

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE MOULOUD MAMMERI DE TIZI OUZOU

Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques



Département des Sciences Biologiques

Mémoire de projet de fin d'études pour l'obtention du diplôme de

Master en Biologie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Parasitologie

Présenté par :

CHABANE RAZIKA

Thème :

**Étude de l'importance des amibes libres présentes dans les sources
thermales et bains maures dans la région de Tizi -Ouzou**

Devant le jury composé de :

Mr. K. SIFER	MAA-FSBSA/UMMTO	Président
Mme N. LAAMA-EDDAIKRA	MR - IPA	Promotrice
Mr. M. BOUKHEMZA	PR -FSBSA/UMMTO	Co-promoteur
Mr. A. K. MOULOUA	MCA-FSBSA/UMMTO	Examineur

Année universitaire : 2022-2023

Remerciements

Je remercie Dieu de m'avoir donné l'envie et d'avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui. C'est grâce à lui que ce présent travail a vu le jour.

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde gratitude à ma promotrice Mme LAAMA-EDDAIKRA N. maître de recherche de laboratoire à l'Institut Pasteur d'Alger d'avoir cru en moi et de d'avoir proposé le sujet de mon mémoire. Je lui remercie aussi de son suivi permanent de mon travail, ses remarques et suggestions et son temps précieux qu'elle m'a consacré.

Je me ferai un agréable devoir de remercier mon Co-promoteur Mr. BOUKHEMZA, Professeur à la Faculté des Sciences biologiques et sciences agronomiques de l'université de Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou pour avoir dirigé ce travail de recherche et m'avoir fait bénéficier de ses précieux conseils.

Je suis sensible à l'honneur que me fait Mr. K. SIFER, de présider le jury de ce travail. Qu'il veuille accepter mon profond respect et mon immense estime.

Je suis particulièrement heureuse que Mr. MOULOUA. A. K, me fasse l'honneur de faire partie du jury de ce travail. Qu'elle trouve ici l'expression de mes sentiments les plus distingués.

Un énorme Merci à madame BENABBOU pour ses conseils et son soutien tous le long de mon stage à l'IPA.

Et à mademoiselle MARIA DEKAR pour son précieux aide, et ça grande générosité tout au long tu travaille

Mes remerciements s'adressent aussi à tous les membres de laboratoire d'Eco épidémiologie Parasitaire Et Génétique des populations qui m'ont aidée et soutenue, et pour tous les membres de laboratoire d'analyse microbiologique des eaux de l'IPA également qui m'ont soutenu tout au long du travail malgré tous les obstacles.

Dédicaces

Je dédie ce mémoire à :

À ma chère mère qui m'a quitté très tôt que Dieu t'accueille dans son vaste paradis tu as su me porter les soins et consentir les efforts pour mon éducation. Aucune dédicace ne saurait exprimer tout le respect et l'amour que je te porte.

À mon cher père malgré tes grandes responsabilités et toutes les épreuves difficiles auxquelles tu as fait face, tu as toujours été près de moi, pour m'écouter, me soutenir, me suivre et m'encourager. Puisse ce travail diminuer tes souffrances et te porter bonheur.

À mon cher frère et à ma chère sœur je vous réserve la plus grande partie de ce travail. Vous avez toujours été pour moi d'une aide précieuse. Je vous remercie pour tous les bienfaits que chacun a pu faire pour moi.

À toute ma famille mes tantes et oncles, merci pour le soutiens.

Un spécial remerciement à madame N. BOUKHEMZA, pour tout ce qu'elle m'a apporté le long de mon cursus universitaire et pour tous mes enseignants et enseignantes qui m'ont illuminé mon chemin.

À tous mes amis et camarades de classe, puisse Dieu conserver notre amitié.

J'en profite pour glisser une pensée pour mes grands-parents ceux qui n'ont pas pu voir cet aboutissement.

Résumé

Les amibes libres sont des eucaryotes protozoaires, cosmopolites et ubiquitaires dans les habitats hydriques. Ils sont responsables de pathologies sévères mais exceptionnelles, telles que la méningoencéphalite amibienne primitive induite par *Naegleria fowleri* ou l'encéphalite granulomateuse amibienne causée par *Acanthamoeba* spp. Ou *Balamuthia mandrillaris*. Nous avons analysé les amibes dans diverses sources d'eau, telles que les sources thermales, les puits, les réseaux d'eau, et les bains maures, et nous les avons identifiés par leur morphologie, et par une coloration, nous avons effectué par la suite une observation microscopique. *Acanthamoeba* spp a été détecté avec un pourcentage de 70%, avec d'autres formes d'amibes libres atypiques. Et notre travail a été complété par une identification moléculaire par extraction d'ADN à l'aide de deux kits différents, en contrôlant la pureté de l'ADN par électrophorèse sur gel. Enfin nous avons effectué une PCR avec des amorces spécifiques JDP et Nae et nous avons confirmé l'identification d'*Acanthamoeba* spp et *Naegleria* par cette technique moléculaire. Nous avons également confirmé la présence de *Légionella pneumophila* séroroupe1 et *Légionella* spp séroroupe 7, dans les mêmes prélèvements de biofilms contenant des amibes libres, ce qui nous confirme une potentiel association entre les deux microorganismes.

Mots-clés : Amibes libres, bains chauds, sources, puits, identification, *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Legionella*

Sommaire

Remerciements

Dédicaces

Résumé

Sommaire

Liste de figures

Liste de tableaux

Liste des abréviations

Introduction	1
Généralités.....	3
1.Classification	3
2.Reproduction.....	3
3.Nutrition.....	4
4.Les espèces d'amibes libres	4
4.1. <i>Acanthamoeba spp</i>	4
4.2. <i>Naegleria</i>	6
4.3. <i>Balamuthia mandrillaris</i>	8
4.4. <i>Sappinia spp</i>	10
4.5. <i>Vermamoeba vermiformis</i>	12
5. Les biofilms.....	13
5.1. Association entre les pathogènes et les amibes.....	13
5.2. Légionelle.....	14
Matériel et méthodes	15
1. Méthode	16
2.1. Mise en culture.....	16
2.2. Filtration.....	17
2.3. Isolement des amibes.....	17
2.4. Culture des légionelles.....	17
2.5. Culture et Repiquage des amibes libres isolées.....	18
2.6. Observation sous microscope inversé des boites de culture et de repiquage.....	18

2.7. Identification morphologique.....	18
2.8. Test de flagellation.....	20
2.9. Coloration avec Giemsa.....	20
3. Identification moléculaire des amibes libres.....	20
3.1. Extraction d'ADN.....	21
3.2. Extraction d'ADN par kit QIAGEN®.....	21
3.3. Extraction d'ADN par le Mag-Bind®.....	21
3.4. Analyse qualitative de l'ADN.....	21
3.5. La PCR « Polymerase Chain Reaction ».....	21
4. Analyse statistique	21
Résultats.....	22
1. Résultats de culture d'amibes libre	22
2. Identification morphologique	23
3. Résultats de culture d' <i>Escherichia coli</i>	25
4. Résultats des repiquages des cultures d'amibes libres	25
4.1. Identification morphologique au microscope optique des boîtes de cultures des prélèvements	27
4.2. Contrôle au microscope inversé des cultures de repiquage	29
4.3. Examen au microscope photonique des cultures de repiquage	30
4.4. Test de flagellation	30
4.5. Coloration au Giemsa	30
5. Identification moléculaire	32
5.1. Résultats de la charge parasitaire après récolte pour extraction	32
5.2. Résultats de l'analyse qualitative de l'ADN	32
5.3 La PCR en temps réel.	33
6. Résultats des cultures de légionelles	36

6.1. Résultats du test d'agglutination	36
6.2. Résultats de culture sur gélose au sang.....	37
6.3. Résultats de conservation.....	38
6.4. Résultats des cultures d'Amibes.....	38
Discussion.....	39
Conclusion.....	42
Références bibliographiques.....	44

ANNEXES

Résumé

Abstract

Liste de figures

Figure 1 : Schéma de classification des amibes libres.....	3
Figure 2 : Photo par microscopie électronique d' <i>Acanthamoeba spp.</i> (A) Microscopie électronique à transmission d'un trophozoïte. (B) Microscopie électronique à balayage d'un kyste. (C) Microscopie électronique à transmission d'un kyste.....	5
Figure 3 : Le cycle de vie et la voie d'infection d' <i>Acanthamoeba spp.</i>	6
Figure 4 : <i>Naegleria fowleri</i> (a)trophozoïte, (b)flagellé, et (c)kyste. Toutes les images à x1000.....	7
Figure 5 : Cycle de vie et de transmission de <i>Naegleria fowleri</i>	9
Figure 6 : Photo de <i>Balamuthia mandrillaris</i> par microscopie photonique. Trophozoïte (a), et kyste (b). Les deux images à x850.....	10
Figure 7 : Cycle de vie de <i>Balamuthia mandrillaris</i> dans la nature et dans le corps.....	11
Figure 8 : Photo d' <i>Hartmannella</i> (a) et <i>Acanthamoeba</i> (b). Trophozoïtes (flèche blanche), formes de kystes (flèche noire) (grossissement original ; Gx400).....	12
Figure 9 : Carte représentante les régions échantillonnées ; et l'origine des échantillons à Tizi-Ouzou.....	15
Figure 10 : Schéma récapitulatif de la méthodologie expérimentale.....	16
Figure 11 : (A) kystes d' <i>Acanthamoeba spp.</i> au grossissement Grx400 (Vijayakumar, 2018) ; (B) Forme kystique de <i>Naegleria spp.</i> (Al-Herrawy & Gad, 2015) ; (C) forme kystique de <i>Balamuthia mandrillaris</i> (Visvesvara et al., 2007) ; (D) kyste de <i>Vermamoeba vermiformis</i> au grossissement original Gx400 (Park, 2016).....	18
Figure 12 : Photo d'une Boite de culture d'un prélèvement d'eau après filtration et mise en culture par dépôt des filtres coupé sur Gélose blanche tapissée d' <i>Escherichia coli</i> morte (Originale).....	19
Figure 13 : Observation d'une plage de kystes des amibes libres sous microscope inversé Grx200(originale).....	20
Figure 14 : Distribution de l'ensemble de nos prélèvements d'eau et d'écouvillons de biofilms pour la recherche d'amibes libres dans la wilaya de Tizi-Ouzou.....	22
Figure 15 : Distribution des prélèvements d'eau et d'écouvillons de biofilms dans les sources d'eau naturelles et des réseaux confondus pour la recherche d'amibes libres dans la wilaya de Tizi-Ouzou.....	23
Figure 16 : Résultats de cultures positives de FLA en fonction du délai d'apparition des positifs dans les boites incubées à 30°C.....	24
Figure 17 : Résultats de cultures positives de FLA en fonction du délai d'apparition des positifs	

dans les boites incubées à 37°C.....	24
Figure 18 : Nombre et jour d'apparition des contaminations selon le types et l'origine des Prélèvements incubés à 30°C.....	24
Figure19 : Nombre et jour d'apparition des contaminations selon le type et l'origine des prélèvements incubés à 37°C.....	25
Figure 20 : Graphe représentant la vitesse de croissance et la richesse des cultures de repiquage des amibes libres dans les cultures de repiquages à 30°C et à 37°C.....	26
Figure 21 : Observation de culture de repiquage des colonies de kystes d'amibes libres (A) Sous microscope optique avec grossissement Gr _x 200 (originale). (B) : représentation (B) schématique.....	26
Figure 22 : Observation d'une plage de kystes des amibes libres à partir du filtre sous microscope inversé Gr _x 200(originale).....	27
Figure 23 : Distribution des identifications des FLA en fonction des types de prélèvements et des températures d'incubation des cultures. (acanth : acanthamoeba).....	28
Figure 24 : Observation au microscope optique d'une déformation d'un kyste d' <i>Acanthamoeba spp</i> au grossissement _x 400(Originale).....	28
Figure 25 : : Observation d'un amas de kystes d'amibes libres sous microscope photonique au grossissement Gr _x 400 (originale).....	29
Figure 26 : Observation d'un petit amas de kystes d'amibes sous microscope optique au grossissement Gr _x 400 (originale).....	29
Figure 27 : Observation au microscope optique de kystes d'amibes libres après coloration au Giemsa avec grossissement Gr _x 400 (originale).....	31
Figure 28 : Observation de kystes d'amibes libres après coloration au Giemsa sous microscope optique au grossissement Gr _x 1000 avec l'huile à immersion (originale).....	31
Figure 29 : Comparaison des résultats de numération : Absence de différence significative entre les catégories.....	32
Figure 30 : résultats de gel de qualité d'agarose de l'électrophorèse des prélèvements (Sources R1, R1', R5, R9, Puits, R2, R2', R3, R4, R6, R7, R10).....	33
Figure 31 : Résultats des amplifications en temps réel de l'amorce spécifique à <i>Naegleria spp</i>	34
Figure 32 : Résultats des 6 échantillons testés en JDP avec les Ct obtenues.....	35
Figure 33 : Colonies de légionelles sur milieu de culture BCYE après 4 jours d'incubation (originale).....	36
Figure 34 : (A) kit d'agglutination avec les différents sérums ;(B) résultat positif formation d'une réaction d'agglutination sur la zone de test.....	37
Figure 35 : Milieu de gélose au sang avec une culture de légionelles (un côté positif et un côté	

negatif)37

Liste de tableaux

Tableau 1 : Distribution de l'origine des prélèvements effectués pour la recherche des amibes libres dans la région de Tizi-Ouzou.....	17
Tableau 2 : composition du mix PCR.....	52
Tableau 3 : programme PCR d' <i>Acanthamoeba spp.</i> (JDP1, JDP2) (Schroeder et al., 2001).....	52
Tableau 4 : identification morphologique des amibes libres dans les filtres avec microscope optique au grossissement (Grx400).....	53
Tableau 5 : identification morphologique des amibes libres dans les écouvillons de biofilms avec microscope optique au grossissement (Grx400).....	53
Tableau 6 : comptage et lectures des résultats du gel d'électrophorèse de qualité	54
Tableau 7 : Résultats des Ct obtenus aux cours de nos PCR en temps réel.....	35
Tableau 8 : Résultats et nombre des cultures de légionelles, et des tests de confirmation.....	38
Tableau 9 : Résultats de culture d'amibes libres et de Légionelles.....	38

Liste d'abréviation

A

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : Acide RiboNucléique

ATCC : American type culture collection

B

BCYE : Buffered Charcoal Yeast Extract

B.H.I.B : Bouillon Cœur- cervelle

F

FLA : free living amoeba

G

GAE : l'encéphalite amibienne granulomateuse

L

LCR : liquide céphalo-rachidien

P

PAM : méningo-encéphalite amibienne primitive

S

SNC : système nerveux centrale

Introduction

Introduction

Les amibes libres sont des organismes opportunistes qui vivent généralement librement dans diverses conditions environnementales, en particulier dans l'eau chaude et dans les tuyaux et réservoirs d'eau raccordés. En plus de vivre librement, ces protistes sont également à l'origine de maladies très graves chez l'homme et l'animal. (Salehi *et al.*, 2022).

Ce qui fait que les sources thermales et bains maures sont des lieux propices à la prolifération des amibes libres, car ils offrent des conditions de température et d'humidité favorables. Les baigneurs peuvent être exposés au risque d'infection par ces amibes, notamment par voie nasale ou oculaire (Salazar-Ardilles *et al.*, 2022).

Les amibes se nourrissent généralement de bactéries et d'autres micro-organismes comme les champignons également, ils sont absorbés par phagocytose, mais elles peuvent aussi être parasites. Les amibes libres sont des protozoaires non pathogènes, tandis que les amibes parasites ont besoin d'un hôte pour se reproduire. Grâce à leurs pseudopodes, les formes végétatives dite "trophozoïque", peuvent ramper sur des supports ou saisir des proies microscopiques. La forme flagellée permet un déplacement rapide dans un environnement liquide, tandis que la forme kystique permet à l'amibe de se propager dans l'environnement et de coloniser de nouveaux endroits, car elle est capable de résister à la dessiccation pendant de longues périodes lorsque les conditions deviennent défavorables.

L'association des amibes libres avec d'autres microorganismes au niveau des biofilms représente un problème de santé humaine, et aussi un souci de résistance contre les désinfectants ce qui augmente le taux de dangerosité de ces espèces. L'exemple le plus reporté dans la littérature mondiale est celui de l'association entre amibes et légionelles.

La première étude sur les légionelles a été réalisée en 1976, suite à une épidémie qui a touché des anciens combattants de l'American Légion lors d'un congrès à Philadelphie, aux États-Unis. Les chercheurs ont isolé la bactérie responsable de la maladie, qu'ils ont nommée *Légionella pneumophila*. Depuis, plus de 60 espèces de légionelles ont été décrites, dont certaines sont également pathogènes pour l'Homme.

En Algérie, il n'existe que très peu de données relatives aux amibes libres ni sur les maladies qu'elles peuvent provoquer. En 2020, une étude faite sur les eaux thermales de 10 stations dans le nord de l'Algérie a rapporté l'association des amibes libres avec les légionelles (Boilataabi *et al.*, 2020)

Introduction

Nous avons donc entrepris de déterminer les risques sanitaires associés aux amibes libres et aux biofilms dans les sources naturelles (puits et sources) et les réseaux d'eau potable de la wilaya de Tizi Ouzou. Nos objectifs sont de mettre au point les isolements à partir des échantillons d'eau et des Biofilms, de les mettre en culture et d'identifier les espèces présentes pour évaluer leur impact sur la santé publique.

La première partie de notre travail correspond à une description des amibes libres pathogènes et des pathologies associées. Dans la deuxième partie, nous avons abordé la partie pratique avec notre méthodologie d'échantillonnage et de traitement des échantillons, suivie de nos résultats, et discussion.

Généralités

Généralités

Les amibes vivantes (FLA) sont des protozoaires omniprésents, largement répandus dans la nature, qui se composent de plusieurs genres communs tels qu'*Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Vermamoeba* et *Balamuthia*. Ces micro-organismes ont été appelés amibes amphizoïques avec un potentiel pathogène pour les humains et les animaux. Des espèces diversifiées d'amibes sont présentes dans un large éventail d'habitats à travers le monde.

Les amibes libres ont été détectées dans l'eau douce et l'eau de mer (Samba-Louaka et al., 2019). Ils peuvent être présentes également dans les eaux de sources, surtout si elles sont chaudes et stagnantes (Fabros et al., 2021), dans l'eau potable traitée (Thomas & Ashbolt, 2010) ; les lacs, les ruisseaux, les rivières, les piscines, et l'eau du robinet (Armand et al., 2015), ainsi que dans les sources d'eau chaude et spa (Latifi et al., 2020).

Ces microorganismes peuvent vivre librement dans la nature. Mais en cas de contact avec l'être humain ou les animaux, ils peuvent causer des maladies très graves et généralement incurables.

1. Classification des amibes libres

Jusqu'en 2002, les amibes, comme les micro-organismes eucaryotes, étaient principalement étudiées et caractérisées en fonction de leur morphologie. La première description des amibes date de 1826. La société internationale des protozoologistes a proposé une nouvelle classification basée sur des approches morphologiques, biochimiques et phylogénétiques. Des super groupes sont ainsi devenus plus claires (figure 1). Le super groupe **Amoebozoa** comprend la plupart des organismes capables de produire des pseudopodes en forme lobé, le super groupe **Rhizaria** qui est caractérisé par la production de pseudopodes filamenteux, et le super groupe **Excavata** comprend la majorité des hétérotrophes flagellés (Salazar-Ardiles et al., 2022b).

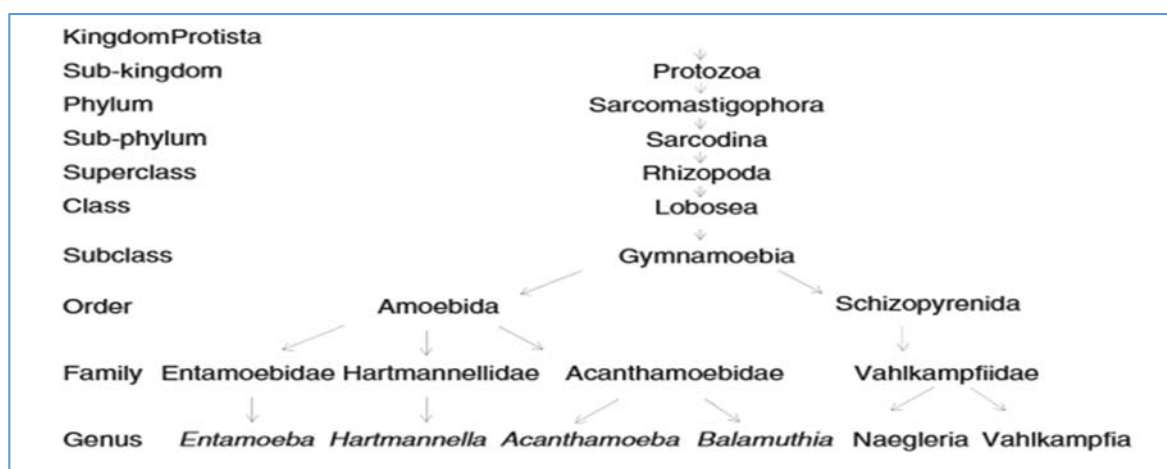


Figure1 : Schéma de classification des amibes libres (Khan, 2006b)

2. Reproduction des amibes libres

Les amibes libres se reproduisent de manière asexuée par **fission binaire** : la cellule mère se divise mitotiquement en deux cellules filles. La division nucléaire se fait par mitose conventionnelle dans laquelle le nucléole et la membrane nucléaire disparaissent. Les kystes se forment à la suite de conditions environnementales défavorables. Une variation marquée existe entre les souches concernant la forme et la taille des kystes.. (Khan, 2006b).

3. Nutrition

Les amibes libres se nourrissent activement de bactéries, d'algues, de levures ou de petites particules organiques et de nombreuses vacuoles alimentaires peuvent être observées dans le cytoplasme de la cellule (Khan, 2006b).

4. Les espèces d'amibes libres

4.1. *Acanthamoeba* spp

En 1913, Puschkarew a isolé une amibe du genre *Acanthamoeba* de la poussière et nommé *Amoeba polyphagus* (Puschkarew 1913). C'est une amibe libre de l'environnement, cosmopolite et est la plus répandue. En 1930, Castellani a isolé une amibe qui s'est produite comme contaminant dans une culture de levure (Visvesvara et al., 2007). Elle a été décrite comme agent causal de l'encéphalite granulomateuse (AGE) dans les années 1960 et de la kératite dans les années 1970.

4.1.1. Morphologie

Elle possède deux stades, un trophique ou d'alimentation et en division et un stade de kyste résistant. Les trophozoïtes peuvent mesurer de (14 à 40 μm) alors que le kyste mesure de (10 à 25 μm) de diamètre, ils possèdent généralement un seul noyau qui contient un gros nucléole densément coloré (Visvesvara, 2013b). (Figure 2)

Basés uniquement sur des critères morphologiques, pas moins de 24 espèces ont été incluses dans le genre *Acanthamoeba*. Ces espèces ont été classées en trois catégories différentes, en fonction des différences de morphologie et taille des trophozoïtes et des kystes.

Groupe I : est composé d'espèces caractérisées par de grands kystes et trophozoïtes, avec des endocystes en forme d'étoile et des ectocystes qui peuvent être lisses ou rugueux.

Groupe II : contient des amibes où l'ectocyste est rugueux et épais, tandis que l'endocyste peut être polygonal, triangulaire, ovale ou arrondi.

Généralités

Groupe III :: l'ectocyste est mince et ondulé, tandis que l'endocyste est généralement arrondi (Castrillon and Orozco, 2013)

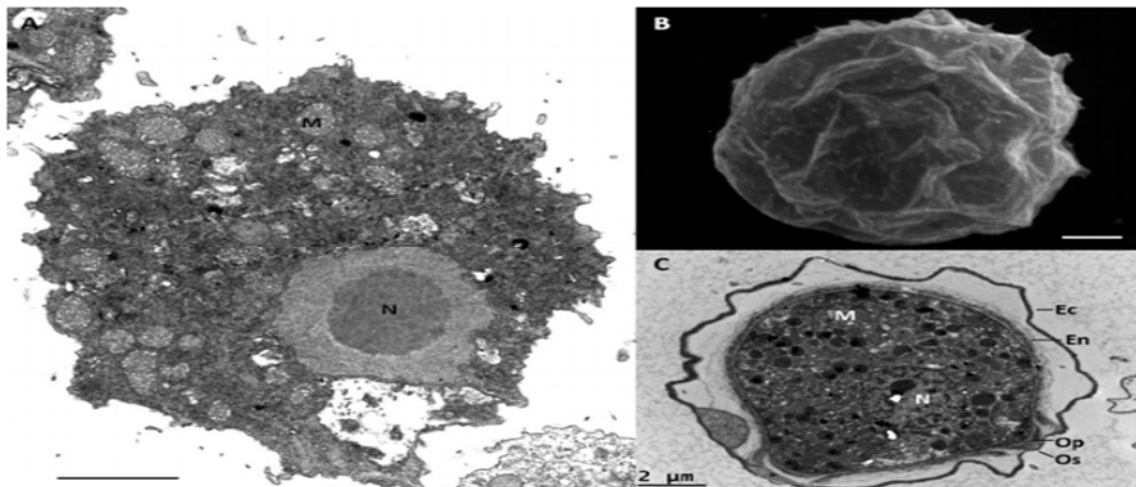


Figure 2 : Photo par microscopie électronique d'*Acanthamoeba* spp.

(A) Microscopie électronique à transmission d'un trophozoïte. (B) Microscopie électronique à balayage d'un kyste. (C) Microscopie électronique à transmission d'un kyste. (Fouque et al., 2012)

4.1.2. Locomotion

Les trophozoïtes du genre *Acanthamoeba* sont très mobiles et se déplacent sur des supports en effectuant ce que l'on appelle une locomotion amiboïde. Cette locomotion consiste en une contraction et une élongation du cytoplasme, formant des pseudopodes dans la direction du déplacement, ce qui leur permet d'avancer. Les amibes initient la locomotion en attachant leurs cellules au substrat en réponse à des signaux tels que la nutrition ou la présence de micro-organismes (Schuster & Levandowsky, 1996).

4.1.3. Pathogénicité et cycles de vie

Acanthamoeba spp, peut causer plusieurs problèmes de santé humaine tel que l'encéphalite amibienne granulomateuse (GAE), les lésions cutanées, nasopharyngées, pulmonaires et rénales. Ces infections se trouvent principalement chez les patients immunodéprimés. Elles peuvent également déclencher une kératite amibienne chez les personnes immunocompétentes, et les porteurs de lentilles de contact également (Trabelsi et al., 2012b). La contamination se fait par voies respiratoire, cutanée ou oculaire. Les amibes se propageant ensuite jusqu'à l'encéphale en traversant la barrière hématoencéphalique. (Figure 3)

Dans des conditions de croissance optimales, les *Acanthamoeba* se reproduisent par fission binaire. Le temps de génération diffère entre les isolats appartenant à différentes

Généralités

espèces/génotypes de 8 à 24 h. Les trophozoïtes contiennent de l'ADN cellulaire, nucléaire et mitochondrial, l'ADN nucléaire représentant 80 à 85% de l'ADN total

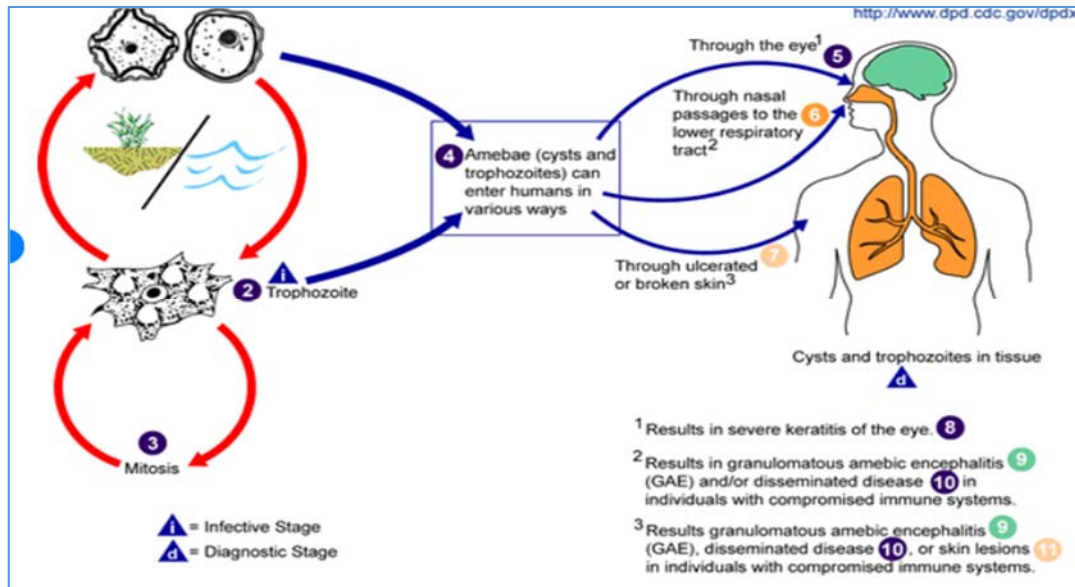


Figure 3 : Le cycle de vie et la voie d'infection d'*Acanthamoeba* spp

<http://www.cdc.gov/parasites/acanthamoeba/biology.html>

4.2. *Naegleria fowleri*

Naegleria fowleri est une amibe thermophile et ubiquiste que l'on trouve dans l'air, le sol et les eaux chaudes. Ses habitats naturels comprennent les sources chaudes, les étangs, les rivières et les lacs d'eau douce. Cependant, elle a également été identifiée dans les systèmes de distribution d'eau potable, les piscines non traitées, les fontaines, les hôpitaux, les eaux thermales, l'eau potable non traitée et les parcs aquatiques (Güemez & García, 2021).

Les *Naegleria* ont été découvertes pour la première fois par Schardinger en 1899, qui a nommé l'organisme *Amoeba gruberi*. En 1912, Alexeieff a proposé le nom de genre *Naegleria* et, bien plus tard, en 1970, Carter a identifié *Naegleria fowleri* comme l'agent responsable d'infections humaines mortelles. (Khan, 2006c).

4.2.1. Morphologie

N. fowleri se présente sous trois formes dans le milieu hydrique : la forme végétative (trophozoïte), la forme flagellée, et la forme kystique (forme de résistance et de dissémination).

Généralités

Les trophozoïtes sont capables de se nourrir et de se multiplier. Ils se déplacent grâce à leurs pseudopodes et ont tendance à adhérer à différents supports. Ils participent ainsi à la constitution des biofilms dont ils se nourrissent. Les trophozoïtes se transforment en kyste lorsque l'environnement devient défavorable par manque de nourriture, dessiccation, changements de température ou de pH, ou encore par surpopulation. *N. fowleri* et toutes les espèces du genre présentent la particularité de se transformer en forme flagellée lorsque les conditions ioniques sont modifiées. La forme flagellée est transitoire et réversible et ne se produit qu'à partir de la forme trophozoïte (Harris & Batra, 2020).

Le trophozoïte : Le trophozoïte amiboïde de (10-25 μm), se déplace rapidement en produisant des renflements hémisphériques, les lobopodes, à l'extrémité antérieure et présente une locomotion sinusoïde/limacine active. Il a un seul noyau vésiculaire avec un nucléole proéminent placé au centre qui se colore de manière dense avec des colorants chromatiques. Le cytoplasme montre une nette distinction entre les ectoplasmes et les endoplasmes ; ce dernier contient de nombreuses mitochondries, des ribosomes, des vacuoles alimentaires et, définissant l'extrémité postérieure, la vacuole contractile et les filaments protoplasmiques traînants (Visvesvara *et al.*, 2007). (Figure 4a)

Le flagellé : Le flagellé a un seul noyau avec un grand nucléole et a généralement deux flagelles mais trois ou quatre flagelles peuvent également être observés occasionnellement ce qui lui confère une grande mobilité. Le flagellé n'a pas de cytostome et ne peut donc pas se nourrir. Sa longueur varie de (10 à 16 μm) (Visvesvara, 2013c). (Figure 4b)

Le kyste : Le stade du kyste offre une protection contre la dessiccation et la privation de nourriture (Marciano-Cabral, 1988). Il est généralement sphérique, mesure de (7 à 14 μm) et est à double paroi avec un endocyste épais et un ectocyste plus fin (Figure 4c) (Visvesvara, 2013d).

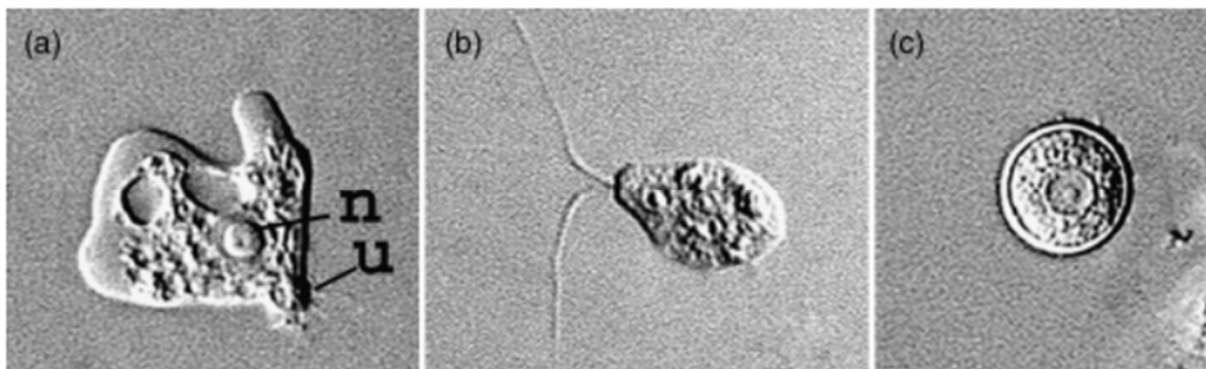


Figure 4 : *Naegleria fowleri* (a)trophozoïte, (b)flagellé, et (c)kyste. Toutes les images à $\times 1000$ (Visvesvara *et al.*, 2007b)

Généralités

4.2.2. Pathogénicité

Naegleria fowleri provoque une méningo-encéphalite amibienne primitive (PAM) hémorragique aiguë et fulgurante, principalement chez les enfants et les jeunes adultes en bonne santé ayant été récemment exposés à des eaux douces chaudes. Elle survient pendant les mois chauds de l'été, lorsqu'un grand nombre de personnes s'adonnent à des activités sportives de l'été. La caractéristique la plus frappante de la PAM est l'apparition rapide des symptômes après l'exposition ; la maladie progresse rapidement et, en l'absence d'un diagnostic et d'une intervention rapides, la mort survient généralement dans un délai d'une semaine ou moins. Bien que l'examen rétrospectif des tissus cérébraux indique que la PAM causée par *N. fowleri* remonte à 1901, elle a été décrite pour la première fois par **Fowler** et **Carter**, dans le cadre d'un projet de recherche sur les maladies infectieuses (Martinez & Visvesvara, 1997).

4.2.3. Cycle de vie

Naegleria fowleri se trouve dans l'eau douce, le sol, les rejets thermiques des centrales électriques, les puits géothermiques et l'eau récréative et l'eau du robinet mal chlorée. Les trophozoïtes peuvent se transformer en formes flagellées temporaires non nourrissantes qui reviennent généralement au stade trophozoïte. Les trophozoïtes infectent les humains ou les animaux en pénétrant dans la muqueuse nasale, généralement au cours de la natation ou de l'irrigation des sinus (5), et en migrant vers le cerveau (6) via les nerfs olfactifs, provoquant une méningo-encéphalite amibienne primaire (PAM). Dans ce cas les trophozoïtes se trouvent dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) et les tissus, tandis que des formes flagellées sont parfois trouvées dans le LCR. Les kystes ne sont pas visibles dans le tissu cérébral (figure 5).

4.3. *Balamuthia mandrillaris*

Balamuthia mandrillaris est une amibe opportuniste qui vit en liberté et qui est pathogène pour l'homme. Elle est présente dans le monde entier au niveau des eaux douces, de la terre (jardins, plantes en pot), des poussières, mais est principalement détectée dans les régions chaudes. Les infections à *Balamuthia* sont rares, mais elles ont été signalées chez des personnes immunocompétentes et immunodéprimées de tous âges. *B. mandrillaris* peut pénétrer par des plaies cutanées ou nasales et provoquer des lésions cutanées et l'encéphalite amibienne à *Balamuthia*, généralement fatale (Bhosale & Parija, 2021).

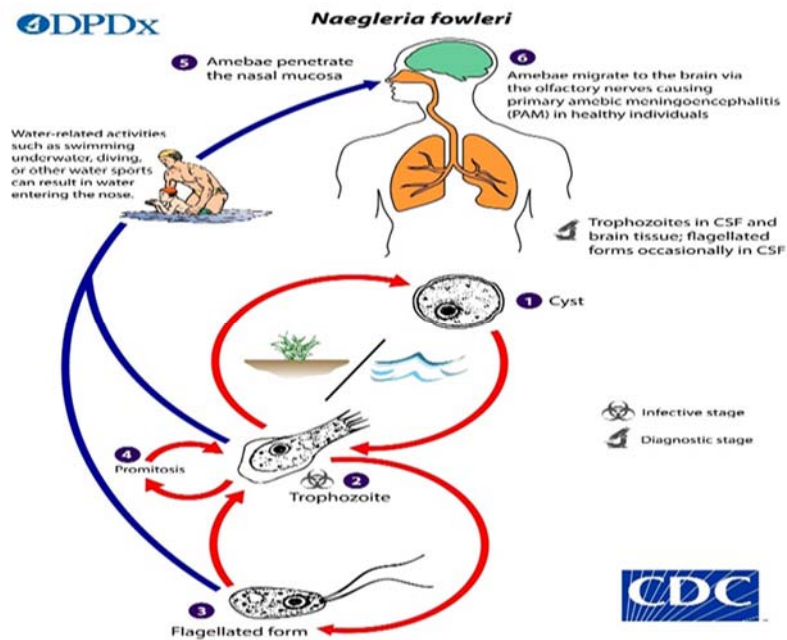


Figure 5 : Cycle de vie et de transmission de *Naegleria fowleri*
<https://www.cdc.gov/parasites/naegleria/pathogen.html>

4.3.1. Morphologie

Balamuthia mandrillaris comme *Acanthamoeba*, a deux stades, un stade trophique végétatif et un stade kyste dormant, dans son cycle de vie. (Figure 6).

Forme trophozoïte : Les trophozoïtes forment de larges pseudopodes et présentent des mouvements de marche arachnéens à travers la monocouche de culture tissulaire sur laquelle ils se nourrissent lors de l'infection. Ils mesurent de (15 μm à 60 μm) de diamètre et se caractérisent par un noyau rond avec un grand nucléole sphérique densément coloré (Martínez et al., 2001).

Forme kystique : Les kystes, de (20 μm sur 1,46 μm), ils ont une double paroi, la paroi externe étant ondulée et la paroi interne ronde, et on ne voit pas de pores dans la paroi (Visvesvara et al., 2007c).

4.3.2. Pathogénicité

L'infection par *Balamuthia mandrillaris* est une maladie rare dans le monde, avec des taux élevés de morbidité et de mortalité (Tao et al., 2022). Elle peut pénétrer dans le corps humain par une plaie ouverte, par les voies respiratoires et, en de rares occasions, par des greffes d'organes. Dans le sang, l'amibe réussit à échapper aux réponses immunitaires de l'hôte (Matin et al., 2008).

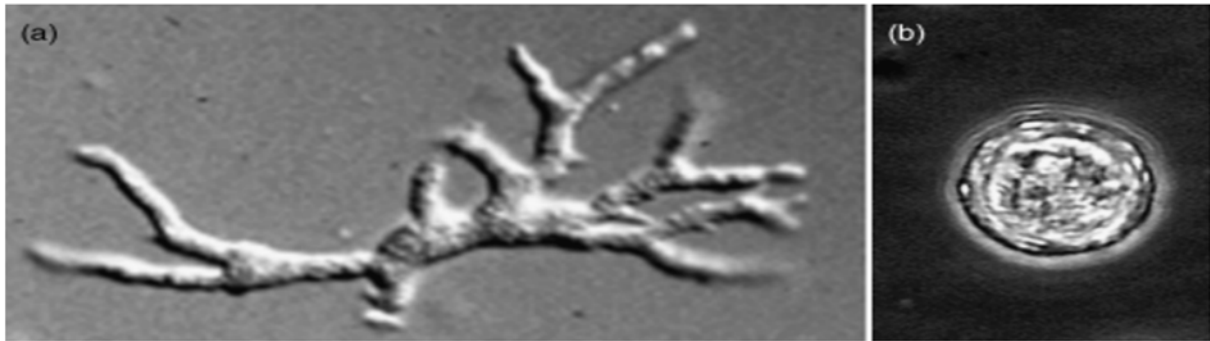


Figure 6 : Photo de *Balamuthia mandrillaris* par microscopie photonique Trophozoïte (a), et kyste (b). Les deux images à $\times 850$ (Visvesvara et al., 2007d)

4.3.3. Cycle de vie

Il s'agit d'un pathogène opportuniste qui se rencontre librement dans le sol, l'eau et l'air, mais qui peut parfois être pathogène pour l'homme. La forme végétative se divise asexuellement par fission binaire. Les kystes sont dormants et très résistants. Les trophozoïtes et les kystes peuvent infecter l'homme par la peau ou par les poumons via le nez. Propagés par voie hématogène à partir des voies respiratoires inférieures, Les trophozoïtes envahissent les organes hôtes, en particulier le cerveau, provoquant une méningo-encéphalite granulomateuse amibienne (MGA) et dévorant le tissu cérébral par phagocytose. L'agent pathogène peut également se propager à la peau, provoquant des lésions connues sous le nom de rosacée cutanée. L'infection cutanée précède souvent les lésions du SNC (système nerveux central). La résistance de la paroi du kyste protège l'amibe d'un environnement difficile, qui peut faciliter la transmission de la maladie ou provoquer des infections récurrentes qui résistent à la chimiothérapie (Bhosale & Parija, 2021b). (Figure 7)

4.4. *Sappinia spp*

Sappinia pedata, décrite comme *S. diploidea* en raison des deux noyaux, mais aussi comme une amibe pathogène vivant en liberté, a causé un cas d'encéphalite chez un homme immunodéprimé en 2001 (Gelman et al., 2001).

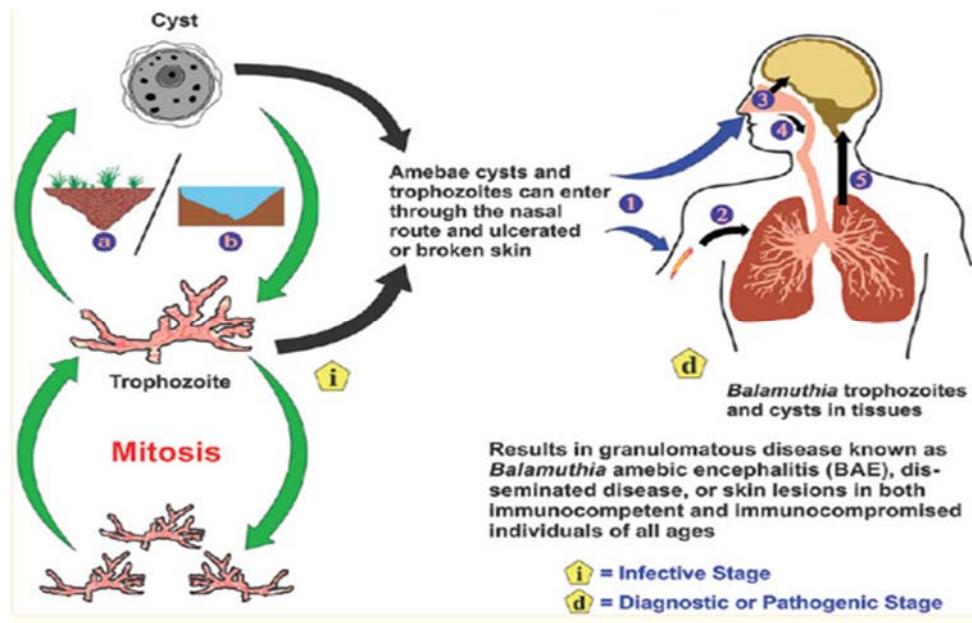


Figure 7 : Cycle de vie de *Balamuthia mandrillaris* dans la nature et dans le corps
(Bhosale & Parija, 2021b)

4.4.1. Morphologie :

Le trophozoïte mesure (40-80 μm), est ovoïde ou oblongue, et semble être aplatie avec des rides occasionnelles à la surface. Le cytoplasme contient la vacuole contractile et les vacuoles alimentaires ; le kyste mature est rond et mesure de (15 à 30 μm) (Gelman et *al.*, 2001b).

Ils se déplacent en utilisant la locomotion monopodiale et ont une grande région hyaline à l'extrémité antérieure de la cellule. L'extrémité postérieure de la cellule est généralement dentelée (Visvesvara et *al.*, 2007e).

4.4.2. Pathogénicité et cycle de vie

Le cycle de vie de ce parasite comporte deux stades, un trophozoïte et un kyste. Les kystes se caractérisent par une formation bicellulaire résultant de la copulation de deux trophozoïtes, se transformant ensuite en kystes unicellulaires binucléés.

Les kystes peuvent survivre au passage dans l'estomac avec son liquide gastrique, mais leur présence intestinale n'est pas synonyme d'infection *Sappinia spp*, ne s'est pas avéré létal pour l'homme ou les animaux de laboratoire et il n'a jamais été impliqué dans la pathologie avant la découverte d'un seul cas d'encéphalite causée par cette amibe chez un jeune homme immunocompétent qui a survécu à l'infection (Gelman et *al.*, 2001).

Généralités

L'infection cérébrale (méningoencéphalite granulomateuse) causée par *Sappinia* peut se développer dans les deux sens ; causée à partir d'une infection sinusale antérieure. Les symptômes comprennent une perte de conscience, des convulsions, des nausées, des vomissements, des maux de tête, une photophobie, des douleurs abdominales et des douleurs musculaires, et vision floue pendant 2 à 3 jours (Trabelsi et *al.*, 2012c).

4.5. *Vermamoeba vermiformis*

Décrite pour la première fois en 1967, *Vermamoeba vermiformis* (anciennement *Hartmannella*) est l'une des amibes libres les plus répandues. Elles ont été retrouvées dans des sources, des étuis de lentilles de contact, des systèmes d'eau d'hôpitaux, et même dans de l'eau minérale en bouteille. De plus, *V. vermiformis* est thermo tolérante et capable de coloniser les systèmes d'eau chaude. Leur ubiquité et leur thermo tolérance en font un réservoir potentiel de pathogènes, leur permettant de se développer dans des conditions extrêmes (Siddiqui et *al.*, 2021).

4.5.1. Morphologie

Ce microorganisme a deux formes : Les trophozoïtes présentent une morphologie de limace allongée, généralement beaucoup plus longue que large avec quelques matériaux granuleux dans le cytoplasme et une petite zone hyaline antérieure. Les cellules sont monopodales dans la locomotion mais deviennent bi ou multipodales lorsqu'elles changent de direction. (Figure 8) Le kyste de *V. vermiformis* est sphérique et petit (environ 6 μm), et sa paroi est composée de deux couches : un endocyste de (50 nm) d'épaisseur et un ectocyste de 110 à 140 nm d'épaisseur (Delafont et *al.*, 2018).

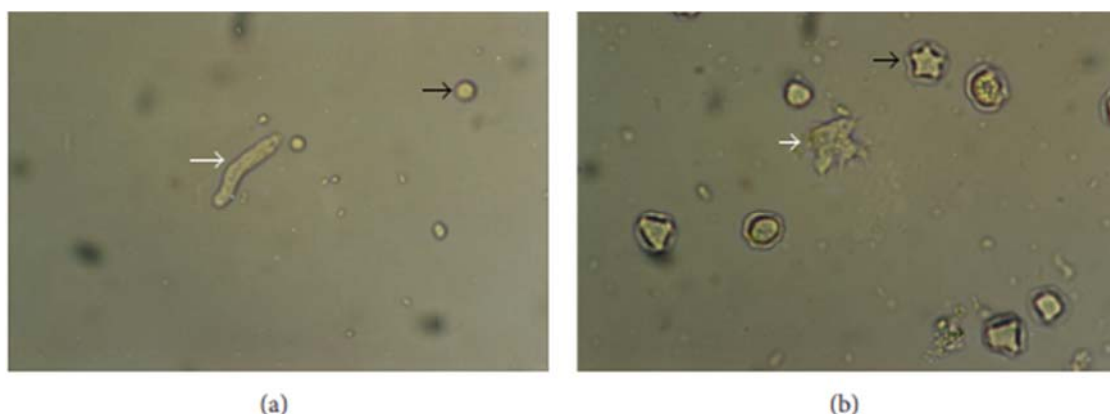


Figure 8 : Photo d'*Hartmannella* (a) et *Acanthamoeba* (b)

Trophozoïtes (flèche blanche), formes de kystes (flèche noire) (grossissement original ; Gx400)

(Coşkun et *al.*, 2013)

4.5.2. Pathogénicité

Bien que les infections à *V. vermiformis* soient rares, ce parasite a été déclaré parasite humain en 1997 (Abedkhozasteh, 2013). Malgré la déclaration par **Garcia** de *V. vermiformis* comme parasite humain, la pathogénicité de cette amibe reste controversée. Jonckheere & Brown soutiennent que cette amibe est omniprésente et qu'elle pourrait simplement être un contaminant dans les cas signalés (De Jonckheere & Brown, 1998b).

4.5.3. Cycle de vie

Comme pour d'autres amibes, le cycle de vie de *V. vermiformis* comprend un stade actif et un stade dormant, le trophozoïte et le kyste, respectivement (Cateau et al., 2014). La capacité des amibes à s'enkyster permet à *V. vermiformis* de prospérer dans des environnements hostiles et l'enkystement est induit par la privation de nutriments le stress osmotique, les variations de température, les fluctuations de pH et les toxines bactériennes (Scheid et al., 2019).

5. Les biofilms

Les biofilms sont constitués d'un mélange de micro-organismes, tels que des levures, des champignons et des protozoaires, et de dépôts associés, enfermés dans un polymère extracellulaire auto généré. La présence de biofilms peut avoir des effets néfastes sur un large éventail d'industries, notamment alimentaires, environnementales et biomédicales (Kang et al., 2019).

5.1. Association entre les pathogènes et les amibes

Malgré le fait que la majorité des amibes sont des prédateurs d'autres microorganismes, en particulier des bactéries, une interaction entre eux a été observée. Plusieurs espèces d'amibes peuvent servir d'hôtes à des bactéries dans un environnement naturel et dans les systèmes d'eau construits par l'homme, tels que les conduites d'eau, les tours de refroidissement, etc. Car les bactéries ont développé des mécanismes d'adaptation au fil du temps pour échapper à la prédation (Barker & Brown, 1994). En conséquence, les bactéries peuvent non seulement être résistantes aux amibes, mais elles peuvent aussi se multiplier dans les amibes et profiter des avantages qu'elles peuvent offrir, tels qu'une source de nutriments et une protection supplémentaire contre la température, les désinfectants ou les rayons UV. (Cervero-Aragó et al., 2014a ; Cervero-Aragó et al., 2015). Les mécanismes qui ont permis aux bactéries d'échapper à la prédation peuvent devenir des facteurs de virulence bactérienne. Le fait de

Généralités

parasiter les amibes (FLA) et d'être membre d'un biofilm d'espèces mixtes augmente la capacité à produire des polysaccharides et à former des biofilms (Valciņa et *al.*, 2019).

Parmi ces microorganismes présents dans les biofilms et qui peuvent rentrer en interaction avec les amibes libres, il y a principalement les légionelles.

5.2. Légionelle

La légionelle est une bactérie intracellulaire facultative à Gram négatif, que l'on trouve dans les environnements naturels d'eau douce ainsi que dans les systèmes de distribution d'eau potable. (Steinert et *al.*, 2002).

5.2.1. Pathologie

Cette bactérie est l'agent causal de la maladie du légionnaire qui est une pneumonie atypique qui peut ressembler cliniquement à une pneumonie à pneumocoque ou à d'autres pneumonies bactériennes, avec des symptômes tels que maux de tête, myalgies, asthénie et anorexie. La fièvre est généralement présente, et les symptômes gastro-intestinaux peuvent être importants et inclure la diarrhée, les nausées, les vomissements et les douleurs abdominales (Cunha et *al.*, 2016).

Matériel et Méthodes

Matériel et Méthodes

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire d'éco-épidémiologie parasitaire et génétique des populations de l'Institut Pasteur à Dely Brahim-Alger, durant une période d'étude de six mois, s'étalant du mois de janvier au mois de juin 2023.

1. Matériel

1.1. Échantillonnage

Dans le but de rechercher les amibes libres présentes dans les réseaux d'eau confondus, domestiques et naturels et les biofilms dans 3 communes de la région de Tizi-Ouzou, nous avons réalisé une enquête sur 63 prélèvements (Eau + Ecouvillonnages de biofilms) (tableau 1). On retrouve la distribution des différents prélèvements dans la figure 9.

Nous avons prélevé 1 litre d'eau (18 eaux et 36) écouvillons : sources, puits ; réseaux d'eau de Mosquées, et quelques réseaux domestiques. Des prélèvements de 500ml d'eau ont été fait pour les bains chauds : 3 eaux et 6 écouvillons (tableau 1). Pour les 42 prélèvements par écouvillonnages des biofilms, nous avons réalisé 2 écouvillonnages pour chaque prélèvement (tableau 1). Par ailleurs, nos prélèvements ont aussi été traités pour la recherche des légionelles qui pourraient être associées aux amibes libres.

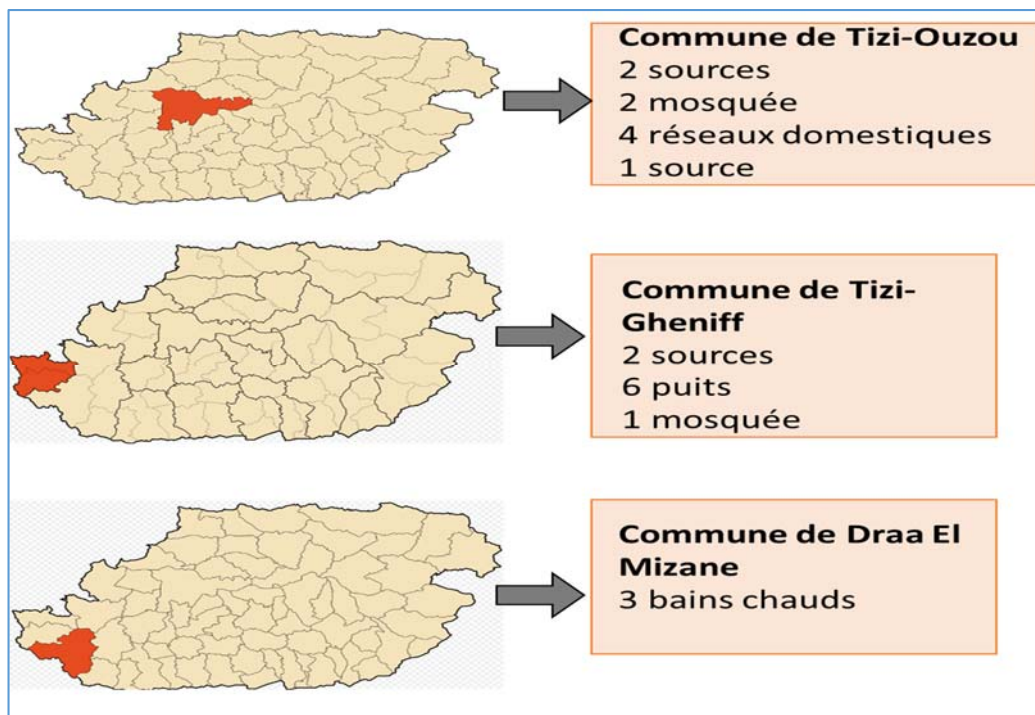


Figure 9 : Carte représentante les régions échantillonnées ; et l'origine des échantillons à Tizi-Ouzou

Matériel et Méthodes

2. Méthode

L'objectif de ce travail était de rechercher les amibes libres dans des échantillons d'eau et des prélèvements par écouvillons de biofilms. Les prélèvements sont se fait dans des bouteilles d'eau minérale stériles et des écouvillonnages à partir des sources d'eau, puits, réseaux d'eau des mosquées, réseaux d'eau domestiques, et dans des contenants en verre de 500ml pour les prélèvements des bains chauds qui ont été transportés par la suite au laboratoire des Eaux de l'IPA pour la filtration puis au laboratoire d'éco-épidémiologie parasitaire pour être mis en culture et traités par la suite par des méthodes morphologiques et moléculaires PCR des amorces spécifiques. La figure 10 récapitule l'ensemble de notre méthode.

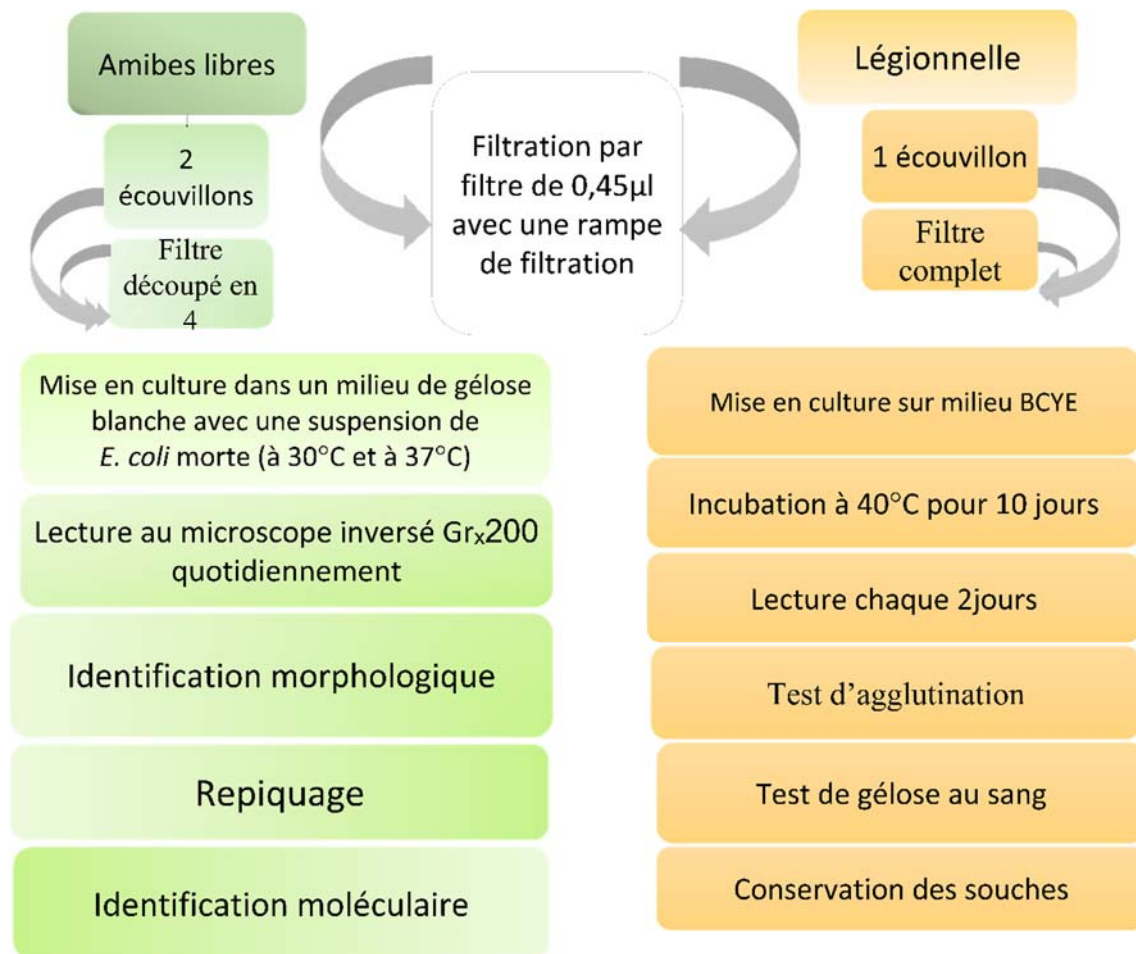


Figure 10 : Schéma récapitulatif de la méthodologie expérimentale

2.1. Mise en culture

Après l'échantillonnage les prélèvements ont été par la suite mis en culture directe pour les écouvillonnages, et après filtration pour les prélèvements d'eau. Cette opération a été effectuée aussi bien pour les prélèvements destinés aux amibes, que pour ceux des légionelles.

Matériel et Méthodes

Tableau 1 : Distribution de l'origine des prélèvements effectués pour la recherche des amibes libres dans la région de Tizi-Ouzou.

Lieu de prélèvement	Type de prélèvement	Nombre de prélèvement	Nombre d'échantillons
Sources d'eau	Eau	5	5
	Écouvillon	10	5
Puits	Eau	6	6
	Écouvillon	12	6
Réseaux d'eau de Mosquées	Eau	3	3
	Écouvillon	6	3
Bain chaud	Eau	3	3
	Écouvillon	6	3
Réseaux d'eau domestiques	Eau	4	4
	Écouvillon	8	4

2.2. Filtration

La filtration est un procédé de séparation des constituants d'un mélange à travers un milieu poreux (filtre). Après l'échantillonnage, nos prélèvements ont été transportés au laboratoire pour être filtrés dans les 24h qui ont suivis l'échantillonnage par l'emploi d'une rampe de filtration. Après stérilisation de la rampe de filtration avec de l'alcool et on la flambant, on la refroidit avec de l'eau distillée stérile. On dépose ensuite un filtre stérile d'une porosité de 0.45µm avant le dépôt des entonnoirs sur la rampe, puis nous avons réalisé la filtration de 1L d'eau échantillonnée.

Pour les écouvillons prélevés par les biofilms, nous avons rajouté de l'eau physiologique, puis nous les avons bien agités avant de les mettre en culture.

2.3. Isolement des amibes

La culture est le développement contrôlé de micro-organismes, croissance *in vitro* a pour but de faciliter l'étude et avoir des résultats plus fiables. Les filtres et l'eau physiologique des écouvillons sont déposés et versés respectivement dans une gélose blanche agar agar, et ont été cultivés dans différents condition d'incubation à 30°C et 37°C, en présence d'*Escherichia coli* (ATCC 25922) morte (qui est une source de nutrition pour les amibes). (Annexe 1)

2.4. Culture des légionelles

Les biofilms ont été ensemencés directement sur milieu spécifique au légionelles BCYE (Buffered Charcoal Yeast Extract), et incubé à 40°C. Après le processus de filtration, nous avons placé le filtre complet sur le milieu BCYE, et ensuite nous avons incubé à 40°C. La lecture se fait tous les 2 jours, durant 10 jours, dans les cas positifs on a observé une poussée de colonies blanches bien délimitées (Annexe 2).

Matériel et Méthodes

2.5. Culture et Repiquage des amibes libres isolées

Le repiquage a été réalisé dans le but d'isoler les kystes ainsi que pour éliminer les contaminations par d'autres germes ou champignons qui pourraient être présentes. En effet, une colonie isolée a été prélevée, soit 63 boîtes mères de chaque prélèvement, pour être étalées sur une autre gélose blanche tapissée d'*Escherichia coli* (morte) et être incubée à 30°C et 37°C pendant 10 jours.

2.6. Observation sous microscope inversé des boîtes de culture et de repiquage

Les observations ont été effectuées de 2 jusqu'à 10 jours quotidiennement pour évaluer la présence des kystes d'amibes au grossissement Grx200 en balayant tout le long du filtre, du côté qui est coupé, et tout au long de la boîte pour les cultures et repiquages des écouvillons. Pour pouvoir observer les kystes d'amibes libres, les observations se sont faites le long du filtre déposé sur la gélose pour repérer les kystes, leur forme et leur quantité ce qui varie par rapport aux conditions d'incubation et au type et origine du prélèvement, ce qui fait la différence des résultats d'un échantillon à un autre. Les observations des boîtes repiquées ont été réalisées dès le 2ème jusqu'au 10ème jour de culture. De plus, une goutte d'eau distillée qui contient le kyste des amibes libres a été déposée sur une lame et a été observée à grossissement Grx400 et Grx1000 sous microscope photonique dans le but de les identifier morphologiquement.

2.7. Identification morphologique

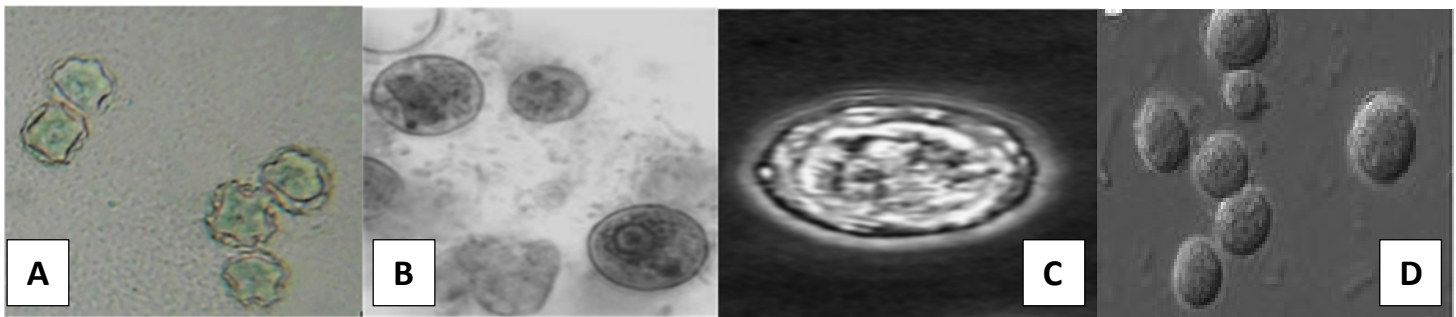


Figure 11 : (A) kystes d'*Acanthamoeba* spp au grossissement Grx400 (Vijayakumar, 2018) ; (B) Forme kystique de *Naegleria* spp (Al-Herrawy & Gad, 2015) ; (C) forme kystique de *Balamuthia mandrillaris* (Visvesvara et al., 2007) ; (D) kyste de *Vermamoeba vermiformis* au grossissement original Gx400 (Park, 2016)

Les kystes ont été identifiés sur la base de critères morphologique : le Kyste d'*Acanthamoeba* spp mesure de 10 à 25 μm de diamètre, et possède généralement un seul noyau qui contient un gros nucléole, et une double paroi qui diffère de forme selon l'espèce. La couche interne est plus rigide et peut être lisse, rugueuse, épineuse ou ornée de structures variées (écailles, tubercules, spicules). La paroi kystique peut être de forme polygonale, sphérique, ovale ou irrégulière selon les espèces.

Matériel et Méthodes

Kystes de *Naegleria spp* est généralement sphérique, mesure de (7 à 14 μm) et est à double paroi avec un endocyste épais et un ectocyste plus fine, et un noyau plus dense.

Kyste de *Balamuthia mandrillaris* : Les kystes, de (20 μm sur 1,46 μm), ils ont une double paroi, la paroi externe étant ondulée et la paroi interne ronde, et on ne voit pas de pores dans la paroi. Kyste de *Vermamoeba vermiformis* : il est sphérique et petit (environ 6 μm), et sa paroi est composée de deux couches : un endocyste de (50 nm) d'épaisseur et un ectocyste de 110 à 140 nm d'épaisseur, on peut les trouver également sous forme d'amas.

2.7.1. Observation sous microscope

Une partie de gélose qui contient les kystes des amibes libres a été raclée et déposée sur une lame avec une goutte d'eau distillée et a été recouverte d'une lamelle et observée sous microscope Photonique au grossissement x400 et x100. L'observation a été réalisée pour tous les prélèvements des filtres et biofilms et repiquages en se référant aux clés d'identification. (Figure 11)



Figure 12 : Photo d'une Boite de culture d'un prélèvement d'eau après filtration et mise en culture par dépôt des filtres coupé sur Gélose blanche tapissée d'*Escherichia coli* morte (Originale)

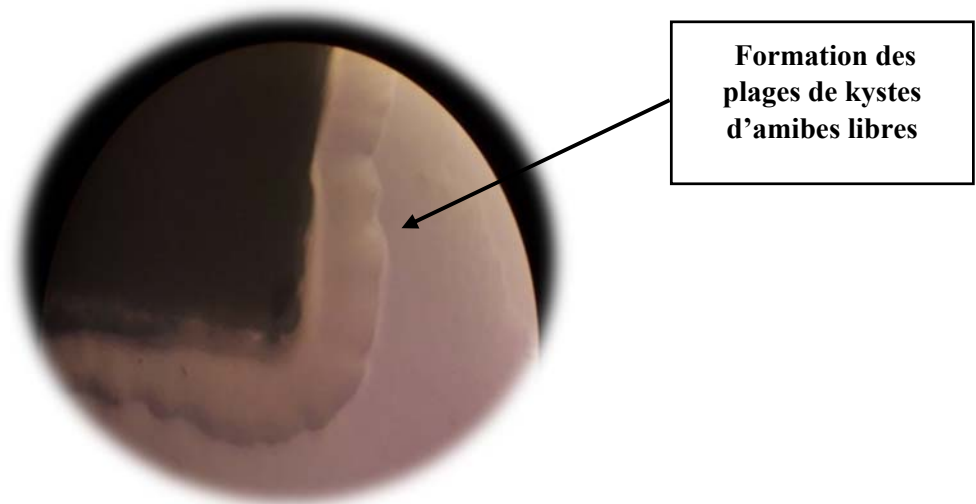


Figure 13 : Observation d'une plage de kystes des amibes libres sous microscope inversé Grx200(original)

2.8. Test de flagellation :

La méthode de test de flagellation est utilisée spécifiquement pour l'observation des flagelles de genre *Naegleria* et les pseudopodes pour les autres types et a été testée sur toutes les cultures. Donc un volume de 5 ml d'eau distillée a été ajouté à la gélose contenant les amibes libres après la récupération de filtre. L'eau distillée a été récupérée dans un tube à vis après avoir bien raclé la gélose afin de récolter les amibes libres, puis a été incubée à 37°C pendant 1h. L'observation au microscope s'effectue toutes les 10 minutes.

2.9. Coloration avec Giemsa

Cette coloration consiste à la préparation d'une solution de travail Giemsa en mélangeant 1 ml de colorant Giemsa et 9 ml d'eau de robinet. La solution a ensuite été filtrée et en même temps le frottis a été fixé en déposant de l'alcool sur l'étalement à l'aide d'une pipette Pasteur et laisser sécher. Par la suite la solution de colorant a été versée délicatement sur la lame jusqu'à ce que les étalements soient recouverts et a été laissée 10 minutes. Le colorant a été éliminé de la lame en ajoutant goutte à goutte de l'eau physiologique et laisser sécher à l'air.

3. Identification moléculaire des amibes libres

3.1. Extraction d'ADN

La récolte des amibes libres se fait en raclant la gélose, après un contact avec l'eau physiologique. La récolte de FLA a été mise dans un microtube et centrifugée à 5500 tours pendant 15 minutes. Une numération du culot récupéré a été faite avec la cellule Tomas en comptant les 16 carreaux. Par ailleurs, ce culot déjà récupéré a été utilisé pour l'extraction de l'ADN. Afin d'optimiser l'extraction de l'ADN, nous avons testé 2 kits d'extraction sur nos échantillons.

Matériel et Méthodes

3.2. Extraction d'ADN par kit QIAGEN®

La technique consiste à désorganiser les membranes cellulaires en émulsionnant leurs lipoprotéines à l'aide d'un détergent, ensuite faire précipiter l'ADN et enrouler les filaments (De Vroey, 2002). Nous avons fait une lyse, suivi d'une purification d'ADN (Annexe 3)

3.3. Extraction d'ADN par le Mag-Bind®

Le kit Mag-Bind® kit permet d'isoler rapidement et de manière fiable de l'ADN de haute qualité. On a d'abord effectué une lyse qui a consisté à réaliser des chocs thermiques afin de brisé la paroi des microorganismes présents dans le culot, en déposant les tubes Eppendorfs dans de l'azote liquide (à -196°C) pour 1 minute ; puis rapidement les déplacés dans de l'eau bouillante (à +70°C) pendant 2 minutes. On a répété cette opération pour 5 cycles. La technique est détaillée en (Annexe 4)

3.4. Analyse qualitative de l'ADN

Le gel est communément utilisé pour séparer des molécules en fonction de leur charge, leur taille et leur forme. (Annexe 5)

3.5. La PCR « Polymerase Chain Reaction »

C'est une réaction biochimique de synthèse d'ADN réalisée *in vitro* et de manière répétée, ce qui permet d'amplifier en grande quantité un fragment d'ADN à partir d'une matrice d'ADN qui contient ce fragment ce qui va permettre d'identifier chaque type des amibes libres.

Un mix PCR avec une amorce spécifique à (*JDP Acanthamoeba*) (JDP1, JDP2) a été préparé avec des volumes et concentration précise (Annexe 6, tableau 2), ainsi que *Naegleria* spp (NaeR, NaeF). Ensuite un volume de 1,9 µl d'ADN a été ajouté au volume total du mix 20 µl donc un volume total de 25 µl a été utilisé pour la PCR en temps réel avec un thermocycleur en utilisant le programme du MIC® (Annexe 6, tableau 3).

4. Analyse statistique

Afin de déterminer la significativité de nos résultats, nous avons effectué des tests statistiques à l'aide du logiciel Prism version 9.5.1 (GraphPad CA, USA). Nous avons analysé les résultats des cultures et repiquages en fonction du temps à l'aide d'une analyse de variance à un facteur (ANOVA) suivie du test de Tukey. Le coefficient de corrélation de Pearson a été utilisé pour déterminer la relation entre la charge parasitaire et la croissance dans les milieux. Une valeur P < 0,05 a été considérée comme statistiquement significative.

Résultats

Résultats

Afin de détecter et identifier les amibes libres dans différentes structures dans certaines localités de la région de Tizi-Ouzou, nous avons réalisé 63 prélèvements d'eau et d'écouvillonnage qui ont été traités par la suite à l'Institut Pasteur d'Alger. Les échantillons ont été mis en culture pour l'isolement et l'identification des différentes espèces d'amibes libres trouvées dans l'eau de 5 sources d'eau naturelles, 6 puits, 3 réseaux d'eau de mosquées, 3 prélèvements de bains chauds, et 4 de réseaux d'eau domestiques. Nous avons ainsi obtenu 21 prélèvements d'eau et 42 prélèvements d'écouvillons (figure 14).

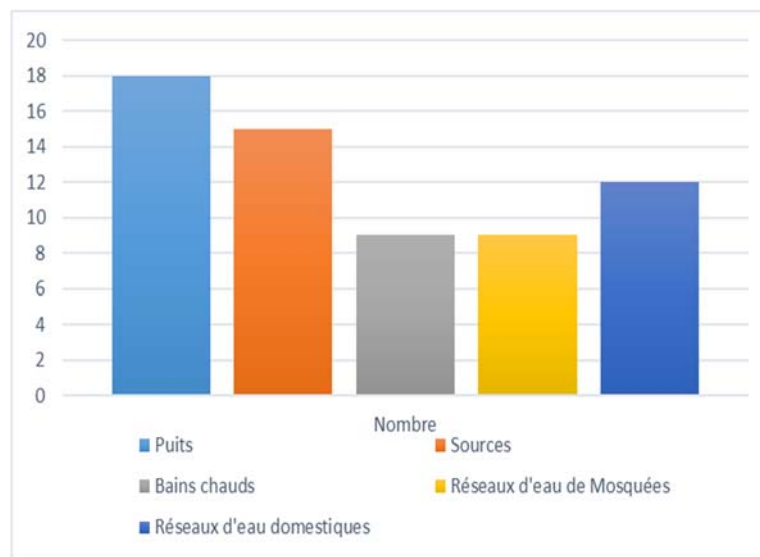


Figure 14 : Distribution de l'ensemble de nos prélèvements d'eau et d'écouvillons de biofilms pour la recherche d'amibes libres dans la wilaya de Tizi-Ouzou

1. Résultats de culture d'amibes libre

Les résultats de pourcentage des cultures positives en fonction du type et de l'origine du prélèvement, ont montré que la majorité des prélèvements provenaient des puits et sources naturelles avec 6 prélèvements d'eau et 12 écouvillons de puits ; et 5 prélèvements d'eau et 10 écouvillons pour les sources. Par contre une petite quantité des prélèvements a été collectée à partir des bains chauds, réseaux d'eau domestiques, et de réseaux d'eau de mosquées avec respectivement 3,4, et 3 échantillons d'eau ; et 6, 8 et 6 écouvillons (figure 15).

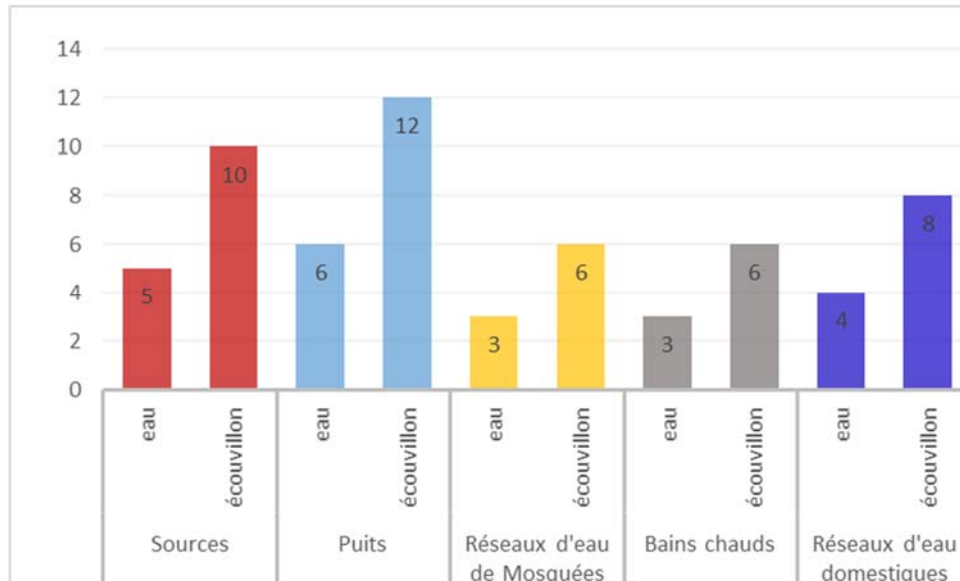


Figure 15 : Distribution des prélèvements d'eau et d'écouvillons de biofilms dans les sources d'eau naturelles et des réseaux confondus pour la recherche d'amibes libres dans la wilaya de Tizi-Ouzou

2. Identification morphologique

2.1. Identification au microscope inversé

Une observation quotidienne des boîtes de culture a été réalisée dès le 1er jour, pour les cultures incubées à 30°C et 37°C ; dont nous avons obtenu une apparition des plages de kystes autour du filtre (côtés coupés), et sur toute la boîte pour les biofilms.

Cependant, l'observation sous microscope inversé n'as pas permis l'identification des genres d'amibes libres, cela dit elle a permis de faire une comparaison entre les délais d'apparition des kystes de FLA. Le graphe montre que la majorité des apparitions des kystes d'amibes libres se produisent à partir des 3 à 6 jours d'incubation à 30°C pour la plupart des sources de prélèvements surtout pour les puits et les bains chauds. Et pour le type de prélèvement d'écouvillon l'apparition est dès le 3^{ème} jour d'incubation à 30°C et à partir du 2^{ème} jour pour les prélèvements incubés à 37°C. Donc une préférence d'apparition pour le type de prélèvements d'eau et d'écouvillons est dès le 2^{ème} et 3^{ème} jours (figure 16 et 17).

L'inconvénient majeur que nous avons rencontré dans les cultures d'amibes libres est l'apparition de champignons dont la croissance est plus rapide que celle des kystes d'amibes libres et qui envahissent la boîte de culture ; nous avons remarqué que le début de pousse de ces derniers commence à partir du 7^{ème} et 8^{ème} jour d'incubation pour les 2 températures d'incubation (30°C et 37°C). On a remarqué une croissance plus rapide et riche au niveau des boîtes d'amibes incubées à 37°C par rapport à celles incubées à 30°C (figure 18 et 19)

Résultats

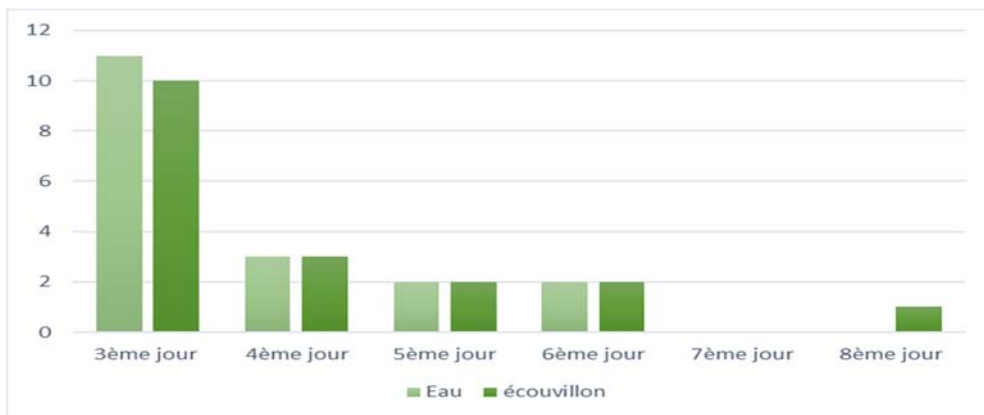


Figure 16 : Résultats de cultures positives de FLA en fonction du délai d'apparition des positifs dans les boites incubées à 30°C

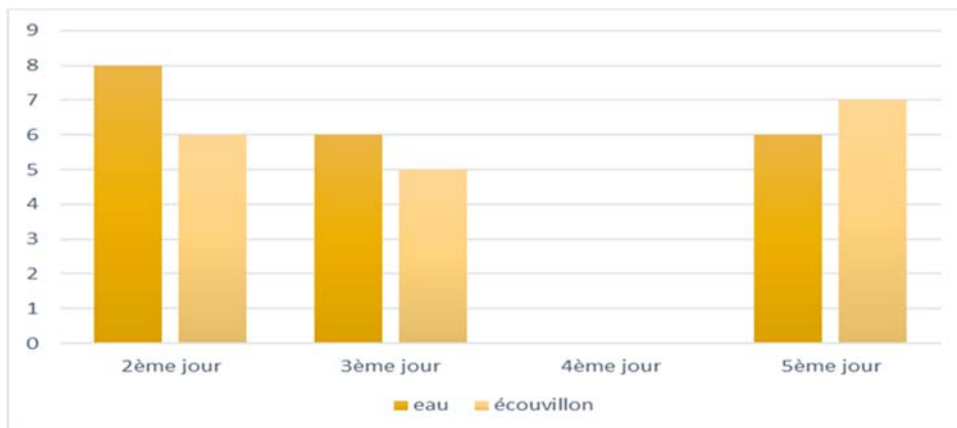


Figure 17 : Résultats de cultures positives de FLA en fonction du délai d'apparition des positifs dans les boites incubées à 37°C

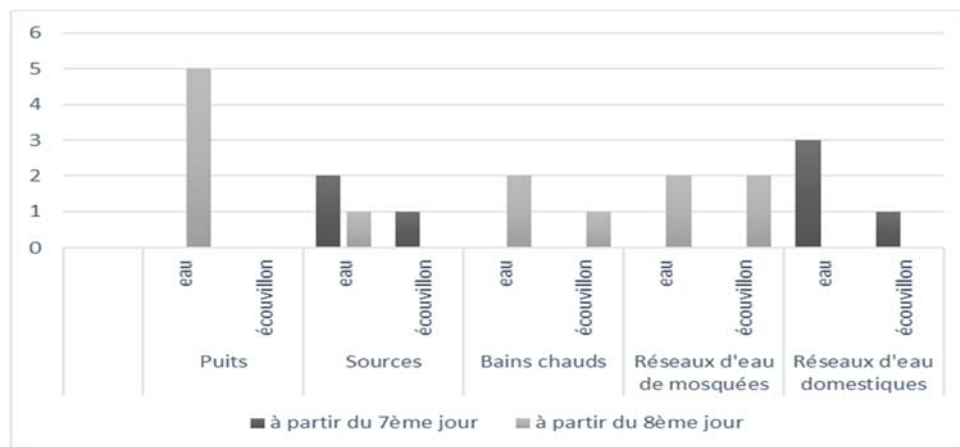


Figure 18 : Nombre et jour d'apparition des contaminations selon le types et l'origine des Prélèvements incubés à 30°C

Résultats

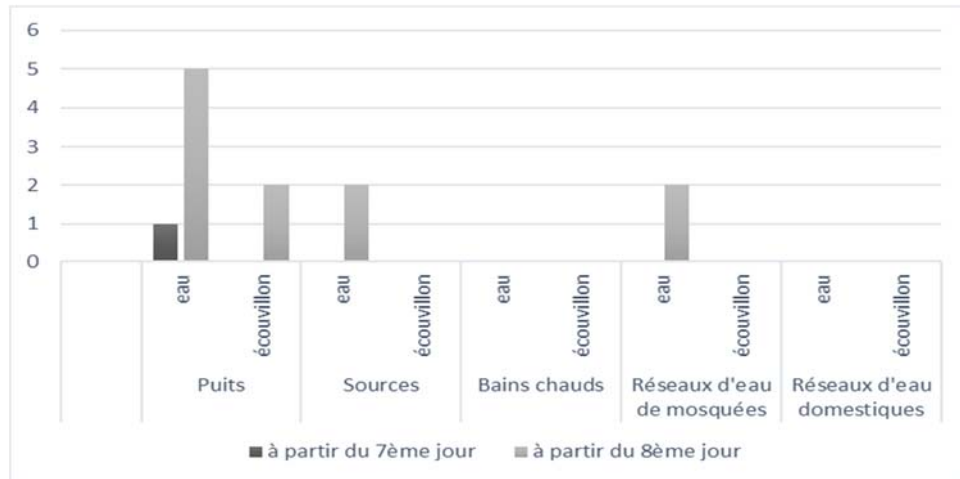


Figure 19 : Nombre et jour d'apparition des contaminations selon le type et l'origine des prélèvements incubés à 37°C

3. Résultats de culture d'*Escherichia coli*

Avant toute incubation des cultures d'amibes libres avec *E. Coli*, nous l'avons d'abordensemencé sur GN et ensuite la boîte préparée ensemencé a été incubée pendant 24h à 37°C. Des colonies très riches ont été remarquées sur toute la boîte de GN et qui a été utilisé par la suite pour les cultures des amibes libres. La boîte de GN déjà ensemencée avec *E. Coli* a été positive après 24h d'incubation avec une observation de colonies bien précises et définie et sans aucune contamination.

4. Résultats des repiquages des cultures d'amibes libres

Une observation d'apparition d'amibes libres plus rapide dès le 2ème jour et accroissement de nombre d'amibes en durée de 2 à 7 jours, plus une diminution de contamination remarquable des bactéries ou des champignons.

Parmi les 27 boîtes de repiquage, à 30°C on a remarqué que 12 boîtes dont 5 prélèvements d'eau et 7 d'écouvillons ont eu des formations de plages plus rapides que les autres, et à 37°C. On a observé que parmi les 15 boîtes dont 6 prélèvements d'eau et 9 d'écouvillons ont eu une croissance plus importante que les autres boîtes (figure 20). De plus, la durée de positivité des boîtes est plus rapide spécialement pour les écouvillons qui en plus d'être rapide, sont très riches. Pour les types des prélèvements, les observations ont montré que les boîtes de repiquage les plus riches étaient les boîtes d'écouvillons des prélèvements de puits et sources, qui ont une grande vitesse d'apparition des amibes libres plus que la richesse dans la boîte au fil des jours.

Résultats

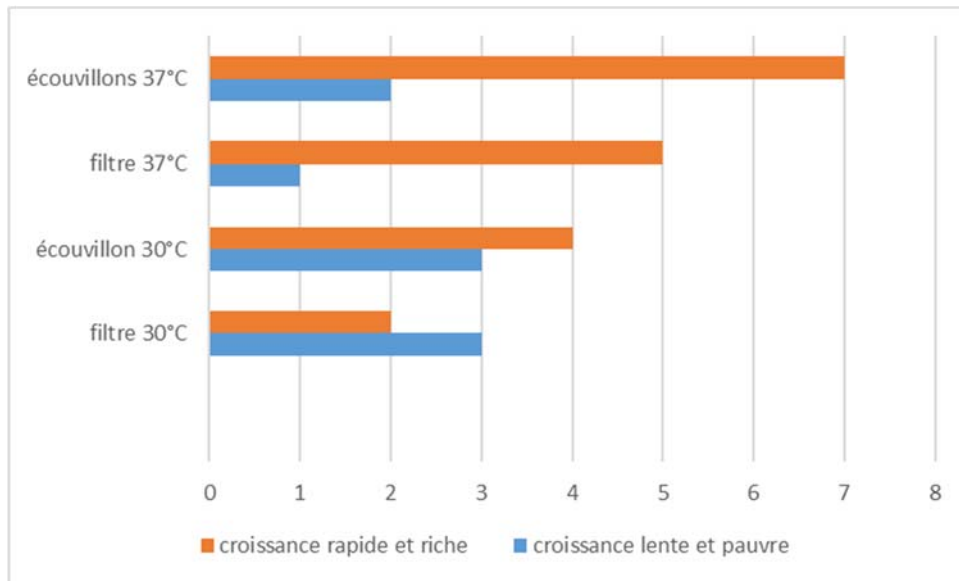


Figure 20 : Graphe représentant la vitesse de croissance et la richesse des cultures de repiquage des amibes libres dans les cultures de repiquages à 30°C et à 37°C

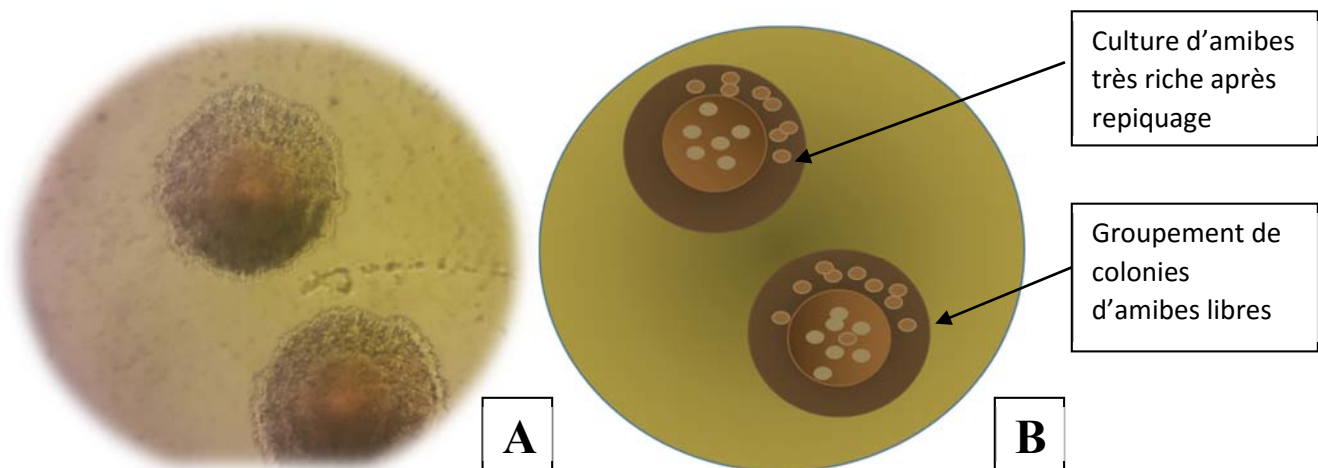


Figure 21 : Observation de culture de repiquage des colonies de kystes d'amibes libres (A) Sous microscope optique avec grossissement Gr_x200 (originale). (B) : représentation schématique

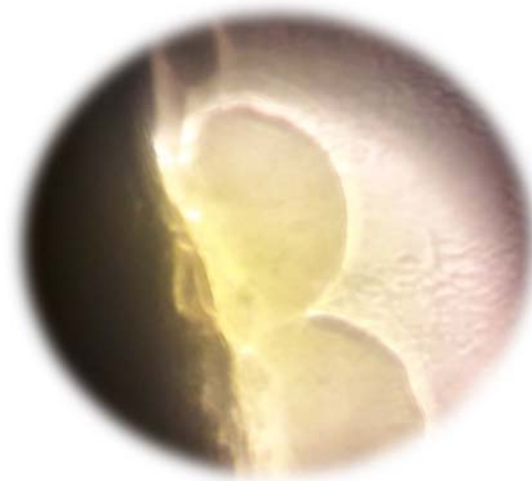


Figure 22 : Observation d'une plage de kystes des amibes libres à partir du filtre sous microscope inversé Gr_x200(original)

4.1. Identification morphologique au microscope optique des boîtes de cultures des prélèvements

Les observations au microscope ont montré que les différentes formes des kystes des amibes libres étaient soit regroupés en amas ou séparés. Nous avons aussi identifié des formes soit rondes ou carré ou même en triangles avec une membrane extérieure bien définis pour les différentes cultures de 30°C.

Les autres cultures à température 37°C ont permis l'observation des amibes libres au microscope en grande quantité. En remarquant les différentes formes de la paroi extérieure des kystes des amibes libres.

Les observations ont permis d'identifier avec les clés d'identification de Page (Garcia, et *al.*, 2013) d'*Acanthamoeba* à cause de sa double paroi avec un pourcentage de 70% du total des espèces donc une forte présence. Ainsi que l'identification de formes atypiques de kystes d'autres amibes libres également. (Figure 23)

Les filtres incubés à 37°C sont ceux qui ont donné de meilleurs résultats, alors que les filtres à 30°C sont ceux qui ont donné les résultats les plus bas.

Résultats

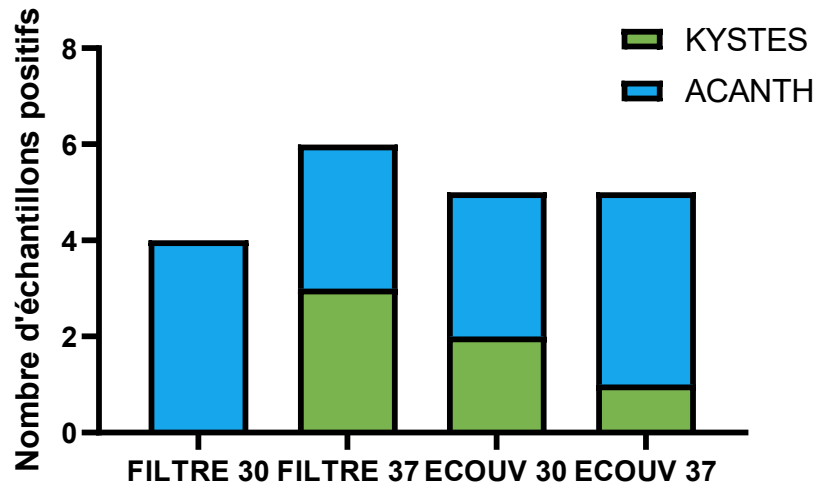


Figure 23 : Distribution des identifications des FLA en fonction des types de prélèvements et des températures d'incubation des cultures.
(acanth : acanthamoeba)

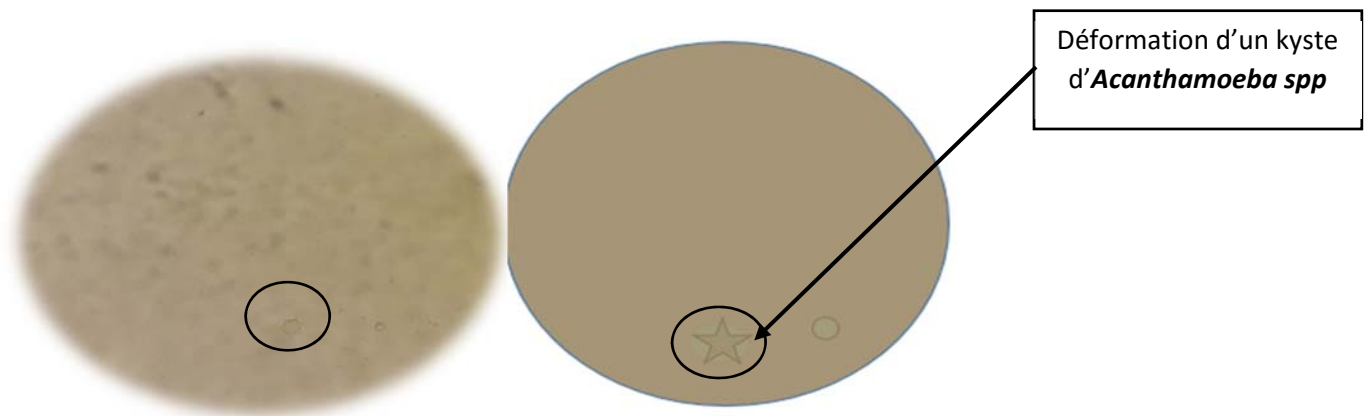


Figure 24 : Observation au microscope optique d'une déformation d'un kyste d'*Acanthamoeba* spp au grossissement $\times 400$ (Originale)

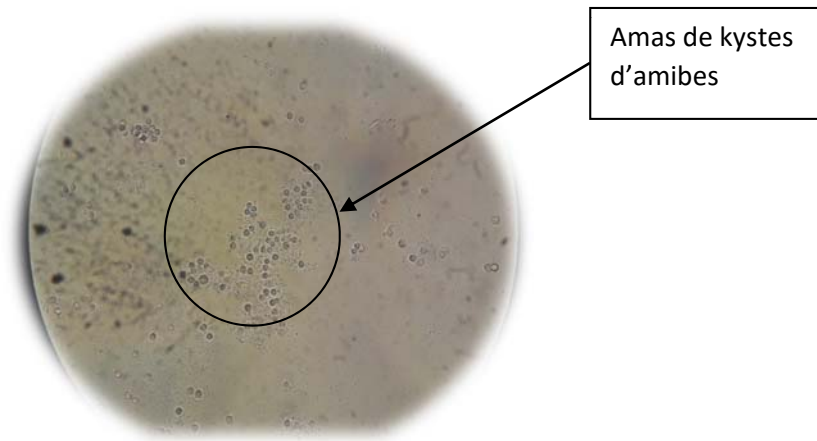


Figure 25 : Observation d'un amas de kystes d'amibes libres sous microscope photonique au grossissement Gr_x400 (originale)

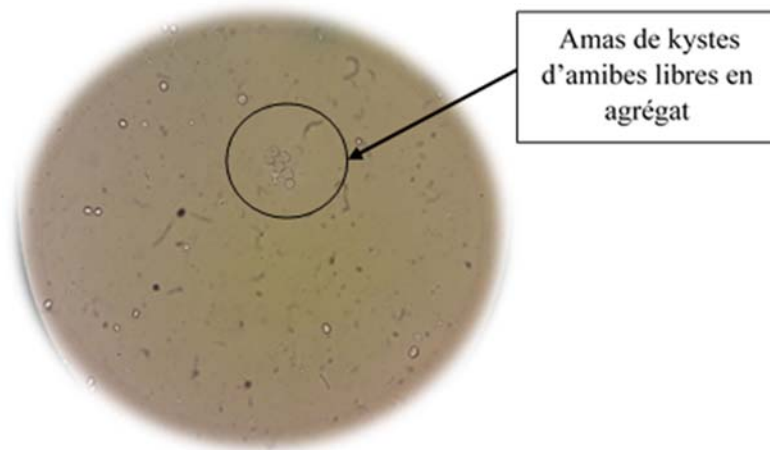


Figure 26 : Observation d'un petit amas de kystes d'amibes sous microscope optique au grossissement Gr_x400 (originale)

4.2. Contrôle au microscope inversé des cultures de repiquage

L'apparition des amibes libres a été obtenue à partir du 2^{ème} jour après le repiquage avec un accroissement du nombre d'amibes d'une durée de 4 à 5 jours. En arrivant au 10^{ème} jour, les résultats des observations ont montré une boîte de culture très riche en kystes d'amibes libres sur toute la surface de la boîte. En Outre, nous avons observé une apparition de plages d'amibes libres avec une couleur plus foncée là où la charge parasitaire était plus élevée, et moins foncée où les amibes étaient moins présentes.

4.3. Examen au microscope photonique des cultures de repiquage

L'examen au microscope optique a montré que le repiquage a permis l'augmentation du nombre d'amibes observée ainsi que la grande différence des types de kystes d'amibes libres présent dans les boîtes de repiquage.

4.4. Test de flagellation

Les contrôles effectués sous microscope toutes les 10 minutes pendant une heure ont montré qu'une incubation d'une heure avait permis d'avoir que des formes kystiques d'amibes libres. Concernant les résultats du test de flagellation pour les prélèvements d'écouvillons et de filtres, on a observé que des kystes d'amibes libres ne se déformant pas malgré l'augmentation de la température. Bien que la température d'incubation a été augmentée à 90°C, le test n'était pas concluant.

4.5. Coloration au Giemsa

La coloration au Giemsa a permis de mettre en évidence la présence des amibes libres tout en observant leur morphologie et en repérant la membrane extérieure ainsi que la membrane intérieure. Dans nos résultats nous avons obtenus des formes kystiques seulement.

La forme kystique, est immobile entouré d'une paroi double, dont une couche externe et une autre interne, le cytoplasme contient un seul noyau. La forme et la taille du kyste sont variables, de forme sphérique, ovale ou irrégulière (figure 27, 28). On a également observé des kystes sphériques ou ovales, avec une paroi simple et lisse, et un cytoplasme contenant un seul noyau. Sur le totale des 4 colorations que nous avons effectuées ; On a pu identifier des formes d'*Acanthamoeba spp*, ainsi qu'on a suspecté d'autres formes d'amibes libres différents des *Acanthamoeba*.

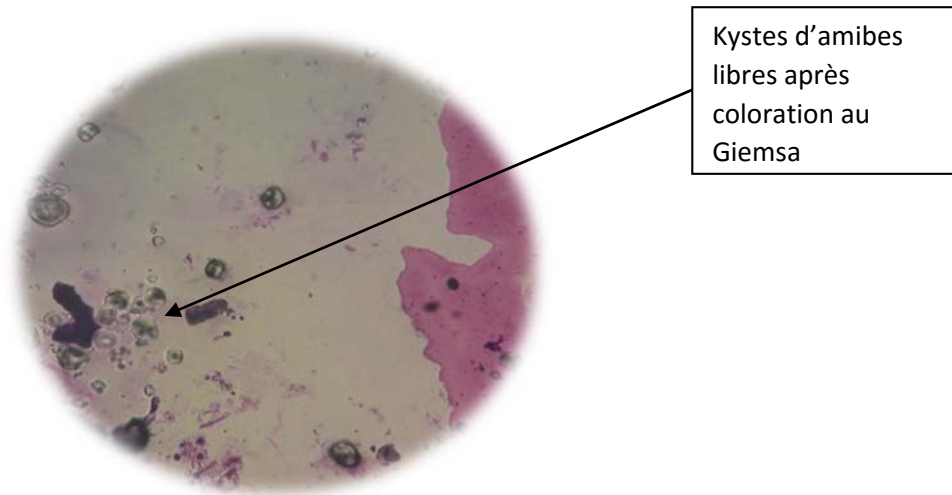


Figure 27 : Observation au microscope optique de kystes d'amibes libres après coloration au Giemsa avec grossissement Gr₄₀₀ (originale)

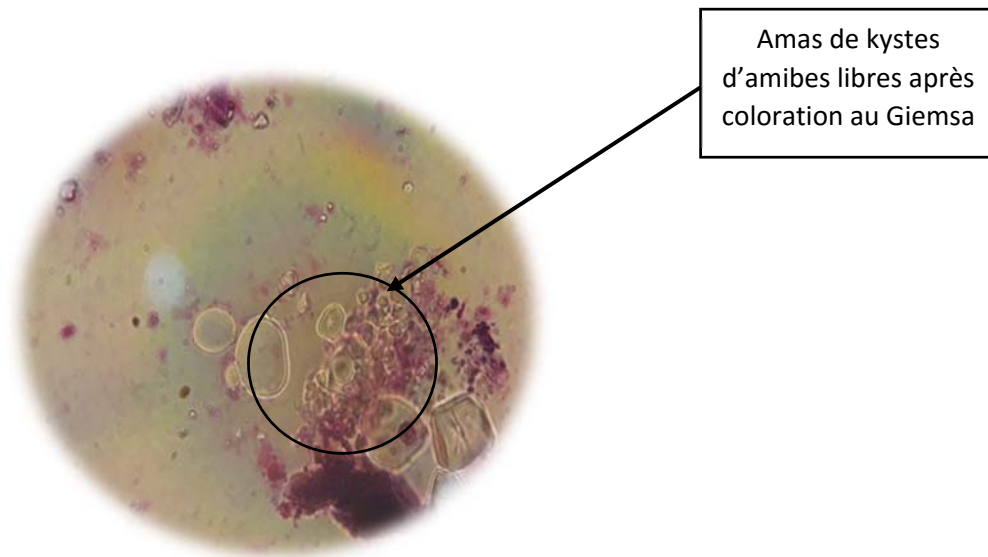


Figure 28 : Observation de kystes d'amibes libres après coloration au Giemsa sous microscope optique au grossissement Gr₁₀₀₀ avec l'huile à immersion (originale).

5. Identification moléculaire

5.1. Résultats de la charge parasitaire après récolte pour extraction

Les résultats de l'observation des amibes libres ont été obtenus en utilisant un microscope optique GRX 400 et une cellule de comptage de type Thomas.

L'analyse par une ANOVA à un facteur des résultats de la numération des prélèvements utilisés pour l'extraction n'ont pas montré de différence entre les 4 catégories (figure 29).

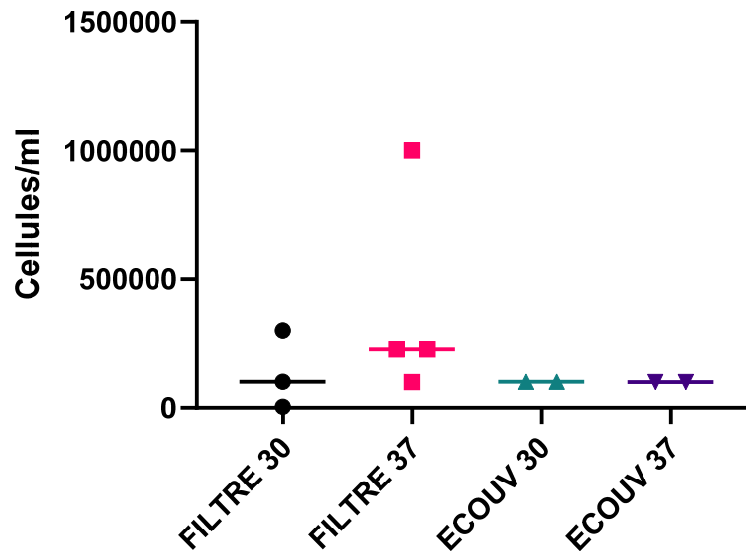


Figure 29 : Comparaison des résultats de numération : Absence de différence significative entre les catégories.

5.2. Résultats de l'analyse qualitative de l'ADN

Le gel a permis d'obtenir des bandes fluorescentes de l'ADN claires et d'autres échantillons où il n'y avait pas de bandes fluorescentes remarquées. Les échantillons n'ont pas montré de smears donc absence de contamination par les protéines et d'ARN. Ce qui fait que l'ADN des amibes libres a été extrait dans quelques échantillons mais avec différentes ampleurs et cette différence est due aux différentes concentrations présente dans chaque prélèvement (figure 30).

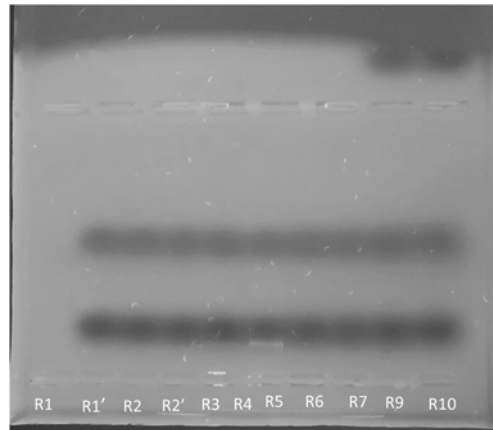


Figure 30 : résultats de gel de qualité d'agarose de l'électrophorèse des prélèvements (Sources R1, R1', R5, R9, Puits, R2, R2', R3, R4, R6, R7, R10)

5.3. La PCR en temps réel

Sur les 11 échantillons extraits, nous avons amplifié en PCR temps réel en utilisant le colorant Syber green, 9 échantillons avec l'amorce JDP spécifique à l'espèce *Acanthamoeba*. Et 3 échantillons suspecté *Naegleria*, à l'amorce *Nae* spécifique à l'espèce *Naegleria*.

Afin de rechercher une différence entre nos échantillons, nous avons fait suivre nos PCR d'une fusion (melting).

Sur les 3 échantillons ayant présenté des kystes similaires à *Naegleria*, Nous avons obtenu une amplification positive au genre *Naegleria* avec une température de fusion de 87,20 °C au niveau d'un échantillon de puit (figure 31).

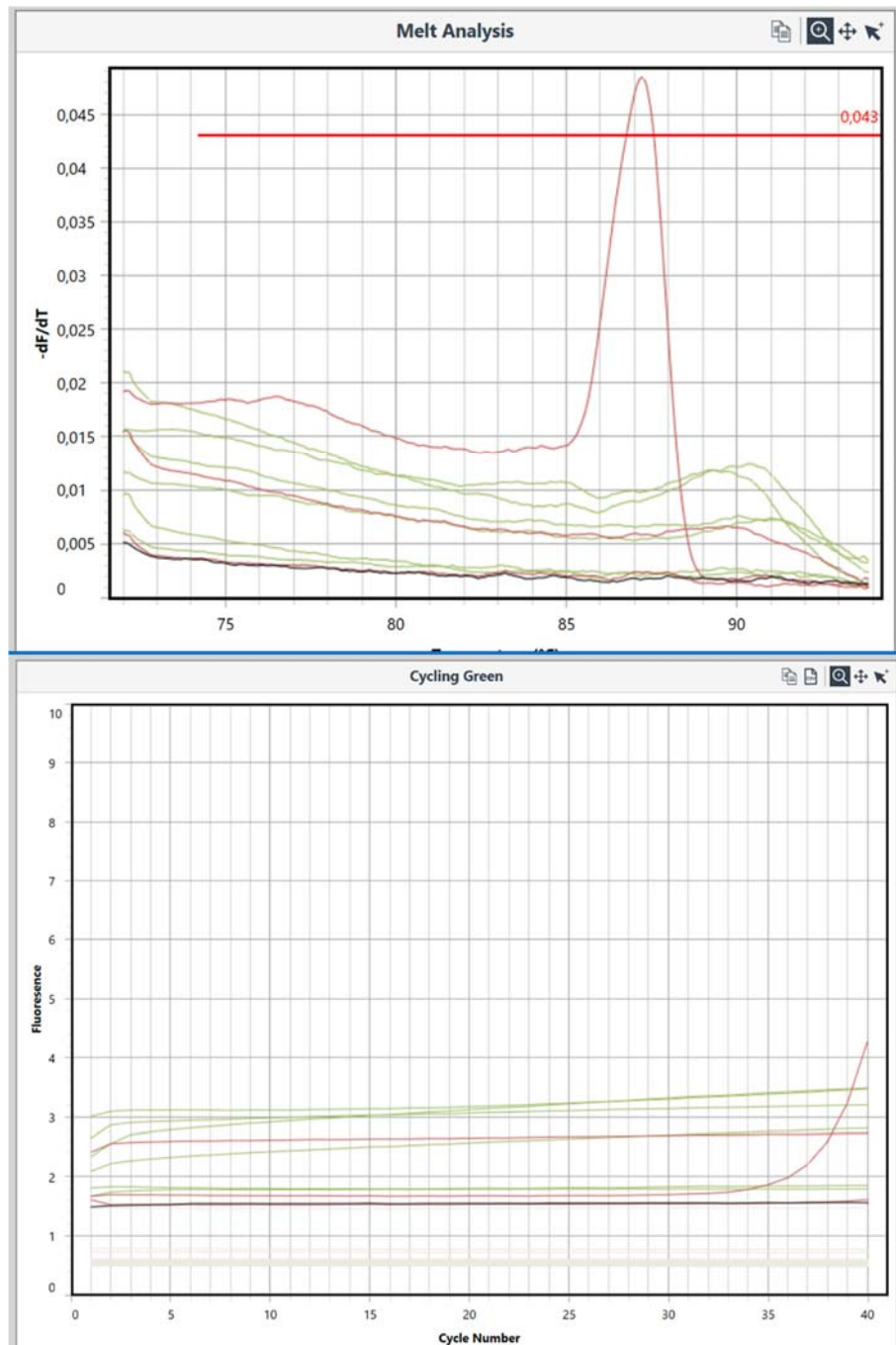


Figure 31 : Résultats des amplifications en temps réel de l'amorce spécifique à *Naegleria spp.*

Les résultats des amplifications spécifiques à *Acanthamoeba* avec l'amorce JDP sur 6 échantillons sont regroupés dans la figure 32. Ils montrent que les 6 échantillons sont positifs.

Les Ct obtenus figurent dans le tableau 7 Ils montrent que nos échantillons avaient des concentrations variables sachant que Ct sont inversement proportionnels aux concentrations.

Résultats

Tableau 7 : Résultats des Ct obtenus aux cours de nos PCR en temps réel

Échantillon	Puit 1	Puit 2	Puit 3	Puit 4	Puit 5	Puit 6
Ct (°C)	30,53	28,92	24,10	29,17	27,69	28,10

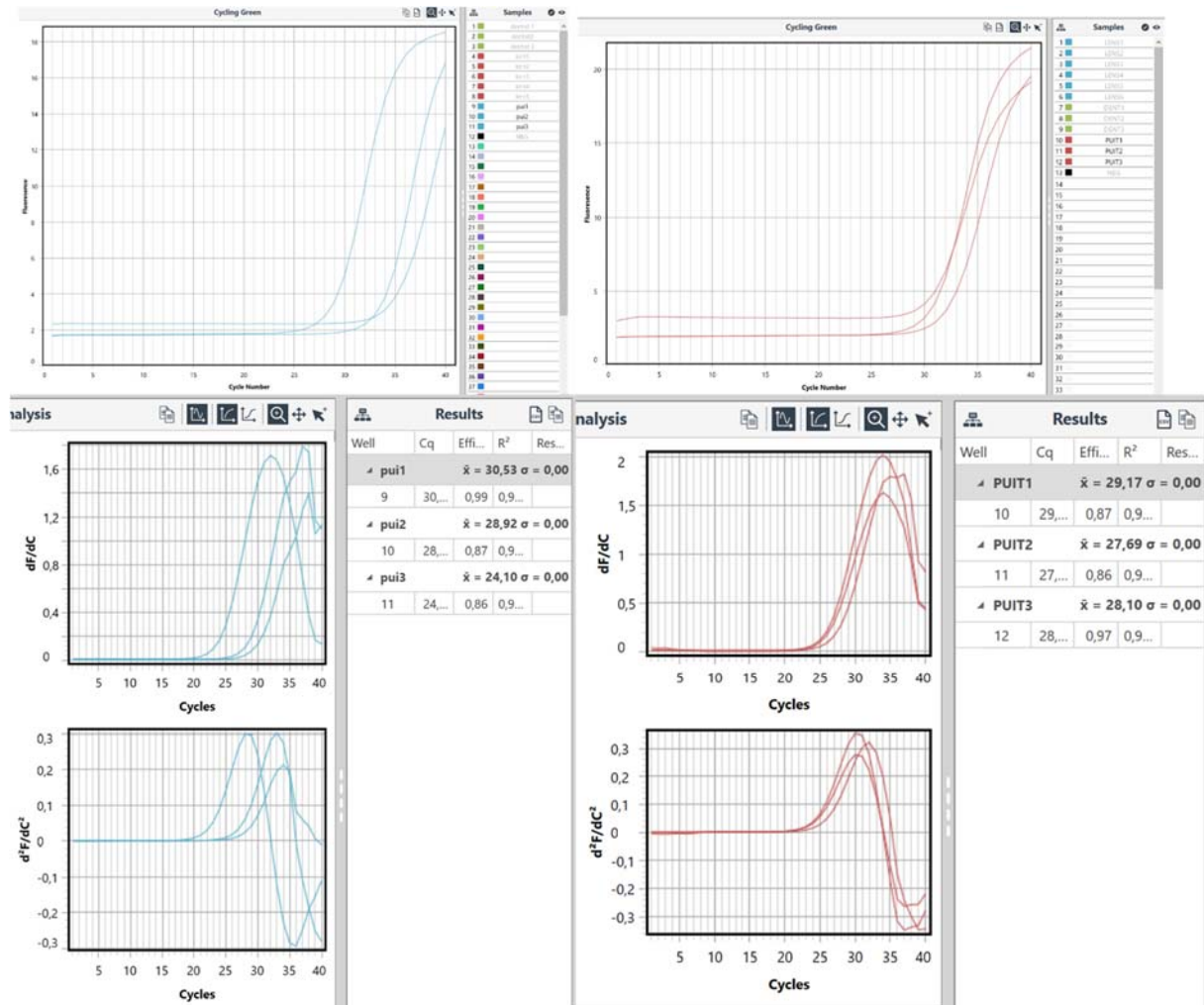


Figure 32 : Résultats des 6 échantillons testés en JDP avec les Ct obtenues

6. Résultats des cultures de légionelles

Les résultats de pourcentages des cultures positives en fonction du type et de l'origine du prélèvement, ont montré que parmi les 42 prélèvements nous avons obtenus, seuls 2 résultats positifs où on a observé une apparition de colonies de légionelles à partir du 3^{ème} au 5^{ème} jours d'incubation. Ces colonies sont de couleurs blanches bien rondes, lisses, et bien définies. (Figure33)



Figure 33 : Colonies de légionelles sur milieu de culture BCYE après 4 jours d'incubation
(originale)

6.1. Résultats du test d'agglutination

Une fois que la culture est positive nous avons prélevé une petite quantité de ces colonies et nous les avons placés sur la feuille du test d'agglutination puis nous avons rajouté une goutte de réactif (sérum qui correspond à quelques espèces de légionelles), et nous avons mélangé par la suite avec une pipette Pasteur, et en cas de résultats positifs (si le sérum correspond à l'espèce présente sur la boîte de culture) nous remarquerons une agglutination sur la zone du test. (Figure 34)

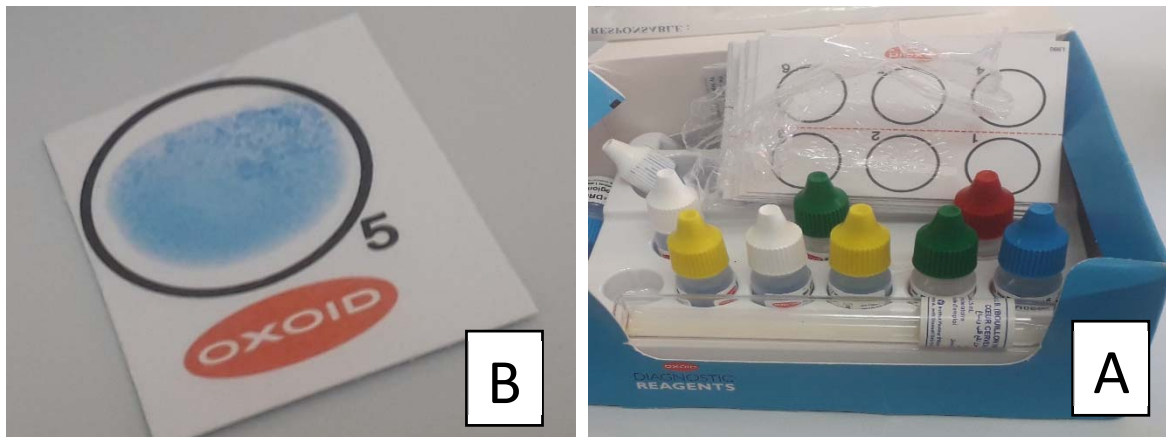


Figure 34 : (A) kit d'agglutination avec les différents sérums ;(B) résultat positif formation d'une réaction d'agglutination sur la zone de test

6.2. Résultats de culture sur gélose au sang

Afin de confirmer les résultats des cultures et du test d'agglutination nous avons également réalisé une culture des colonies de légionelles sur gélose au sang, nous avons observé que pour les 2 cas positifs, il n'y a pas eu de pousses donc les colonies sont bien des légionelles. Cependant, pour les autres cultures nous avons observé une pousse sur le milieu de gélose au sang ce qui prouve que ce ne sont pas des légionelles, car les légionelles ne poussent pas sur un milieu avec du sang. (Figure 35)

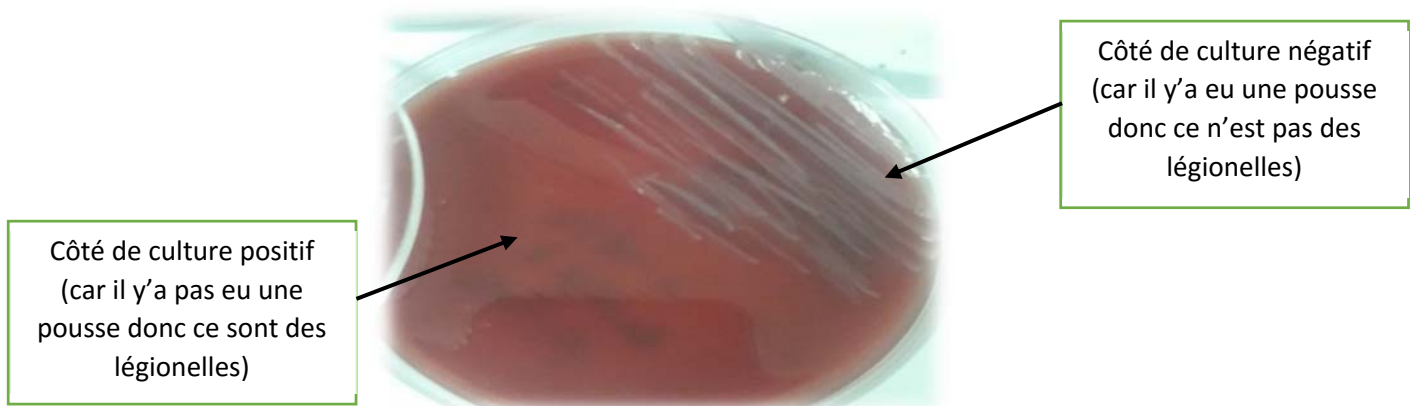


Figure 35 : Milieu de gélose au sang avec une culture de légionelles (un côté positif et un côté négatif)

Résultats

6.3. Résultats de conservation

Afin de garder les souches de légionelles obtenus comme référence nous avons procédé à la conservation des 2 souches positives.

Tableau 8 : Résultats et nombre des cultures de légionelles, et des tests de confirmation

Origine	Type	culture sur BCYE	Test d'agglutination	Culture sur gélose au sang	Espèces de légionelles identifiées
Source d'eau naturelle	Écouvillon	Positif	Agglutination positive	Négatif (pas de poussées)	<i>Legionella pneumophila</i> (séro groupe 1)
Puit	Écouvillon	Positif	Agglutination positive	Négatif (pas de poussées)	<i>Legionella spp</i> (séro groupe 7)

6.4. Résultats des cultures d'Amibes

Pour les deux prélèvements de biofilms, on a identifié morphologiquement des formes d'*Acanthamoeba spp* ; et les 2 ont été positifs aux cultures de légionelles, ce qui peut nous donner un indice sur la relation potentielle entre ces deux microorganismes, qui vivent dans les biofilms en association

Tableau 9 : Résultats de culture d'amibes libres et de Légionelles

Origine	Type	Culture sur BCYE	Espèces de légionelles identifiées	Culture d'amibe libres
Source d'eau naturelle	Écouvillon	Positif	<i>Legionella pneumophila</i> (séro groupe 1)	<i>Acanthamoeba. spp</i>
Puit	Écouvillon	Positif	<i>Legionella spp</i> (séro groupe 7)	<i>Acanthamoeba spp</i>

Discussion

Discussion

Dans la présente étude, nous avons obtenu 47% (20/42) de prélèvements positifs identifiés morphologiquement à partir des échantillons d'eau et écouvillons prélevés à différents points d'échantillonnage. Nos cultures étaient positives à l'identification de kystes d'amibes libres après 3 semaines d'incubation. Le taux de positivité était de 22% (33/ 150) échantillons Au total, 150 échantillons d'eau du robinet de la région d'Anatolie centrale en Turquie ; (Coşkun *et al.*, 2013) et avec un pourcentage de 62,1% des échantillons positifs dans l'article de (Krishnamoorthi *et al.*, 2022) ; eau de surface ont été prélevés dans 29 masses d'eau. Il s'agit de 11 étangs, 6 lacs, 5 ruisseaux, 4 fontaines, 1 barrage et 2 piscines. À Chandigarh et les régions environnantes de l'État du Pendjab (Inde)

Plusieurs paramètres ont été utilisés pour les différentes modifications développés dans notre étude. Il s'agit notamment du volume de l'échantillon. Dans notre étude, nous avons utilisé 2 volumes d'eau, à savoir 1 litre d'eau et 500 ml d'eau par échantillon. Le volume d'eau filtrée varie dans la littérature de 500 ml à 1 litre. Certains auteurs tel que Mahmoudi *et co.* (2011), ont utilisé un volume de 500 ml. De meilleurs résultats ont été obtenus lorsqu'un volume plus important de 1 litre a été utilisé (Moussa *et al.*, 2011).

Par ailleurs, un autre paramètre important pourrait influencer les résultats obtenus, c'est la taille des pores du filtre utilisé. Différentes tailles de filtres de 0,2 µm à 0,45 µm sont utilisées, en fonction de l'objectif et de la méthode d'échantillonnage et de culture des amibes. Par exemple, dans une étude de Delafont *et col* (2013) (Paknejad *et al.*, 2019), un filtre de 0,2 µm a été utilisé pour concentrer les amibes libres. Les travaux de Mahmoudi *et col.* (2011), ont montré qu'un filtre de 0,45 µm a été utilisé pour concentrer ces micro-organismes et a obtenu 70,3 % de cultures positives en se basant sur des critères morphologiques. Et pour notre étude, un filtre de 0,45 µm a été utilisé et les résultats de l'identification morphologique ont été positifs à 47% (20/42) de positifs identifiés morphologiquement.

Nous avons aussi utilisé la gélose blanche milieu (agar-agar) tapissé d'une suspension de *Escherichia coli* thermo inactivée comme milieu de culture plus propice pour la croissance des amibes libres en similitude avec de nombreux auteurs (Sousa-Ramos *et al.*, 2022 ; Behnia, 2017 ; Marciano-Cabral *et al.*, 2009b ; Üstüntürk-Onan & Walochnik, 2018). Les milieux stériles riches en suspension *E. coli* morte sont favorables à la croissance et à la multiplication des amibes libres et à l'isolement des espèces pour obtenir des cultures pures, puisque les bactéries constituent la principale source de nutriment qui favorise la multiplication et croissance.

La température de culture est également un facteur important dans l'isolement, la culture et la propagation des amibes libres. La plupart des auteurs utilisent une température de culture entre 30°C et 37°C (Khan, 2006d ; Ramirez *et al.*, 2014). Les cultures à 30°C et 37°C ont montré un haut niveau de positivité (100% de positivité), comme dans notre étude. Ce sont donc des températures idéales pour obtenir de bons résultats en termes de nombre et de développement d'amibes libres.

L'identification morphologique des amibes libres est basée sur la morphologie des kystes et des trophozoïtes, la double paroi pour *Acanthamoeba* et le test de flagellation pour *Naegleria*. (Siddiqui & Khan, 2012). Ces deux méthodes ont été utilisées dans la présente étude pour identifier les genres d'amibes libres. Le test de flagellation a également été très bien étudié et a permis d'observer la transition de la forme kystique à la forme végétative mais pour notre étude

Discussion

les kystes ne se transformé pas en trophozoïtes contrairement à ce que l'on retrouve dans la littérature. Parmi les méthodes d'identification morphologique, nous avons utilisé la coloration de Giemsa qui nous a permis de mieux observer et identifier les espèces et leurs kystes. Cette méthode est similaire à celle d'El-Sayed & Hikal (2014), car dans cette méthode un colorant se fixe sur les structures cellulaires des amibes, comme le noyau ou les vacuoles. Elle permet ainsi de distinguer les amibes des autres microorganismes.

Plusieurs auteurs ont rapporté la présence des kystes d'*Acanthamoeba* comme l'espèce la plus communément trouvée dans les sources d'eau chaude, avec des taux qui varie de 47,8 % à 42,9%. Les identifications ont été faite sur la base de critères morphologiques tel que dans les étuds de Dodangeh et col, (2018) et Badirzadeh, (2011). Un taux de 44% (11 Sur les 25 échantillons d'eau prélevés dans des sources minérales) du nord de l'Iran, étaient positifs pour *Acanthamoeba* spp, dans l'étude de Haddad et col. (2020) ; Les résultats de notre étude ont également démontré une importante présence de cette espèce par rapport aux autres amibes libres, avec un pourcentage de 70% (14/20) d'*Acanthamoeba* spp.

L'utilisation du milieu (BCYE) avec addition antibiotiques, le milieu solide le plus couramment utilisé pour la culture de *Légionella pneumophila* (Chatfield & Cianciotto, 2012 ; Tabatabaei, 2016). Les cultures de légionelles ont été incubées à 40°C comme dans le manuel (De Veenendaal et al., 2017), contrairement à la plupart des autres articles qui utilisent la température de 37°C d'incubation (Ülger et al., 2022).

Les espèces de *Légionella* les plus fréquemment observées étaient *Légionella pneumophila*, qui a été détectée le plus dans les échantillons prélevés dans l'article de (Valciņa et al., 2019b).

Dans notre étude nous avons obtenu 1 échantillon positif pour *Légionella pneumophila* et 1 pour *Légionella* spp séro groupe 7, dans les prélèvements de biofilms provenant des mêmes points de prélèvements d'échantillons d'amibes aussi positifs (source d'eau naturelle ; et puit respectivement). Dans les travaux de Gomes et col, (2020), le séro groupe 1 de *L. pneumophila* apparaît comme le groupe le plus fréquemment identifié, représentant 81 % des cas confirmés par la culture. La capacité de *Légionella* spp, à persister dans des biofilms et à se répliquer en parasitant des cellules d'amibes peut être considérée comme un mécanisme de survie, et au même temps un problème de résistance et d'échappement aux méthodes de désinfections. (Lau & Ashbolt, 2009)

Pour notre identification moléculaire, nous avons utilisé 2 kit d'extraction d'ADN : le kit QIAGEN® comme dans la méthode utilisée dans l'article de Eroğlu, (2018). Dans notre étude les résultats avec ce kit été négatifs, par contre l'extraction par kit Mag-Bind® a donné des résultats positifs d'extraction

L'identification moléculaire des amibes libres par PCR est la plus utilisée dans la littérature en raison de sa précision grâce à l'utilisation d'amorces spécifiques. *JDP1* et *JDP2* sont les plus étudiés dans l'identification du genre *Acanthamoeba*. (Caumo & Rott, 2011), et d'autres amorces spécifiques à *Naegleria* (Nae)

Pour notre étude nous avons utilisé la PCR à temps réel qui nous a donner des résultats positifs et plus précis en fonction de leur concentration. Sur les 11 échantillons extraits, nous avons amplifié en PCR temps réel en utilisant le colorant Syber green, 9 échantillons avec l'amorce JDP spécifique à l'espèce *Acanthamoeba* qui a donné 6 résultats positifs.

Discussion

Et (3/11) échantillons suspecté *Naegleria*, à l'amorce *Nae* spécifique à l'espèce *Naegleria* parmi lesquels nous avons un seul échantillon positif (1/3) contenant le genre *Naegleria* ; dans l'étude de Kao et col. (2013) ; *Naegleria* a été détecté avec un pourcentage de 4,0 % (7/176) des échantillons d'eau de rivière, l'eau potable brute et l'eau thermale.

Parmi les amibes libres qu'on trouve dans les sources d'eau chaudes les espèces les plus courantes sont *Vermamoeba vermiformis* et *Naegleria* selon (Berrilli et al., 2021), mais on peut les trouver aussi dans les puits comme dans notre étude où nous avons pu identifier le genre *Naegleria*.

Conclusion

Conclusion

Il est connu que les conduites d'eau des robinets de réseaux domestiques, puits, bains chauds et sources d'eau naturelles, peuvent héberger des amibes libres dans l'eau et les biofilms. Le but est de rechercher et d'étudier la présence et l'importance des amibes libres et les identifier dans l'eau et les biofilms à l'aide des écouvillons et de filtres. Nous nous sommes intéressée aux amibes libres qui pourraient être présentes dans les eaux de sources et bains maures, avec également quelques réseaux d'eau confondus dans la wilaya de Tizi Ouzou, sur la base de méthodes morphologique et moléculaire.

Les filtres et écouvillons de nos échantillons ont été traités par culture sur gélose en utilisant des *E. coli* mortes, qui est une source nutritive supplémentaire requise par l'amibe. Deux types d'échantillons ont été utilisés et incubés à deux températures différentes, 30°C et 37°C. L'utilisation de ces deux températures a également démontré que la croissance des cultures était complémentaire.

Les kystes d'amibes libres ont été détecté morphologiquement dans 100% des cultures. L'identification morphologique a montré que l'amibe majoritaire était *Acanthamoeba* à 70%. D'autres formes atypiques d'amibes libres ont été retrouvées. De plus, la coloration Giesma a été réalisé pour une meilleure distinction de la paroi des amibes libres.

Pour l'identification moléculaire, 2 types d'extraction d'ADN ont été utilisé à l'aide de 2 kits (kit QIAGEN®, et par kit Mag-Bind®). L'analyse qualitative de l'extraction par gel d'agarose a montré l'efficacité des deux kits. Par la suite une PCR à temps réel utilisant le colorant Syber Green a été nécessaire pour confirmer nos identifications morphologiques. L'amorce JDP spécifique à *Acanthamoeba* a confirmé nos identifications sur 6 échantillons. Par ailleurs, l'amorce Nae ciblant le genre *Naegleria* a permis de confirmer la présence dans un échantillon de puit sur les 3 que nous avons testé.

Notre étude a également démontré la présence de 2 espèces de légionelles (*Legionella pneumophila* séro groupe 1 et *Legionella* spp séro groupe 7) dans les mêmes échantillons d'eau de biofilms réalisés pour l'étude des amibes provenant du même point de prélèvement (source d'eau naturelle, et puit respectivement). Ce qui nous confirme une potentielle association entre les deux et donc un plus grand risque de dissémination de cette bactérie et des infections liées à ces dernières. De plus, cette association peut générer une résistance aux méthodes de désinfection des eaux, ce qui va augmenter le risque sanitaire lié à ces microorganismes.

Notre travail de recherche a permis d'ouvrir la voie à de nouveaux projets d'investigation sur les amibes libres en Algérie, qui pourraient fournir des informations sur l'origine, le développement et les mécanismes pathogènes de ce microorganisme afin de prévenir les maladies liées aux amibes libres dans l'eau des sources, et de robinet des systèmes d'eau, et bains maures.

Cette étude devrait être complétée par un échantillonnage plus important et une identification moléculaire complète de la totalité des échantillons ; et le séquençage des produits PCR fournirait des précieuses informations sur la phylogénie des espèces présentes en Algérie, en particulier dans la région de Tizi Ouzou.

Conclusion

Les résultats suggèrent qu'on devrait être conscients des dangers des amibes libres. La fréquence réelle n'est pas connue et est probablement sous-estimée. Les bains chauds et l'eau de puits comme source d'eau devraient être évités ou traitée avant l'utilisation et suggérer l'installation de filtres dans les réseaux d'eau. Il est également important de faire comprendre aux enfants pour qu'ils évitent les baignades incontrôlées dans les eaux courantes et stagnantes, en particulier pendant les mois d'été lorsque l'amibe est la plus active.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Abedkhozasteh, H. (2013, 1 septembre). First Report of Hartmannella keratitis in a Cosmetic Soft Contact Lens Wearer in Iran. PubMed Central (PMC).
- Armand, B., Motazedian, M. H., & Asgari, Q. (2015). Isolation and identification of pathogenic free-living amoeba from surface and tap water of Shiraz City using morphological and molecular methods. *Parasitology Research*, 115(1), 63-68.
- Badirzadeh, A. (2011, 1 juin). Isolation of Free-Living Amoebae from Sarein Hot Springs in Ardebil Province, Iran. PubMed Central (PMC).
- Barker, J. R., & Brown, M. A. (1994). Trojan Horses of the microbial world : protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. *Microbiology*, 140(6), 1253-1259.
- Behnia, M. (2017, 1 décembre). *Occurrence of Acanthamoeba Genotypes in Wastewater Samples in Tehran, Iran*. PubMed Central (PMC).
- Berrilli, F., Di Cave, D., Novelletto, A., & Di Filippo, M. M. (2021). PCR-based identification of thermotolerant free-living amoebae in Italian hot springs. *European Journal of Protistology*, 80, 125812.
- Bhosale, N. K., & Parija, S. C. (2021). Balamuthia mandrillaris : An opportunistic, free-living ameba - An updated review. PubMed, 11(2), 78-88.
- Bhosale, N. K., & Parija, S. C. (2021b). Balamuthia mandrillaris : An opportunistic, free-living ameba - An updated review. PubMed, 11(2), 78-88.
- Boilattabi, N., Barrassi, L., Bouanane-Darenfed, A., & La Scola, B. (2020). Isolation and identification of *Legionella* spp. from hot spring water in *Algeria* by culture and molecular methods. *Journal of Applied Microbiology*, 130(4), 1394-1400.
- Castrillón, J. C., & Orozco, L. P. (2013). Acanthamoeba spp. como parásitos patógenos y oportunistas [Acanthamoeba spp. as opportunistic pathogens parasites]. *Revista chilena de infectología : organo oficial de la Sociedad Chilena de Infectología*, 30(2).
- Cateau, E., Maisonneuve, E., Peguilhan, S., Quellard, N., Héchard, Y., & Rodier, M. (2014). Stenotrophomonas maltophilia and Vermamoeba vermiformis relationships : Bacterial multiplication and protection in amoebal-derived structures. *Research in Microbiology*, 165(10), 847-851.
- Caumo, K. S., & Rott, M. B. (2011). Acanthamoeba T3, T4 and T5 in swimming-pool waters from Southern Brazil. *Acta Tropica*, 117(3), 233-235.
- Cervero-Aragó, S., Rodríguez-Martínez, S., Puertas-Bennasar, A., & Araujo, R. (2015). Effect of Common Drinking Water Disinfectants, Chlorine and Heat, on Free Legionella and Amoebae-Associated Legionella. *PLOS ONE*, 10(8), e0134726.
- Cervero-Aragó, S., Sommer, R., & Araujo, R. (2014b). Effect of UV irradiation (253.7 nm) on free Legionella and Legionella associated with its amoebae hosts. *Water Research*, 67, 299-309.
- Chatfield, C. H., & Cianciotto, N. P. (2012). *Culturing, Media, and Handling of Legionella*. Dans Humana Press eBooks (p. 151-162).

Références bibliographiques

- Coşkun, K., Özçelik, S., Tutar, L., Elaldi, N., & Tutar, Y. (2013). Isolation and Identification of Free-Living Amoebae from Tap Water in Sivas, Turkey. *BioMed Research International*, 2013, 1-8.
- Cunha, B. A., Burillo, A., & Bouza, E. (2016). Legionnaires' disease. *The Lancet*, 387(10016), 376-385.
- De Jonckheere, J. F., & Brown, S. J. (1998b). There Is No Evidence That the Free-Living Ameba *Hartmannella* Is a Human Parasite. *Clinical Infectious Diseases*.
- Delafont, V., Rodier, M., Maisonneuve, E., & Cateau, E. (2018). *Vermamoeba vermiformis* : a Free-Living Amoeba of Interest. *Microbial Ecology*, 76(4), 991-1001.
- Dodangeh, S., Kialashaki, E., Daryani, A., Sharif, M., Sarvi, S., Moghaddam, Y. H., & Hosseini, S. A. (2018). Isolation and molecular identification of *Acanthamoeba* spp. from hot springs in Mazandaran province, northern Iran. *Journal of Water and Health*, 16(5), 807-813.
- El-Sayed, N. M., & Hikal, W. M. (2014). Several staining techniques to enhance the visibility of *Acanthamoeba* cysts. *Parasitology Research*, 114(3), 823-830.
- Eroğlu, F. (2018). Türkiye'nin Güney ve Güneydoğusundaki Evlerin İklimlendirmelerinde *Balamuthia mandrillaris* Parazitinin İzolasyonu. *Mikrobiyoloji Bulteni*.
- Fabros, M. R. L., Diesta, X. R. S., Oronan, J. A., Verdejo, K. S., Garcia, J. S. M., Romey, M. S., & De Jesus Milanez, G. (2021). Current report on the prevalence of free-living amoebae (FLA) in natural hot springs: a systematic review. *Journal of Water and Health*, 19(4), 563-574.
- Fouque, E., Trouilhé, M., Thomas, V., Hartemann, P., Rodier, M., & Héchar, Y. (2012). Cellular, Biochemical, and Molecular Changes during Encystment of Free-Living Amoebae. *Eukaryotic Cell*, 11(4), 382-387.
- Gelman, B. B., Rauf, S. J., Nader, R., Popov, V., Borkowski, J., Chaljub, G., Nauta, H. J., & Visvesvara, G. S. (2001). Amoebic Encephalitis Due to *Sappinia diploidea*. *JAMA*, 285(19), 2450.
- Gelman, B. B., Rauf, S. J., Nader, R., Popov, V., Borkowski, J., Chaljub, G., Nauta, H. J., & Visvesvara, G. S. (2001b). Amoebic Encephalitis Due to *Sappinia diploidea*. *JAMA*, 285(19), 2450.
- Gomes, T. S., Vaccaro, L., Miró, G., Izquierdo, F., Acosta, L., Martínez-Fernández, C., Mayo, L., Moran, M., Pozuelo, M. J., Peña-Fernández, A., & Del Aguila, C. (2020). Presence and interaction of free-living amoebae and amoeba-resisting bacteria in water from drinking water treatment plants. *Science of The Total Environment*, 719, 137080.
- Güémez, A. M., & García, E. L. (2021). Primary Amoebic Meningoencephalitis by *Naegleria fowleri* : Pathogenesis and Treatments. *Biomolecules*, 11(9).
- Haddad, M. H. F., Habibpour, H., & Mahmoudi, M. R. (2020). Isolation and molecular identification of free-living amoebae (*Naegleria* spp., *Acanthamoeba* spp. and *Vermamoeba* spp.) from mineral springs in Guilan Province, northern Iran. *Journal of Water and Health*, 18(1), 60-66.

Références bibliographiques

Harris, G. R., & Batra, R. (2020). *Naegleria fowleri*. *The New England Journal of Medicine*, 383(11), 1057.

Isolation and identification of Legionella spp. from different aquatic sources in south-west of Iran by molecular & culture methods. (2016, 1 décembre). PubMed.

Kang, Z., Peng, C., Peng, P., Lin, Y., Zhang, X., & Ren, H. (2019). Towards the biofilm characterization and regulation in biological wastewater treatment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(3), 1115-1129.

Kao, P., Tung, M., Hsu, B., Chou, M., Yang, H., She, C., & Shen, S. (2013). Quantitative detection and identification of *Naegleria* spp. in various environmental water samples using real-time quantitative PCR assay. *Parasitology Research*, 112(4), 1467-1474.

Khan, K. M. (2006a). *Acanthamoeba* : biology and increasing importance in human health. *Fems Microbiology Reviews*.

Khan, K. M. (2006b). *Acanthamoeba* : biology and increasing importance in human health. *Fems*

Khan, K. M. (2006c). *Acanthamoeba* : biology and increasing importance in human health. *Fems Microbiology Reviews*, 30(4), 564-595.

Krishnamoorthi, S., Sharma, C., Mewara, A., & Khurana, S. (2022). Environmental water surveillance for free-living amoeba in North India. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 40(3), 389-393.

Latifi, A., Salami, M., Kazemi-Rad, E., & Soleimani, M. (2020). Isolation and identification of free-living amoeba from the hot springs and beaches of the Caspian Sea. *Parasite Epidemiology and Control*, 10, e00151.

Lau, H., & Ashbolt, N. J. (2009). The role of biofilms and protozoa in *Legionella* pathogenesis : implications for drinking water. *Journal of Applied Microbiology*, 107(2), 368-378.

Mahmoudi, M. R., Taghipour, N., Eftekhar, M. A., Haghghi, A., & Karanis, P. (2011). Isolation of *Acanthamoeba* species in surface waters of Gilan province-north of Iran. *Parasitology Research*, 110(1), 473-477.

Marciano-Cabral, F. (1988). Biology of *Naegleria* spp. *Microbiological reviews*, 52(1), 114-133.

Marciano-Cabral, F., Jamerson, M., & Kaneshiro, E. S. (2009b). Free-living amoebae, *Legionella* and *Mycobacterium* in tap water supplied by a municipal drinking water utility in the USA. *Journal of Water and Health*, 8(1), 71-82.

Martinez, A. A., & Visvesvara, G. S. (1997). Free-living, Amphizoic and Opportunistic Amebas. *Brain Pathology*, 7(1), 583-598.

Martínez, A. D., Schuster, F. L., & Visvesvara, G. S. (2001). *Balamuthia mandrillaris* : its Pathogenic Potential. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 48, 6s-9s.

Matin, M. A., Siddiqui, R., Jayasekera, S., & Khan, K. M. (2008). Increasing Importance of *Balamuthia mandrillaris*. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(3), 435-448.

Références bibliographiques

Microbiology Reviews, 30(4), 564-595.

Moussa, M., Marcelino, I., Richard, V., Guerlotté, J., & Talarmin, A. (2020). An Optimized Most Probable Number (MPN) Method to Assess the Number of Thermophilic Free-Living Amoebae (FLA) in Water Samples. *Pathogens*, 9(5), 409.

Paknejad, N., Hajjalilo, E., Saraei, M., & Javadi, A. (2019). Isolation and identification of Acanthamoeba genotypes and Naegleria spp. from the water samples of public swimming pools in Qazvin, Iran. *Journal of Water and Health*, 18(2), 244-251.

Rafsanjani, M. K., Hajjalilo, E., Saraei, M., Alizadeh, S. A., & Javadi, A. (2020). Isolation and Molecular Identification of Acanthamoeba and Naegleria from Agricultural Water Canal in Qazvin, Iran. *Iranian Journal of Parasitology*, 15(3): 393-402.

Ramirez, E., Robles, E., Martinez, B., Ayala, R., Sainz, G., Martinez, M. E., & Gonzalez, M. C. (2014). Distribution of free-living amoebae in a treatment system of textile industrial wastewater. *Experimental Parasitology*, 145, S34-S38.

Salazar-Ardiles, C., Asserella-Rebollo, L., & Andrade, D. C. (2022b). Free-Living Amoebas in Extreme Environments : The True Survival in our Planet. *BioMed Research International*, 2022, 1-10.

Salehi, A., Arjmand, R., Beiromvand, M., & Tavalla, M. (2022). Molecular Identification of Free-living Amoebae Isolated from Hospital Water Systems in Southwest Iran. *Infectious disorders drug targets*, 22(8).

Samba-Louaka, A., Delafont, V., Rodier, M., Cateau, E., & Héchard, Y. (2019). Free-living amoebae and squatters in the wild : ecological and molecular features. *Fems Microbiology Reviews*, 43(4), 415-434.

Scheid, P., Lâm, T., Sinsch, U., & Balczun, C. (2019). Vermamoeba vermiformis as etiological agent of a painful ulcer close to the eye. *Parasitology Research*, 118(6), 1999-2004.

Schuster, F. L., & Levandowsky, M. (1996). Chemosensory Responses of Acanthamoeba castellanii : Visual Analysis of Random Movement and Responses to Chemical Signals. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 43(2).

Siddiqui, R., & Khan, K. M. (2012). Biology and pathogenesis of Acanthamoeba. *Parasites & Vectors*, 5(1).

Siddiqui, R., Makhlof, Z., & Khan, K. M. (2021). The increasing importance of Vermamoeba vermiformis. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 68(5).

Sousa-Ramos, D., Reyes-Battle, M., Bellini, N. K., Rodríguez-Expósito, R. L., Martín-Real, C., Piñero, J. M. L., & Lorenzo-Morales, J. (2022). Pathogenic free-living amoebae from water sources in Cape Verde. *Parasitology Research*, 121(8), 2399-2404.

Steinert, M., Hentschel, U., & Hacker, J. (2002). Legionella pneumophila : an aquatic microbe goes astray. *Fems Microbiology Reviews*, 26(2), 149-162.

Tabatabaei, M. (2016, 1 décembre). *Isolation and identification of Legionella spp. from different aquatic sources in south-west of Iran by molecular & culture methods*. PubMed Central (PMC).

Références bibliographiques

- Tao, K., Wang, T., Zhang, L., Yang, X., & Zhai, Z. (2022). Fatal Balamuthia mandrillaris infection with red plaques on the nasal dorsum as the first presentation. *Anais brasileiros de dermatologia*.
- Thomas, J., & Ashbolt, N. J. (2010). Do Free-Living Amoebae in Treated Drinking Water Systems Present an Emerging Health Risk ? *ENVIRONMENTAL SCIENCE & TECHNOLOGY*, 45(3), 860-869.
- Trabelsi, H., Dendana, F., Sellami, A., Sellami, H., Cheikhrouhou, F., Neji, S., Makni, F., & Ayadi, A. (2012b). Pathogenic free-living amoebae : Epidemiology and clinical review. *Pathologie Biologie*, 60(6), 399-405.
- Trabelsi, H., Dendana, F., Sellami, A., Sellami, H., Cheikhrouhou, F., Neji, S., Makni, F., & Ayadi, A. (2012c). Pathogenic free-living amoebae : Epidemiology and clinical review. *Pathologie Biologie*, 60(6), 399-405.
- Ülger, M., Ülger, S. T., Bekçi, A., Ötgün, S. N., Delialioğlu, N., & Aslan, G. (2022). Gemilerin Su Sistemlerinden İzole Edilen Legionella Türleri ve Moleküler Karakterizasyonu. *Mikrobiyoloji Bulteni*, 56(1), 11-24.
- Üstüntürk-Onan, M., & Walochnik, J. (2018). Identification of free-living amoebae isolated from tap water in Istanbul, Turkey. *Experimental Parasitology*, 195, 34-37.
- Valčiņa, O., Pūle, D., Mališevs, A., Trofimova, J., Makarova, S., Konvisers, G., Bērziņš, A., & Krūmiņa, A. (2019). Co-Occurrence of Free-Living Amoeba and Legionella in Drinking Water Supply Systems. *Medicina*, 55(8), 492.
- Valčiņa, O., Pūle, D., Mališevs, A., Trofimova, J., Makarova, S., Konvisers, G., Bērziņš, A., & Krūmiņa, A. (2019b). Co-Occurrence of Free-Living Amoeba and Legionella in Drinking Water Supply Systems. *Medicina-lithuania*, 55(8), 492.
- Veenendaal, H. R., Brouwer-Hanzens, A. J., & Van Der Kooij, D. (2017). Incubation of premise plumbing water samples on Buffered Charcoal Yeast Extract agar at elevated temperature and pH selects for Legionella pneumophila. *Water Research*, 123, 439-447.
- Visvesvara, G. S. (2013). Infections with free-living amebae. Dans *Handbook of Clinical Neurology* (p. 153-168). Elsevier BV.
- Visvesvara, G. S. (2013b). Infections with free-living amebae. Dans *Handbook of Clinical Neurology* (p. 153-168). Elsevier BV.
- Visvesvara, G. S. (2013c). Infections with free-living amebae. Dans *Handbook of Clinical Neurology* (p. 153-168). Elsevier BV.
- Visvesvara, G. S. (2013d). Infections with free-living amebae. Dans *Handbook of Clinical Neurology* (p. 153-168). Elsevier BV.
- Visvesvara, G. S., Moura, H., & Schuster, F. L. (2007). Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: Acanthamoeba spp., Balamuthia mandrillaris, Naegleria fowleri, and Sappinia diploidea. *FEMS immunology and medical microbiology*, 50(1), 1–26.

Références bibliographiques

Visvesvara, G. S., Moura, H., & Schuster, F. L. (2007). Pathogenic and opportunistic free-living amoebae : Acanthamoebaspp.,Balamuthia mandrillaris,Naegleria fowleri, andSappinia diploidea. FEMS immunology and medical microbiology, 50(1), 1-26.

Visvesvara, G. S., Moura, H., & Schuster, F. L. (2007b). Pathogenic and opportunistic free-living amoebae : Acanthamoebaspp.,Balamuthia mandrillaris,Naegleria fowleri, andSappinia diploidea. FEMS immunology and medical microbiology, 50(1), 1-26.

Visvesvara, G. S., Moura, H., & Schuster, F. L. (2007c). Pathogenic and opportunistic free-living amoebae : Acanthamoebaspp.,Balamuthia mandrillaris,Naegleria fowleri, andSappinia diploidea. FEMS Immunol Med Microbiol ., 50(1), 1-26.

Visvesvara, G. S., Moura, H., & Schuster, F. L. (2007d). Pathogenic and opportunistic free-living amoebae : Acanthamoebaspp.,Balamuthia mandrillaris,Naegleria fowleri, andSappinia diploidea. FEMS Immunol Med Microbiol ., 50(1), 1-26.

Visvesvara, G. S., Moura, H., & Schuster, F. L. (2007e). Pathogenic and opportunistic free-living amoebae : Acanthamoebaspp.,Balamuthia mandrillaris,Naegleria fowleri, andSappinia diploidea. FEMS Immunol Med Microbiol ., 50(1), 1-26.

Annexes

Annexe 1

Préparation de sources de nutrition des amibes (*Escherichia coli* morte)

Une colonie d'*Escherichia coli* (ATCC 25922) vivante a été prélevée de la colonie mère et ensemencée sur une gélose nutritive qui a été incubée par la suite à 37°C pendant 24h. Cette opération va nous permettre d'avoir une culture riche qui va être utilisée pour la culture des amibes libres. Après les 24h passées une colonie importante d'*Escherichia coli* vivante a été rajoutée au milieu B.H.I.B et incubée au bain marie à 60°C pendant 1h (dans le but létal), puis nous l'avons conservé à (+4°C).

Annexe 2

Test de confirmation pour les cultures de légionelles

Pour confirmer les résultats, nous avons fait d'abord un test d'agglutination avec des réactifs spécifiques à quelques sérogroupes de légionelles. En cas d'agglutination, la culture est positive et dans ce cas on passe un 2ème test de confirmation par un ensemencement par stries serrées sur milieu (gélose au sang). Dans le cas où la culture est négative, au bout de 48h donc les colonies sont des légionelles (car les légionelles ne se développent pas dans le sang).

En cas de résultats positifs, nous réalisons une conservation des souches obtenus. Pour réaliser la conservation de ces dernières nous avons pris des cryotubes auxquels nous avons rajouté 70% de BHIB (Bouillon Cœur- cervelle) et 30% de glycérol. Ensuite nous avons récupéré les souches de légionelles présentes dans la boîte de culture et nous les avons ajoutées aux cryotubes puis ils ont été conservés à (-20°C ou à -70°C).

Annexe 3

Extraction d'ADN par kit QIAGEN®

1. Lyse des parasites,

les échantillons d'eau ont été introduire dans des tubes Eppendorfs préalablement numérotés et codés, 200µl d'ATL ont été additionné (Broyage chimique), et on a ajouté 20µl de la protéinase K, puis agité rapidement à l'aide du vortex, ils ont été Incubés par la suite dans un bain à sec à 56° C une nuit. , puis centrifugés rapidement à 8000 tr/min pendant 4 seconde ; 200µl d'AL ont été ajoutés au échantillons, puis agités 15 secondes au vortex, les échantillons ont été placés par la suite au bain sec à 70° C pendant 10 minutes, et centrifugés rapidement ; 200µl d'éthanol ont été additionnés au échantillons , et agités pendant 15 secondes, le mix a été versé dans des tubes collecteurs à filtre, puis centrifugés pendant 1minute à 8.000 tr/min.

2. Purification de l'ADN

L'éluât a été jeté et on a placé le filtre dans un nouveau tube collecteur, un premier lavage a été réalisé avec 500µl d'AW1, puis on a centrifugé les échantillons pour 1minute à 8.000 tr/min, on a ensuite jeté l'éluât et placé le filtre dans un nouveau tube collecteur ; et un deuxième lavage

Annexes

a été effectué avec 500µl d'AW2, une centrifugation pour 4 minutes à 10.000 tr/min a été faite, enfin l'éluât été placé dans un nouveau tube collecteur et centrifugé une nouvelle fois pour 1 minute à 10 000 tr/min.

Pour finir, le filtre a été placé dans un nouveau tube Eppendorf, auquel on a ajouté 200µl de tampon AE, et Incubé 1 à 5 minutes à température ambiante puis centrifugé une dernière fois pendant 1 minute à 8.000 tr/min ; l'éluât contenant l'échantillon d'ADN a été récupéré et conservé le produit à + 4°C.

Annexe 4

Extraction d'ADN par le Mag-Bind®

On a préparé une solution de lyse qui était composée de 3300 µl de TNA Lysis Buffer, à laquelle on a ajouté 13,8 µl de Carrier RNA, puis vortexé ; 240µl de mélange de lyse a été ajouté à chaque échantillon ; ensuite on a pipeté de haut en bas 20 fois pour mélanger, par la suite 20µl de protéinase k ont été ajoutés dans chaque tube, et le tout a été placés au bain sec (60°C) pour toute une nuit. Dans chaque tube pour renforcer l'efficacité de la lyse ; un mélange maître de liaison (3750µl d'isopropanol et 66,24µl de Mag-Bind® Particles RQ) a été préparé par la suite, vortexé les particules Mag-Bind® RQ pour les remettre complètement en suspension. 280µl de mélange maître de liaison ont été additionnés et mélangés en pipetant de haut en bas 10 fois s'assurer que les Mag-Bind® Particles RQ ont été complètement remises en suspension dans le mélange maître de liaison avant utilisation. Vortexé pendant 30 secondes toutes les 2 minutes pendant 10 minutes au total.

Les tubes ont été laissés reposés à température ambiante jusqu'à ce que les particules Mag-Bind® Particles RQ complètement éliminées de la solution ; le surnageant a été aspiré et jeté sans perturber le mélange, et on a retiré la plaque du dispositif de séparation magnétique.

On a ajouté 350µl de tampon RMP dilué avec 100% d'isopropanol, puis vortexé pendant 5 minutes pour mélanger, la remise en suspension complète des Mag-Bind® Particles RQ est essentielle pour obtenir une bonne pureté ; la plaque été placée sur le dispositif magnétique et laissée reposer à température ambiante jusqu'à ce que toutes les particules ont été complètement éliminées de la solution, le surnageant a été par la suite aspiré et jeté sans perturbé les, après Mag-Bind® Particles RQ , l'aspiration la plaque a été retiré du dispositif magnétique et 350µl d'éthanol à 80% a été ajouté et mélangé au vortex pendant 5 minutes ; placer la plaque sur le dispositif de séparation magnétique et laisser reposer à température ambiante jusqu'à ce que les particules soient complètement éliminées, puis aspirer et jeter le surnageant nettoyé sans perturber les particules Mag-Bind® RQ laisser la plaque sur le dispositif de séparation magnétique attendre 1 minute éliminer le liquide résiduel à l'aide d'une pipette sécher les particules Mag-Bind® RQ pendant 5-10 minutes supplémentaires retirer la plaque du dispositif de séparation magnétique.

50-100µl de (nuclease-free water) est ajouté puis mélangé au vortex pendant 30 secondes toutes les 2 minutes pour un totale de 10 minutes ; la plaque a été placé par la suite sur le dispositif de séparation magnétique pour magnétiser les Mag-Bind® Particles RQ, puis laissé reposer à température ambiante jusqu'à ce que ces dernières soient complètement éliminées de la solution.

Le surnageant nettoyé contenant l'ADN purifié a été transféré dans une microplaque à puits (non fournie) stocker l'ADN à -80°C.

Annexe 5

Dans une éprouvette 50 ml de TBE sont additionnés avec l'eau distillé jusqu'à 500ml. Un volume de 100 ml du mélange a été prélevé et supplémenté de 0.8g d'agarose. La solution a ensuite été mise dans micro-onde pendant 90 secondes. 7 µl de BET ont été rajouté à la solution après refroidissement et versé dans la cuve de l'électrophorèse et les pinces placer le gel a été laisser se solidifier. Après polymérisation du gel, 5 µL d'ADN ont été déposé dans les puits et la cuve est brancher au générateur réglé à 90 Volt pendant 40 min.

Annexe 6

Tableau 2 : composition du mix PCR

Mix	N=1(µl)	N=14 (µl)
H2O PCR grade	7,1	99,4
Amorce R	2	28
Amorce F	2	28
Master mix (Sybrgreen)	12	168

Tableau 3 : programme PCR d'*Acanthamoeba spp.* (JDP1, JDP2) (Schroeder et al., 2001)

	Température (°C)	Temps	Cycles
Dénaturation	95	5 minutes	
Amplification (40 cycles)	96 60 72	60 Secondes 60 Secondes 60 Secondes	40 cycles
Élongation	72	7 Minutes	

Annexe 7

Tableau 4 : identification morphologique des amibes libres dans les filtres avec microscope optique au grossissement (Grx400).

Nom du prélèvement	Type du prélèvement	Température	Forme identifiées
AMBE 4	Filtre	37°C	<i>Acanthamoeba.spp</i>
AMBE 5	Filtre	37°C	<i>Acanthamoeba.spp</i>
AMBE 6	Filtre	30°C	<i>Acanthamoeba.spp</i>
AMBE 7	Filtre	30°C	<i>Acanthamoeba.spp</i>
AMBE 8	Filtre	37°C	<i>Acanthamoeba.spp</i>
AMBE 9	Filtre	37°C	<i>Kystes d'amibes libres</i>
AMBE 10	Filtre	37°C	<i>Kystes d'amibes libres</i>
AMBE 11	Filtre	37°C	<i>Kystes d'amibes libres</i>
AMBE 12	Filtre	30°C	<i>Acanthamoeba.spp</i>
AMBE 13	Filtre	30°C	<i>Acanthamoeba.spp</i>

Tableau 5 : identification morphologique des amibes libres dans les écouvillons de biofilms avec microscope optique au grossissement (Grx400).

Nom du prélèvement	Type du prélèvement	Température	Forme identifiées
AMBE 4	Écouvillon	37°C	<i>Acanthamoeba.spp</i>
AMBE 5	Écouvillon	37°C	<i>Acanthamoeba.spp</i>
AMBE 6	Écouvillon	30°C	<i>Acanthamoeba.spp</i>
AMBE 7	Écouvillon	30°C	<i>Acanthamoeba.spp</i>
AMBE 8	Écouvillon	37°C	<i>Kystes d'amibes libres</i>
AMBE 9	Écouvillon	37°C	<i>Acanthamoeba.spp</i>
AMBE 10	Écouvillon	37°C	<i>Acanthamoeba.spp</i>
AMBE 11	Écouvillon	30°C	<i>Kystes d'amibes libres</i>
AMBE 12	Écouvillon	30°C	<i>Acanthamoeba.spp</i>
AMBE 13	Écouvillon	30°C	<i>Kystes d'amibes libres</i>

Annexes

Tableau 6 : comptage et lectures des résultats du gel d'électrophorèse de qualité

Échantillon	Nom de l'échantillon	Origine du prélèvement	Comptage Cel/ml	Intensité de la bande
R1	AMBE 11 37°C REP FILTRE	Source	228000	Pas de migration importante
R1'	AMBE11 37°C REP FILTRE	Source	228000	Pas de migration importante
R2	AMBE 15 30°C REP ECOV	Puit	102000	Pas de migration importante
R2'	AMBE 15 30°C REP ECOV	Puit	102000	Pas de migration importante
R3	AMBE 15 37°C REP ECOV	Puit	100000	Pas de migration importante
R4	AMBE 15 30°C REP FILTRE	Puit	102000	Bande claire
R5	AMBE 11 30°C REP FILTRE	Source	4000	Bande plutôt foncé
R6	AMBE 15 37°C ECOV	Puit	100000	Pas de migration importante
R7	AMBE 15 37°C FILTRE	Puit	1000000	Pas de migration importante
R9	AMBE 11 30°C FILTRE	Source	300000	Pas de migration importante
R10	AMBE 15 37°C REP FILTRE	Puit	100000	Pas de migration importante

Résumé

Les amibes libres sont des eucaryotes protozoaires, cosmopolites et ubiquitaires dans les habitats hydriques. Ils sont responsables de pathologies sévères mais exceptionnelles, telles que la méningoencéphalite amibienne primitive induite par *Naegleria fowleri* ou l'encéphalite granulomateuse amibienne causée par *Acanthamoeba* spp. Ou *Balamuthia mandrillaris*. Nous avons analysé les amibes dans diverses sources d'eau, telles que les sources thermales, les puits, les réseaux d'eau, et les bains maures, et nous les avons identifiés par leur morphologie, et par une coloration, nous avons effectué par la suite une observation microscopique. *Acanthamoeba* spp a été détecté avec un pourcentage de 70%, avec d'autres formes d'amibes libres atypiques. Et notre travail a été complété par une identification moléculaire par extraction d'ADN à l'aide de deux kits différents, en contrôlant la pureté de l'ADN par électrophorèse sur gel. Enfin nous avons effectué une PCR avec des amorces spécifiques JDP et Nae et nous avons confirmé l'identification d'*Acanthamoeba* spp et *Naegleria* par cette technique moléculaire. Nous avons également confirmé la présence de *Légionella pneumophila* sérogroupe 1 et *Légionella* spp sérogroupe 7, dans les mêmes prélèvements de biofilms contenant des amibes libres, ce qui nous confirme une potentiel association entre les deux microorganismes.

Mots-clés : Amibes libres, bains chauds, sources, puits, identification, *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Legionella*

Abstract

Free-living amoebae are protozoan eukaryotes, cosmopolitan and ubiquitous in water habitats. They are responsible for severe but exceptional pathologies, such as primary amoebic meningoencephalitis induced by *Naegleria fowleri*, or amoebic granulomatous encephalitis caused by *Acanthamoeba* spp. or *Balamuthia mandrillaris*. We analyzed amoebae in various water sources, such as hot springs, wells, water systems and Moorish baths, and identified them by morphology and staining, followed by microscopic observation. *Acanthamoeba* spp was detected with a percentage of 70%, along with other forms of atypical free-living amoebae. And our work was completed by molecular identification by DNA extraction using two different kits, checking DNA purity by gel electrophoresis. Finally, we performed a PCR with specific primers JDP and Nae and confirmed the identification of *Acanthamoeba* spp and *Naegleria* by this molecular technique. We also confirmed the presence of *Legionella pneumophila* serogroup 1 and *Legionella* spp serogroup 7, in the same biofilm samples containing free amoebae, confirming a potential association between the two microorganisms.

Keywords: Keywords: Free-living amoebae, hot baths, springs, wells, identification, *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Legionella*