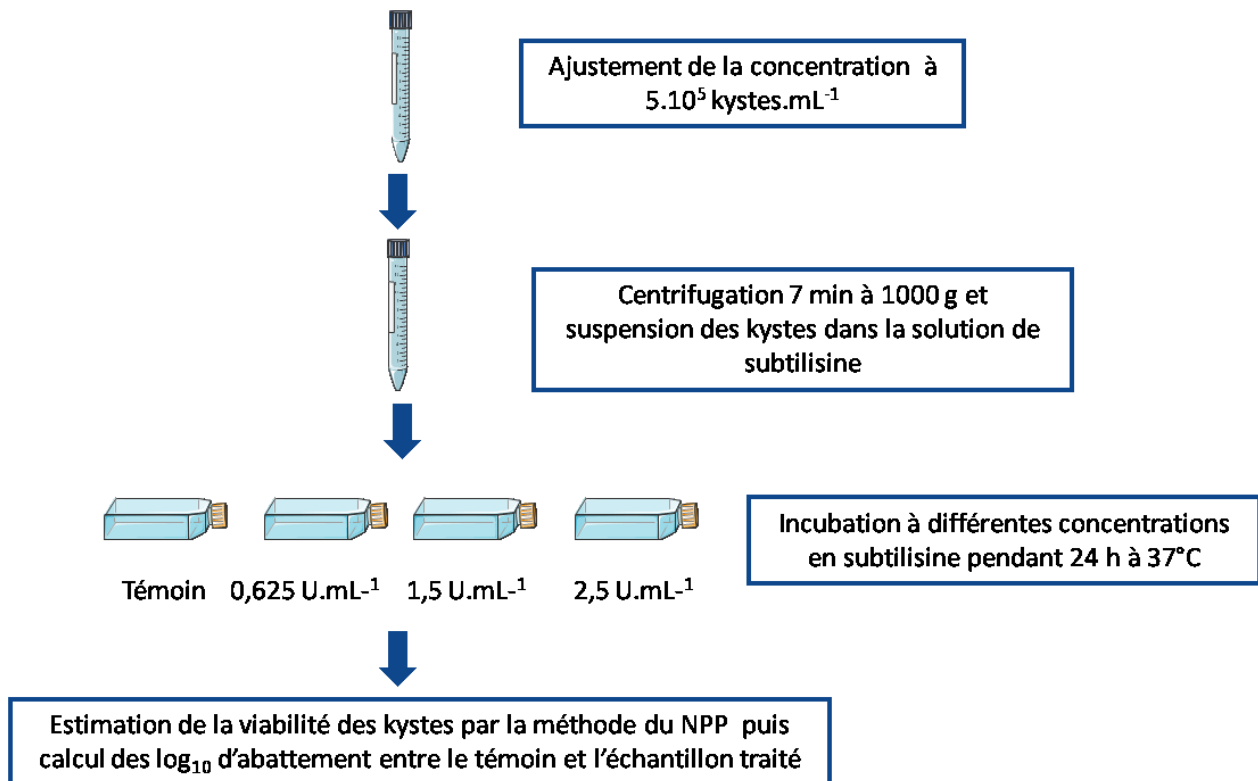


Figure 35 : Protocole de traitement des kystes de *V. vermiformis* à la subtilisine, une protéase.

## 2. Résultats et discussion

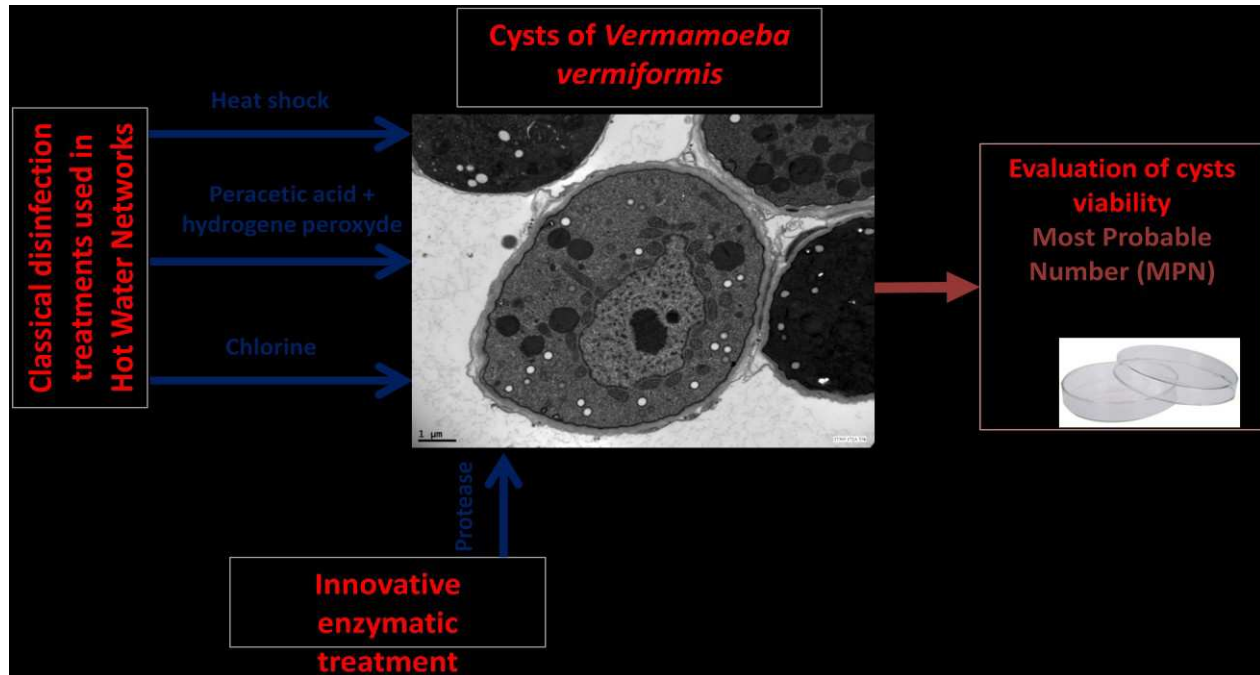
Ce travail de recherche a fait l'objet d'un article scientifique qui a été soumis en octobre 2013 dans le journal « Environmental Science & Technology ». Le manuscrit de l'article, ainsi que des illustrations complémentaires sont présentés ci-après.

### **2.1. Article « *Sensitivity of Vermamoeba vermiformis* cysts to conventional disinfectants and protease »**

Sensitivity of *Vermamoeba (Hartmannella) vermiformis* cysts to conventional disinfectants and protease.

Emilie Fouque, Yann Héchard, Philippe Hartemann, Philippe Humeau, Marie-Cécile Trouilhé

Graphical abstract:



**Abstract:**

*Vermamoeba vermiformis* is a free-living amoeba (FLA) which is widely distributed in the environment. It is known to colonize hot water networks and to be the reservoir of pathogenic bacteria such as *Legionella pneumophila*. FLA are partly resistant to biocides, especially in their cyst form. The control of *V. vermiformis* in hot water networks represents an important health issue, but there is very few data on their resistance to disinfection treatments. We investigated the cysts sensitivity of two strains of *V. vermiformis* to three disinfectants frequently used in hot water networks (chlorine, heat shock and peracetic acid mixed with hydrogen peroxide). We tested, *in vitro*, several concentrations of biocides, temperatures and exposure times according to the French regulation. The cysts were fully inactivated by the following conditions: 15 mg/L of chlorine for 10 min; 60 °C for 30 min and 0.5 g/L equivalent  $H_2O_2$  of peracetic acid mixed with  $H_2O_2$  for 30 min. The next step will be to evaluate these procedures on a pilot or a real hot

water network. For the first time, we showed the strong efficacy of subtilisin (0.625 U/mL for 24 h), a protease, to inactivate the *V. vermiformis* cysts. This finding can let imagine a new approach for disinfection.

**Keywords:** Disinfectant, Free-living amoeba, Hot water network, Protease, Subtilisin, *Vermamoeba (Hartmannella) vermiformis*.

## Introduction

Free-living amoebae (FLA) are protozoa widely distributed in the environment and isolated from water, soil, air, compost and sediments (Rodriguez-Zaragoza 1994). FLA also colonize aquatic environment related to human activities such as water treatment plants (Thomas 2008), water distribution networks (Thomas 2006), cooling towers (Srikanth & Berk 1993), cooling systems of nuclear power plants (Sykora et al. 1983) and hot water networks (Rohr 1998). Even if FLA are not considered to constitute a major threat for human health, those belonging to *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris* and *Naegleria fowleri* can potentially be responsible for severe brain pathologies (Marciano-Cabral & Cabral 2003, Schuster & Visvesvara 2004). The genus *Acanthamoeba* is also responsible for many cases of keratitis (Schuster & Visvesvara, 2004).

FLA have two stages of development: a vegetative form named trophozoite and a dormant form named cyst, this differentiation is called encystment (for review see Fouque 2012). Encystment occurs when environmental conditions become unfavorable such as nutrient starvation or osmotic stress. Encystment induces extensive morphological changes: FLA become spherical and a cyst wall is formed, leading to increase resistance of cysts to treatments and harsh conditions.

FLA are mainly encountered in biofilms and feed by grazing on microorganisms. Importantly, several pathogenic bacterial species like *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Mycobacterium* spp. resist to amoebic phagocytosis (Greub & Raoult 2004). Thus, it is recognized that FLA act as reservoirs of pathogenic bacteria, resulting in protection from hostile conditions and promoting bacterial dissemination in the environment (Horn 2000, Greub & Raoult 2004, Thomas 2010, Santic 2011). For example, the relationship between FLA and *L. pneumophila* is particularly well documented and it was demonstrated that

the majority of legionellosis outbreaks were linked to hot water networks contaminated by *L. pneumophila* associated to FLA (Fields 2002). The management of FLA in hot water networks is therefore a first issue in the control of public health risks.

Despite the awareness of the importance of FLA control in management of health risks, related to devices linked to human activities, few data regarding FLA resistance to various biocides and disinfection procedures are available. Most studies dealing with FLA resistance to treatment focus on the genus *Acanthamoeba* (De Jonckheere & van de Voorde 1976, Coulon 2010, Dupuy 2013). Besides, *Vermamoeba* and *Hartmannella* were poorly studied, although these genera seem to be predominant in hot water networks (Rohr 1998, Buse 2013, Ovrusky 2013), likely because they are not pathogenic by themselves. Only two studies have investigated the resistance of *V. vermiformis* to biocides used in hot water networks and cooling towers. A study conducted on the impact of chlorine and heat, alone and in combination, on both *V. vermiformis* trophozoites and cysts showed that trophozoites were more sensitive than cysts (Kutcha 1993). Two other authors have evaluated the efficacy of three biocides (chlorine, bromine and isothiazolinone) used in cooling towers on trophozoites and cysts of three strains: *Acanthamoeba* sp., *Vahlkampfia* sp. and *V. vermiformis* (Critchley & Bentham 2008). They have shown that cysts were more resistant than trophozoites for the three strains. Also, *Acanthamoeba* strain was more resistant than *V. vermiformis* strain which was more resistant than *Vahlkampfia* strain (Critchley & Bentham 2008). These studies were conducted on one strain of *V. vermiformis* which does not allow assessing the differences within the same species.

The lack of knowledge about the sensitivity of *V. vermiformis* cysts to disinfection treatments led us to investigate the cysts sensitivity of two strains (environmental and reference) to biocides frequently used in hot water networks. We selected three treatments (chlorine, heat shock and peracetic acid mix with hydrogen peroxide) according to the French circular in relation to *Legionella* risk prevention in health facilities (DGS/SD7A/DHOS/EA n°2002/243, 2002-04-22).

Finally, several studies have shown that classical biocides are not sufficient to eliminate FLA in hot water networks, thus it is necessary to develop new treatments (Rohr 1998). In this context, we decided to test the efficacy of an innovative enzymatic treatment. A protease was selected

because the major components of the cyst wall of *H. glebae*, which is closed to *V. vermiformis*, are proteins (Upadhyay 1984). Thus, subtilisin, was chosen because it was recently identified for its antifouling activity on marine biofilms (Leroy 2008).

## Methods

### Amoebal strains

Two strains of *Vermamoeba vermiformis* were used in this study: *V. vermiformis* Page ATCC 50237, a reference strain isolated from a hospital cooling tower in South Dakota (USA), and *V. vermiformis* 172A, an environmental strain isolated from a hospital water network (Lausanne, Switzerland) (Thomas 2006) where it is referenced as *H. vermiformis* strain 2. Indeed, since 2011 the specie *H. vermiformis* has been reclassified in the genus *Vermamoeba* which contains only the species *vermiformis* (Smirnov 2011).

### Cultivation

*V. vermiformis* were grown axenically in 15 mL of modified PYNFH medium (pH = 6.5, 1 % bacto-peptone, 1 % yeast extract, 0.1 % RNA of torula yeast type VI, 33 µmol/L folic acid, 1.5 µmol/L hemin, 3.6 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 26 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 % fetal bovine serum), in a 75 cm<sup>2</sup> tissue culture flask at 28 °C. After 3-5 days of culture, the strains were subcultured into modified PYNFH medium.

### Encystment

Cysts were prepared from trophozoites using Neff's encystment medium (pH 8.8, 0.1 mol/L KCl, 8 mmol/L MgSO<sub>4</sub>, 0.4 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 20 mmol/L Tris (2-amino-2-hydroxymethyl-1.3-propanediol), NaHCO<sub>3</sub> 1 mmol/L). Trophozoites (3 days old) were harvested by centrifugation (500 x g for 7 min), washed twice in encystment medium and suspended in 15 mL of encystment medium at approximately 1 x 10<sup>6</sup> trophozoites/mL. The cell concentration was estimated by enumeration in counting chamber (Fast-Read 102<sup>®</sup>). Then trophozoites were incubated in a 75 cm<sup>2</sup> tissue culture flask at 28 °C during 7 days to obtain mature cysts. Mature cysts were harvested by centrifugation (1000 x g for 7 min), washed twice in phosphate buffer (pH 7, 50 mmol/L) and suspended in the same phosphate buffer at approximately 1 x 10<sup>6</sup> cells/mL and stored at 4 °C up to two weeks.

### Inactivation tests

For all experiments, cysts concentration was adjusted at  $5 \times 10^5$  cysts/mL in phosphate buffer (pH 7, 50 mmol/L) before treatment. The cell concentration was estimated by enumeration in counting chamber (Fast-Read 102<sup>®</sup>). Biocide concentrations (chlorine and peracetic acid mixed with hydrogen peroxide), heat shock temperatures and exposure times were chosen according to the French circular in relation to *Legionella* risk prevention in health facilities (DGS/SD7A/DHOS/EA n°2002/243, 2002-04-22). Table 1 summarizes the disinfection procedures recommended by French circular. For each condition, cysts viability was evaluated by the Most Probable Number (MPN) method and all experiments were performed in triplicate.

Table 1: Disinfection procedures recommended by French regulation (DGS/SD7A/DHOS/EA n°2002/243, 2002-04-22) in hot water networks

| Disinfection                              | Continuous treatment                           | Discontinuous treatment | Curative treatment shock  |
|---|--|-------------------------|---|
| Chlorine (free)                           | 1 mg/L   | 10 mg/L during 8 h      | 100 mg/L during 1 h<br>or 50 mg/L during 12 h<br>or 15 mg/L during 24 h |
| Heat shock                                | 60/50 °C in the network and 50 °C in bathrooms | 70 °C during 30 min     | /   |
| Peracetic acid mix with hydrogen peroxide | /  | /                       | 1 g/L equivalent H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> during 2 h               |

### Chlorine

Tests were performed with a commercial sodium hypochlorite solution containing 13 % active chlorine (Acros Organics). Before each experiment the concentration in free chlorine was assessed by titrimetric method with *N,N*-diethylphenylene-1,4 diamine (NF EN ISO 7393-1) and a chlorine solution at 1 g/L was prepared. The cysts suspension was distributed in sterile 15 mL tubes and chlorine treatments were applied with the previous solution. Different concentrations of free chlorine and exposure times were tested: 2.5, 5, 10 and 15 mg/L during 10 to 60 min at 28 °C. At the end of the treatment, free chlorine residual was neutralized by the addition in excess (5 µL/mL) of a solution of sterile sodium thiosulfate (0.1 mol/L).

**Heat shock**

Heat shocks were performed by incubation of cysts in a dry heat oven at different temperatures and exposure times. The cysts suspension was distributed in sterile 25 cm<sup>2</sup> tissue culture flasks and the flasks were incubated at 50, 55, 60 and 70 °C during 30 and 60 min. The control sample was incubated at 28 °C during 30 and 60 min.

**Peracetic acid mixed with hydrogen peroxide**

Experiments were performed with a commercial solution of peracetic acid (PAA) mixed with hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Ferrocid 8591, BKG Water Solutions). A solution at 100 g/L expressed in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> equivalent was prepared. The cysts suspension was distributed in sterile 15 mL tubes and PAA-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatments were applied with the previous solution. Different concentrations of this biocide and contact times were tested: 0.1, 0.5 and 1 g/L during 30 and 60 min at 28 °C. Seven minutes before the end of contact time, cysts were recovered by centrifugation (1000 x g for 7 min), resuspended for 5 min in Dey-Engley neutralizing broth (D3435, Fluka Analytical) with 0.02 % bovine catalase (C1345, Sigma) to neutralize PAA and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Then cysts were centrifuged (1000 x g for 7 min) and suspended in phosphate buffer (pH 7, 50 mmol/L).

**Protease**

Protease tests were performed using a commercial solution of subtilisin (protease isolated from *Bacillus licheniformis*, Novozymes). The cysts suspension was distributed in sterile 25 cm<sup>2</sup> tissue culture flasks and subtilisin treatments were applied. Flasks were incubated at 37 °C (optimal enzymatic activity) for 24 h with different concentrations in subtilisin: 0.625, 1.25 and 2.5 U/mL. The control sample was also incubated at 37 °C during 24 h.

**Cyst viability**

Cysts viability was evaluated by using the Most Probable Number (MPN) method. For each sample a serial dilution ranging from a factor 10<sup>0</sup> to 10<sup>-7</sup> was performed in phosphate buffer (pH 7, 50 mmol/L). Each dilution was inoculated in triplicate on Non-Nutritive Agar (NNA) (15 g/L) recovered by alive *Escherichia coli* XL1-Blue. During two weeks of incubation at ambient temperature, the Petri plates were observed daily with an inverted microscope (CKX41, Olympus) to observe the presence or absence of trophozoites. According to these results, the

number of viable cysts by mL for each sample was calculated using a MPN calculation program ([http://www.wiwiss.fu-berlin.de/institute/iso/mitarbeiter/wilrich/MPN\\_ver2.xls](http://www.wiwiss.fu-berlin.de/institute/iso/mitarbeiter/wilrich/MPN_ver2.xls)).  $\text{Log}_{10}$  reductions were calculated by comparison to the non-treated control. Limit Of Detection (LOD) of this analysis was set at  $\text{log}_{10}$  reduction= 6.

## Results

### Chlorine treatment

The amoebicidal activity of chlorine on *V. vermiformis* cysts was assessed at different concentration and treatment times (Figure 1). At 2.5 mg/L, chlorine had a low (less than 1 log) amoebicidal activity. At 5 mg/L, the 50237 strain and 172A strain had  $\text{log}_{10}$  reductions between 0.45 and 1 unit and between 0.95 and 1.7 units respectively. Considering a 10 mg/L free chlorine concentration, the strain 50237 presented a  $\text{log}_{10}$  reduction between 2 and 3.4 units while the strain 172A was totally inactivated after a 10 min exposure. For the highest tested free chlorine concentration (15 mg/L), a 10 min exposure was enough to completely inactivate both strains. The results illustrate that the strain 172A might be slightly more sensitive than strain 50237. In addition, for a given concentration, there was hardly any difference between contact times.



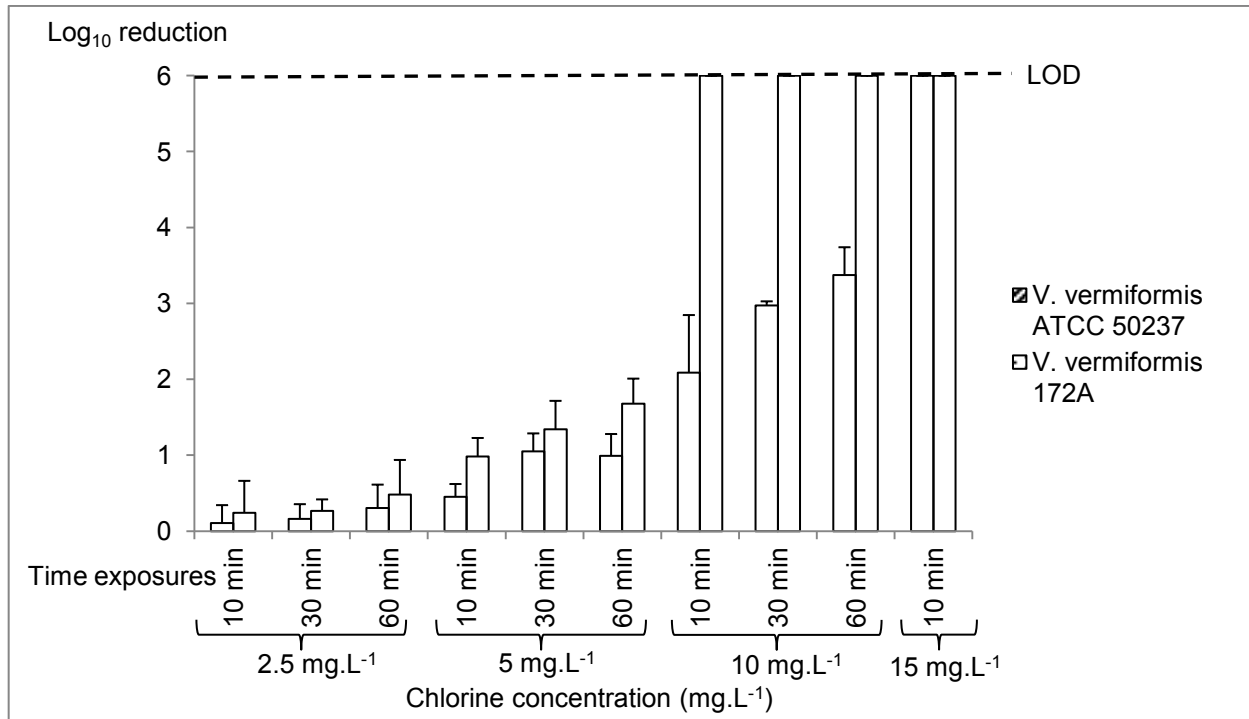


Figure 1: Amoebicidal activity of chlorine at different concentrations and exposure times on *Vermamoeba vermiformis* cysts (LOD: Limit Of Detection)

### Heat shock treatment

The cystidial activity of heat shock on *V. vermiformis* cysts was assessed at various temperature and exposure times (Figure 2). At 50 °C, inactivation was low (up to 1 log). At 55 °C during 30 min, the log<sub>10</sub> reductions were 2.7 units for the strain 50237 and 4.6 for the strain 172A. At the same temperature for a 60 min exposure, log<sub>10</sub> reductions were approximately equal to 5.6 units for the two strains. At 60 and 70 °C cysts of the two strains were completely inactivated from 30 min. The two strains showed a similar sensitivity to heat treatment. For a given temperature, the extension of exposure led to a better inactivation.

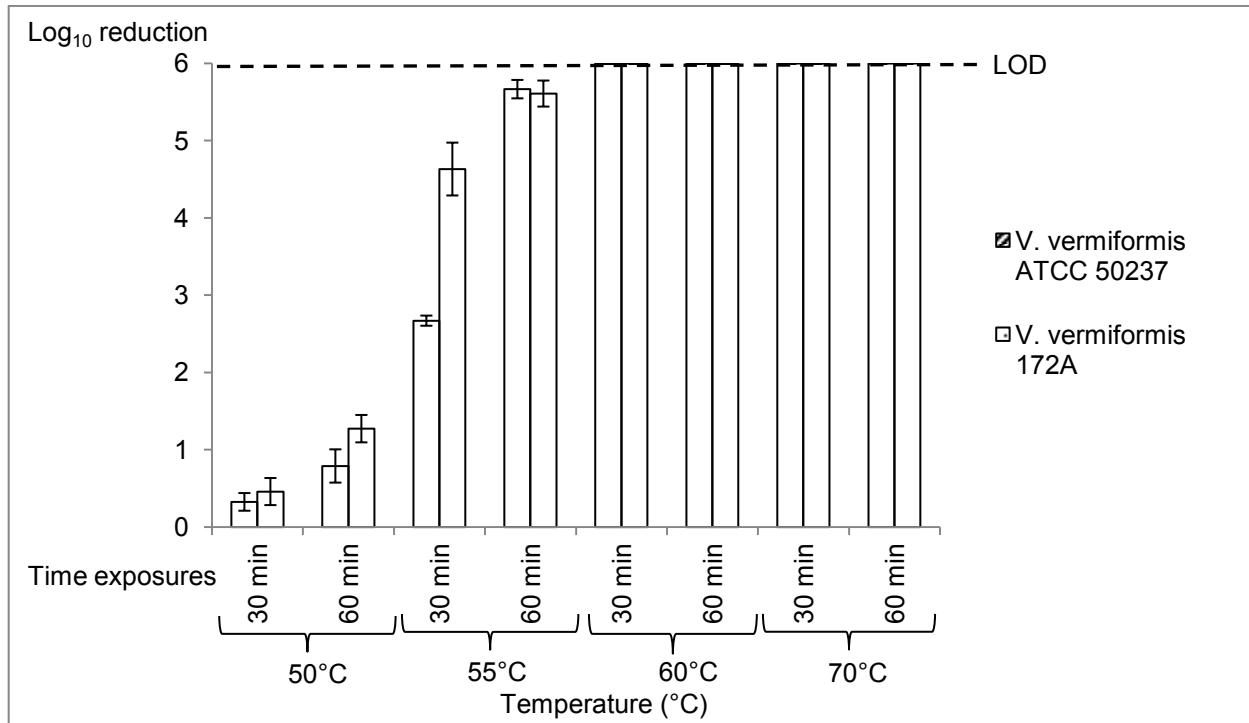


Figure 2: Amoebicidal activity of temperature at different temperatures and exposure times on *Vermamoeba vermiformis* cysts (LOD: Limit Of Detection)

**Peracetic acid mixed with hydrogen peroxide treatment**

The amoebicidal activity of PAA mixed with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on *V. vermiformis* cysts was assessed at different concentration and treatment times (Figure 3). For the strain 50237, at 0.1 g/L equivalent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, log<sub>10</sub> reductions were 0.68 and 1.25 units for 30 and 60 min exposures respectively. For the strain 172A, at 0.1 g/L, log<sub>10</sub> reductions were 1.28 and 2.37 units for 30 and 60 min respectively. Cysts of two strains were completely inactivated when 0.5 and 1 g/L equivalent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were applied for both 30 and 60 min.

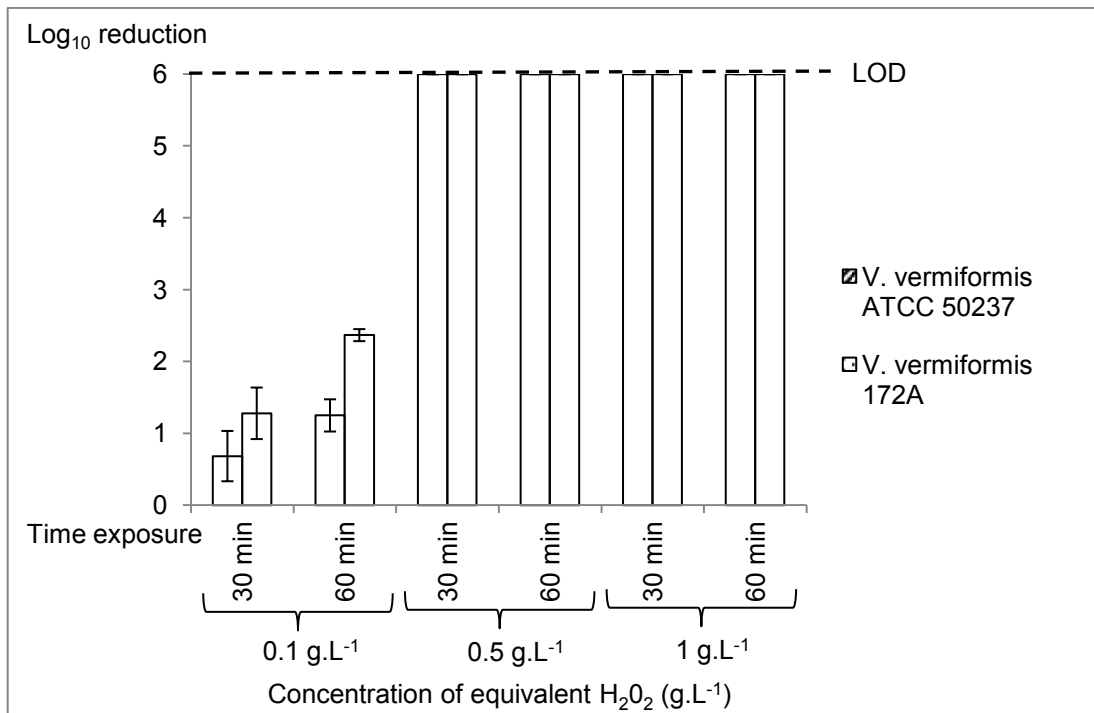


Figure 3: Amoebicidal activity of peracetic acid mixed with hydrogen peroxide at different concentrations and exposure times on *Vermamoeba vermiformis* cysts (LOD: Limit Of Detection)

### Protease treatment

We evaluated the cystidal activity of subtilisin (protease isolated from *Bacillus licheniformis*) at various concentrations on *V. vermiformis* cysts (Figure 4). Subtilisin had a strong cystidal activity as a complete inactivation was obtained from 1.25 U/mL. For the strain 172A, at 0.625 U/mL, log<sub>10</sub> reduction was approximately 5 units. Cysts of the 50237 strain were completely inactivated by the three tested concentrations.

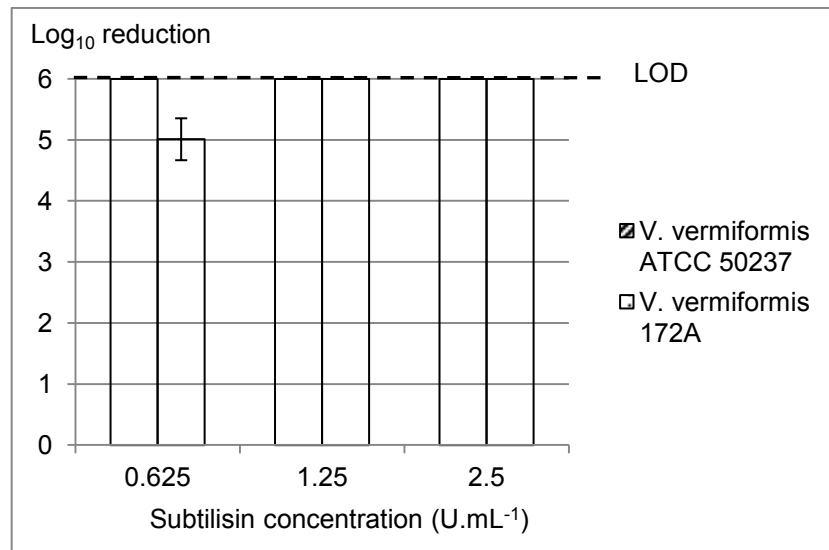


Figure 4: Amoebicidal activity of subtilisin (protease) at different concentrations on *Vermamoeba vermiformis* cysts (LOD: Limit Of Detection)

## Discussion

*Vermamoeba vermiformis* is a FLA frequently found in hot water networks (Rohr 1998; Buse 2013; Ovruskty 2013) and very often associated to *Legionella pneumophila* and other pathogenic bacteria (Fields 1990; Thomas 2006). There are very few data in the literature on the *V. vermiformis* cysts resistance to disinfection treatments used in hot water networks. Therefore, the present study investigated the cysts sensitivity of *V. vermiformis* to chlorine, heat, PAA mixed with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, which are disinfection procedures frequently used in hot water networks. Biocide concentrations (chlorine and PAA mixed with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and heat shock temperatures were chosen according to the French circular (DGS/SD7A/DHOS/EA n°2002/243, 2002-04-22) in relation to *Legionella* risk prevention in health facilities. Also, sensitivity of *V. vermiformis* cysts to an innovative treatment, protease, was evaluated.

In hot water networks, chlorine curative shock treatments may vary from 15 mg/L to 100 mg/L for an 1 h to 24 h exposures (Table 1). We first tested the sensitivity of *V. vermiformis* cyst to a 10 min exposure at 15 mg/L free chlorine and we observed that cysts were totally inactivated by this treatment. *In vitro*, free chlorine concentrations recommend by the French regulation (Table 1) for curative shock treatment in hot water systems seem very efficient to inactivate *V. vermiformis* cysts. Then we decreased free chlorine concentrations in order to define the

sensitive range of *V. vermiformis* cysts and to be able to compare our results to those already published. At 10 mg/L for 10, 30 and 60 min exposures, the sensitivity of *V. vermiformis* cysts varied depending on the strain. Indeed,  $\log_{10}$  reductions for the strain 50237 were between 2 and 3.4 units whereas 172A strain cysts were completely inactivated. These results are consistent with a previous study in which the authors tested the sensitivity of cysts of one strain of *V. vermiformis* to a 30 min exposure at 10 mg/L free chlorine and who found out that only 0.01 % of cysts had resisted to this treatment (Kutcha 1993). At 5 mg/L, chlorine seems to have a limited action on *V. vermiformis* cysts (Kutcha 1993). Nevertheless, another work (Critchley & Bentham 2008) found that 5 mg/L free chlorine were efficient when *V. vermiformis* cysts were exposed during 8 h at 25 °C. Finally, 2.5 mg/L were inefficient for the inactivation of *V. vermiformis* cysts, in agreement with Kutcha (1993) who tested the sensitivity of *V. vermiformis* cysts to a 30 min exposure at 2 mg/L free chlorine and who noticed that 49 % of cysts resisted to this treatment. For a given concentration, the duration of exposure had a limited effect suggesting that chlorine is rapidly consumed by cysts.

Water temperature in hot water networks is well regulated in France. At any point of a hot water network temperature must be above 50 °C (Table 1). Heat shocks can be used as a discontinuous treatment at 70 °C for at least 30 min (Table 1). Thus, we chose to study the sensitivity of *V. vermiformis* cysts between 50 and 70 °C. At 60 and 70 °C, cysts of both strains were completely inactivated. It shows that, in these conditions, heat shock procedure was efficient to inactivate *V. vermiformis* cysts. These results were in accordance with an older study (Kutcha 1993) which showed that cysts of a *V. vermiformis* strain were totally inactivated by a 30 min exposure at 60 °C. Also at 50 and 55 °C our results were similar to this referenced work (Kutcha 1993) which found that, for the same treatment, 0.05 % and 16 % of *V. vermiformis* cysts survived at 55 °C and 50 °C respectively. Thus, *in vitro*, a temperature of 50 °C seems to be poorly effective on viability of *V. vermiformis* cysts.

PAA mixed with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> can be used only as a curative shock treatment in hot water networks according the following procedure: 2 h exposures at 1 g/L equivalent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Table 1). So we decided to test the sensitivity of *V. vermiformis* cysts to an exposure at 1 g/L equivalent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> during 30 and 60 min. Cysts of the two strains tested were completely inactivated by this

treatment and same results were observed when *V. vermiformis* cysts were exposed to 0.5 g/L equivalent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *In vitro*, concentrations in PAA mixed with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> recommend by French regulation (Table 1) for curative treatments seem very efficient to eliminate *V. vermiformis* cysts. Our results are original since there is no publication referring to inactivation *V. vermiformis* cysts, nor other FLA cysts, with PAA mixed with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

*In vitro*, all these procedures were very efficient to inactivate *V. vermiformis* cysts. Nevertheless, our study was limited to *in vitro* tests using axenical *V. vermiformis* cultures. In real hot water networks, there is a large microbial diversity and chemical biocides are consumed by all these microorganisms. The materials, in which the network is made, can consume a part of the chemical disinfectants too. Also, in hot water network the majority of FLA are not suspended in the aqueous phase but associated with biofilm. Many publications underline that biofilm protects microorganisms from disinfection treatments (Srikanth & Berk, 1993). So to evaluate the real efficacy of these disinfection treatments in hot water networks, it will be necessary to test them on real network or on pilot network, as performed in applied researches (Farhat 2010, 2011).

The compilation of our results and literature clearly suggests that cysts of *V. vermiformis* are more sensitive to chlorine and heat than cysts of *Acanthamoeba* spp. and *Balamuthia mandrillaris*. For example, *A. culbertsoni* cysts resisted 3 h to a concentration of 40 mg/L free chlorine (De Jonckheere & van der Voorde 1976) and those of *A. polyphaga* resisted 18 h at 50 mg/L (Kilvington & Price 1990). Cysts of *B. mandrillaris* were shown surviving to a concentration of 25 mg/L free chlorine for 1 h (Siddiqui 2008). Also, cysts of thermotolerant strains of *Acanthamoeba* had resisted to moist heat at 80 °C for a 10 min exposure (Storey 2004). In addition, cysts of *B. mandrillaris* were recognized to resist to a 60 min exposure at 60 and 70 °C (Siddiqui 2008). Besides, there is no clear cut difference with the sensitivity of *Naegleria* cysts (De Jonckheere & van de Voorde 1976; Chang 1978).

Several studies have shown that classical biocides are not sufficient to eliminate FLA in hot water networks, thus it is necessary to develop new treatments (Rohr 1998). So we decided to test the efficacy of an innovative treatment with protease because the cyst wall of *H. glebae*, a FLA closed to *V. vermiformis*, mainly contains proteins (Upadhyay 1984). We selected the

subtilisin because it was recently identified for its antifouling activity on marine biofilms (Leroy 2008). First, we tested a concentration of 2.5 U/mL, the cysts of the two strains of *V. vermiformis* were totally inactivated. Then, we decreased the concentration to 1.25 and 0.625 U/mL, and even the lowest tested concentration inactivated the cysts very efficiently. However, we are aware that the subtilisin probably cannot be used as such in hot water networks. Indeed, its cost is important and its impact on the environment must be addressed. But this type of approach can permit to identify new targets and ways to develop the next generation of disinfection treatments.

### **Conclusions**

In conclusion, we tested the efficacy of disinfection treatments frequently used in hot water networks on the cysts of two strains of *V. vermiformis*. The concentrations in biocides (chlorine and PAA mix with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), the heat shocks and exposure times recommended by the French regulation (DGS/SD7A/DHOS/EA n°2002/243, 2002-04-22), were efficient *in vitro* for the inactivation of *V. vermiformis* cysts. The next step will be to evaluate the efficacy of these treatments on a pilot or a real hot water network.

Also we showed, for the first time, the efficacy of subtilisin for inactivate the *V. vermiformis* cysts. This finding can lead to the identification of new targets and ways to develop the future generation of disinfectants.

## 2.2. Illustrations complémentaires

Nous avons également réalisé des observations en microscopie optique à contraste de phase des kystes de *V. vermiformis* après traitement à la subtilisine. Nous avons pu observer une altération importante des kystes et ce dès la concentration la plus faible en subtilisine testée :  $0,625 \text{ U.mL}^{-1}$  (Figure 36). Il semblerait qu'après traitement une partie de la paroi des kystes subsisterait. En effet, les kystes ne semblaient pas lysés par contre le contenu cellulaire apparaissait très endommagé et localisé au centre du kyste.

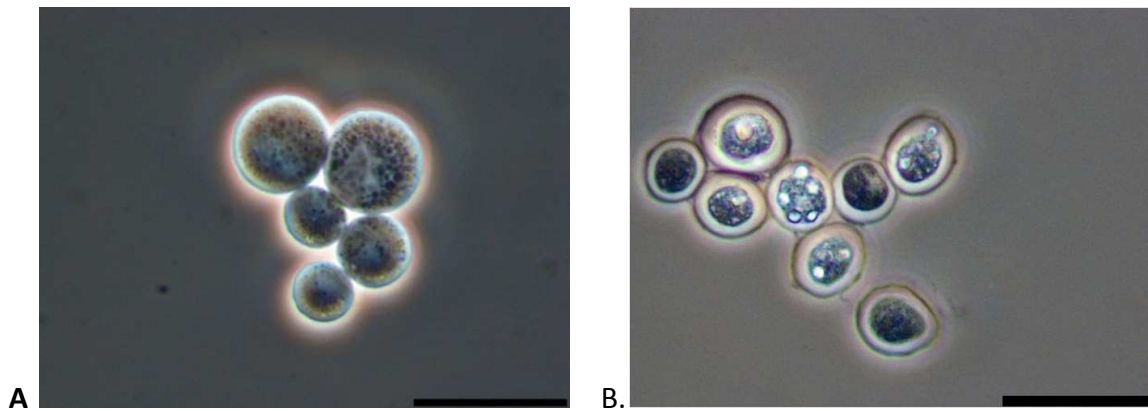


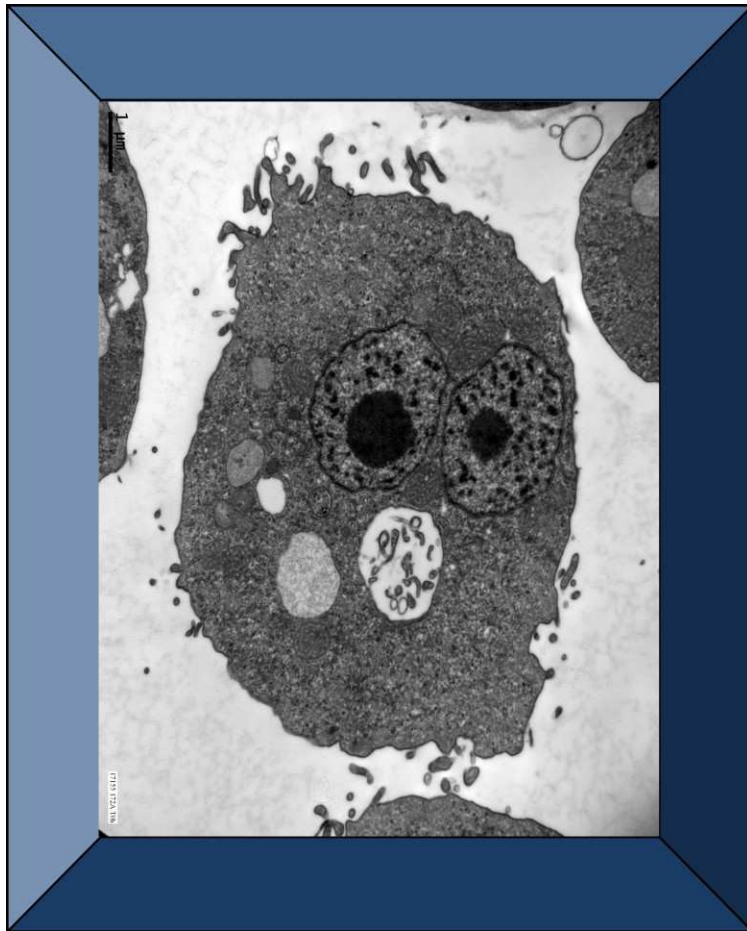
Figure 36 : Aspect des kystes de *Vermamoeba vermiformis* en microscopie optique à contraste de phase avant (A) et après traitement (B) à  $0,625 \text{ U.mL}^{-1}$  de subtilisine (protéase).

Barre d'échelle :  $20 \mu\text{m}$





## CHAPITRE VII : Discussion générale



**CHAPITRE VII : Discussion générale**

*V. vermiformis* est une amibe libre largement répandue dans l'environnement. Elle colonise également les milieux aquatiques artificiels comme les réseaux d'eau chaude sanitaire (RECS) et les tours aérorefrigérantes (TAR). Cette amibe libre n'est pas directement pathogène pour l'Homme, même si certains auteurs la considèrent comme un pathogène opportuniste associé dans des cas de méningo-encéphalites (Centeno *et al.*, 1996) et de kératites (Aitken *et al.*, 1996 ; Inouet *et al.*, 1998 ; Lorenzo-Morales *et al.*, 2007). Cependant, il est maintenant bien établi qu'elle joue un rôle de réservoir pour de nombreuses bactéries pathogènes, comme *Legionella pneumophila*. Le contrôle de *V. vermiformis* dans les environnements artificiels représente donc un enjeu sanitaire important. Les amibes libres ont la capacité de passer d'une forme métaboliquement active (trophozoïte) à une forme de résistance, le kyste, lorsque les conditions sont défavorables ce qui leur confère une résistance aux traitements de désinfections. Malgré la haute prévalence de *V. vermiformis* dans les environnements artificiels, le processus d'enkystement n'a été que très peu étudié chez cette espèce d'amibe libre. En effet, la majorité des études, portant sur l'enkystement des amibes libres, a été menée chez les genres *Acanthamoeba* et *Naegleria* en raison de leur pouvoir pathogène à l'encontre de l'Homme.

Concernant l'espèce *V. vermiformis*, seules quelques études ont décrit la morphologie et la structure des trophozoïtes et des kystes. Cette espèce a été décrite pour la première fois par Page en 1967 qui la décrira de nouveau en 1974 et 1986. Plus récemment, Smirnov et Michel (1999) ont décrit la structure des kystes de *V. vermiformis* par MET. En 2005, Dykova *et al.* ont décrit la structure des trophozoïtes, des kystes immatures et des kystes matures de deux souches de *V. vermiformis* isolées de poissons. Mais, au début de la thèse, il n'existait aucun travail de recherche portant sur les changements morphologiques et ultrastructuraux qui s'opèrent lors de l'enkystement de *V. vermiformis*. Nous avons donc décidé d'étudier grâce à des techniques de microscopie optique et de microscopie électronique l'enkystement de *V. vermiformis*. La première partie de ce travail a consisté à mettre au point un protocole d'enkystement de *V. vermiformis* qui permettait de produire rapidement et de façon synchrone

des kystes. Pour cela, nous nous sommes basés sur les nombreux travaux qui ont été menés sur l'enkystement d'*Acanthamoeba* (Aqeel *et al.*, 2013 ; Byers, 1979 ; Cordingley *et al.*, 1996 ; Khunkitti *et al.*, 1998 ; Neff *et al.*, 1964). De ce fait, nous avons choisi un milieu d'enkystement liquide appelé « milieu d'enkystement Neff ». Cette étude structurale et morphologique a été réalisée sur deux souches modèles : la souche de référence *V. vermiformis* ATCC 50237 et la souche environnementale *V. vermiformis* 172A.

La première approche, dans l'étude de l'enkystement de *V. vermiformis*, a été de suivre ce processus par une acquisition en transmission au cours du temps. Les vidéos ont permis de visualiser que, dans le milieu d'enkystement Neff, l'enkystement de *V. vermiformis* était rapide et synchrone, la majorité des cellules était enkystée après 9 h d'incubation. Durant l'enkystement, la plupart des cellules s'immobilisait puis devenait sphériques avec une diminution du volume cellulaire. Les kystes étaient souvent retrouvés sous forme d'agrégats. Les vidéos ont également permis de distinguer qu'un petit groupe de cellules restait sous une forme mobile et qu'elles se déplaçaient activement de paquets de kystes en paquets de kystes. Les vidéos suggèrent qu'elles seraient impliquées dans la formation des agrégats de kystes. De ces observations, deux idées fortes se dégagent : (i) la première est la possibilité de l'existence de mécanismes de communication inter-amibienne par contact cellulaire et (ii) la deuxième est l'éventualité d'un comportement social chez *V. vermiformis*. Après avoir suivi l'enkystement au cours du temps par microscopie optique, nous avons étudié les changements ultrastructuraux qui s'opèrent lors de l'enkystement de *V. vermiformis* par MET. Les résultats ont été similaires pour les deux souches testées. Nous avons observé, après 3 h d'incubation dans le milieu d'enkystement Neff, une sphérification des cellules, une baisse du volume cellulaire et une apparition d'autophagosomes peu denses. Après 6 h d'incubation dans le milieu d'enkystement Neff, les cellules étaient sphériques ou ovoïdes, et les mitochondries se rapprochaient du noyau. La paroi du kyste était en cours de synthèse et elle était composée d'un matériel fibrillaire déversé dans l'espace péricellulaire par des vésicules de 100 à 200 nm de diamètre. L'épaisseur de la paroi variait en fonction de l'état de maturation du kyste. Il y avait également des phénomènes d'autophagie dans les cellules, ce qui semble logique car la cellule a besoin de fournir de l'énergie et des molécules pour s'enkyster. Ceci peut également expliquer la baisse du

volume cellulaire. Des dépôts peu denses de glycogène étaient également observables dans le cytoplasme, il pourrait s'agir de la formation de réserves énergétiques. Après 9 h d'incubation dans le milieu d'enkystement Neff, la grande majorité des cellules était sous forme de kystes matures. Les kystes matures observés après 24 h et 7 j d'incubation dans le milieu d'enkystement Neff étaient identiques à ceux obtenus au bout de 9 h. Ceci nous a permis de conclure que, dans nos conditions expérimentales, l'enkystement de *V. vermiformis* était total après 9 h d'incubation. Dans les kystes matures, les mitochondries entouraient le noyau et il y avait la présence de deux structures non observées dans les trophozoïtes. Il s'agissait (i) d'autophagosomes denses et homogènes et (ii) de vésicules recouvertes de ribosome-like. La paroi, d'environ 250-400 nm d'épaisseur, était composée d'une double couche, où l'ectokyste et l'endokyste étaient accolés ou partiellement séparés. Les kystes de *V. vermiformis* ne possédaient pas d'ostiole, comme c'est le cas chez *Acanthamoeba* et *Naegleria*. Des dépôts denses de glycogène étaient observés dans les kystes. Il est possible de penser que ce glycogène sert de réserve énergétique lors du maintien des conditions défavorables. Ces réserves de glycogène pourraient également intervenir lors du processus de déenkystement.

A ce stade, l'étude de l'enkystement n'avait été menée que dans une seule condition : le milieu d'enkystement Neff à 25 °C. Mais, il est évident que les conditions environnementales peuvent avoir un effet sur ce processus. Par exemple, chez *Acanthamoeba*, il semblerait que les pH basiques, une température de 30-32 °C et une pression osmotique de 0,2 osmolar favorisent l'enkystement (Neff *et al.*, 1964). Il nous semblait donc important d'étudier l'effet des conditions environnementales (température, pH et pression osmotique) sur l'enkystement des deux souches de *V. vermiformis* sélectionnées. Pour cela, les cellules ont été mises à enkyster dans différentes conditions dans le milieu d'enkystement Neff modifié ou non (différents pH, différentes concentrations en KCl). Afin d'estimer l'effet des conditions environnementales sur l'enkystement, nous avons décidé de mesurer le taux d'enkystement après différents temps dans les différentes conditions. Il a donc été nécessaire de mettre en place une technique permettant de mesurer ce paramètre chez *V. vermiformis*. Après une série d'essais et contrairement à ce qui est observé chez *Acanthamoeba* (Connell *et al.*, 2001 ; Imayasu *et al.*, 2013), l'utilisation de la cytométrie en flux s'est avérée inadaptée à la mesure du taux

d'enkystement de *V. vermiformis*. Nous avons donc utilisé le dénombrement direct sur cellule de numération pour mesurer le taux d'enkystement chez *V. vermiformis*. Par la suite, nous avons réalisé des cinétiques d'enkystement des deux souches de *V. vermiformis* dans le milieu d'enkystement Neff, où le taux d'enkystement a été mesuré toutes les 3 h jusqu'à obtention d'un enkystement maximal. Les résultats ont montré que les cinétiques d'enkystement étaient similaires pour les deux souches. Après 3 h dans le milieu d'enkystement, le taux d'enkystement était nul ce qui est cohérent avec les résultats obtenus en MET. En effet, nous avons pu voir qu'après 3 h d'incubation dans le milieu d'enkystement Neff la synthèse de la paroi kystique n'était pas démarrée, les cellules étaient donc sensibles au traitement à 0,5 % de SDS qui a pour effet d'éliminer les trophozoïtes et les kystes immatures. Après 6 h d'incubation, le taux d'enkystement était compris entre 37 et 56 %. Ceci est également en adéquation avec les résultats obtenus en MET. A ce temps, la synthèse de la paroi kystique était en cours et son épaisseur variait en fonction de l'état de maturation du kyste. Il semblerait que les kystes, chez qui la synthèse de la paroi était la plus avancée, étaient résistants au traitement à 0,5 % de SDS. Après 9 h d'incubation, le taux d'enkystement était maximal ce qui est également cohérent avec les observations faites en MET qui montraient que les kystes étaient matures et donc résistant à 0,5 % de SDS. Par cette technique, nous avons pu vérifier que l'enkystement de *V. vermiformis* dans le milieu d'enkystement Neff est plus rapide (environ 9 h) que celui d'*Acanthamoeba* qui dure entre 16 et 24 h dans les mêmes conditions (Hugues *et al.*, 2003 ; Neff *et al.*, 1964). Dans les deux cas, le processus s'avère être synchrone dans ce milieu d'enkystement. Ainsi, pour la suite de nos expérimentations, nous avons choisi de mesurer le taux d'enkystement après 6 et 9 h d'incubation dans les différentes conditions de température, pH et concentration en KCl. Les résultats ont montré que les deux souches avaient un comportement similaire vis-à-vis de la température, un enkystement optimal était obtenu à 25 et 37 °C. En ce qui concerne le pH et la pression osmotique, les effets sur l'enkystement étaient différents en fonction de la souche testée. Pour la souche de référence (ATCC 50237), les profils d'enkystement étaient similaires pour les pH compris entre 5 et 9 et pour les concentrations en KCl comprises entre 0,05 et 0,2 mol.L<sup>-1</sup>. Pour la souche environnementale (172A), un enkystement optimal était obtenu pour les pH basiques (8 et 9) et une concentration en KCl de 0,1 mol.L<sup>-1</sup>. Les observations au

microscope à contraste de phase ont montré que la souche environnementale 172A était plus sensible à la pression osmotique que la souche de référence 50237.

Les vidéos réalisées lors de l'enkystement de *V. vermiformis* ont également suggéré l'existence de mécanismes de communication inter-amibienne par contact cellulaire. Nous avons donc voulu tester l'effet de la concentration cellulaire sur l'enkystement. Les résultats ont clairement montré que plus la concentration cellulaire était élevée plus l'enkystement était rapide. Ce résultat laisse également suggérer l'existence d'une communication inter-amibienne. En plus de la communication par contact cellulaire, il existe d'autres types de communications intercellulaires par substances diffusibles. Par exemple, chez les bactéries, il existe une réponse coordonnée dans les populations dans le cas d'une haute concentration cellulaire qui est nommée détection du quorum mais plus généralement appelée sous le terme anglais « quorum-sensing » (Miller et Bassler, 2001). Le quorum-sensing est basé sur la production d'une substance dite auto-inductrice. Lorsque la concentration cellulaire est faible, il y a peu de substance auto-inductrice dans le milieu. Lorsque la concentration cellulaire est élevée, la concentration en substance auto-inductrice va augmenter dans le milieu jusqu'à atteindre une concentration seuil à laquelle les cellules perçoivent le signal et déclenchent une réponse cellulaire. Chez le genre *Acanthamoeba*, Akins et Byers (1980) ont reporté un facteur, nommé encystment-enhancing activity (EEA), qui était sécrété dans les cultures de haute densité. Ce facteur était capable de stimuler l'enkystement d'*Acanthamoeba*. Les auteurs ont spéculé sur le fait que le facteur EEA pourrait agir de façon similaire aux substances auto-inductrices dans les phénomènes de quorum-sensing. En 2001, Eichinger a suggéré que les catécholamines pouvaient être des molécules du quorum-sensing impliquées dans les communications procaryotes et eucaryotes. Chez *Acanthamoeba*, il a été montré que les catécholamines (adrénaline et noradrénaline) induisent l'enkystement probablement par fixation sur des récepteurs adrénérgiques-like qui activent la synthèse de l'AMPc (Murti, 1975 ; Srivastava et Shukla, 1983). Mais, il est nécessaire de clarifier si les catécholamines sont un signal pour tous les genres d'amibes libres et si elles peuvent être synthétisées par ces microorganismes, comme c'est le cas chez *Entamoeba invadens* (Coppi et al., 2002). Il serait intéressant d'essayer d'isoler

et identifier les molécules présentes dans le surnageant de cultures de haute densité cellulaire lors de la culture et lors de l'enkystement de *V. vermiformis*.

Forts de ces résultats, nous avons tenté d'identifier certains mécanismes moléculaires impliqués dans l'enkystement de *V. vermiformis*. Pour cela, nous avons utilisé différents inhibiteurs : (i) la cytochalasine D (inhibiteur de la polymérisation des filaments d'actine), (ii) un inhibiteur des protéines ERK et (iii) un inhibiteur des protéines PI3K. Ces trois inhibiteurs avaient été décrits pour limiter l'enkystement d'*Acanthamoeba* ou de *Balamuthia mandrillaris* (Dudley *et al.*, 2009 ; Siddiqui *et al.*, 2010). Nous avons également testé un inhibiteur de la glycogène phosphorylase car il a été montré, chez *Acanthamoeba*, que l'inhibition de l'expression de la glycogène phosphorylase par des petits ARN interférants (siRNA) induisait un enkystement défaillant (Lorenzo-Morales *et al.*, 2008). Ces quatre inhibiteurs sont uniquement solubles dans des solvants organiques comme le DMSO. Nous avons donc introduit à nos expérimentations un témoin contenant uniquement le milieu d'enkystement et un autre contenant le milieu d'enkystement additionné de la même concentration en DMSO que celle introduite dans les échantillons traités avec les inhibiteurs. Un profil d'enkystement similaire a été obtenu entre les échantillons traités avec les inhibiteurs et les témoins contenant le DMSO. Par contre les profils d'enkystement étaient différents entre les deux témoins, l'enkystement était plus rapide en présence de DMSO. Il semblerait donc que le DMSO soit un fort signal d'enkystement, il induirait un enkystement plus rapide qu'une seule déplétion nutritive. Chez *Acanthamoeba*, des études récentes ont montré que les solvants organiques (DMSO, acétone et méthanol) et le propylène glycol, en faible concentration, induisaient une réponse cellulaire immédiate qui conduit à la formation rapide de pseudokystes (Kliescikova *et al.*, 2011a et b). Il semblerait que la formation des pseudokystes et des kystes soient deux réactions de défense distinctes qui sont activées par des conditions environnementales différentes (Kliescikova *et al.*, 2011a et b). La formation des pseudokystes permettrait de protéger les *Acanthamoeba* des changements brusques de l'environnement car c'est un processus plus rapide que l'enkystement. Nos tests sur les inhibiteurs de l'enkystement de *V. vermiformis* n'ont pu aboutir sur des résultats concrets. Cependant, nous avons montré que l'utilisation du DMSO dans de tels travaux pouvait engendrer des biais expérimentaux. L'utilisation d'autres solvants organiques reste à explorer.



L'ensemble des résultats obtenus sur l'étude de l'enkystement de *V. vermiformis* et ceux présents dans la littérature suggèrent que l'induction et la régulation de l'enkystement des amibes libres est complexe et que différents facteurs peuvent agir en synergie pour stimuler l'enkystement. Il semblerait même qu'il existe plusieurs mécanismes et formes de résistance (kystes, pseudokystes) en fonction du type de stress présent dans le milieu. Il est également probable qu'il existe des phénomènes de communication inter-amibienne, par contact cellulaire et/ou substance diffusible, impliqués dans l'enkystement des amibes libres. De plus, il est aussi concevable qu'il existe une structure sociale dans les populations de *V. vermiformis* durant l'enkystement. En effet, les amibes qui restaient sous forme mobile semblaient impliquées dans la formation des agrégats de kystes ce qui peut donner des avantages dans la survie de la population et de l'espèce. La formation des agrégats peut être vue comme une stratégie de survie qui offrirait une plus grande résistance aux kystes positionnés au cœur de l'agrégat. Cela pourrait permettre de mieux protéger ces kystes des contraintes mécaniques, chimiques et environnementales. Cela pourrait également fournir un avantage lors de la dissémination dans l'environnement et permettre une colonisation plus rapide des nouveaux écosystèmes. Il est évident que les amibes libres ont développé des mécanismes et des stratégies de survie efficaces pour résister à une grande palette de stress rencontrés dans les environnements naturels et artificiels.

Par la suite, nous avons estimé la résistance des kystes de *V. vermiformis* aux traitements de désinfection car très peu de données sont disponibles dans la littérature. En effet, la majorité des études portant sur la résistance des kystes d'amibes libres aux traitements de désinfection a été menée chez le genre *Acanthamoeba* en raison de son pouvoir pathogène pour l'Homme. Nous avons choisi d'évaluer la résistance des kystes de *V. vermiformis* à trois traitements fréquemment utilisés dans les RECS car ils représentent l'une des sources souvent incriminée lors des épidémies de légionellose. Dans ces cas, les RECS incriminés présentaient des associations *L. pneumophila* et amibes libres dont *V. vermiformis* (Fields *et al.*, 2002). Nous avons donc évalué la résistance des deux souches de *V. vermiformis* sélectionnées aux traitements chlorés, aux chocs thermiques et aux traitements à base d'acide péracétique couplé au peroxyde d'hydrogène en testant, en autres, les valeurs conseillées par la circulaire sur la

prévention du risque légionelles dans les RECS (DGS/SD7A/DHOS/EA n°2002/243). Nos résultats ont montré que les kystes de *V. vermiformis* étaient complètement inactivés par les conditions suivantes : 15 mg.L<sup>-1</sup> de chlore pendant 10 min ; 60 °C pendant 30 min et 0,5 g.L<sup>-1</sup> équivalent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> d'acide péracétique couplé au peroxyde d'hydrogène. La souche environnementale 172A était plus sensible au chlore que la souche de référence 50237. Or, nous avons déjà observé que la souche 172A était plus sensible à la pression osmotique que la souche de référence ; il semble donc exister des différences de sensibilité entre les souches de *V. vermiformis*. Les résultats obtenus ont montré que, *in vitro*, les valeurs conseillées pour la désinfection des RECS sont efficaces pour éliminer les kystes de *V. vermiformis*. Mais dans les RECS, il existe une large diversité microbienne qui consomme les composés chimiques. Les matériaux composant les RECS peuvent aussi entrer en jeu dans la quantité de désinfectant réellement disponible. Enfin, dans les RECS la majorité des amibes libres n'est pas sous forme planctonique mais associée au biofilm. Il a déjà été montré que le biofilm peut protéger les amibes libres des traitements de désinfections (Srikanth et Berk, 1993). Donc, pour évaluer l'efficacité réelle de ces traitements de désinfection, il serait nécessaire de les tester sur des RECS réels ou des pilotes à échelle réelle comme celui utilisé par Farhat *et al.* (2010 et 2011). Cependant, il a déjà été montré dans la littérature que les biocides classiques sont parfois inefficaces pour éliminer totalement les amibes libres des RECS (Rohr *et al.*, 1998). C'est pourquoi, il serait nécessaire de développer de nouveaux traitements. Dans cette optique, nous avons testé un traitement innovant en utilisant des enzymes pour désactiver les kystes de *V. vermiformis*. Notre choix s'est porté sur les protéases car il a été montré que les composants majeurs de la paroi des kystes d'*Hartmannella glabrae*, une amibe libre proche de *V. vermiformis*, sont des protéines (Upadhyay *et al.*, 1984). Nous avons sélectionné, comme protéase, la subtilisine qui a été récemment identifiée pour son activité antifouling sur les biofilms marins (Leroy *et al.*, 2008a et b). La subtilisine semble très efficace pour inactiver les kystes de *V. vermiformis*. Une incubation de 24 h dans une concentration de subtilisine de 1,25 U.mL<sup>-1</sup> permettait d'inactiver la totalité des kystes des deux souches de *V. vermiformis* testées. Les observations au microscope à contraste de phase montraient une altération importante des kystes bien qu'ils ne semblaient pas lysés. En effet, une partie de la paroi des kystes semblait subsister alors que le contenu cellulaire apparaissait

très endommagé et localisé au centre du kyste. Il serait intéressant d'étudier la structure des kystes, après traitement à la subtilisine, par MET afin de mieux comprendre l'effet de cette protéase sur les kystes de *V. vermiformis*. Malgré la bonne efficacité de la subtilisine pour désactiver les kystes de *V. vermiformis*, nous sommes conscients que ce traitement ne pourra probablement pas être utilisé tel quel dans les RECS. En effet, son coût est important et son impact sur l'environnement doit être évalué. Mais ce type d'approche peut permettre d'identifier de nouvelles cibles et voies pour développer la prochaine génération de traitements de désinfection.

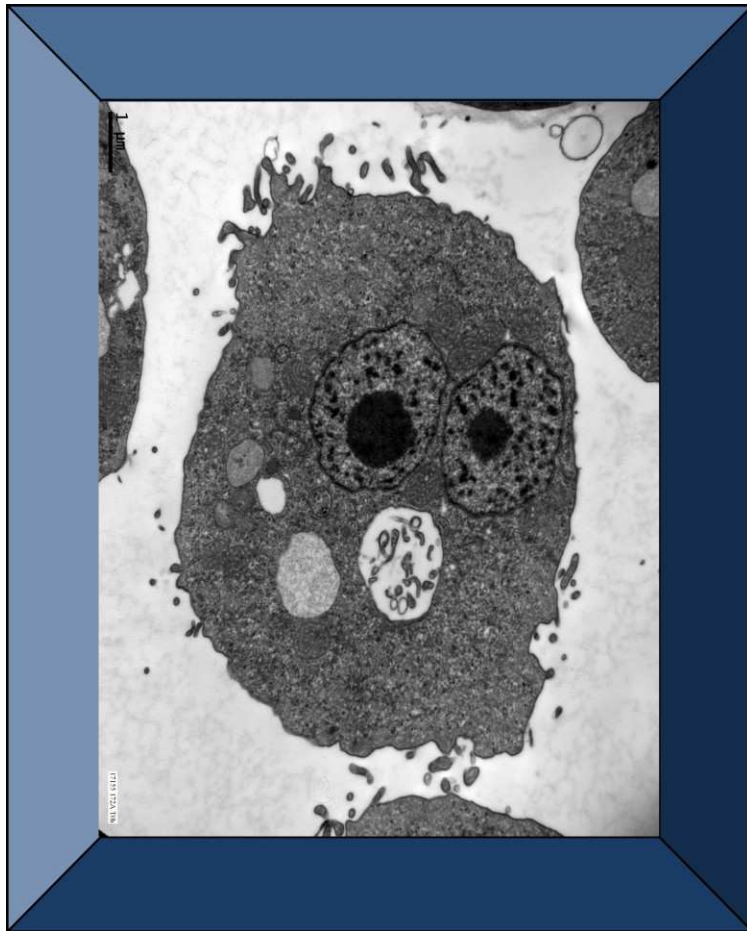
Enfin, nous avons étudié le processus de désenkystement. Au début de la thèse, il n'existait aucun travail de recherche faisant référence au processus de désenkystement chez *V. vermiformis*. De manière générale, il existe peu d'information concernant le processus de désenkystement chez les amibes libres et en particulier sur les facteurs induisant ce processus et les mécanismes moléculaires mis en jeu. La majorité des travaux de recherche sont des études morphologiques, structurales et ultrastructurales de ce processus de différenciation chez les genres *Acanthamoeba* et *Naegleria* (Chávez-Munguía *et al.*, 2005, 2009 et 2013). Chez *Acanthamoeba* et *Naegleria*, lors du désenkystement, les trophozoïtes émergent du kyste au niveau des ostioles. Lors de l'étude des kystes de *V. vermiformis* par MEB et MET, nous n'avons observé aucun ostiole à la surface des kystes. Nous avons donc été curieux de visualiser le processus de désenkystement chez *V. vermiformis* par différentes techniques de microscopie optique et électronique. Nous avons tout d'abord suivi le désenkystement de *V. vermiformis* par microscopie confocale. Les vidéos réalisées ont permis de voir que, dans le milieu de culture PYNFH modifié, le désenkystement de *V. vermiformis* était moins synchrone que l'enkystement dans le milieu Neff. Cette observation est en accord avec les résultats de Chambers et Thompson (1974) qui ont montré un désenkystement asynchrone chez *Acanthamoeba*. Dans notre étude, les premiers trophozoïtes apparaissaient après 9 h d'incubation. Ce temps est beaucoup plus faible que les données présentes dans la littérature pour des suivis de désenkystement dans des milieux nutritifs. Ainsi, Mattar et Byer (1971) ont montré que le désenkystement d'*Acanthamoeba castelanii* se déroulait sur une période de 12,5 h à 36 h. De la même façon, Kaushal et Shukla (1977a) ont rapporté que le désenkystement d'*Acanthamoeba*

*culbertsoni* pouvait prendre jusqu'à 48 h. Nous avons noté que durant le désenkystement, les trophozoïtes bougeaient à l'intérieur des kystes, puis l'émergence d'une ou plusieurs projections cytoplasmiques étaient observées à travers la paroi du kyste. Enfin les trophozoïtes s'expulsaient des kystes laissant une paroi vide. Les mêmes observations ont été faites en MEB. Puis nous avons suivi, par MET, les changements ultrastructuraux qui s'opèrent lors du désenkystement de *V. vermiformis*. Après 6 et 9 h dans le milieu PYNFH modifié, des lysosomes seuls et/ou des vacuoles contenant à la fois des débris cellulaires et des lysosomes sont libérés dans l'espace péricellulaire. On peut imaginer que cela induit une fragilisation et une digestion par les enzymes lytiques (généralement des lipases, protéases et des osidases) de la paroi kystique. Puis, les amibes se détachaient de la paroi des kystes et bougeaient à l'intérieur de la paroi comme les vidéos le suggéraient. Cette étape était accompagnée d'une dégradation des dépôts de glycogène qui devait probablement fournir l'énergie nécessaire à ce processus. Enfin, les amibes émergeaient, à travers les parois des kystes qui semblaient partiellement digérées, et reprenaient une structure type du trophozoïte. Il semblerait qu'une partie de la paroi du kyste subsiste à la dégradation par les enzymes lysosomales. Il se pourrait que, lors des traitements à la subtilisine, cette même partie de la paroi des kystes soit résistante à la protéase. Il serait alors intéressant d'étudier la structure des kystes après traitement à la subtilisine en MET et de les comparer avec ceux observés lors du désenkystement. Il est possible que l'endokyste et l'ectokyste aient une composition et une structure très différentes.

Le désenkystement de *V. vermiformis* est un processus rapide, il montre la capacité remarquable de *V. vermiformis* à s'adapter rapidement aux changements qui surviennent dans son environnement. Par la suite, il serait intéressant d'étudier la composition de la paroi des kystes, les facteurs induisant ce processus et les mécanismes moléculaires mis en jeu.



## CONCLUSION ET PERSPECTIVES



## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les amibes libres sont largement répandues dans l'environnement et colonisent les milieux aquatiques artificiels comme les RECS et les TAR. Certains genres ou espèces d'amibes libres sont potentiellement pathogènes pour l'Homme mais en tant que telles, elles ne sont pas considérées comme un problème majeur de santé publique. Cependant, il est maintenant bien établi qu'elles jouent un rôle de réservoir pour de nombreuses bactéries pathogènes comme *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* ou *Mycobacterium* spp.. Le contrôle des amibes libres dans les environnements artificiels représente donc un enjeu sanitaire important. Cependant, les amibes libres ont la capacité de passer d'une forme métaboliquement active (trophozoïte) à une forme de résistance, le kyste, lorsque les conditions sont défavorables ce qui leur confère une résistance aux traitements de désinfections. L'enkystement est une étape clé dans la survie et la résistance des amibes libres aux conditions défavorables. Dans l'optique de maîtriser les amibes libres dans les environnements artificiels (RECS, TAR...), et donc de prévenir les risques sanitaires, une meilleure compréhension des processus de différenciation et de la résistance des kystes aux traitements de désinfection est nécessaire. La plupart des travaux de recherche, portant sur les processus de différenciation et la résistance des kystes, a été menée chez les genres *Acanthamoeba* et *Naegleria* en raison de leur pouvoir pathogène à l'encontre de l'Homme. Lors de notre étude bibliographique, nous avons remarqué qu'il n'existait que peu de données concernant les processus de différenciation et la résistance des kystes de *Vermamoeba vermiformis* alors que plusieurs études montrent que cette espèce est prédominante dans les milieux artificiels. De plus, son rôle de réservoir pour des bactéries pathogènes, et en particulier *L. pneumophila*, est maintenant bien reconnu et documenté. Il était donc important de faire avancer l'état des connaissances sur les processus de différenciation et la résistance des kystes aux traitements de désinfection chez l'amibe libre *V. vermiformis*.

Dans un premier temps, nous avons étudié les processus d'enkystement et de déenkystement de *V. vermiformis* par différentes techniques de microscopie optique et électronique. Nous avons montré que l'enkystement de *V. vermiformis* est un processus

synchrone et rapide, il est réalisé en 9 h environ. Il conduit à la formation de kystes, entourés d'une paroi double couche composée d'un endokyste et d'un ectokyste. Nous avons observé, qu'à l'inverse des genres *Acanthamoeba* et *Naegleria*, les kystes de *V. vermiformis* ne possèdent pas d'ostiole. Nous étions donc curieux d'étudier le mécanisme de désenkystement chez cette espèce. Le désenkystement de *V. vermiformis* est moins synchrone que l'enkystement, il reste cependant rapide, les premiers trophozoïtes ont été observés après 9 h d'incubation dans un milieu nutritif. Durant le désenkystement, les cellules libèrent dans l'espace péricellulaire des lysosomes et des vacuoles contenant à la fois des débris cellulaires et des lysosomes, ce qui conduit, vraisemblablement, à une fragilisation et une digestion partielle de la paroi du kyste. Puis, l'amibe se détache de la paroi et bouge à l'intérieur du kyste jusqu'à émerger laissant la paroi vide. Les différentes observations réalisées dans cette étude laissent également suggérer l'existence de mécanismes de communication inter-amibienne par contact cellulaire et l'existence d'un comportement social chez *V. vermiformis*.

Puis dans une deuxième partie, nous avons investigué l'effet des conditions environnementales (température, pH et pression osmotique) sur l'enkystement de *V. vermiformis*. Nous avons observé que les conditions environnementales ont un impact sur l'enkystement de *V. vermiformis*, et qu'il existe des différences de sensibilité entre les deux souches testées. Pour la souche de référence (ATCC 50237), un enkystement optimal a été obtenu (i) pour des températures de 25 et 37 °C, (ii) pour des pH compris entre 5 et 9 et (iii) pour des concentrations en KCl comprises entre 0,05 et 0,2 mol.L<sup>-1</sup>. Quant à la souche environnementale (172A), un enkystement optimal a été observé (i) pour des températures de 25 et 37 °C, (ii) pour les pH basiques (8 et 9) et (iii) pour une concentration en KCl de 0,1 mol.L<sup>-1</sup>. Par la suite, nous avons testé l'effet de la concentration cellulaire sur l'enkystement de *V. vermiformis*. Nous avons observé que plus la concentration cellulaire était élevée plus l'enkystement était rapide ce qui suggère l'existence de mécanismes de communication inter-amibienne. En plus d'une communication par contact cellulaire, on peut imaginer l'existence d'une communication inter-amibienne par substance diffusible, comme le quorum-sensing connu chez les bactéries.



Les perspectives de nos recherches sur l'enkystement de *V. vermiformis* et, plus généralement, les perspectives à l'étude du processus d'enkystement chez les amibes libres sont nombreuses.

Ainsi, il serait utile de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans l'enkystement des amibes libres. En effet, les récepteurs membranaires et les voies de signalisation impliqués dans ce processus sont encore mal identifiés. Il reste également à découvrir de nouvelles molécules impliquées dans ce processus. Il serait également intéressant d'étudier si la présence de bactéries intracellulaires peut interférer avec le processus d'enkystement. On pourrait aussi envisager d'étudier les mécanismes de communication inter-amibienne, comme la communication par contact cellulaire ou bien des mécanismes proches du quorum-sensing bactérien. L'idée de l'éventuelle existence d'un comportement social chez les amibes libres reste encore à explorer. Enfin, le processus de désenkystement, encore mal connu, mériterait d'être étudié plus en détails. En effet, concernant le dernier point, il existe peu ou pas de données sur les facteurs induisant le désenkystement, les voies de signalisation et les molécules impliqués. La majorité des études portant sur les processus de différenciation chez les amibes libres a été menée chez *Acanthamoeba*. A l'avenir, il semblerait intéressant d'élargir ces travaux à d'autres genres afin d'améliorer la prévention des risques sanitaires directement ou indirectement liés aux amibes libres et de ce fait mieux cibler les procédures de désinfection.

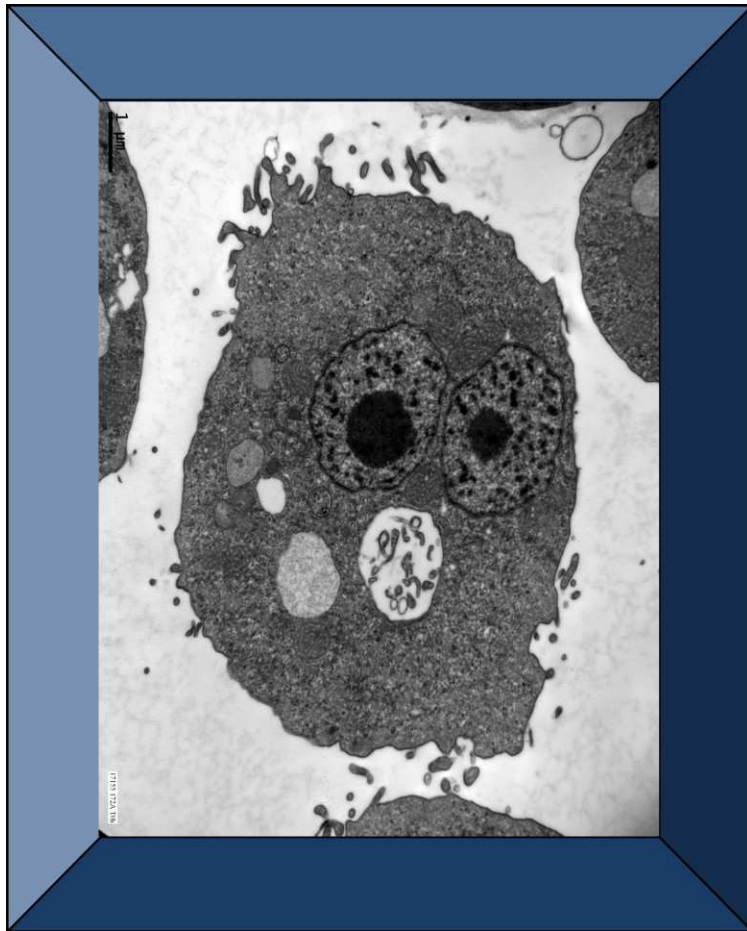
Dans un troisième temps, nous avons étudié la résistance des kystes de *V. vermiformis* aux traitements de désinfection. Nous avons sélectionné trois traitements fréquemment utilisés dans les RECS (chlore, chocs thermiques et acide péracétique couplé au peroxyde d'hydrogène), car ils sont souvent incriminés dans les épidémies de légionellose où *L. pneumophila* peut être associée aux amibes libres. Nous avons montré que, *in vitro*, les procédures de traitement recommandées pour la désinfection des RECS dans le cadre de la prévention du risque légionelles sont efficaces pour inactiver les kystes de *V. vermiformis*. Cependant, dans un RECS réel, les désinfectants chimiques sont consommés par l'ensemble de la flore microbienne ainsi que par les matériaux composants le RECS lui-même. Il a également été montré que le biofilm,

auquel les amibes libres sont associées, peut les protéger des traitements de désinfection. Il serait donc nécessaire de vérifier l'efficacité *in situ* de ces traitements sur un banc d'essais ou un RECS réel. Cependant, il a déjà été montré dans la littérature que les biocides classiques sont parfois inefficaces pour éliminer totalement les amibes libres des RECS, c'est pourquoi il est aussi nécessaire de développer de nouveaux traitements. Dans cette optique, nous avons testé un traitement innovant à base d'une protéase : la subtilisine. Cette enzyme semble très efficace pour inactiver les kystes de *V. vermiformis* mais nous sommes conscients qu'elle ne pourra probablement pas être utilisée tel quel dans les RECS. Son coût est élevé et son impact sur l'environnement nécessite d'être évalué. Cependant, cette découverte peut laisser envisager une nouvelle approche pour les traitements de désinfection. Une perspective, à cette étude, serait de tester l'effet d'autres enzymes (seules ou combinées) comme les lipases ou les osidases pour désactiver les kystes de *V. vermiformis*. Il serait également judicieux de déterminer la composition de la paroi des kystes de *V. vermiformis*, cela pourrait permettre de trouver de nouvelles cibles pour le développement de traitements innovants plus efficaces.

Pour conclure, ce travail de thèse a permis d'apporter des connaissances de base sur les processus de différenciation et la résistance des kystes aux traitements de désinfection chez *V. vermiformis*, une amibe libre peu étudiée. Il a également permis de souligner le fait que les amibes libres ont développé de nombreux mécanismes de survie pour s'adapter aux changements de l'environnement et qu'il existe des différences à la fois entre les genres, entre les espèces et entre les souches au sein d'une même espèce. Enfin, je souhaiterais clore ce manuscrit par une citation qui illustre bien les travaux menés au cours de ce travail de doctorat : « Les espèces qui survivent ne sont pas les espèces les plus fortes, ni les plus intelligentes, mais celles qui s'adaptent le mieux aux changements » (Charles Darwin).



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

**Abd, H., Weintraub, A., Sandstrom, G. (2005).** Intracellular survival and replication of *Vibrio Cholerae* O139 in aquatic free-living amoebae. *Environ. Microbiol.*, **7**: 1003-1008.

**Adl, S.M., Simpson, A.G.B., Farmer, M.A., Andersen, R.A., Anderson, O.R., Barta, J.R., Bowser, S.S., Brugerolle, G. et al. (2005).** The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **52(5)**: 399-451.

**Adl, S.M., Simpson, A.G.B., Lane, C.E., Lukes, J., Bass, D., Bowser, S.S., Brown, M.W., Burki, F. et al. (2012).** The revised classification of eukaryotes. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **59(5)**: 429-493.

**Abu Kwaik, Y, Fields, B.S., Engleberg, N.C. (1994).** Protein expression by the protozoan *Hartmannella vermiformis* upon contact with its bacterial parasite *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.*, **62**: 1860-1866.

**Abu Kwaik, Y (1996).** The phagosome containing *Legionella pneumophila* within the protozoan *Hartmannella vermiformis* is surrounded by the rough endoplasmic reticulum. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**: 2022-2028.

**Adekambi, T., Salah, S.B, Khlif, M., Raoult, D., Drancourt, M. (2006).** Survival of environmental Mycobacteria in *Acanthamoeba polyphaga*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72(9)**: 5974-5981.

**Aitken, D., Hay, J., Kinnear, F.B., Kirkness, C.M., Lee, W.R., Seal, D. (1996).** Amebic keratitis in a wearer of disposable contact lenses due to a mixed *Vahlkampfia* and *Hartmannella* infection. *Ophthalmology*, **103**: 485-494.

**Akins, R.A. & Byers, T.J. (1980).** Differentiation promoting factors induced in *Acanthamoeba* by inhibitors of mitochondrial macromolecule synthesis. *Dev. Biol.*, **78**: 126-140.

**Aksozek, A., McClellan, K., Howard, K., Niederkorn, J.Y., Alizadeh, H. (2002).** Resistance of *Acanthamoeba castellanii* cysts to physical, chemical, and radiological conditions. *J. Parasitol.*, **88**: 621-623.

**Alexeieff, A. (1912a).** Sur les caractères cytologiques de la systématique des amibes du groupe limax (*Naegleria* nov. gen. et *Hartmannella* nov. gen.) et des amibes parasites des vertébrés (*Proctamoeba* nov. gen.). *Bull. Soc. Zool.*, **37**: 55-74.

**Alexeieff, A. (1912b).** Quelques remarques complémentaires sur la systématique des amibes du groupe limax. *Bull. Soc. Zool.*, **37**: 149-157.

**Anger, C. & Lally, J.M. (2008).** *Acanthamoeba* : a review of its potential to cause keratitis, current lens care solution disinfection standards and methodologies, and strategies to reduce patient risk. *Eye Contact Lens*, **34**: 247-253.

**Aqeel, Y. Siddiqui, R., Iftikhar, H., Khan, N.A. (2013).** The effect of different environmental conditions on the encystation of *Acanthamoeba castellanii* belonging to the T4 genotype. *Exp. Parasitol.*, **135(1)**: 30-35.

**Arroyo-Begovich, A. & Carabez-Trejo, A. (1982).** Location on chitin in the cyst wall of *Entamoeba invadens* with colloidal gold tracers. *J. Parasitol.*, **68**: 253-258.

**Averner, M. & Fluton, C. (1966).** Carbon dioxide: signal for excystment of *Naegleria gruberi*. *J. Gen. Microbiol.*, **42**: 245-255.

**Baker, H. (1753).** Of the *Proteus*. In: *Employment for the microscope*. London : R. Dodsley, part the second , 260-266.

**Barbeau, J. & Buhler, T. (2001).** Biofilms augment the number of free-living amoebae in dental unit waterlines. *Res. Microbiol.*, **152(8)**: 753-760.

**Bard, D. & Lambrozo, J. (1992).** Les méningo-encéphalites et encéphalites à amibes libres. *Méd. Mal. Infect.*, **22**: 698-705.

**Barker, J., Brown, M.R.W., Collier, P.J., Farrell, I., Gilbert, P. (1992).** Relationship between *Legionella pneumophila* and *Acanthamoeba polyphaga* : physiological status and susceptibility to chemical inactivation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**: 2420-2425.

**Baron, D., Danglot, C., Vilagines, R. (1980).** [Role of a free-living amoebae from water, *Acanthamoeba castellanii*, in the transport of naked or enveloped animal viruses]. *C. R. Seances Acad. Sci. D.*, **291(7)**: 629-632.

**Berk, S.G., Gunderson, J.H., Newsome, A.L., Farone, A.L., Hayes, B.J., Redding, K.S., Uddin, N., Williams, E.L. et al. (2006).** Occurrence of infected amoebae in cooling towers compared with natural aquatic environments: implications for emerging pathogens. *Environ. Sci. Technol.*, **40**: 7440-7444.

**Berry, D., Xi, C., Raskin, L. (2006).** Microbial ecology of drinking water distribution systems. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **17**: 297-302.

**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. *Appl. Environ. Microbiol.*, **48**: 859-860.

**Blackler, S.J. & Sommerville, R.I. (1988).** Carbonic acid and the excystement of *Naegleria gruberi* (Heterolobosea: Vahlkampfiidae). *Int. J. Parasitol.*, **18(6)**: 785-791.

**Blanton, W.E. & Villemez, C.L. (1978).** Molecular size and chain length distribution in *Acanthamoeba* cellulose. *J. Protozool.*, **25**: 264-267.

**Bonilla-Lemus, P., Ramirez-Bautista, G.A., Zamora-Munoz, C., Ibarra-Montes, M.R., Ramirez-Flores, E., Hernandez-Martinez, M.D. (2009).** *Acanthamoeba* spp. in domestic tap water in houses of contact lens wearers in the metropolitan area of Mexico City. *Exp. Parasitol.*, **126(1)**: 54-58.

**Boost, M., Cho, P., Lai, S., Sun, W.M. (2008).** Detection of *Acanthamoeba* in tap water and contact lens cases using polymerase chain reaction. *Optom. Vis. Sci.*, **85**:526-530.

**Bory de Saint-Vincent, J.B., Audouin, V., Bourdon, I. et al. (1822).** *Dictionnaire classique d'histoire naturelle*. Paris : Rey et Gravier, Tome 1, 604.

- Bouyer, S., Rodier, M.H., Guillot, A., Hechard, Y. (2009).** *Acanthamoeba castellanii*: proteins involved in actin dynamics, glycolysis, and proteolysis are regulated during encystation. *Exp. Parasitol.*, **123**:90-94.
- Bowers, B. & Korn, E.D. (1969).** The fine structure of *Acanthamoeba castellanii* (Neff strain). II. Encystment. *J. Cell Biol.*, **41**: 786-805.
- Bowers, B. (1977).** Comparison of pinocytosis and phagocytosis in *Acanthamoeba castellanii*. *Exp. Cell. Res.*, **110(2)**: 409-417.
- Boyer, M., Yutin, N., Pagnier, I., Barrassi, L., Fournous, G., Espinosa, L., Robert, C., Azza, S. et al. (2009).** Giant Marseillevirus highlights the role of amoebae as a melting pot in emergence of chimeric microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **106(51)**: 21848-21853.
- Brandt, F.H., Ware, D.A., Visvesvara, G.S. (1989).** Viability of *Acanthamoeba* cysts in ophthalmic solutions. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**: 1144-1146.
- Brown, R.L. (1992).** Successful treatment of primary amebic meningoencephalitis. *Arch. Intern. Med.*, **152**: 1330-1331.
- Brumpt, E. (1925).** Etude sommaire de l'*Entamoeba dispar* n. sp. amibe à kystes quadri-nuclées parasite de l'homme. *Bull. Acad. Med.* **94**: 943- 952.
- Buck, S.L. & Rosenthal, R.A. (1996).** A quantitative method to evaluate neutralizer toxicity against *Acanthamoeba castellanii*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62(9)**: 3521-3526.
- Buck, S.L., Rosenthal, R.A., Abshire, R.L. (1998).** Amoebicidal activity of a preserved contact lens multipurpose disinfecting solution compared to a disinfection/neutralization peroxide system. *Cont. Lens Anterior Eye*, **21**: 105-115.
- Buck, S.L., Rosenthal, R.A., Schlech, B.A. (2000).** Methods used to evaluate the effectiveness of contact lens care solutions and other compounds against *Acanthamoeba* : a review of the literature. *CLAO J.*, **26**: 72-84.



- Burger, R.M., Franco, R.J., Drlica, K. (1994).** Killing *Acanthamoebae* with polyaminopropyl biguanide : quantitation and kinetics. *Antimicrob. Agents Ch.*, **38(4)**: 886-888.
- Buse, H.Y., Lu, J., Struewing, I.T., Ashbolt, N.J. (2013).** Eukaryotic diversity in premise drinking water using 18S rDNA sequencing: implications for health risks. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, **20(9)**: 6351-6366.
- Butt, C.G. (1966).** Primary amoebic meningo-encephalitis. *New Engl. J. Med.*, **274**: 1473-1476.
- Butt, C.G., Baro, C. & Knorr, R.W. (1968).** *Naegleria (sp.)* identified in amebic encephalitis. *Amer. J. Clin. Path.*, **50**: 568-574.
- Byers, T.J. (1979).** Growth, reproduction, and differentiation in *Acanthamoeba*. *Int. Rev. Cytol.*, **61**: 283-338.
- 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. *Wat. Sci. Technol.*, **31(5-6)**: 199-122.
- Castellani, A. (1930a).** An amoeba found in culture of a yeast: preliminary note. *J. Trop. Med. Hyg.*, **33**: 160.
- Castellani, A. (1930b).** An amoeba growing in cultures of a yeast: second note. *J. Trop. Med. Hyg.*, **33**: 188-191.
- Castellani, A. (1930c).** An amoeba found in cultures of a yeast: third note. *J. Trop. Med. Hyg.*, **33**: 221-222.
- Castellani, A. (1930d).** An amoeba growing in cultures of a yeast: fourth note. *J. Trop. Med. Hyg.*, **33**: 237.
- Caumo, K., Frasson, A.P., Pens, C.J., Panatieri, L.F., Frazzon, A.P., Rott, M.B. (2009).** Potentially pathogenic *Acanthamoeba* in swimming pools: a survey in the southern Brazilian city of Porto Alegre. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **103**: 477-485.

- Centeno, M., Rivera, F., Cerva, L., Tsutsumi, V., Gallegos, E., Calderón, A., Ortiz, R., Bonilla, P., Ramírez, E., Suárez, G. (1996).** *Hartmannella vermiformis* isolated from the cerebrospinal fluid of a young male patient with meningoencephalitis and bronchopneumonia. *Arch. Med. Res.*, **27(4)**: 579-586.
- Chambers, J.A. & Thompson, J.E. (1972).** A scanning electron microscopic study of the excystment process of *Acanthamoeba castellanii*. *Exp. Cell Res.*, **73(2)**: 415-421.
- Chambers, J.A. & Thompson, J.E. (1974).** Age-dependent excystment of the protozoan *Acanthamoeba castellanii*. *J. Gen. Microbiol.*, **80(2)**: 375-380.
- Chang, S.L. (1978).** Resistance of pathogenic *Naegleria* to some common physical and chemical agents. *Appl. Environ. Microbiol.*, **35(2)**: 368-375.
- Chang, P.C. & Soong, H.K. (1991).** *Acanthamoeba* keratitis in non-contact lens wearers. *Arch. Ophthalmol.*, **109(4)**: 463-464.
- Chavez-Munguia, B., Omana-Molina, M., Gonzalez-Lazaro, M., Gonzalez-Robles, A., Bonilla, P., Martinez-Palomo, A. (2005).** Ultrastructural study of encystation and excystation in *Acanthamoeba castellanii*. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **52**:153-158.
- Chavez-Munguia, B., Omana-Molina, M., Castanon, G., Bonilla, P., Gonzalez-Lazaro, M., Hernandez-Martinez, D., Salazar-Villatoro, L. et al. (2009).** Ultrastructural study of the encystation and excystation processes in *Naegleria* sp.. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **56(1)**: 66-72.
- Chavez-Munguia, B., Segovia-Gamboa, N., Salazar-Villatoro, L., Omana-Molina, M., Espinosa-Cantellano, M., Martínez-Palomo, A. (2011).** *Naegleria fowleri*: enolase is expressed during cyst differentiation. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **58**: 463-468.
- Chavez-Munguia, B., Salazar-Villatoro, L., Lagunes-Guillén, A., Omana-Molina, M., Espinosa-Cantellano, M., Martínez-Palomo, A. (2013).** *Acanthamoeba castellanii* cysts: new ultrastructural findings. *Parasitol. Res.*, **112**: 1125-1130.

**Chatton, E. & Lalung-Bonnaire, P. (1912).** Amibe limax (*Vahlkampfia* n. gen.) dans l'intestin humain. Son importance pour l'interprétation des amibes de culture. *Bull. Soc. Path., Ex.* **5**: 135-138.

**Chatton, E. (1953).** Ordre des Amoebiens nus ou Amoebae dans traité de zoologie. P.P. Grassé, I, Masson, Paris, fasc. **1**: 5-91.

**Chen, Y.S.R., Sproul, O.J., Rubin, A.J. (1985).** Inactivation of *Naegleria gruberi* cysts by chlorine dioxide. *Water. Res.*, **19(6)**: 783-789.

**Chen, L., Orfeo, T., Gilmartin, G., Bateman, E. (2004).** Mechanism of cyst specific protein 21 mRNA induction during *Acanthamoeba* differentiation. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1691**: 23-31.

**Cirillo, J.D., Falkow, S., Tompkins, L.S., Bermudez, L.E. (1997).** Interaction of *Mycobacterium avium* with environmental amoebae enhances virulence. *Infect. Immun.*, **65**: 3759-3767.

**Connell, A., Rutter, A., Hill, B., Suller, M., Lloyd, D. (2001).** Encystation of *Acanthamoeba castellanii*: dye uptake for assessment by flow cytometry and confocal laser scanning microscopy. *J. Appl. Microbiol.*, **90**: 706-712.

**Connor, C.G., Hopkins, S.L., Salisbury, R.D. (1991).** Effectivity of contact lens disinfection systems against *Acanthamoeba culbertsoni*. *Optom. Vis. Sci.*, **68**: 138-141.

**Coppi, A., Merali, S., Eichinger, D. (2002).** The enteric parasite *Entamoeba* uses an autocrine catecholamine system during differentiation into the infectious cyst stage. *J. Biol. Chem.*, **277**:8083-8090.

**Cordingley, J.S., Wills, R.A., Villemez, C.L. (1996).** Osmolarity is an independent trigger of *Acanthamoeba castellanii* differentiation. *J. Cell Biochem.*, **61(2)**: 167-171.

**Correc, O. et al. (2012).** Maîtrise du risque de développement des légionelles dans les réseaux d'eau chaude sanitaire. Guide technique, CSTB éditions, pp. 81.

- Coulon, C., Collignon, A., McDonnell, G., Thomas, V. (2010).** Resistance of *Acanthamoeba* cysts to disinfection treatments used in health care settings. *J. Clin. Microbiol.*, **48(8)**: 2689-2697.
- Critchley, M. & Bentham, R. (2009).** The efficacy of biocides and other chemical additives in cooling water systems in the control of amoebae. *J. Appl. Microbiol.*, **106**: 784-789.
- Cursons, R.T., Brown, T.J., Keys, E.A. (1980).** Effect of disinfectants on pathogenic free-living amoebae : in axenic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, **40(1)**: 62-66.
- Danes, L. & Cerva, L. (1981).** Survival of polioviruses and echoviruses in *Acanthamoeba castellanii* cultivated *in vitro*. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.*, **25(2)**: 169-174.
- Davies, J.G., Anthony, Y., Meakin, B.J., Kilvington, S., Anger, C.B. (1990).** Evaluation of the anti-Acanthamoebal activity of five contact lens disinfectants. *Int. Contact Lens Clin.*, **17**: 14-20.
- Declerck, P., Behets, J., Margineanu, A., van Hoef, V., De Keersmaecker, B., Ollevier, F. (2009).** Replication of *Legionella pneumophila* in biofilms of water distribution pipes. *Microbiol. Res.*, **164**: 593-603.
- Deering, R.A. (1968).** *Dictyostelium discoideum*: a gamma ray resistant organism. *Science*, **162**: 1289-1290.
- De Jonckheere, J.F., Vandijck, P., van de Voorde, H. (1975).** The effect of thermal pollution on the distribution of *Naegleria fowleri*. *J. Hyg.*, **75**: 7-13.
- De Jonckheere, J.F. & van de Voorde, H. (1976).** Differences in destruction of cysts of pathogenic and nonpathogenic *Naegleria* and *Acanthamoeba* by chlorine. *Appl. Environ. Microbiol.*, **31(2)**: 294-297.
- De Jonckheere, J.F. (1982).** Hospital hydrotherapy pools treated with ultra violet light: bad bacteriological quality and presence of thermophilic *Naegleria*. *J. Hyg. (Lond.)*, **88**: 205-214.
- de Moraes, J. & Alfieri, S.C. (2008).** Growth, encystment, and survival, of *Acanthamoeba castellanii* grazing on different bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **66**: 221-229.

**DIRECTION GÉNÉRALE DE LA SANTÉ et DIRECTION DE L'HOSPITALISATION ET DE L'ORGANISATION DES SOINS.** Circulaire DGS/SD7A/DHOS/E4 n°2002/243 du 22 avril 2002 relative à la prévention du risque lié aux légionelles dans les établissements de santé. Bulletin officiel n°2002-18.

**Dive, D., Picard, J.P., Leclerc, H. (1979).** [Amoebae in the water supply : an epidemiological study (author's transl)]. *Ann. Microbiol. (Paris)*, **130A(4)**: 487-498.

**Drozanski, W. (1956).** Fatal bacteria infection in soil amoebae. *Acta Microbiol. Pol.*, **5(3-4)**: 315-317.

**Dudley, R., Matin, A., Alsam, S., Sissons, J., Maghsood, A.H., Khan, N.A. (2005).** *Acanthamoeba* isolates belonging to T1, T2, T3, T4 but not T7 encyst in response to increased osmolarity and cysts do not bind to human corneal epithelial cells. *Acta. Trop.*, **95**: 100-108.

**Dudley, R., Alsam, S., Khan, N.A. (2007).** Cellulose biosynthesis pathway is a potential target in the improved treatment of *Acanthamoeba* keratitis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **75**: 133-140.

**Dudley, R., Alsam, S., Khan, N.A. (2008).** The role of proteases in the differentiation of *Acanthamoeba castellanii*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **286**: 9-15.

**Dudley, R., Jarroll, E.L., Khan, N.A. (2009).** Carbohydrate analysis of *Acanthamoeba castellanii*. *Exp. Parasitol.*, **122**: 338-343.

**Dujardin, F. (1841).** Description méthodique des infusoires. In : *Histoire naturelle des zoophytes. Infusoires, comprenant la physiologie et la classification de ces animaux, et la manière de les étudier à l'aide d'un microscope*. Paris : Librairie Encyclopédique de Roret, 226-239.

**Dupuy, M., Berne, F., Herbelin, P., Binet, M., Berthelot, N., Soreau, S., Hechard, Y. (2013).** Sensivity of free-living amoeba trophozoites and cysts to water disinfectants. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, In press, available online 17 July 2013.

**Dykova, I., Lom., J., Schroeder-Diedrich, J.M., Booton, G.C., Byers, T.J. (1999).** *Acanthamoeba* strains isolated from organs of freshwater fishes. *J. parasitol.*, **85**: 1106-1113.

**Dykova, I., Pindova, Z., Fiala, I., Dvorakova, H., Machackova, B. (2005).** Fish-isolated strains of *Hartmannella vermiformis* Page, 1967: morphology, phylogeny and molecular diagnosis of the species in tissue lesions. *Folia Parasitol.*, **52**: 295-303.

**Dzeja, P.P., Bortolon, R., Perez-Terzic, C., Holmuhamedov, E.L., Terzic, A. (2002).** Energetic communication between mitochondria and nucleus directed by catalyzed phosphotransfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99(15)**: 10156-10161.

**Ebert, F., Bachmann, A., Nakada-Tsukui, K., Hennings, I., Drescher, B., Nozaki, T., Tannich, E., Bruchhaus, I. (2008).** An *Entamoeba* cysteine peptidase specifically expressed during encystation. *Parasitol. Int.*, **57**: 521-524.

**Eichinger, D. (2001).** A role for a galactose lectin and its ligands during encystment of *Entamoeba*. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **48**: 17-21.

**Elder, M.J., Kilvington, S., Dart, J.K. (1994).** A clinicopathologic study of in vitro sensitivity testing and *Acanthamoeba* keratitis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **35**: 1059-1064.

**El-Etr, S.H. Margolis JJ, Monack D, Robison RA, Cohen M, Moore E, Rasley A. (2009).** Francisella tularensis type A strains cause the rapid encystment of *Acanthamoeba castellanii* and survive in amoebal cysts for three weeks postinfection. *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**: 7488-7500.

**Ercken, D., Verelst, L., Declerk, P., Duvivier, L., Van Damme, A., Ollevier, F. (2003).** Effects of peracetic acid and monochloramine on the inactivation of *Naegleria lovaniensis*. *Wat. Sci. Technol.*, **47(3)**: 167-171.

**European standard - French standard NF EN ISO 7393-1.** Determination of free chlorine and total chlorine Part 1: Titrimetric method using N, N-diethyl-1,4-phenylenediamine. **2000**, 8 p.

**Farhat, M., Trouilhe, M.C., Briand, E., Moletta-Denat, M., Robien, E., Frere, J. (2010).** Development of a pilot-scale 1 for *Legionella* elimination in biofilm in hot water network: heat shock treatment evaluation. *J. Appl. Microbiol.*, **108(3)**: 1073-1082.

**Farhat, M., Trouilhe, M.C., Foret, C., Hater, W., Moletta-Denat, M., Robine, E., Frere, J. (2011).** Chemical disinfection of *Legionella* in hot water systems biofilm: A pilot-scale 1 study. *Water Sci. Technol.*, **64(3)**: 708-714.

**Fields, B.S., Nerad, T.A., Sawyer, T.K., King, C.H., Barbaree, J.M., Martin, W.T., Morill, W.E., Sanden, G.N. (1990).** Characterization of an axenic strain of *Hartmannella vermiformis* obtained from an investigation of nosocomial legionellosis. *J. Protozool.*, **37**: 581-583.

**Fields, B.S. (1996).** The molecular ecology of legionellae. *Trends Microbiol.*, **4**: 286-290.

**Fields, B.S., Benson, R.F., Besser, R.E. (2002).** *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin. Microbiol. Rev.*, **15**: 506-526.

**Fliermans, C.B., Cherry, W.B., Orrisson, L.H., Smith, S.J., Tison, D.L., Pope, D.H. (1981).** Ecological distribution of *Legionella pneumophila*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **41**: 9-16.

**Fritzinger, A.E. & Marciano-Cabral, F. (2004).** Modulation of a "CD59-like" protein in *Naegleria fowleri* amoebae by bacteria. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **51(5)**:522-8.

**Fouque, E., Trouilhe, M.C., Thomas, V., Hartemann, P., Rodier, M.H., Hechard, Y. (2012).** Cellular, biochemical and molecular changes during encystment of free-living amoebae. *Eukaryot. Cell*, **11(4)**: 382-387.

**Fowler, M. & Carter, R.F. (1965).** Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba sp.* : a preliminary report. *Brit. Med. J.*, **2**: 740-742.

**Garcia, M.T., Jones, S., Pelaz, C., Millar, R.D., Kwaik, Y.A. (2007).** *Acanthamoeba polyphaga* resuscitates viable non-culturable *Legionella pneumophila* after disinfection. *Environ. Microbiol.*, **9(5)**: 1267-1277.

**Gatti, S., Cevini, C., Bruno, A., Penso, G., Rama, P., Scaglia, M. (1998).** In vitro effectiveness of povidone-iodine on *Acanthamoeba* isolates from human cornea. *Antimicrob. Agents Ch.*, **42(9)**: 2232-2234.

- Gilbert, P. & Moore, L.E. (2005).** Cationic antiseptics : diversity of action under a common epithet. *J. Appl. Microbiol.*, **99**: 703-715.
- Gomez-Couso, H., Paniagua-Crespo, E., Ares-Mazas, E. (2007).** *Acanthamoeba* as a temporal vehicle of *Cryptosporidium*. *Parasitol. Res.*, **100**: 1151-1154.
- Grassi, B. (1879).** Dei Protozoi parassiti e specialmente di quelli che sono nell'uomo. *Gazz. Med. Ita. Lombard.*, **39**: 445-449.
- Gray, T.B., Kilvington, S., Dart, J.K.G. (1996).** Amoebicidal efficacy of hexamidine, compared with PHMB, chlorhexidine, propamidine and paromycin. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.*, **37**: 875.
- Greub, G. & Raoult, D. (2003a).** Morphology of *Legionella pneumophila* according to their localization within *Hartmannella vermiformis*. *Res. Microbiol.*, **154**: 619-621.
- Greub, G. & Raoult, D. (2003b).** Biocides currently used for bronchoscope decontamination are poorly effective against free-living amoebae. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.*, **24**: 784-786.
- Greub, G. & Raoult, D. (2004).** Microorganism resistant to free-living amoebae. *Clin. Microbiol. Rev.*, **17**: 413-433.
- Greub, G. (2009).** *Parachlamydia acanthamoebae*, an emerging agent of pneumonia. *Clin. Microbiol. Infect.*, **15(1)**: 18-28.
- Grillot, R. & Ambroise-Thomas, P. (1980).** [Free-living ameobae in Grenoble area swimming pool water. Influence of th “winter-summer” use and of the sterilizing procedure (author’s transl)]. *Rev. Epidemiol., Sante Publique*, **28**: 185-207.
- Gros, G. (1849).** Fragments d’helminthologie et de physiologie microscopique. *Bull. Soc. Imp. Nat. Moscow*, **22**: 549-573.
- Heaselgrave, W., Patel, N., Kilvington, S., Kehoe, S.C., McGuigan, K.G., (2006).** Solar disinfection of poliovirus and *Acanthamoeba polyphaga* cysts in water – a laboratory study using simulated sunlight. *Lett. Appl. Microbiol.*, **43**: 125-130.



**Heaselgrave, W., Andrew, P.W., Kilvington, S. (2010).** Acidified nitrite enhances hydrogen peroxide disinfection of *Acanthamoeba*, bacteria and fungi. *J. Antimicrob. Chemother.*, **65(6)**: 1207-1214.

**Hijnen, W.A., Beerendonk, E.F., Medema, G.J. (2006).** Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water : a review. *Water Res.*, **40**: 3-22.

**Hillerbrandt, S. & Müller, L. (1991).** Repair of damage caused by UV- and X-irradiation in the amoeboflagellate *Naegleria gruberi*. *Radiat. Environ. Biophys.*, **30**: 123-130.

**Hirukawa, Y., Nakato, H., Izumi, S., Tsuruhara, T., Tomino, S. (1998).** Structure and expression of a cyst specific protein of *Acanthamoeba castellanii*. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1398**: 47-56.

**Hiti, K., Walochnik, J., Faschinger, C., Haller-Schober, E.M., Aspöck, H. (2001).** Microwave treatment of contact lens cases contaminated with *Acanthamoeba*. *Cornea.*, **20(5)**: 467-470.

**Hoffmann, R. & Michel, R. (2001).** Distribution of free-living amoeba (FLA) during preparation and supply of drinking water. *J. Hyg. Environ. Health*, **203**: 215-219.

**Horn, M., Wagner, M., Müller, K.D., Schmid, E.N., Fritsche, T.R., Schleifer, K.H., Michel, R. (2000).** *Neochlamydia hartmannellae* gen. nov., sp. nov. (Parachlamydiaceae), an endoparasite of the amoeba *Hartmannella vermiformis*. *Microbiology*, **146(5)**: 1231-1239.

**Howard, K. & Inglis, T.J.J. (2005).** Disinfection of *Burkholderia pseudomallei* in potable water. *Water Res.*, **39**: 1085-1092.

**Hughes, R., Heaselgrave, W., Kilvington, S. (2003a).** *Acanthamoeba polyphaga* strain age and method of cyst production influence the observed efficacy of therapeutic agents and contact lens disinfectants. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **47**: 3080-3084.

**Hughes, R., Andrew, P.W., Kilvington, S. (2003b).** Enhanced killing of *Acanthamoeba* cysts with a plant peroxidase-hydrogen peroxide-halide antimicrobial system. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**: 2563-2567.

**Hugo, E.R., McLaughlin, W.R., Oh, K.H., Tuovinen, O.H. (1991).** Quantitative enumeration of *Acanthamoeba* for evaluation of cyst inactivation in contact lens care solutions. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **32**: 655-657.

**Illingworth, C.D. & Cook, S.D. (1998).** *Acanthamoeba* keratitis. *Surv. Ophthalmol.*, **42**: 493-508.

**Imayasu, M., Tchedre, K.T., Cavanagh, H.D. (2013).** Effects of multipurpose solutions on the viability and encystment of *Acanthamoeba* determined by flow cytometry. *Eye Contact Lens*, **39(3)**: 228-233.

**Inouet, T., Asari, S., Tahara, K., Hayashi, K., Kiritoshi, A., Shimomura, Y. (1998).** *Acanthamoeba* keratitis with symbiosis of *Hartmannella amoeba*. *Am. J. Ophthalmol.*, **125**: 721–723.

**Jacquemin, J.L., Simitzis-Le Flohic, A.M., Chauveau, N. (1981).** [Free-living amoebae in fresh water. Study of the water supply of the town of Poitiers (France) (author's transl)]. *Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales*, **74**: 521-524.

**Jadin, J.B. (1975).** Amibes *Limax* vecteurs possibles de Mycobactéries et de *M. leprae*. *Acta Leprol.*, **59**: 57-67.

**Jahn, T.L. & Bovee, E.C. (1965).** Taxonomy and evolution of Sarcodina: a reclassification. *Taxon*, **23**: 483-496.

**Jahn, T.L., Bovee, E.C., Griffith, D.L. (1974).** Mechanisms of movement in taxonomy of Sarcodina. I. As a basis for a new major dichotomy into two classes, Autotractea and Hydraulea. *Am. Midl. Nat.*, **73**: 30-40.

**Jantzen, H. (1981).** Control of actin synthesis during the development of *Acanthamoeba castellanii*. *Dev. Biol.*, **82**: 113-126.

**Jeong, H.J. & Yu, H.S. (2005).** The role of domestic tap water in *Acanthamoeba* contamination in contact lens storage cases in Korean. *Korean J. Parasitol.*, **43**: 47-50.

**Jepps, M.W. & Dobell, C. (1918).** *Dientamoeba fragilis* n.g., n. sp., new intestinal amoeba from man. *Parasitology*, **10**: 352-367.

**Johnston, S.P., Sriram, R., Qvarnstrom, Y., Roy, S., Verani, J. Yoder, J., Lorick, S., Roberts, J. et al. (2009).** Resistance of *Acanthamoeba* cysts to disinfection in multiple contact lens solutions. *J. Clin. Microbiol.*, **47**: 2040-2045.

**Jones, D.B., Visvesvara, G.S., Robinson, N.M. (1975).** *Acanthamoeba polyphaga* keratitis and *Acanthamoeba* uveitis associated with fatal meningoencephalitis. *Trans. Ophthalmol. Soc. U. K.*, **95**: 221-232.

**Kaushal, D.C. & Shukla, O.P. (1976).** Release of certain extracellular enzymes during excystment of axenically produced cysts of *Hartmannella culbertsoni*. *Indian J. Exp. Biol.*, **14(4)**: 498-499.

**Kaushal, D.C. & Shukla, O.P. (1977a).** Excystment of axenically prepared cysts of *Hartmannella culbertsoni*. *J. Gen. Microbiol.*, **98**: 117-123.

**Kaushal, D.C. & Shukla, O.P. (1977b).** Characterization of excystment factor (s) from an aqueous extract of *Escherichia coli*. *Indian J. Exp. Biol.*, **15(7)**: 538-541.

**Kaushal, D.C. & Shukla, O.P. (1977c).** Structure activity relationship of excystment agents of *Hartmannella culbertsoni*. *Indian J. Exp. Biol.*, **15(7)**: 542-543.

**Kaushal, D.C. & Shukla, O.P. (1978a).** Properties of an extracellular protease elaborated during excystment of *Hartmannella culbertsoni*. *Indian J. Exp. Biol.*, **16(10)**: 1102-1104.

**Kaushal, D.C. & Shukla, O.P. (1978b).** Elaboration of proteases, cellulases and chitinase during excystment of *Hartmannella culbertsoni*. *Indian J. Exp. Biol.*, **16(10)**: 1104-1106.

**Khan, N.A. (2006).** *Acanthamoeba* : biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiol. Rev.*, **30**: 564-595.

- Khunkitti, W., Lloyd, D., Furr, J.R., Russell, A.D. (1996).** The lethal effects of biguanides on cysts and trophozoites of *Acanthamoeba castellanii*. *J. Appl. Bacteriol.*, **81**: 73-77.
- Khunkitti, W., Lloyd, D., Furr, J.R., Russell, A.D. (1998).** *Acanthamoeba castellanii*: growth, encystment, excystment and biocide susceptibility. *J. Infect.*, **36**: 43-48.
- Kilvington, S. & Price, J. (1990).** Survival of *Legionella pneumophila* within cysts of *Acanthamoeba polyphaga* following chlorine exposure. *J. Appl. Bacteriol.*, **68**: 519-525.
- Kilvington, S., Gray, T., Dart, J., Morlet, N., Beeching, J.R., Frazer, D.G., Matheson, M. (2004).** *Acanthamoeba* keratitis : the role of domestic tap water contamination in the United Kingdom. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **45**: 165-169.
- Kim, S.Y. & Hahn, T.W. (1999).** *In vitro* amoebicidal efficacy of hexamide, polyhexamethylene biguanide and chlorhexidine on 10 ocular isolates of *Acanthamoeba*. *Invest. Ophthalmol. Visual. Sci.*, **40**: 933-940.
- Kim, W.T., Kong, H.H., Ha, Y.R., Hong, Y.C., Jeong, H.J., Yu, H.S., Chung, D.I. (2006).** Comparison of specific activity and cytopathic effects of purified 33 KDa serine proteinase from *Acanthamoeba* strains with different degree of virulence. *Korean J. Parasitol.*, **44**: 321-330.
- Kliescikova, J., Kulda, J., Nohynkova, E. (2011a).** Stress-induced pseudocyst formation – a newly identified mechanism of protection against organic solvents in *Acanthamoebae* of the T4 genotype. *Protist.*, **162**: 58-69.
- Kliescikova, J., Kulda, J., Nohynkova, E. (2011b).** Propylene glycol and contact-lens solutions containing this diol induce pseudocyst formation in *Acanthamoebae*. *Exp. Parasitol.*, **127**: 326-328.
- Köhler, M., Leitsch, D., Fürnkranz, U., Duchene, M., Aspöck, H., Walochnik, J. (2008).** *Acanthamoeba* strains lose their abilities to encyst synchronously upon prolonged axenic culture. *Parasitol. Res.*, **102**: 1069-1072.

**Krishna-Murti, C.R. & Shukla, O.P. (1984).** Differentiation of pathogenic amoebae : encystation and excystation of *Acanthamoeba culbertsoni* – A model. *J. Biosci.*, **6(4)**: 475-489.

**Krishna-Prasad, B.N. & Gupta, S.K. (1978).** Preliminary report on engulfment and retention of Mycobacteria by trophozoites of axenically grown *Acanthamoeba castellanii* Douglas. *Curr. Sci.*, **47**: 245-247.

**Kuiper, M.W., Wullings, B.A., Akkermans, A.D., Beumer, R.R., van der Kooij, D. (2004).** Intracellular proliferation of *Legionella pneumophila* in *Hartmannella vermiformis* in aquatic biofilms grown on plasticized polyvinyl chloride. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**: 6826-6833.

**Kuchta, J.M., Navratil, J.S., Shepherd, M.E., Wadowsky, R.M., Dowling, J.N., States, S.J., Yee, R.B. (1993).** Impact of chlorine and heat on the survival of *Hartmannella vermiformis* and subsequent growth of *Legionella pneumophila*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59(12)**: 4096-4100.

**Kyle, D.E & Noblet, G.P. (1986).** Seasonal distribution of thermotolerant free-living amoebae. I. Willard's pond. *J. Protozool.*, **33**: 422-434.

**Lahiri, R. & Krahenbuhl, J.L. (2008).** The role of free-living pathogenic amoeba in the transmission of leprosy: a proof of principle. *Leprosy Rev.*, **79**: 401-409.

**Langlais, B. & Perrine, D. (1986).** Action of ozone on trophozoites and free amoeba cysts, whether pathogenic or not. *Ozone-Sci. Eng.*, **8**: 187-198.

**La Scola, B., Audic, S., Robert, C., Jungang, L., De Lamballerie, X., Drancourt, M., Birtles, R., Claverie, J.M. et al. (2003).** A giant virus in amoebae. *Science*, **299(5615)**: 2033.

**La Scola, B., Marrie, T.J., Auffray, J.P., Raoult, D. (2005).** Mimivirus in pneumonia patients. *Emerg. Infect. Dis.*, **11**: 449-452.

**La Scola, B., Desnues, C., Pagnier, I., Robert, C., Barrassi, L., Fournous, G., Merchat, M., Suzan-Monti, M. et al. (2008).** The virophage as a unique parasite of the giant mimivirus. *Nature*, **455(7209)**: 100-104.

- Lasheras, A., Boulestreau, H., Rogues, A.M., Ohayon-Courtes, C., Labadie, J.C., Gachie, J.P. (2006).** Influence of amoebae and physical and chemical characteristics of water on presence and proliferation of *Legionella* species in hospital water systems. *Am. J. Infect. Control*, **34**: 520-525).
- Lasman, M. & Shafran, A. (1978).** Induction of encystment in *Acanthamoeba palestinensis*. *J. protozool.*, **25(4)**: 489-491.
- Lawande, R.V. (1983).** Recovery of soil amoebae from the air during the harmattan in Zaria, Nigeria. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **77**: 45-49.
- Lee X, Reimann C, Greub G, Sufirin J, Croxatto A. (2012).** The *Pseudomonas aeruginosa* toxin L-2-amino-4-methoxy-trans-3-butenoic acid inhibits growth and induces encystment in *Acanthamoeba castellanii*. *Microbes Infect.*, **14(3)**:268-72.
- Leitsch, D., Kohler, M., Marchetti-Deschmann, M., Deutsch, A., Allmaier, G., Duchene, M., Walochnik J. (2010).** Major role for cysteine proteases during the early phase of *Acanthamoeba castellanii* encystment. *Eukaryot. Cell.*, **9**: 611-618.
- Lemgruber, L., Lupetti, P., De Souza, W., Vommaro, R.C., da Rocha-Azevedo, B. (2010).** fine structure of the *Acanthamoeba polyphaga* cyst wall. *FEMS Microbiol. Lett.*, **305**: 170-176.
- Leroy, C., Delbarre, C., Ghillebaert, F., Compere, C., Combes, D. (2008a).** Effects of commercial enzymes on the adhesion of a marine biofilm-forming bacterium. *Biofouling.*, **24(1)**:11-22.
- Leroy, C., Delbarre, C., Ghillebaert, F., Compere, C., Combes, D. (2008b).** Influence of subtilisin on the adhesion of a marine bacterium which produces mainly proteins as extracellular polymers. *J. Appl. Microbiol.*, **(3)**:791-9.
- Linder, M., Winiecka-Krusnell, J., Linder, E (2002).** Use of recombinant cellulose-binding domains of *Trichoderma reesei* cellulase as a selective immunocytochemical marker for cellulose in protozoa. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68(5)**: 2503-2508.

- Lloyd, D., Turner, N.A., Khunkitti, W., Hann, A.C., Furr, J.R., Russell, A.D. (2001). Encystation in *Acanthamoeba castellanii*: development of biocide resistance. *J. Eukaryotic Microbiol.*, **48**: 11-16.
- Lonnen, J., Kilvington, S., Kehoe, S.C., Al-Touati, F., McGuigan, K.G. (2005). Solar and photocatalytic disinfection of protozoan, fungal and bacterial microbes in drinking water. *Water Res.*, **39**: 877-883.
- Lorenzo-Morales, J., Coronado-Alvarez, N., Martinez-Carretero, E., Maciver, S.K., Valladares, B. (2007a). Detection of four adenovirus serotypes within water-isolated strains of *Acanthamoeba* in the Canary Islands, Spain. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **77**(4): 753-756.
- Lorenzo-Morales, J., Martínez-Carretero, E., Batista, N., Alvarez-Marín, J., Bahaya, Y., Walochnik, J., Valladares, B. (2007b). Early diagnosis of amoebic keratitis due to a mixed infection with *Acanthamoeba* and *Hartmannella*. *Parasitol. Res.*, **102**(1): 167-169.
- Lorenzo-Morales, J., Kliescikova, J., Martinez-Carretero, E., De Pablos, L.M., Profotova, B., Nohynkova, E., Osuna, A., Valladares, B. (2008). Glycogen phosphorylase in *Acanthamoeba* spp.: determining the role of the enzyme during the encystment process using RNA interference. *Eukaryot. Cell.*, **7**: 509-517.
- Loret, J.F., Robert, S., Thomas, V., Cooper, A.J., McCoy, W.F., Lévi, Y. (2005). Comparison of disinfectants for biofilm, protozoa and *Legionella* control. *J. Water Health*, **3**(4): 423-433.
- Loret, J.F., Jousset, M., Robert, S., Anselme, C., Saucedo, G., Ribas, F., Martinez, L., Catalan, V. (2008a). Elimination of free-living amoeba by drinking water treatment processes. *Eur. J. Water Qual.*, **39**(1): 37-50.
- Loret, J.F., Jousset, M., Robert, S., Saucedo, G., Ribas, F., Thomas, V., Greub, G. (2008b). Amoebae-resisting bacteria in drinking water : risk assessment and management. *Water Sci. Technol.*, **58**: 571-577.

**Loret, J. F. & Greub, G. (2010).** Free-living amoebae: Biological by-passes in water treatment. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, **213**: 167-175.

**Loschiavo, F., Ventura-Spagnolo, T., Sessa, E., Bramanti, P. (1993).** Acute primary meningoencephalitis from *entamoeba Naegleria fowleri*. Report of a clinical case with a favourable outcome. *Acta. Neurol.*, **15**: 333-340.

**Ludwig, I.H., Meisler, D.M., Rutherford, I., Bican, F.E., Langston, R.H., Visvesvara, G.S. (1986).** Susceptibility of *Acanthamoeba* to soft contact lens disinfection systems. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **27**: 626-628.

**Ly, T.M. & Muller, H.E. (1990).** Ingested *Listeria monocytogenes* survive and multiply in protozoa. *J. Med. Microbiol.*, **33**: 51-54.

**Makioka, A., Kumagai, M., Hiranuka, K., Kobayashi, S., Takeuchi, T. (2011).** *Entamoeba invadens*: identification of ADF/cofilin and their expression analysis in relation to encystation and excystation. *Exp. Parasitol.*, **127**: 195-201.

**Marciano-Cabral, F. (1988).** Biology of *Naegleria* spp.. *Microbiol. Rev.*, **52**: 114-133.

**Marciano-Cabral, F. & Cabral, G. (2003).** *Acanthamoeba* spp. As agents of disease in humans. *Clin. Microbiol. Rev.*, **16**: 273-307.

**Marciano-Cabral, F., Jamerson, M., Kaneshiro, E.S. (2010).** Free-living amoebae, Legionella and Mycobacterium in tap water supplied by a municipal drinking water utility in the USA. *J. Water Health*, **8**: 71-82.

**Malliaris, S.D., Steenbergen, J.N., Casadevall, A. (2004).** *Cryptococcus neoformans* var. gattii can exploit *Acanthamoeba castellanii* for growth. *Med. Mycol.*, **42(2)**:149-58.

**Martin-Navarro, C.M., Lorenzo-Morales, J., Lopez-Arencibia, A., Valladares B. (2010).** *Acanthamoeba* spp. : Efficacy of Bioclen FR One Step®, a povidone-iodine based system for the disinfection of contact lenses. *Exp. Parasitol.*, **126**: 109-112.



**Martinez, A.J. & Janitschke, K. (1985).** *Acanthamoeba*, an opportunistic microorganism: a review. *Infection*, **13(6)**: 251-256.

**Martinez, A.J. (1991).** Infection of the central nervous system due to *Acanthamoeba*. *Rev. Infect. Dis.*, **13(5)**: 399-402.

**Martinez, A.J. & Visvesvara, G.S. (1997).** Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. *Brain Pathol.*, **7(1)**: 583-598.

**Martinez, M.S., Gonzalez-Mediero, G., Santiago, P., Rodriguez de Lope, A., Diz, J., Conde, C., Visvesvara, G.S. (2000).** Granulomatous amebic encephalitis in a patient with AIDS: Isolation of *Acanthamoeba* sp. group II from brain tissue and successful treatment with sulfadiazine and fluconazole. *J. clin. Microbiol.*, **38(10)**: 3892-3895.

**Matin, A., Jeong, S.R., Stins, M., Khan, N.A. (2007).** Effects of human serum on *Balamuthia mandrillaris* interactions with human brain microvascular endothelial cells. *J. Med. Microbiol.*, **56**: 30-35.

**Mattana, A., Serra, C., Mariotti, E., Delogu, G., Fiori, P.L., Cappuccinelli, P. (2006).** *Acanthamoeba castellanii* promotion of in vitro survival and transmission of coxsackie b3 viruses. *Eukaryot. Cell*, **5**: 665-671.

**Mattar, F.E. & Byers, T.J. (1971).** Morphological changes and the requirements for macromolecule synthesis during excystment of *Acanthamoeba castellanii*. *J. Cell Biol.*, **49**: 507-519.

**Matoba, A.Y., Pare, P.D., Le, T.D., Osato, M.S. (1989).** The effects of freezing and antibiotics on the viability of *Acanthamoeba* cysts. *Arch. Ophtalmol.*, **107(3)**: 439-440.

**Maya, C., Beltran, N., Jimenez, B., Bonilla, P. (2003).** Evaluation of the UV disinfection process in bacteria and amphizoic amoeba inactivation. *Water Sci. technol.*, **3**: 285-291.

**McDonnell, G. (2007).** *Antisepsis, Disinfection and Sterilization : Types, Action and Resistance.* ASM Press, Washington, DC.

- Mehdi, H. & Garg, N.K. (1987).** Changes in the lipid composition and activities of isocitrate dehydrogenase and isocitrate lyase during encystation of *Acanthamoeba culbertsoni* strain A-1. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **81**: 633-636.
- Meisler, D.M., Rutherford, I., Bican, F.E., Ludwig, I.H., Langston, R.H., Hall, G.S., Rhinehart, E., Visvesvara, G.S. (1985).** Susceptibility of *Acanthamoeba* to surgical instrument sterilization techniques. *Am. J. Ophthalmol.*, **99**: 724-725.
- Meisler, D.M., Ludwig, I.H., Rutherford, I., Bican, F.E., Langston, R.H., Visvesvara, G.S. (1986).** Susceptibility of *Acanthamoeba* to cryotherapeutic method. *Arch. Ophthalmol.*, **104(1)**: 130-131.
- Miller, M.B. & Bassler, B.L. (2001).** Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, **55**: 165-199.
- Mogoa, E., Bodet, C., Legube, B., Héchard, Y. (2010).** *Acanthamoeba castellanii* : cellular changes induce by chlorination. *Exp. Parasitol.*, **126**: 97-102.
- Moon, E.K., Chung, D.I., Hong, Y.C., Kong, H.H., (2007).** Differentially expressed genes of *Acanthamoeba castellanii* during encystation. *Korean J. Parasitol.*, **45**: 283-285.
- Moon, E.K., Chung, D.I., Hong, Y.C., Kong, H.H., (2008a).** Characterization of a serine proteinase mediating encystation of *Acanthamoeba*. *Eukaryot. Cell*, **7**:1513-1517.
- Moon, E.K., Chung, D.I., Hong, Y.C., Ahn, T.I., Kong, H.H., (2008b).** *Acanthamoeba castellanii*: gene profile of encystation by ESTs analysis and KOG assignment. *Exp. Parasitol.*, **119**: 111-116.
- Moon, E.K., Chung, D.I., Hong, Y.C., Kong, H.H., (2009).** Autophagy protein 8 mediating autophagosome in encysting *Acanthamoeba*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **168**: 43-48.
- Moon, E.K., Chung, D.I., Hong, Y.C., Kong, H.H., (2011).** Expression levels of encystation mediating factors in fresh strain of *Acanthamoeba castellanii* cyst ESTs. *Exp. Parasitol.*, **127**: 811-816.

- Murga, R., Forster, T.S., Brown, E., Pruckler, J.M., Fields, B.S., Donlan, R.M. (2001).** Role of biofilms in the survival of *Legionella pneumophila* in a model-water system. *Microbiology (Reading, England)*, **147**: 3121-3126.
- Murti, C.R. (1975).** Molecular biology of amoebic encystment. *Indian J. Med. Res.*, **63**: 757-767.
- Murti, C.R. & Shukla, O.P. (1984).** Differentiation of pathogenic amoebae: encystation and excystation of *Acanthamoeba culbertsoni*-a model. *J. Biosci.*, **6**: 475-489.
- Neal, R.A. (1960).** Enzymic proteolysis by *Entamoeba histolytica*; biochemical characteristics and relationship with invasiveness. *Parasitol.*, **50**: 531-550.
- Neff, J.R., Ray, S.A., Benton, W.F., Wilborn, M. (1964).** Induction of synchronous encystment (differentiation) in *Acanthamoeba* sp.. In: Prescott DM (ed) *Methods in cell physiology*. Academic press Inc., New York pp 55-83.
- Neff, J.R. & Neff, R.H. (1969).** The biochemistry of amoebic encystment. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **23**: 51-81.
- Nieder Korn, J.Y., Alizadeh, H., Leher, H., McCulley, J.P. (1999).** The pathogenesis of *Acanthamoeba* keratitis. *Microbes Infect.*, **1**: 437-443.
- Niszl, I.A. & Markus, M.B. (1998).** Anti-*Acanthamoeba* activity of contact lens solutions. *Br. J. Ophthalmol.*, **82**: 1033-1038.
- Osato, M.S., Robinson, N.M., Wilhelmus, K.R., Jones, D.B. (1991).** In vitro evaluation of antimicrobial compounds for cysticidal activity against *Acanthamoeba*. *Rev. Infect. Dis.*, **13(5)**: 431-435.
- 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. *J. Biol. Chem.*, **279(15)**: 15621-15629.

Ovrutsky, A.R., Chan, E.D., Kartalija, M., Bai, X., Jackson, M., Gibbs, S. Falkinham, J.O. 3<sup>rd</sup>, Iseman, M.D., Reynolds, P.R., McDonnell, G., Thomas, V. (2013). Cooccurrence of free-living amoebae and nontuberculous mycobacteria in hospital water networks, and preferential growth of *Mycobacterium avium* in *Acanthamoeba lenticulata*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **79**(10): 3185-3192.

Page, F.C. (1967). Taxonomic criteria for limax amoebae, with descriptions of 3 new species of *Hartmannella* and 3 *Vahlkampfia*. *J. Protozool.*, **14**: 499-521.

Page, F.C. (1974). A further study of taxonomic criteria for limax amoebae, with descriptions of new species and a key to genera. *Arch. Protistenk.*, **116**: 149-184.

Page, F.C. (1986). The limax amoebae: comparative fine structure of the Hartmannellidae (Lobosea) and further comparisons with the Vahlkampfiidae (Heterolobosea). *Protistologica.*, **21**: 361-383.

Page, F.C. (1987). The classification of 'naked' amoebae (phylum Rhizopodia). *Arch. Protistenk.*, **133**: 199-217.

Parija, S.C. & Jayakeerthee, S.R. (1999). *Naegleria fowleri*: a free living amoeba of emerging medical importance. *J. Commun. Dis.*, **31**(3): 153-159.

Park, J., Jeong, Y., Ahn, T. (2002). Changes in profiles of major proteins in encysting *Acanthamoeba castellanii*. *Korean J. Biol. Sci.*, **6**: 341-347.

Pasternak, J.J., Thompson, J.E., Schultz, T.M.G., Zachariah, K. (1970). A scanning electron microscopic study of the encystment of *Acanthamoeba castellanii*. *Exp. Cell Res.*, **60**(2): 290-298.

Penley, C.A., Willis, S.W., Sickler, S.G. (1989). Comparative antimicrobial efficacy of soft and rigid gas permeable contact lens solutions against *Acanthamoeba*. *CLAO J.*, **15**: 257-260.

**Perrine, D., Chenu, J.P., Georges, P., Lancelot, J.C., Saturnino, C., Robba, M. (1995).** Amoebicidal efficiencies of various diamidines against two strains of *Acanthamoeba polyphaga*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **39(2)**: 339-342.

**Philippe, C., Blech, M.F., Hartemann, P. (2006).** [Intra-amoebal development of *Legionella pneumophila* and the potential role of amoebae in the transmission of Legionnaire's disease]. *Med. Mal. Infect.*, **36**: 196-200.

**Potter, J. L. & Weisman, R.A. (1971).** Differentiation in *Acanthamoeba*: beta-glucan synthesis during encystment. *Biochim. Biophys. Acta.*, **237**: 65-74.

**Proca-Ciobanu, M., Lupascu, G.H., Petrovici, A., Ionescu, M.D. (1975).** Electron microscopy study of a pathogenic *Acanthamoeba castellanii* strain: the presence of bacterial endosymbionts. *Int. J. Parasitol.*, **5(1)**: 49-56.

**Pumidonming, W., Koehsler, M., Walochnik, J. (2010).** *Acanthamoeba* strains show reduced temperature tolerance after long-term axenic culture. *Parasitol. Res.*, **106**: 553-559.

**Puytorac, P.D., Grain, J., Mignot, J.P. (1987).** *Précis de protistologie*. Boubée ed., Paris.

**Raizada, M.K. & Murti, C.R. (1971).** Changes in the activity of certain enzymes of *Hartmannella* (Culbertson strain A-1) during encystment. *J. Protozool.*, **18(1)**: 115-119.

**Raizada, M.K. & Murti, C.R. (1972a).** Transformation of trophic *Hartmannella culbertsoni* into viable cysts of cyclic 3',5'-adenosine monophosphate. *J. Cell. Biol.*, **52**: 743-748.

**Raizada, M.K. & Murti, C.R. (1972b).** Synthesis of RNA, protein, cellulose, and mucopolysaccharide and changes in the chemical composition of *Hartmannella culbertsoni* during encystment under axenic conditions. *J. Protozool.*, **19**: 691-695.

**Raoult, D., La Scola, B., Birtles, R. (2007).** The discovery and characterization of Mimivirus, the largest known virus and putative pneumonia agent. *Clin. Infect. Dis.*, **45(1)**: 95-102.

**Reynolds, E.S. (1963).** The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.*, **17(1)**: 208-12.

**Rivera, F., Galvan, M., Robles, E., Leal, P., Gonzalez, L., Lacy, A.M. (1981).** Bottled mineral waters polluted by protozoa in Mexico. *J. Protozool.*, **28**: 54-56.

**Rivera, F., Roy-Ocotla, G., Rosas, I., Ramirez, E., Bonilla, P., Lares, F. (1987).** Amoebae isolated from the atmosphere of Mexico City and environs. *Environ. Res.*, **42**: 149-154.

**Rivera, F., Ramirez, E., Bonilla, P., Calderon, A., Gallegos, E., Rodriguez, S., Ortiz, R., Zaldivar, B. et al. (1993).** Pathogenic and free-living amoebae isolated from swimming pools and physiotherapy tubs in Mexico. *Environ. Res.*, **62**: 43-52.

**Rodriguez-Zaragoza, S. (1994).** Ecology of free-living amoebae. *Crit. Rev. Microbiol.*, **20**: 225-241.

**Rohr, U., Weber, S., Michel, R., Selenka, F., Wilhelm, M. (1998).** Comparison of free-living amoebae in hot water systems of hospitals with isolates from moist sanitary areas by identifying genera and determining temperature tolerance. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64(5)**: 1822-1824.

**Rohr, U., Weber, S., Selenka, F., Wilhelm, M. (2000).** Impact of silver and copper on the survival of amoebae and ciliated protozoa *in vitro*. *Int. Hyg. Environ. Health*, **203(1)**: 87-89.

**Rösel von Rosenhof, A.J. (1755).** *Historie der polypen und anderer kleiner wasserinsecten*. Nürnberg : Johann Joseph Flischmann.

**Rowbotham, T.J. (1980).** Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J. Clin. Pathol.*, **33**: 1179-1183.

**Rudick, V.L. (1971).** Relationship between nucleic acid synthetic patterns and encystment in aging unagitated cultures of *Acanthamoeba castellanii*. *J. Cell. Biol.*, **49**: 498.

**Santic, M., Ozanic, M., Semic, V., Pavokovic, G., Mrvcic, V., Kwaik, Y.A. (2011).** Intra-vacuolar proliferation of *F. novicida* within *H. vermiformis*. *Front. Microbiol.*, **2**: 78.

**Scaglia, M., Strosselli, M., Grazioli, V., Gatti, S., Bernuzzi, A.M., De Jonckheere, J.F. (1983).** Isolation and identification of pathogenic *Naegleria australiensis* (Amoeboda Vahlkampfiidae) from a spa in northern Italy. *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**: 1282-1285.

**Schaeffer, A.A. (1926).** Taxonomy of the amebas: with description of thirty-nine new marine and freshwater species. *Pap. Dept. Mar. Biol., Carnegie Inst. of Washington*, **24**: 1-116.

**Schardinger, F. (1899).** Entwicklungskreis einer *Amoeba lobosa* (*Gymnamoeba*): *Amoeba gruberi*. *S. K. Akad. Wiss. Wien, Math. Nat. Cl.*, **108**: 713-734.

**Schaudinn, F. (1903).** Untersuchungen über die Fortpflanzung einiger Rhizopoden. *Arb. Kasis. Gesund.*, **19**: 547-576.

**Schrive, L. (2005).** *Traitement de suspensions biologiques complexes par champs électriques pulsés - Etude des mécanismes de transfert d'énergie.* Thèse de science : Université de Montpellier II, France.

**Schuster, F. (1963).** An electron microscope study of the amoeboid-flagellate, *Naegleria gruberi* (Schardinger). II. The Cyst Stage. *J. Protozool.*, **10**: 313-320.

**Schuster, F.L. & Levandowsky, M. (1996).** Chemosensory responses of *Acanthamoeba castellanii* : visual analysis of random movement and responses to chemicals signals. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **43**: 150-158.

**Schuster, F.L. & Visvesvara, G.S. (2004).** Amebae and ciliated protozoa as causal agents of waterborne zoonotic disease. *Vet. Parasitol.*, **126**: 91-120.

**Seal, D.V., Beattie, T.K., Tomlinson, A., Fan, D., Wong, E. (2003).** *Acanthamoeba* keratitis. *Brit. J. Ophthalmol.*, **87**: 516-517.

**Segovia-Gamboa, N. C., Chavez-Munguia, B., Medina-Flores, Y., Cazares-Raga, F.E., Hernandez-Ramirez, V.I., Martinez-Palomo, A., Talamas-Rohana, P. (2010).** *Entamoeba invadens*, encystation process and enolase. *Exp. Parasitol.*, **125**: 63-69.

- Segovia-Gamboa, N. C., Talamas-Rohana, P., Angel-Martinez, A., Cazares-Raga, F.E., Gonzalez-Robles, A., Hernandez-Ramirez, V.I., Martinez-Palomo, A., Chavez-Munguia, B. (2011).** Differentiation of *Entamoeba histolytica*: A possible role for enolase. *Exp. Parasitol.*, **129**: 65-71.
- Sharma, S., Srinivasan, M., Geroge, C. (1990).** *Acanthamoeba* keratitis in non-contact lens wearers. *Arch. Ophthalmol.*, **108(5)**: 676-678.
- Sharma, S., Garg, P., Rao, G.N. (2000).** Patients characteristics, diagnosis, and treatment of non-contact lens related *Acanthamoeba* keratitis. *Brit. J. Ophthalmol.*, **84**: 1103-1108.
- Sharma, S., Sachdeva, P., Viridi, J.S. (2003).** Emerging water-borne pathogens. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **61**: 424-428.
- Siddiqui, R., Ortega-Rivas, A., Khan, N.A. (2008).** *Balamuthia mandrillaris* resistance to hostile conditions. *J. Med. Microbiol.*, **57**: 428-431.
- Siddiqui, R., Jarroll, E.L., Khan, N.A. (2010).** *Balamuthia mandrillaris*: role of galactose in encystment and identification of potential inhibitory targets. *Exp. Parasitol.*, **126**: 22-27.
- Silvany, R.E., Dougherty, J.M., McCulley, J.P., Wood, T.S., Bowman, R.W., Moore, M.B. (1990).** The effect of currently available contact lens disinfection systems on *Acanthamoeba castellanii* and *Acanthamoeba polyphaga*. *Ophthalmology*, **97**: 286-290.
- Silvany, R.E., Dougherty, J.M., McCulley, J.P. (1991).** Effect of contact lens preservatives on *Acanthamoeba*. *Ophthalmology*, **98(6)**: 854-857.
- Singh, B.N. (1952).** Nuclear division in nine species of small free-living amoebae and its bearing on the classification of the order amoebida. *Philosoph. Trans. Roy. Soc. Lond. Ser.*, **B236**: 405-461.
- Smirnov, A.V. & Michel, R. (1999).** New data on the cyst structure of *Hartmannella vermiformis* Page, 1967 (Lobosea, Gymnamoebia). *Protistology*, **1(2)**: 82-85.



**Smirnov, A.V., Chao, E., Nassonova, E.S., Cavalier-Smith, T. (2011).** A revised classification of naked lobose amoebae (Amoebozoa: Lobosa). *Protist.*, **162(4)**: 545-570.

**Sperandio, V., Torres, A.G., Jarvis, B., Nataro, J.P., Kaper, J.B. (2003).** Bacteria-host communication: the language of hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100**: 8951-8956.

**Srikanth, S. & Berk, S.G. (1993).** Stimulatory effect of cooling tower biocides on amoebae. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**: 3245-3249.

**Srivastava, D.K. & Shukla, O.P. (1983).** Encystment of *Acanthamoeba culbertsoni* by organic effectors. *Indian J. Exp. Biol.*, **21**: 444-447.

**Steenbergen, J.N., Nosanchuk, J.D., Malliaris, S.D., Casadevall, A. (2004).** Interaction of *Blastomyces dermatitidis*, *Sporothrix schenckii*, and *Histoplasma capsulatum* with *Acanthamoeba castellanii*. *Infect. Immun.*, **72**: 3478-3488.

**Steinberg, J.P., Galindo, R.L., Kraus, E.S., Ghanem, K.G. (2002).** Disseminated acanthamebiasis in a renal transplant recipient with osteomyelitis and cutaneous lesions: case report and literature review. *Clin. Infect. Dis.*, **35(5)**: 43-49.

**Stevens, A. R., Tyndall, R.L., Coutant, C.C., Willaert, E. (1977).** Isolation of the etiological agent of primary amoebic meningoencephalitis from artificially heated waters. *Appl. Environ. Microbiol.*, **34**: 701-705.

**Storey, M.V., Winiacka-Krusnell, J., Ashbolt, N.J., Stenström, T.A. (2004).** The efficacy of heat and chlorine treatment against thermotolerant *Acanthamoeba* and *Legionellae*. *Scand. J. Infect. Dis.*, **36(9)**: 656-662.

**Stott, R., May, E., Ramirez, E., Warren, A. (2003).** Predation of *Cryptosporidium* oocysts by protozoa and rotifers: implications for water quality and public health. *Wat. Sci. Technol.*, **47**: 77-83.

**Sukthana, Y., Lekkla, A., Sutthikornchai, C., Wanapongse, P., Vejjajiva, A., Bovornkitti, S. (2005).** Spa, springs and safety. Southeast. *Asian J. Trop. Med. Public Health.*, **34(4)**: 10-16.

**Sundermann, C.A. & Estridge, B.H. (2010).** Inactivation of *Giardia lamblia* cysts by cobalt-60 irradiation. *J. parasitol.*, **96(2)**: 425-428.

**Sutherland, EE. & Berk, S.G. (1996).** Survival of protozoa in cooling tower biocides. *J. Ind. Microbiol.*, **16**: 73-78.

**Sykora, J. L., Keleti, G., Martinez, A.J. (1983).** Occurrence and pathogenicity of *Naegleria fowleri* in artificially heated waters. *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**: 974-979.

**Thomas, V., Bouchez, T., Nicolas, V., Robert, S., Loret, J.F., Levi, Y. (2004).** Amoeba in domestic water systems: resistance to disinfection treatments and implication in Legionella persistence. *J. Appl. Microbiol.*, **97**: 950-963.

**Thomas, V., Herrera-Rimann, K., Blanc, D.S., Greub, G. (2006).** Biodiversity of amoebae and amoebae-resisting bacteria in a hospital water network. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**: 2428-2438.

**Thomas, V., Loret, J.F., Jousset, M., Greub, G. (2008).** Biodiversity of amoebae and amoebae-resisting bacteria in a drinking water treatment plant. *Environ. Microbiol.*, **10**: 2728-2745.

**Thomas, V. & McDonnell, G. (2008).** Efficacy of hydrogen peroxide gas against amoebal cysts and amoebae-associated mycobacteria. *Poster presented at 108<sup>th</sup> ASM General Meeting, Boston, USA, 1-5 June.*

**Thomas, V., McDonnell, G., Denyer, S.P., Maillard, J.Y. (2010).** Free-living amoebae and their intracellular pathogenic microorganisms : risk for water quality. *FEMS Microbiol. Rev.*, **34(3)**: 231-259.

**Thomas, V., Bertelli, C., Collyn, F., Casson, N., Telenti, A., Goesmann, A., Croxatto, A., Greub, G. (2011).** Lausannevirus, a giant amoebal virus encoding histone doublets. *Environ. Microbiol.*, **13(6)**: 1454-1466.

**Tiewchaloren, S., Junnu, V., Chinabut, P. (2002).** In vitro effect of antifungal drugs on pathogenic *Naegleria* spp.. *Southeast Asian J. Trop. Med. Publi. Health*, **3**: 38-41.

- Tiewchaloren, S. & Junnu, V. (1999).** Factors affecting the viability of pathogenic *Naegleria* species isolated from Thai patients. *J. Trop. Med. Parasitol.*, **22(1)**: 15-21.
- Tomlinson, G. & Jones, E.A., (1962).** Isolation of cellulose from the cyst wall of a soil amoeba. *Biochim. Biophys. Acta.*, **63**: 194-200.
- Trabelsi, H., Sellami, A., Dendena, F., Sellami, H., Cheikh-Rouhou, F., Ben, D.S., Ayadi, A. (2010).** Free-living amoebae (FLA): morphological and molecular identification of *Acanthamoeba* in dental unit water. *Parasite (Paris, France)*, **17**: 67-70.
- Turner, N.A., Russel, A.D., Furr, J.R., Lloyd, D. (2000).** Emergence of resistance to biocides during differentiation of *Acanthamoeba castellanii*. *J. Antimicrob. Chemoth.*, **46**: 27-34.
- Tyndall, R. L. (1985).** Pathogenic organisms in thermally altered reservoirs and other waters. In D. Gunnison (ed.). *Microbial processes in reservoirs*. Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht, The Netherlands, p. 135-154.
- Tyndall, R. L., Ironside, K.S., Metler, P.L., Tan, E.L., Hazen, T.Z., 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. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**: 722-732.
- Upadhyay, J. M., Crow, S. & Cox, A. (1984).** The cyst wall composition of *Hartmannella glebae*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **175**: 424-428.
- Venkataraman, C., Haack, B.J., Bondada, S., Abu Kwaik, Y. (1997).** Identification of a Gal/GalNAc lectin in the protozoan *Hartmannella vermiformis* as a potential receptor for attachment and invasion by the Legionnaires' disease bacterium, *Legionella pneumophila*. *J. Exp. Med.*, **186**: 537-547.
- Venkataraman, C., Gao, L.Y., Harb, O.S. (1998).** Identification of putative cytoskeletal protein homologues in the protozoan *Hartmannella vermiformis* as substrates for induced tyrosine phosphatase activity upon attachment to the Legionnaires' disease bacterium, *Legionella pneumophila*. *J. Exp. Med.*, **188**: 505-514.

- Venkataraman, C. & Abu Kwaik, Y. (2000).** Signal induction in the protozoan host *Hartmannella vermiformis* upon attachment to *Legionella pneumophila*. *Microbes Infect.*, **2**: 867-875.
- Verani, J.R., Lorick, S.A., Yoder, J.S., Beach, M.J., Braden, C.R., Roberts, J.M. et al. (2009).** National outbreak of *Acanthamoeba* keratitis associated with use of a contact lens solution, United States. *Emerg. Infect. Dis.*, **15**: 1236-1242.
- Verma, A. K., Raizada, M.K. & Krishna-Murti, C.R. (1974).** Effect of bioamines on the cellular differentiation of *Hartmannella culbertsoni*. *Biochem. Pharmacol.*, **23**: 57-63.
- Vernhes, M.C., Benichou, A., Pernin, P., Cabanes, P.A., Teissié, J. (2002).** Elimination of free-living amoebae in fresh-water with pulsed electric fields. *Water Res.*, **36**: 3429-3438.
- Vesaluoma, M., Kalso, S., Jokipii, L., Warhurst, D., Ponka, A., Tervo, T. (1995).** Microbiological quality in Finnish public swimming pools and whirlpools with special reference to free living amoebae : a risk factor for contact lens wearers ? *Br. J. Ophthalmol.*, **79**: 178-181.
- Visvesvara, G.S., Martinez, A., Schuster, F.L., Leitch, G.J., Wallace, S.V., Sawyer, T.K., Anderson, M. (1990).** *Leptomyxid ameba*, a new agent of amebic meningoencephalitis in humans and animals. *J. Clin. Microbiol.*, **28**: 2750-2756.
- Visvesvara, G.S., Schuster, F.L., Martinez, A. (1993).** *Balamuthia mandrillaris*, N. G., N. sp., agent of amebic meningoencephalitis in humans and other animals. *J. Euk. Microbiol.*, **40**: 504-514.
- 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 Immunol. Med. Microbiol.*, **50**: 1-26.
- Volkonsky, M. (1931).** *Hartmannella castellanii* Douglas, et classification des Hartmannelles. *Arch. Zool. Exp. Gen.*, **72**: 317-329.
- Von Gunten, U. (2003).** Ozonation of drinking water : Part I. Oxidation kinetics and product formation. *Water Res.*, **37**: 1443-1467.

**von Prowazek, S., Ehrlich, P., Fülleborn F. et al. (1912).** *Handbuch der pathogenen protozoen.* Leipzig : J. A. Barth, volume 1, 515.

**Wadowsky, R.M., Butler, L.J., Cook, M.K., Verma, S.M., Paul, M.A., Fields, B.S., Keleti, G., Sykora, J.L. et al. (1998).** Growth-supporting activity for *Legionella pneumophila* in tap water cultures and implication of hartmannellid amoebae as growth factors. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**: 2677-2682.

**Wang, A., Kay, R., Poon, W.S., Ng, H.K. (1993).** Successful treatment of amoebic meningoencephalitis in a Chinese living Hong Kong. *Clin. Neurol. Neurosurg.*, **95**: 249-252.

**Weisman, R.A. (1976).** Differentiation in *Acanthamoeba castellanii*. *Annu. Rev. Microbiol.*, **30**: 189-219.

**Wenyon, C.M. & O'Connor, F.W. (1917).** *Human intestinal protozoa in the near east.* London : John Bale, Sons & Danielsson, 218.

**Whan, L., Grant, I.R., Rowe, M.T. (2006).** Interaction between *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis and environmental protozoa. *BMC Microbiology*, **6**: 63.

**Wickramanayake, G.B., Rubin, A.J., Sproul, O.J. (1984).** Inactivation of *Naegleria* and *Giardia* cysts in water ozonation. *J. Water Pollut. Con. F.*, **56**: 983-988.

**Willaert, E., Stevens, A.R., Healy, G.R. (1978).** Retrospective identification of *Acanthamoeba culbertsoni* in a case of amoebic meningoencephalitis. *J. Clin. Pathol.*, **31**: 717-720.

**Winiiecka-Krusnell, J., Wreiber, K., von Euler, A., Engstrand, L., Linder, E. (2002).** Free-living amoebae promote growth and survival of *Helicobacter pylori*. *Scand. J. Infect. Dis.*, **34**: 253-256.

**Winiiecka-Krusnell, J., Dellacasa-Lindberg, I., Dubey, J.P., Barragan, A. (2009).** *Toxoplasma gondii* : uptake and survival of oocysts in free-living amoeba. *Exp. Parasitol.*, **121**: 124-131.

**Wysenbeek, Y.S., Blank-Porat, D. Harizman, N., Wagnanski-Jaffe, T., Keller, N., Avni, I. (2000).** The reculture technique: individualizing the treatment of *Acanthamoeba* keratitis. *Cornea*, **19**: 464-467.

**Yu, H.S., Jeong, H.J., Hong, Y.C., Seol, S.Y., Chung, D.I., Kong, H.H. (2007).** Natural occurrence of *Mycobacterium* as an endosymbiont of *Acanthamoeba* isolated from a contact lens storage case. *Korean J. Parasitol.*, **45(1)**: 11-18.

**Zanetti, S., Fiori, P.L., Pinna, A., Usai, S., Carta, F., Fadda, G. (1995).** Susceptibility of *Acanthamoeba castellanii* to contact lens disinfecting solutions. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **39**: 1596-1598.

## Les processus de différenciation et la résistance des kystes aux traitements de désinfection chez l'amibe libre *Vermamoeba vermiformis*

*V. vermiformis* est une amibe libre répandue dans l'environnement et les milieux artificiels comme les réseaux d'eau chaude sanitaire (RECS). Il est maintenant bien établi qu'elle joue un rôle de réservoir pour des bactéries pathogènes, comme *L. pneumophila*. Le contrôle de *V. vermiformis* dans les RECS représente donc un enjeu sanitaire important. Les amibes libres peuvent passer d'une forme métaboliquement active (trophozoïte) à une forme de résistance, le kyste, lorsque les conditions sont défavorables ce qui leur confère une résistance aux traitements. Malgré la haute prévalence de *V. vermiformis* dans les RECS, les processus de différenciation et la résistance de ses kystes aux traitements n'ont été que peu étudiés. Nous avons donc investigué les changements morphologiques et ultrastructuraux qui s'opèrent lors de l'enkystement et déenkystement de *V. vermiformis*. Il en ressort que l'enkystement est un phénomène rapide (9 h) qui conduit à la formation de kystes entourés d'une paroi double couche. Lors du déenkystement, les trophozoïtes n'émergent pas à travers un ostiole comme c'est le cas chez *Acanthamoeba*. Puis, nous avons étudié l'effet des conditions environnementales et de la concentration cellulaire sur l'enkystement. Nous avons observé que plus la concentration cellulaire est élevée plus l'enkystement est rapide, ce qui suggère l'existence de mécanismes de communication intercellulaire. Enfin, nous avons étudié la résistance des kystes aux traitements utilisés dans les RECS et aux protéases. Ces traitements étaient efficaces, *in vitro*, pour inactiver les kystes de *V. vermiformis*. Ces travaux ont permis d'apporter des connaissances de bases sur les processus de différenciation et la résistance des kystes de *V. vermiformis*, une amibe libre peu étudiée.

**Mots clés :** *Vermamoeba vermiformis*, amibe libre, enkystement, déenkystement, microscopie électronique, communication intercellulaire, traitement de désinfection, réseau d'eau chaude sanitaire.

## The processes of differentiation and resistance of cysts to disinfection treatments in the free-living amoeba *Vermamoeba vermiformis*

*Vermamoeba vermiformis* is a free-living amoeba (FLA) widespread in the environment and artificial environments such as hot water networks. It is now well established that it acts as a reservoir for many pathogenic bacteria, such as *Legionella pneumophila*. The control of *V. vermiformis* in artificial environments represents an important health issue. FLA can turn from a metabolic active form (trophozoite) to a resistance form, called cyst, when conditions are unfavorable. Cysts are more resistant to treatments. Despite the high prevalence of *V. vermiformis* in hot water networks, the processes of differentiation and the resistance of cysts to disinfection treatments have been poorly studied. Therefore we investigated morphological and ultrastructural changes occurring during encystment and excystment of *V. vermiformis*. It appears that encystment is a fast process (9 h) which leads to the formation of cysts surrounded by a double-layered wall. During excystment, trophozoites do not emerge through an ostiole as is the case with *Acanthamoeba*. Then, we studied the effect of environmental conditions and cell concentration on encystment. We observed that the higher cell concentration was, the faster the encystment was, which suggests the existence of intercellular communication. Finally, we studied the resistance of cysts to conventional disinfection treatments used in hot water networks and to innovative treatment with proteases. These treatments were effective, *in vitro*, to inactivate *V. vermiformis* cysts. This work provides new finding regarding differentiation processes and cysts resistance of *V. vermiformis*, a free-living amoeba poorly studied.

**Keywords:** *Vermamoeba vermiformis*, free-living amoeba, encystment, excystment, electron microscopy, intercellular communication, disinfection treatment, hot water network.