

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 :

BOUCHOUCHANE AYA

BOUHAMAM SARAH

Thème :

**La recherche des amibes libres dans les eaux des fermes
d'élevage de la région de Tizi-Ouzou**

Devant le jury composé de :

Mme N. BOUKHEMZA-ZEMMOURI	FSBSA/UMMTO	Présidente
Mme N. LAAMA-EDDAIKRA	MR – IPA	Promotrice
Mr. M. BOUKHEMZA	PR –FSBSA/UMMTO	Co-promoteur
Mme S. YOUSFI	MCA/UMMTO	Examinatrice

Année universitaire : 2024-2025

Remerciements

Avant tout, nous tenons à exprimer notre profonde gratitude envers Dieu Tout-Puissant pour nous avoir accordé la force, la patience et la persévérance nécessaires à l'accomplissement de ce travail.

Nous souhaitons exprimer notre plus profonde reconnaissance à Madame LAAMA EDDAIKRA N., Maître de recherche au laboratoire de l'Institut Pasteur d'Alger, pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant de diriger ce travail et en nous proposant un sujet aussi enrichissant. Nous la remercions vivement pour son accompagnement rigoureux, la pertinence de ses remarques, la qualité de ses conseils, ainsi que pour le temps et l'attention qu'elle a bien voulu nous accorder tout au long de ce mémoire. Sa confiance et son engagement ont représenté pour nous un soutien inestimable.

Nous tenons à adresser nos sincères remerciements à Monsieur BOUKHEMZA, Professeur à la Faculté des Sciences biologiques et des Sciences agronomiques de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, pour avoir codirigé ce travail de recherche et nous avoir fait bénéficier de ses précieux conseils, de son expertise et de son encadrement tout au long de ce projet.

Nous sommes honorés que Madame. N.BOUKHEMZA-ZEMMOURI ait accepté de présider le jury de ce travail. Qu'elle trouve ici l'expression de notre profond respect et de notre sincère gratitude.

Nous exprimons également notre reconnaissance à Madame S. YOUSFI pour l'honneur qu'elle nous fait en acceptant de faire partie du jury. Nous lui adressons nos salutations les plus distinguées et nos remerciements les plus sincères.

Nous adressons également nos remerciements les plus sincères à l'ensemble des membres du laboratoire d'Éco-épidémiologie parasitaire et de génétique des populations pour l'aide et le soutien qu'ils nous ont apportés tout au long de ce travail. Nos remerciements vont également aux membres du laboratoire d'analyse microbiologique des eaux de l'Institut Pasteur d'Alger, dont l'appui constant, malgré les difficultés rencontrées, a été précieux pour la réalisation de ce mémoire.

Dédicaces

Dédicace de Bouchouchane Aya :

À ma maman chérie,

Ton amour est ma lumière dans les moments sombres, ta tendresse mon refuge dans les épreuves. Merci pour chaque prière murmurée, chaque mot doux, chaque regard rassurant. Ton soutien a été le pilier de ce parcours. Ce travail porte l'empreinte de ton courage et de ton amour sans limites.

À mon père,

Ton silence est porteur de force, ta présence un repère. Tu m'as transmis le sens de l'effort, de la persévérance et de la dignité. Ce mémoire est aussi le fruit de ton soutien discret mais essentiel.

À mes frères, Sofian et Abdelbaki,

Merci d'être mes alliés, mes complices, mes amis. Vos mots, vos conseils et votre confiance en moi ont toujours été une source de motivation.

À mes sœurs, Meriem, Wassila et Assinet Loudjaine,

Vous êtes mes repères de douceur et de stabilité. Merci pour vos encouragements, votre bienveillance, et pour chaque geste qui m'a aidé à avancer.

Merci à tous mes amis pour votre présence et vos encouragements.

À vous tous,

Ce mémoire est dédié avec tout mon amour, ma gratitude et mon respect. Vous êtes la raison pour laquelle je me suis toujours relevée, et celle pour laquelle je continuerai d'avancer.

Dédicace de Bouhamam Sarah :

Je dédie ce travail à ma famille, elle qui m'a doté d'une éducation digne, son amour a fait de moi ce que je suis aujourd'hui : particulièrement à ma chère mère ainsi que mon cher père ceux qui ont été toujours à mes côtés et m'ont toujours soutenu tout au long de mon parcours.

À mon grand-père qui a été tout le temps à mes côtés pour subvenir mes besoins, ceci est ma profonde gratitude pour ton éternel amour, j'espère que tu seras toujours fier de moi.

À vous mes chers frères (Chafaa et Rayan) et sœurs (Lynda et Mélissa) qui m'avaient toujours soutenu et encouragé. À ma tante Fatma qui a fait de son mieux pour m'aider et m'encourager dans les moments délicats et mon petit oncle Juba.

À mes chers cousines Dihia, Daouia et Amel avec qui j'ai partagé rires, peines et souvenirs inoubliables. À toute ma famille, mes tantes et mes oncles, merci d'avoir été là.

Enfin, à tous mes amis rencontrés au fil de mon parcours universitaire, que Dieu protège cette belle amitié qui nous unit.

Sommaire

Remerciements	2
Dédicaces	3
Liste des tableaux	8
Introduction	9
Généralités	3
1. Classification des amibes libre	4
2. La nutrition	4
3. La reproduction	5
4. Les espèces d'amibes libres	5
4.1. <i>Naegleria fowleri</i>	5
4.2. <i>Acanthamoeba spp</i>	7
4.3. <i>Balamuthia mandrillaris</i>	9
4.4. <i>Sappinia spp</i>	11
4.5. <i>Vermamoeba vermiformis</i>	12
5. Présence des amibes libres dans l'environnement et leur impact sur la santé humaine et animale	14
1 .Echantillonnage	17
2 .Méthode	18
a. Mise en culture	19
b. Filtration	19
c. Culture et isolement des amibes libres	19
d. Repiquage et purification des cultures d'amibes	20
e. Observation au microscope inversé des cultures et repiquages	20
f. Identification morphologique	21
g. Observation microscopique	21
h. Test de flagellation	22
i. La coloration de Giemsa	22
j. Identification moléculaire	22
i. Extraction d'ADN	22
1.1.1. Choc thermique	23
1.1.2. Méthode phénol chloroforme	23
1.2. Le dosage de l'ADN	23
1.3. Polymerase chaine reaction PCR	24

Résultats	25
3. Résultats des cultures des échantillons filtrés et des écouvillons	27
2. Identification morphologique	27
3.1. Identification au microscope inversé	27
3.2. Résultats de culture d'<i>Escherichia coli</i>	29
3.3. Contrôle au microscope inversé des cultures de repiquage	29
3.4. Identification morphologique au microscope optique des boîtes de cultures des prélèvements	29
4. Test de flagellation	31
5. Coloration au Giemsa	32
6. Résultats de l'identification moléculaire	33
6.1. Résultats de l'électrophorèse sur gel d'agarose en utilisant le protocole JDP <i>Acanthamoeba</i>	33
6.2. Résultats de l'électrophorèse sur gel d'agarose en utilisant le protocole PLFW <i>Neagleria</i>	34
Conclusion	40
Références bibliographiques	43
Annexes	49

Liste de figures :

Figure 1 Classification de plusieurs genres amibiens (Adapté à Adl et al., 2019):.....	4
Figure 2 : Différents formes de <i>Neogleria fowleri</i> (a)trophozoïte,(b)flagellée,(c)kystique observées sous microscope électronique (Rose Hoban 2016.....	6
Figure 3 : cycle de vie et mode de contamination de <i>neogleria fowleri</i>	7
Figure 4 : Différents formes de <i>Acanthamoeba</i> spp.(a)trophozoïte,(b)kyste observées sous microscope optique avec grossissement *100	8
Figure 5 : cycle de vie et voies de contamination de <i>Acanthamoeba</i> spp.	9
Figure 6 : Différents formes de <i>Balamuthia mandrillaris</i> (a)trophozoïte,(b)kyste observées sous microscope optique avec grossissement *100.....	10
Figure 7 : cycle de vie et de transmission de <i>balamuthia mandrillaris</i>	11
Figure 8 : (a) Kyste de <i>Sappinia</i> sp. en culture, observé au microscope à contraste interférentiel différentiel (DIC), (b) Trophozoïte de <i>Sappinia</i> sp. en culture, observé au microscope DIC.	12
Figure 9 : photo de <i>vermamoeba vermiformis</i> à droite forme kystique , à gauche forme trophozoïte observer sous microscope photonique a contraste de phase (schied ;2019).....	13
Figure 10 : carte des communes de la wilaya de Tizi Ouzou	17
Figure 11 : schéma récapitulatif des méthodes utilisé (originale)	18
Figure 12 : une rampe de filtration d'eau (originale)	19
Figure 13 : photo de filtre pose sur une gélose (originale).....	20
Figure 14 : (a) kyste de <i>Acanthamoeba</i> spp.en culture.CDC ; (b) kyste de <i>Naegleria fowleri</i> en culture (angrup , 2010).....	21
Figure 15 : photo d'un spectrophotomètre Nano Drop (Thermo Scientific) (originale IPA).....	23
Figure 16 : photo du d'un thermocycleur MIC® (Magnetic Induction Cycler) (originale IPA).....	24
Figure 17 : Observation d'une plaque de kystes des amibes libres sous microscope inversé Grx200(Originale).....	29
Figure 18 : Observation au microscope optique des kystes de genre <i>Neogleria</i> au grossissement x40(Originale).....	31
Figure 19 : Observation au microscope optique des amas de kystes de genre <i>Acanthamoeba</i> au grossissement x40(Originale).....	31
Figure 20 : Observation au microscope optique de la forme végétative après le test de flagellation au grossissement x40 (Originale).....	32
Figure 21 : Observation au microscope optique de kystes d'amibes libres après coloration au Giemsa avec grossissement Grx400. (Originale)	33
Figure 22 : Résultats de gel de migration de l'électrophorèse des prélèvements (E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9, E10, E12, E13, E14, E15, E16, E17, T+, T-.....	34
Figure 23 : Résultats de gel de migration de l'électrophorèse des prélèvements (E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, T+, T-).....	35

Liste des tableaux

Tableau I : Liste de communes échantillonné et le nombre d'échantillon	17
Tableau II : JDP Acanthamoeba.....	51
Tableau III : PLFW Neagleria.....	51
Tableau IV : Tableau des températures du protocole JDP Acanthamoeba	52
Tableau V : Tableau des températures du protocole PLFW Neagleria	52

Introduction

Le terme « amibes » en grec "**amoibē**" signifie changements ou alternance. Les amibes englobent le groupe d'organismes le plus diversifié parmi les protistes. Ces organismes sont étudiés depuis la découverte du microscope primitif (Khan,2006).

Les amibes libres, que nous désignerons par la suite AL. Sont des protistes retrouvés dans la nature. Ils se divisent en amibes parasites et amibes non parasites qui accomplissent leurs cycles dans l'environnement de façon autonome sans nécessiter un hôte. Elles sont qualifiées aussi d'amibes amphizoïques, puisqu'elles sont capables, dans certains cas, de se développer à l'intérieur d'un hôte (endozoïque) en plus de leurs conditions de vie libre (exozoïque) (Cateau *et al.*, 2014).

Ces protozoaires sont omniprésents dans l'environnement et comprennent différents genres ; cependant, certains taxons peuvent être des pathogènes opportunistes. Parmi ces espèces peuvent causer plusieurs maladies chez l'humain et les animaux, on retrouve *Acanthamoeba spp.*, *Naegleria fowleri* et *Balamuthia mandrillaris*, (Peña-Fernández,2023).

Les AL sont répandus dans de nombreux habitats, notamment le sol, la poussière, l'air, l'eau de mer, l'eau potable, les piscines, les eaux usées, les solutions de lavage oculaire, les lentilles de contact (Balczun *et al.*, 2017a). Par ailleurs, les AL se nourrissent dans l'environnement de micro-organismes tels que des bactéries, des champignons ou des virus. (Maisonneuve ,2017)

La prévalence des AL dans les réseaux d'eau sont associées à des biofilms, où elles vivent en sympathie au sein d'une biocénose avec d'autres micro-organismes. Ces biofilms servent un milieu nutritif pour les amibes libres et leur offrent aussi une certaine protection, tandis que les AL adhèrent à leurs surfaces. (Balczun *et al.*, 2017b)

En Algérie des cas d'encéphalite amibienne primaire ont été identifiés chez une vache et une brebis à Batna. Les deux ruminants sont décédés en raison d'une infection causée par des amibes libres. Ces cas d'encéphalite amibienne primaire ont été signalés au cours de la saison chaude, et la source d'infection été l'eau dont le bétail s'abreuve (Benterki *et al.*,2016).

Dans le présent projet de fin d'études, il est question de rechercher des amibes libres présentent dans les eaux des fermes d'élevages de la wilaya de Tizi-Ouzou. Les objectifs fixés dans la présente étude sont l'isolement des amibes libres à partir des prélèvements d'eaux et de Biofilms, et leur mise en culture afin d'identifier les différentes espèces présentes pour apprécier leur impact sur la santé animale et humaine.

Ce travail est divisé en deux parties, la première est dédiée aux généralités sur les amibes libres, en mettant l'accent sur les espèces pathogènes et les pathologies qu'elles peuvent engendrer. La deuxième est relative à l'expérimentation, à savoir, la méthodologie de l'échantillonnage, le traitement des échantillons, suivis par l'analyse et l'interprétation des résultats obtenus et leurs discussions.

Généralités

Les AL sont des protozoaires opportunistes et pathogènes possédant des caractéristiques aérobies. On les retrouve couramment dans la nature et le milieu humain. Ces amibes libres comptent de nombreux genres, mais ceux qui infectent les humains et les animaux proviennent des genres *Acanthamoeba spp*, *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria (Naegleria fowleri)* et *Sappinia (Sappinia pedata)*. (Maryantia *et al.*, 2022a)

1. Classification des amibes libre

Depuis leur première identification en 1753 par Henri Baker (Bolivar *et al.*, 2001). La classification des amibes a évolué au fil du temps Avec le développement continu des analyses moléculaires. La classification des eucaryotes a été révisée une première fois en 2012 puis une deuxième fois en 2019, en réarrangeant l'emplacement des amibes et en proposant ainsi une classification plus détaillée de tous les eucaryotes (Adl *et al.*, 2012 ; Adl *et al.*, 2019). La dernière classification décrit les amibes comme un large groupe polyphylétique et inclue ainsi ces protozoaires dans plusieurs super-groupes (figure 1).

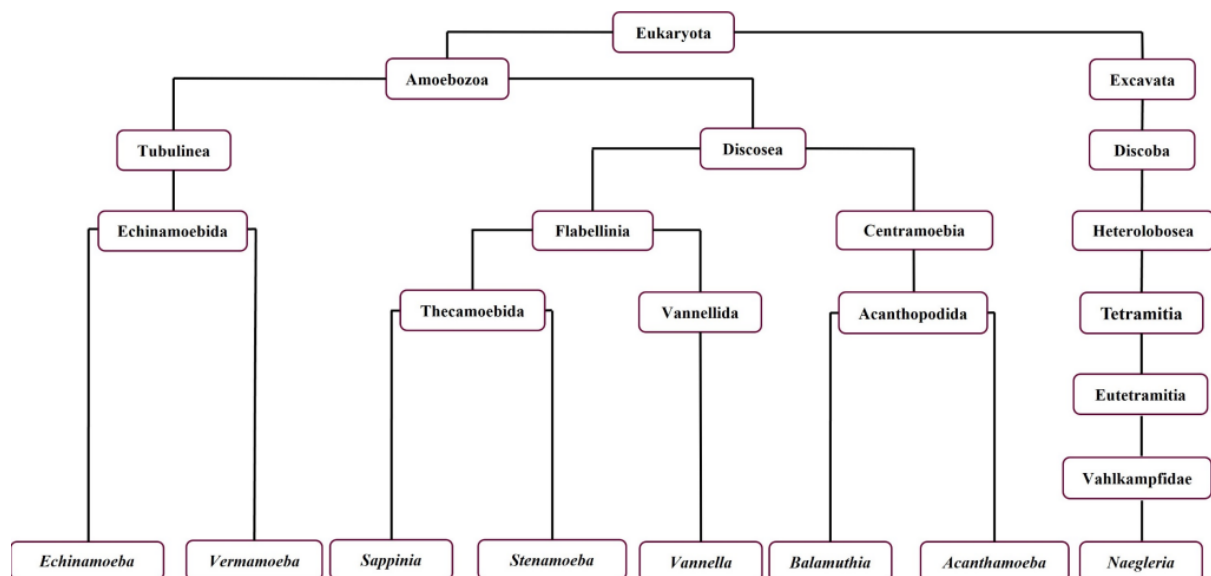


Figure 1 : Classification des genres amibiens (Adapté de Adl *et al.*, 2019):

2. La nutrition

Les amibes libres se nourrissent principalement d'autres microorganismes, principalement de bactéries, par le biais d'un processus appelé phagocytose. Elles engloutissent leurs proies et les digèrent en interne, jouant ainsi un rôle crucial dans l'écologie microbienne de leurs environnements, tels que l'eau et les sols. Ce comportement alimentaire contribue non seulement à réguler les populations bactériennes, mais met également en évidence l'importance des amibes dans le cycle des nutriments et la dynamique des écosystèmes. Leurs interactions

avec divers microorganismes soulignent encore davantage leur importance écologique. (Samba-Louaka *et al.*, 2019)

3. La reproduction

Les amibes libres se multiplient de manière asexuée par fission binaire, un processus au cours duquel une cellule mère se divise par mitose pour donner naissance à deux cellules filles génétiquement identiques. La division nucléaire s'effectue par une mitose conventionnelle, caractérisée par la disparition transitoire du nucléole et de l'enveloppe nucléaire. La formation de kystes est induite par des conditions environnementales défavorables. Il existe une variabilité notable entre les différentes souches en ce qui concerne la morphologie et la taille des kystes (Khan, 2006b).

4. Les espèces d'amibes libres

4.1. *Naegleria fowleri*

Naegleria fowleri est l'une des amibes libres les plus couramment infectantes parmi les AL, et se distingue aussi par sa virulence ou pathogénicité élevée. Ce parasite est thermophile, anciennement dénommé *N. gruberi*. Dans l'environnement naturel, les nutriments sont fournis par les bactéries, les cellules de levure et les débris orphelins. (Maryantia *et al.*, 2022b)

4.1.1. Ecologie

Cette amibe libre prospère dans un milieu cosmopolite et est présente à l'échelle mondiale. Elle se trouve dans le sol et dans les eaux douces stagnantes, comme celles des piscines, des lacs et des bains chauds. (Maryantia *et al.*, 2022c)

4.1.2. Morphologie

Naegleria fowleri se présente sous trois formes : trophozoïte, flagellée et kystique.

Forme trophozoïte : Dans des conditions favorables, l'amibe se transforme en forme trophozoïtes actifs, caractérisée par une forme irrégulière mesurant environ 22 μm de longueur et 7 μm de largeur. Cette forme présente des pseudopodes qui permettent la locomotion. (Maciver *et al.*, 2020)

Forme flagellée : Lorsque le milieu est pauvre en nutriment mais en présence d'eau, *Neagleria* se transforme en une Forme flagellée transitoire. Cette forme présente une apparence en forme de poire mesurant entre 10 et 16 μm et possède deux flagelles d'une longueur approximativement équivalente. (Güémez *et al.*, 2021a)

Forme kystique : lorsque les conditions deviennent défavorables cette amibe libre se transforme en kyste qui est une forme de résistance. Cette forme a une structure sphérique avec un diamètre variant entre 7 et 12 μm et elle se caractérise par la présence de double paroi lisse et épaisse. (Güemez *et al.*,2021b)

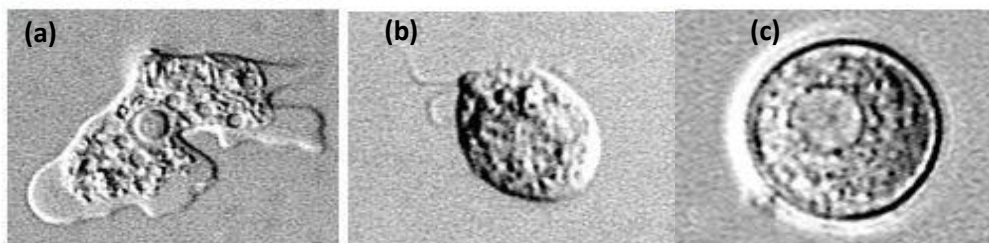


Figure 2 : Différents formes de *Naegleria fowleri*

(a)trophozoïte, (b) flagellée, (c)kystique observées sous microscope électronique (Hoban 2016)

4.1.3. Pathogénicité

La méningo-encéphalite hémorragique nécrosante causée par *N. fowleri*, également connue sous le nom de méningo-encéphalite amibienne primaire est surtout observée chez les jeunes adultes et les enfants immunocompétents. Cette maladie se manifeste généralement pendant l'été, période où la température de l'eau convient à l'amibe et où les individus pratiquent des activités aquatiques. Fowler et Carter ont été les premiers à décrire la MAP (Méningo-encéphalite primitive) en 1965, ce qui explique le nom attribué à cette espèce. (Bonilla Lemus *et al.*,2020)

4.1.4. Mode de contamination et cycle de vie

L'infection chez les humains se produit par inhalation lorsque le patient nage ou est exposé à de l'eau contenant *Naegleria fowleri*. Plus les humains sont exposés ou en contact avec de l'eau contenant cette amibe, plus le risque d'infection est grand et c'est un facteur prédisposant à l'infection par ce parasite.(Kanget *al.*,2020)

L'amibe s'introduit dans l'organisme puis envahit le tissu cérébral où elle se reproduit. Le principal point d'entrée des parasites dans le système nerveux central est le neuroépithélium olfactif de la muqueuse nasale supérieure. Les trophozoïtes, en pénétrant le système nerveux central qui est riche en vascularisation, s'est avéré être une source significative de nutriments et d'un environnement propice à la prolifération de cette amibe lors de son invasion cérébrale. L'incubation dure entre 5 et 7 jours. (Maryantia *et al.* 2022d).

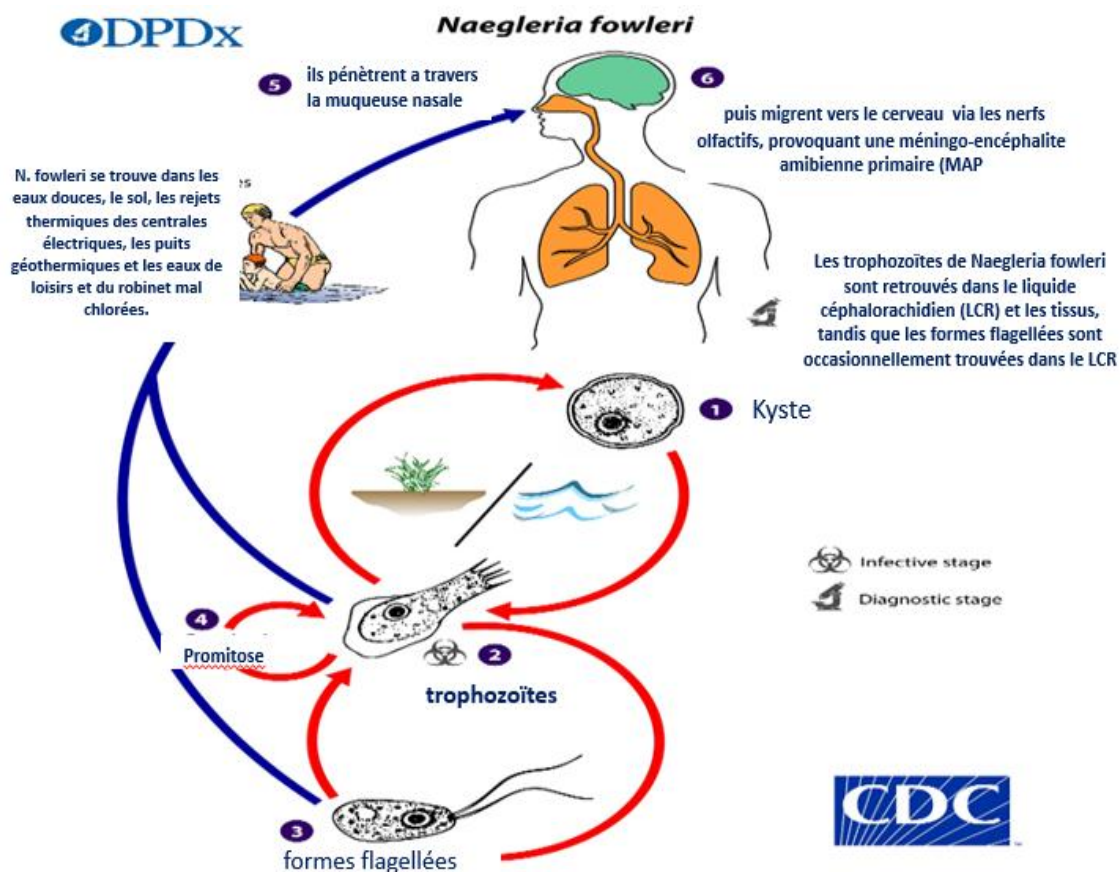


Figure 3: Cycle de vie et mode de contamination de *Naegleria fowleri*. (CDC, 2022), <https://www.cdc.gov/parasites/naegleria/>

4.2. *Acanthamoeba* spp

Les *Acanthamoeba* spp., sont perçues comme des protozoaires pathogènes et opportunistes. Les différents génotypes d'*Acanthamoeba* sont cosmopolite. Ils sont retrouvés dans le sol, poussières, air et l'eau. (Jalilehvand *et al.*, 2022). Le genre *Acanthamoeba* est considéré comme un parasite émergent en raison de la complexité à traiter les infections engendrées par ces organismes. Par ailleurs, son importance clinique ne se limite pas à sa capacité à provoquer des infections, elle réside également dans sa capacité à héberger d'autres micro-organismes pathogènes. (Reyes-Battle *et al.*, 2022)

4.2.1. Morphologie

Le trophozoïte : à un diamètre variable entre 25 et 40 μm , et adopte une forme ovale allongée ou irrégulière. La frontière cytoplasmique du trophozoïte est indistincte et l'endoplasme présente une granularité, émettant plusieurs pseudopodes aciculaires ou épineux qui se propagent sur l'ensemble de la cellule. Les pseudopodes donnent au trophozoïte un aspect

distinctif et contribuent à l'alimentation et aux mouvements d'*Acanthamoeba* (Wanget *al.*,2023a).

Le Kyste : La forme peut varier considérablement. La plupart sont ronds et leur diamètre est d'environ 13 à 20 µm. Contrairement aux trophozoïtes, le kyste possède une paroi cellulaire à double couche, ce qui lui offre une grande résistance à de nombreuses conditions environnementales hostile (Wang *et al.*,2023b).



Figure 4 : Différents formes de *Acanthamoeba* spp.

(CDC, 2017), <https://www.cdc.gov/dpdx/acanthamoeba/index.html>

(a)trophozoïte,(b)kyste observées sous microscope optique avec grossissement Gx1000

4.2.2. Pathogénicité

Les maladies causées par *Acanthamoeba* spp. Sont variées et peuvent toucher aussi bien les individus immunocompétents que les immunodéprimés. La kératite amibienne est l'infection la plus courante, affectant la cornée et pouvant conduire à une cécité, généralement associée à une hygiène inadéquate lors de l'usage des lentilles de contact. (Khan, 2006). Ce parasite est également capable de provoquer une encéphalite amibienne granulomateuse (EAG), une infection du système nerveux central qui, bien que rare, est souvent. Elle est principalement observée chez les individus ayant un système immunitaire affaibli (sida, cancers, transplantations) (Marciano-Cabral & Cabral, 2003). L'*Acanthamoeba* peut aussi engendrer des formes chroniques cutanées, des sinusites et des infections secondaires aux poumons (Schuster et Visvesvara, 2004).

4.2.3. Mode de contamination et cycle de vie

Chez l'humain, *Acanthamoeba* est capable d'envahir divers tissus de corps, provoquant des manifestations cliniques. L'amibe pénètre la barrière hémato-encéphalique, provoque une inflammation granulomateuse et entraîne des signes neurologiques des lésions cutanées peuvent également apparaître. *Acanthamoeba* a capacité à survivre dans les macrophages, échappant ainsi à la réponse immunitaire innée. Cette faculté d'invasion et de persistance dans l'organisme humain en fait un agent pathogène redoutable et difficile à éradiquer (Visvesvara *et al.*, 2007).

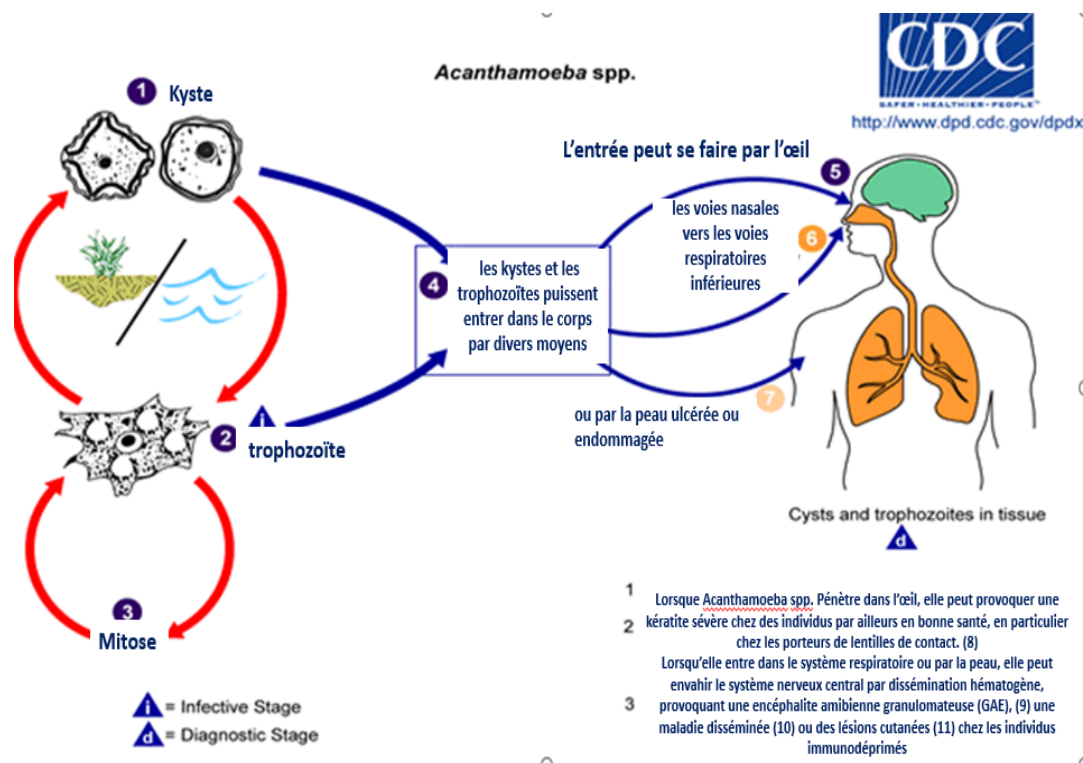


Figure 5 : cycle de vie et vois de contamination de *Acanthamoeba* spp. Reproduit de Centers for Disease Control and Prevention (n.d.), https://www.cdc.gov/parasites/images/acanthamoeba/acanthamoeba_lifecycle.gif

4.3. *Balamuthia mandrillaris*

Balamuthia mandrillaris est une amibe libre opportuniste et pathogène pour l'homme et pour l'animal. Elle est cosmopolite mais principalement détectée dans les régions chaudes. Les infections à *Balamuthia* sont rares, mais ont été signalées chez des personnes immunocompétentes et immunodéprimées de tous âges. *Balamuthia mandrillaris* a été isolé pour la première fois en 1986 chez une femelle babouin mandrill gravide décédée d'une maladie neurologique (Bhosale et Parija, 2021a).

4.3.1. Morphologie

Balamuthia mandrillaris se présente sous deux formes :

Le trophozoïte : *B. mandrillaris* mesure 30 à 65 μm . Il présente des pseudopodes qui qui permet son déplacement, un cytoplasme transparent et un seul gros noyau (Moker et Muslim,2018a).

Le kyste : lors des conditions environnementales défavorables *B. mandrillaris* se transforme en forme de résistance, le kyste. Il est arrondi, d'environ 13 à 30 μm , entouré d'une membrane interne épaisse et régulière et d'une membrane externe fine et ridée. Certains kystes présentent une membrane externe arrondie et lisse (Moker et Muslim,2018b).

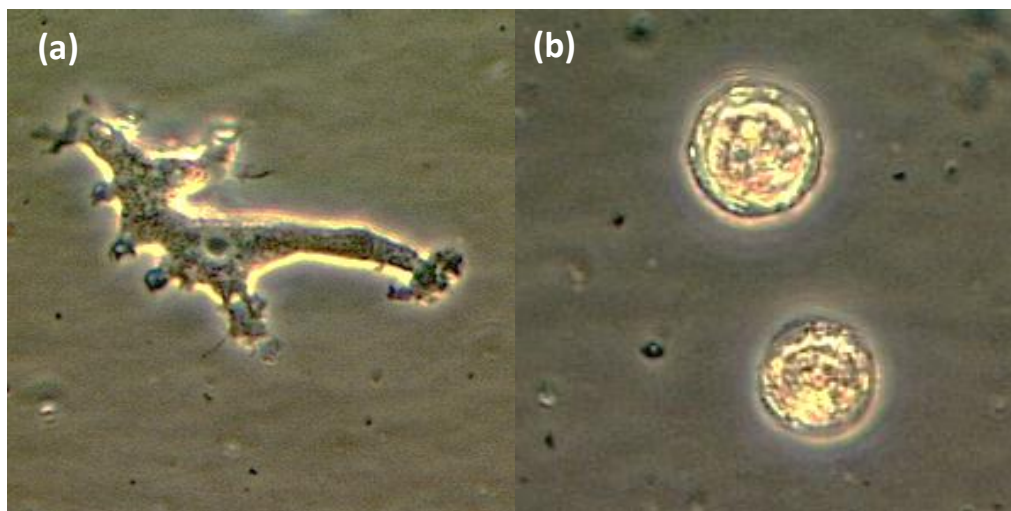


Figure 6 : Différents formes de *Balamuthia mandrillaris*(Centers for Disease Control and Prevention (n.d.) (a)trophozoïte,(b)kyste observées sous microscope optique avec Gx1000

4.3.2. Mode de contamination et cycle de vie

B. mandrillaris peut pénétrer par des plaies cutanées ou par voie nasale et provoque des lésions cutanées et l'encéphalite amibienne à *Balamuthia* (EAB), qui est généralement mortelle. L'infection se propage généralement à partir des poumons ou par les fibres nerveuses, et attaque le système nerveux central, formant des lésions granulomateuses et de la nécrose dans le cerveau (Bhosale et Parija, 2021).

Lors de la contraction d'une infection à *Balamuthia*, les premiers symptômes cliniques comprennent des céphalées et une photophobie, souvent suivies d'une hémiparésie, d'une

raideur de la nuque, de myalgies, de nausées et d'une légère fièvre. Une perte de poids, des changements de comportement, des troubles de l'élocution et des crises focales surviennent rapidement, la maladie progressant vers une atteinte du Système Nerveux Central entraînant une paralysie, un coma et finalement le décès (Visvesvara *et al.*, 2007).

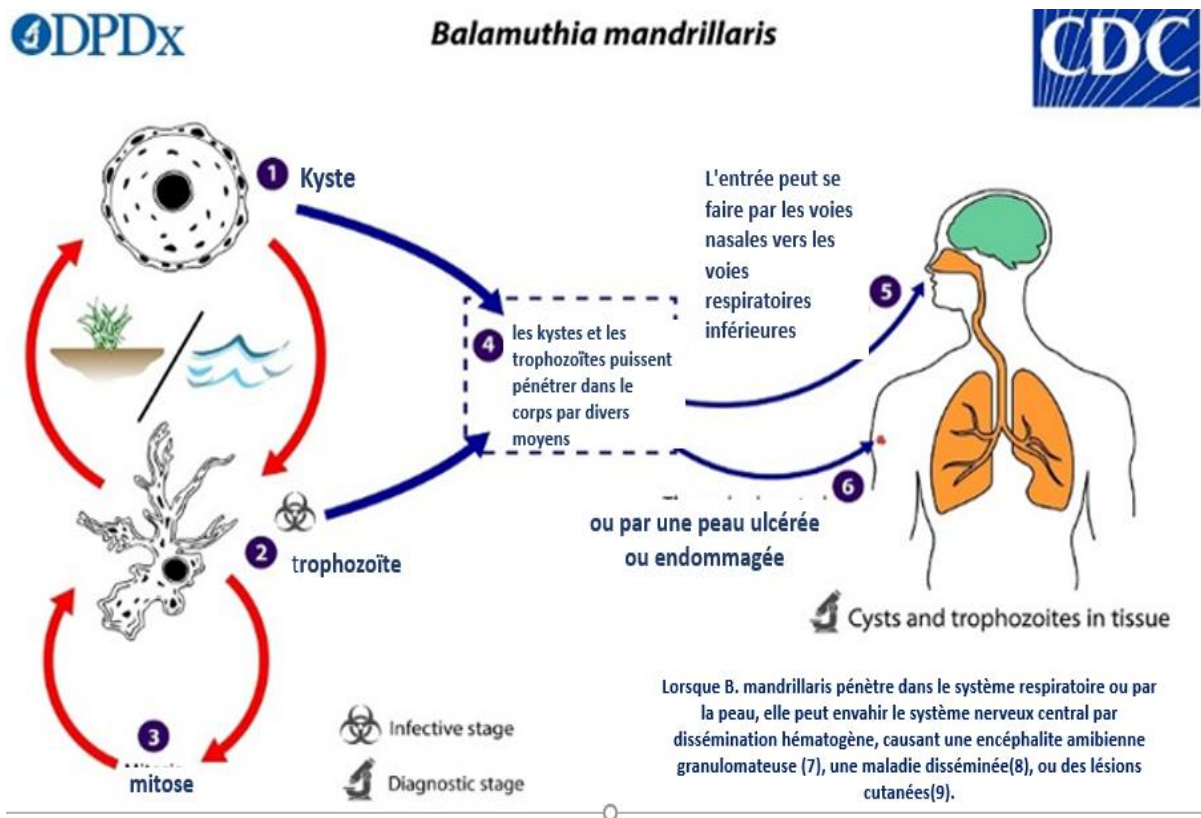


Figure 7 : cycle de vie et de transmission de *Balamuthia mandrillaris*
(https://www.cdc.gov/dpdx/freelivingamebic/modules/Balamuthia_LifeCycle)

4.4. *Sappinia* spp

Les espèces de *Sappinia* sont des amibes libres présentes dans divers environnements, notamment dans le sol, l'eau douce et les excréments d'animaux. Après l'analyse phylogénétique des séquences du gène de l'ARNr 18S (Tyml et Dykova, 2018), deux espèces principales ont été identifiées : *S. diploidea* et *S. pedata*, ainsi qu'une espèce récemment décrite, *S. platani* (Siddiqui *et al.* 2024 ; Wylezich *et al.*, 2015). Les espèces de *Sappinia* sont identifiées comme des agents pathogènes opportunistes pour l'homme (AL-Aboody *et al.*, 2024).

4.4.1. La morphologie

Forme trophozoïte : Les espèces de *Sappinia* présentent des trophozoïtes binucléés aplatis présentant un morphotype linguolaire, mesurant 57 à 76 μm de longueur et 23 à 38 μm de largeur (Wylezich *et al.*, 2015).

Forme kystique : Ils forment des kystes bicellulaires de 23 à 30 μm de diamètre et possèdent une couche lâche de structures irrégulières et courbées ressemblant à des cheveux sur la membrane plasmique (Wylezich *et al.*, 2015).

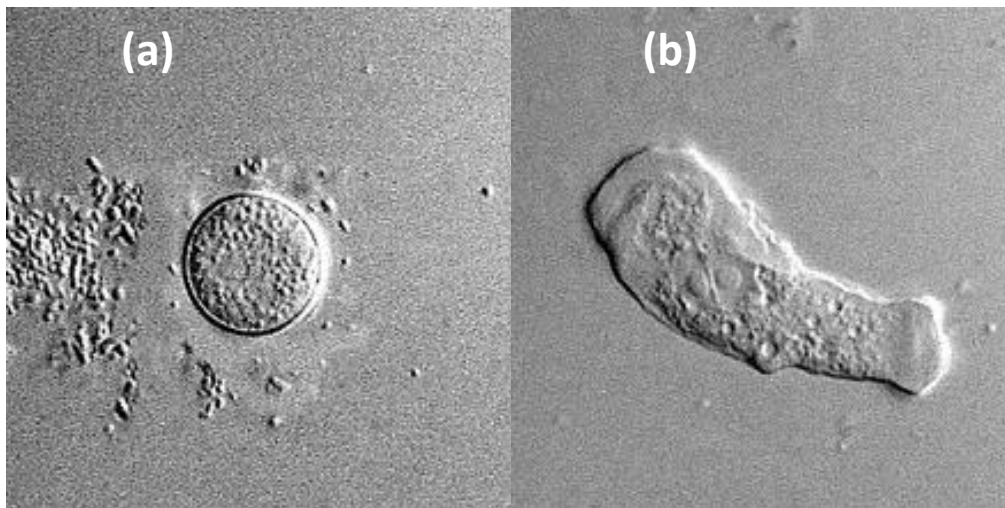


Figure 8 : *Sappinia sp.* En culture, observé au microscope à contraste interférentiel différentiel
(a) Kyste, (b) Trophozoïte,

(https://www.cdc.gov/dpdx/freelivingamebic/images/7/Sappinia_troph)

4.4.2. Cycle de vie et pathogénicité

Le cycle de vie comprend un stade trophozoïte, au cours duquel les amibes sont actives et se nourrissent, et un stade kyste, essentiel à la survie dans des conditions difficiles. *S. diploidea* est connu pour ses kystes bicellulaires sessiles (Brown *et al.*, 2007). La présence de *Sappinia* dans les échantillons cliniques, bien que rare, met en évidence son potentiel en tant que pathogène opportuniste, comme en témoigne un cas signalé d'encéphalite amibienne non granulomateuse chez un individu par ailleurs en bonne santé (Siddiqui *et al.*, 2024 ; AL-Aboody *et al.*, 2024).

4.5. *Vermamoeba vermiformis*

C'est une amibe libre de la famille des Hartmannellidae, anciennement nommée *Hartmannellavermiformis* (Page, 1967). Cette espèce a été reconnue pour sa prévalence dans divers environnements, y compris les réseaux d'alimentation en eau des hôpitaux, où elle peut

héberger des microorganismes pathogènes tels que *Legionella pneumophila*, contribuant à des risques sanitaires tels que la légionellose et la kératite (Siddiqui *et al.*, 2021 ; Delafont *et al.*, 2018 ; Park, 2016). Thermotolérante, cette amibe a également été identifiée comme un réservoir favorisant la prolifération de bactéries et de virus géants, soulignant ainsi son rôle dans la dissémination de ces agents pathogènes (Chelkha *et al.*, 2020).

4.5.1. La morphologie

La forme trophozoïtes : présentent une morphologie allongée en forme de limace, généralement beaucoup plus longue que large avec peu de matériel granulaire dans le cytoplasme et une petite zone hyaline antérieure. (Fučíková *et al.*, 2016).

La forme kystique est sphérique et petite (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 en sachant que Le processus d'enkystement produit en 9 h, comme l'ont montré Fouque *et al.* (2015)



Figure 9 : photo de *Vermamoeba vermiformis* à droite forme kystique, à gauche forme trophozoïte observé sous microscope photonique a contraste de phase (schied, 2019)

4.5.2. Cycle de vie

Cette amibe se présente en forme trophozoïtes et forme kystique, ce qui lui permet de s'adapter à diverses conditions environnementales. Les trophozoïtes ont une forme cylindrique et peuvent prospérer dans divers habitats, notamment en eau douce et dans la neige, démontrant une thermotolérance et une résilience au stress osmotique (Delafont *et al.*, 2018 ; Reyes-Batlle *et al.*, 2015). Dans des conditions défavorables, *V. vermiformis* s'enkyste, formant un kyste

résistant capable de survivre dans des environnements hostiles. Ce processus est rapide, les kystes matures se développant en 9 heures environ (Fouque *et al.*, 2015).

4.5.3. Pathogénicité

Vermamoeba vermiformis est de plus en plus reconnue pour sa pathogénicité potentielle, notamment en ce qui concerne la santé humaine. Ce protozoaire a été impliquée dans diverses maladies, notamment l'inflammation allergique des voies respiratoires, la kératite et même des associations avec la maladie des légionnaires en raison de sa présence dans les réseaux d'alimentation en eau des hôpitaux (Lee *et al.*, 2022 ; Siddiqui *et al.*, 2021). Des études ont montré que *V. vermiformis* peut induire des réponses immunitaires importantes, telles que le recrutement d'éosinophiles et la régulation positive des cytokines, ce qui suggère son rôle en tant qu'allergène (Lee *et al.*, 2022).

5. Présence des amibes libres dans l'environnement et leur impact sur la santé humaine et animale

Certaines espèces d'amibe libre, notamment *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba spp.* Et *Balamuthia mandrillaris*, sont pathogènes et peuvent entraîner des infections graves chez l'humain, telles que la méningo-encéphalite amibienne primaire (PAM), la kératite amibienne et l'encéphalite granulomateuse, notamment chez les patients immunodéprimés ou porteurs de lentilles de contact (Scheid, 2018)

En plus de leur rôle direct dans les pathologies humaines, les AL interagissent étroitement avec d'autres micro-organismes en servant d'hôtes intracellulaires. Elles hébergent notamment des bactéries opportunistes comme *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa* ou *Mycobacterium avium*, ainsi que des virus géants tels que Mimivirus et Pandoravirus. Ces micro-organismes peuvent survivre et se multiplier dans le cytoplasme des trophozoïtes, ou persister à l'intérieur des kystes, leur conférant ainsi une protection contre les traitements désinfectants et les stress environnementaux (Scheid, 2018). Ce mécanisme permet à ces agents pathogènes de contourner les barrières classiques de désinfection, ce qui complique leur élimination dans des environnements sensibles comme les hôpitaux.

L'impact environnemental de ces interactions est considérable. Les AL jouent un rôle clé dans la dynamique des communautés microbiennes, notamment en facilitant la survie, la dissémination et parfois l'évolution de micro-organismes pathogènes dans les écosystèmes

aquatiques et artificiels. Leur présence dans les réseaux de distribution d'eau, les biofilms et les dispositifs médicaux représente un risque émergent pour la santé publique.

Dans ce contexte, les biofilms représentent un écosystème particulièrement favorable à la survie et à la dissémination des amibes libres. Il s'agit de communautés microbiennes complexes, adhérant aux surfaces et enfermées dans une matrice extracellulaire autoproduite. Ces structures accueillent une grande diversité de micro-organismes, incluant des bactéries, des champignons, et parfois même des protozoaires (Ashford, 2022 ; "Biofilm", 2023). Les amibes libres interagissent en permanence avec ces biofilms, qui leur offrent un habitat protecteur, riche en nutriments, favorisant leur croissance. En retour, elles peuvent y abriter des agents pathogènes, contribuant ainsi à leur protection et à leur dissémination. Cette symbiose renforce la résilience des pathogènes face aux désinfections classiques et accentue les risques sanitaires associés à la contamination des environnements artificiels et naturels (Guerlotté,2015).

Matériel et Méthodes

Le présent 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 cinq mois, s'étalant du mois de février au mois de juin 2025.

1 .Echantillonnage

Dans le cadre de la recherche de la présence des amibes libres dans les eaux des fermes de la région de Tizi-Ouzou, une enquête a été réalisée dans 13 fermes réparties sur 7 communes. Un total de 39 échantillons d'eau et de biofilms a été collecté (26 prélèvements d'eau et 13 écouvillons). Pour chaque ferme, un volume de 1,5 litre d'eau a été prélevé à partir des bassins d'abreuvement et des réservoirs de stockage utilisés pour les animaux, l'origine des prélèvements provient à partir d'eau de puits (18 prélèvements) et des eaux de conduite (8 prélèvements).

Lors de l'échantillonnage des paramètres ont été mesurés tels que la température et le pH de l'eau.

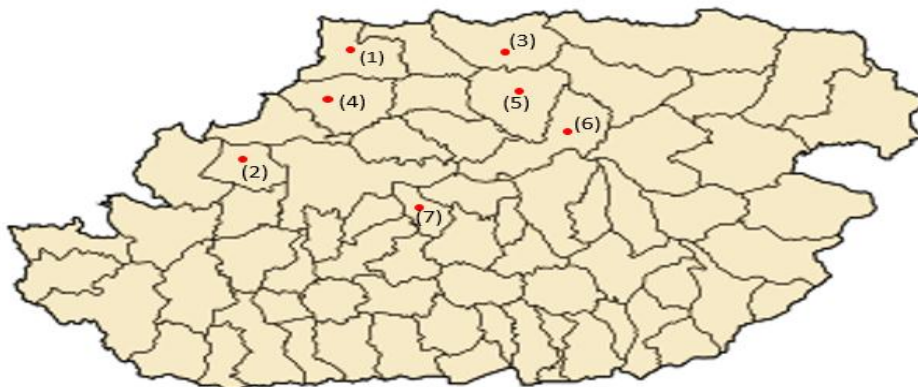


Figure10 : Carte des communes de la wilaya de Tizi-Ouzou concernées par l'échantillonnage

Tableau I : Liste de communes échantillonnées et le nombre d'échantillons dans les fermes de la wilaya de Tizi-Ouzou

Liste des communes	Nombre d'échantillon :	
	Eaux	Écouvillon
1. Mizrana	2	1
2. Draa ben khada	2	1
3. Iflissen	6	3
4. Makouda	4	2
5. Abizar	6	3
6. Freha	4	2
7. Iredjen	2	1

2 .Méthode

L'objectif de cette étude était de détecter la présence d'amibes libres dans des échantillons d'eau ainsi que dans des prélèvements de biofilms réalisés par écouvillonnage. Les échantillons d'eau ont été collectés dans des bouteilles d'eau minérale stériles, tandis que les écouvillons ont été utilisés pour le prélèvement des biofilms. L'ensemble des échantillons a été transporté au laboratoire des Eaux de l'IPA pour une étape de filtration, puis transféré au laboratoire d'éco-épidémiologie parasitaire pour mise en culture. L'étude a été ensuite réalisée à l'aide de méthodes morphologiques et de techniques moléculaires

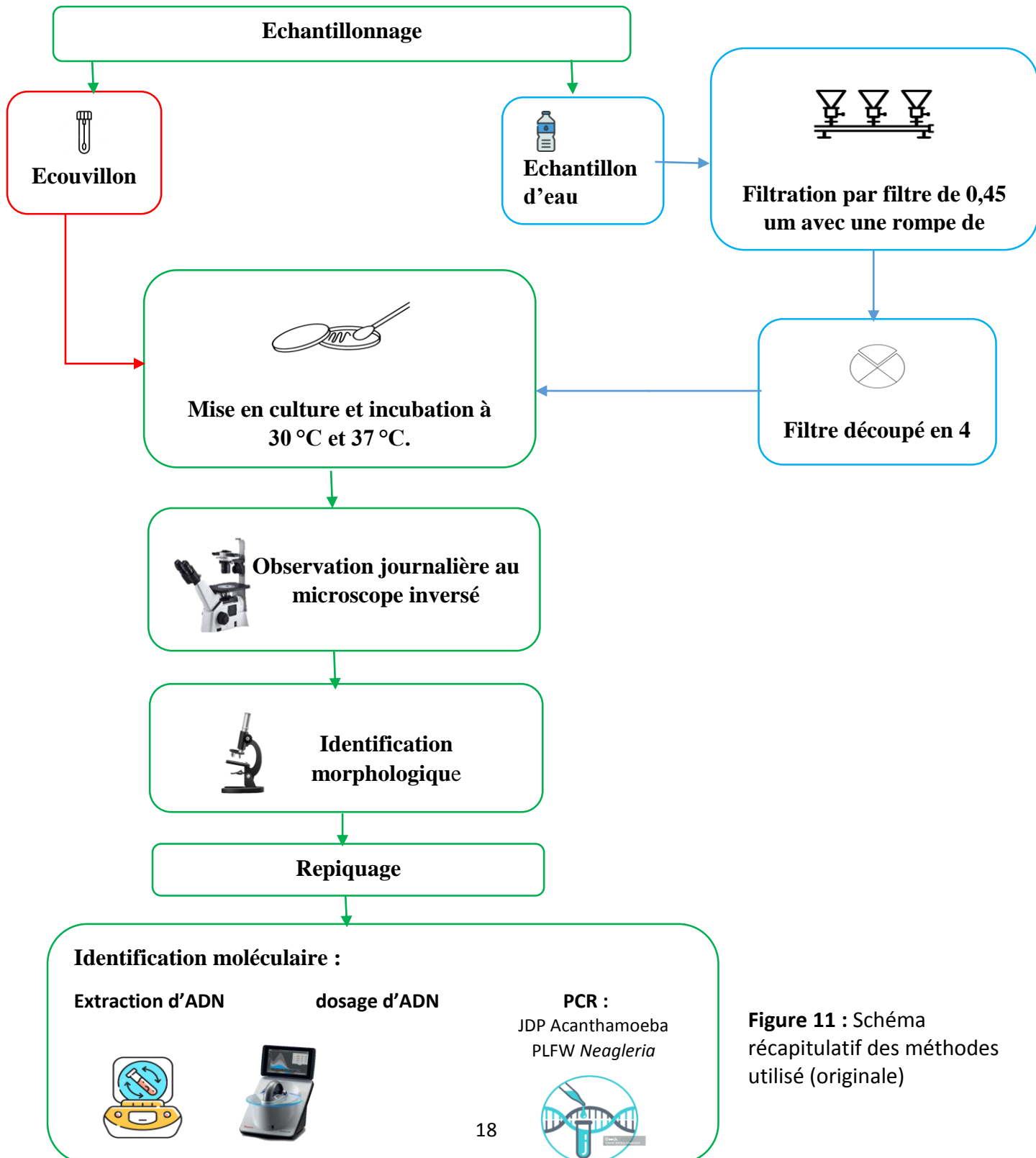


Figure 11 : Schéma récapitulatif des méthodes utilisées (originale)

a. Mise en culture

Après l'échantillonnage, les prélèvements réalisés par écouvillonnage ont été directement mis en culture, tandis que les échantillons d'eau ont d'abord été soumis à une étape de filtration avant d'êtreensemencés

b. Filtration

La filtration est une méthode permettant de séparer les constituants d'un mélange à l'aide d'un support poreux. Dans cette étude, les prélèvements d'eau ont été transportés au laboratoire et filtrés dans un délai de 24 heures suivant l'échantillonnage, à l'aide d'une rampe de filtration (figure12). Avant utilisation, la rampe a été stérilisée à l'alcool, puis flambée et refroidie avec de l'eau distillée stérile. Un filtre stérile d'une porosité de $0,45\ \mu\text{m}$ a ensuite été placé sur la rampe, suivi de la mise en place des entonnoirs. La filtration a été réalisée sur un volume de 1,5 litre d'eau pour chaque échantillon.



Figure 12 : Une rampe de filtration d'eau Millipore™ (originale)

c. Culture et isolement des amibes libres

La culture permet le développement contrôlé de micro-organismes *in vitro*, dans le but de faciliter leur identification et d'obtenir des résultats plus fiables. Dans la présente étude, les filtres issus de la filtration ainsi que les prélèvements d'écouvillons, ont été déposés sur un milieu solide à base d'agar ou gélose blanche (figure 13). Les cultures ont été incubées à $30\ ^\circ\text{C}$

et à 37 °C, en présence de bactéries *Escherichia coli* mortes servant de source nutritive pour les amibes.



Figure 13 : Photo de filtre posé sur une gélose blanche (originale)

d. Repiquage et purification des cultures d'amibes

Le repiquage a été effectué afin de purifier les cultures, en isolant les kystes d'amibes et en éliminant les contaminations potentielles par d'autres micro-organismes, tels que les bactéries ou les champignons. Pour cela, une colonie isolée a été prélevée à partir de chacune des 78 boîtes de culture initiales (boîtes mères), puis réensemencée sur une nouvelle gélose blanche enrichie en *Escherichia coli* mortes, servant de source nutritive. Les boîtes ont ensuite été incubées à 30 °C et 37 °C pendant une période de 10 jours.

e. Observation au microscope inversé des cultures et repiquages

Les boîtes de culture, ainsi que celles issues du repiquage, ont été observées quotidiennement entre le 4^e et le 7^e jour d'incubation à l'aide d'un microscope inversé. L'objectif de ces observations était de détecter l'apparition de plaques de croissance caractéristiques des amibes libres. Les examens ont été réalisés à un grossissement de 200× (Grx200), en balayant soigneusement toute la surface du filtre, en particulier le bord découpé, où la croissance est souvent plus visible. Les éventuelles contaminations par d'autres micro-organismes (bactéries, champignons) ont également été notées afin d'évaluer la pureté des cultures.

f. Identification morphologique

L'utilisation des clés d'identification morphologiques des amibes libres a permis de réaliser l'identification des amibes libres observées au microscope optique, à un grossissement de 400×

Les amibes libres pathogènes, telles que *Acanthamoeba spp.*, *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris* et *Vermamoeba vermiformis*, présentent des kystes aux caractéristiques morphologiques distinctes, permettant leur identification microscopique. Les kystes d'*Acanthamoeba spp.* mesurent généralement entre 13 et 20 μm de diamètre et possèdent une double paroi bien définie, constituée d'un ectocyste externe fibreux et d'un endocyste interne plus épais et granulaire. *Naegleria fowleri* forme des kystes sphériques de 7 à 12 μm de diamètre, caractérisés par une paroi lisse et mince, renfermant un noyau unique central doté d'un nucléole bien distinct. Les kystes de *Balamuthia mandrillaris*, mesurant entre 13 et 30 μm , présentent une double paroi clairement visible. Enfin, *Vermamoeba vermiformis* produit des kystes plus petits, d'environ 6 à 9 μm , possédant une double paroi (figure 14).

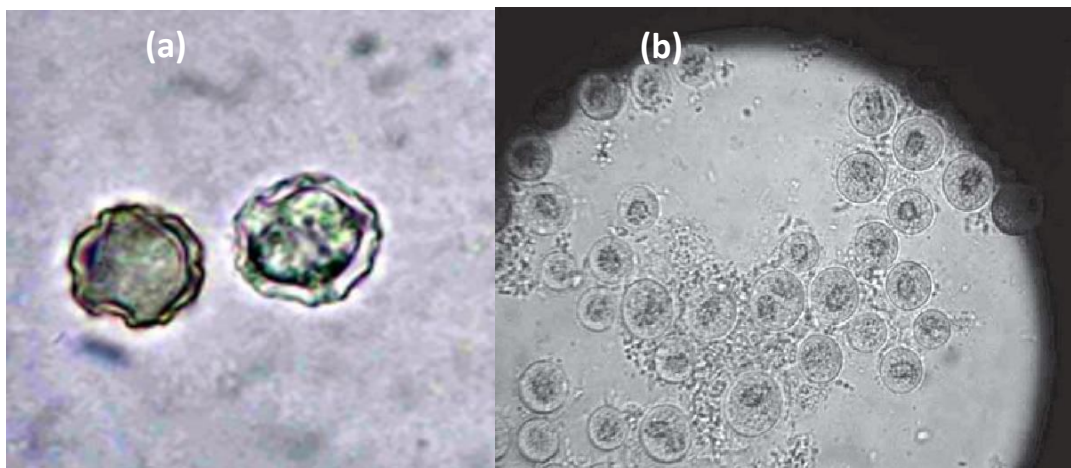


Figure 14 (a) Kyste d'*Acanthamoeba spp.* en culture. CDC ;(b)Kyste de *Naegleria fowleri* en culture (angrup, 2010)

g. Observation microscopique

L'observation microscopique au microscope optique a été réalisée dans le but de mettre en évidence les kystes d'amibes libres, généralement visibles sous un grossissement de $\times 400$. Pour ce faire, une petite quantité d'eau physiologique stérile a été déposée sur la boîte de Pétri. Le pourtour du filtre a été délicatement gratté à l'aide d'une lame stérile, afin de détacher les éléments susceptibles de contenir des kystes. Une goutte du prélèvement ainsi obtenu a été déposée sur une lame de microscope, puis recouverte d'une lamelle, en vue de l'examen microscopique

h. Test de flagellation

La méthode de test de flagellation a été employée afin de différencier les formes flagellées, typiques du genre *Naegleria*, des formes amiboïdes possédant des pseudopodes, caractéristiques des autres genres. Cette technique a été appliquée à l'ensemble des cultures. Pour ce faire, un volume de 5 ml d'eau distillée a été ajouté à la surface de la gélose contenant les amibes libres. La surface de la gélose a été soigneusement raclée afin de détacher les FLA, puis la suspension obtenue a été transférée dans un tube à bouchon vissé et incubée à 37 °C pendant 10 minutes 2 fois puis 30 minutes respectivement, à chaque fin d'incubation deux goutte de la suspension ont été prélevés et observés sous microscope optique grossissement 400X en rajoutant le Lugol pour bien délimiter le noyau et le cytoplasme.

i. La coloration de Giemsa

La coloration de Giemsa a été réalisée à partir d'une solution obtenue en diluant 1 ml de colorant Giemsa dans 9 ml d'eau du robinet. Après filtration, cette solution a été utilisée pour la coloration des frottis préalablement fixés. La fixation a été effectuée par application du méthanol à l'aide d'une pipette sur la surface des frottis, pendant 30 seconds suivis d'un séchage à l'air libre. La solution de Giemsa a ensuite été déposée délicatement sur les lames jusqu'à recouvrement complet des frottis, et laissée en contact pendant 30 minutes. Le colorant a été éliminé progressivement par rinçage goutte à goutte avec de l'eau de robinet, puis les lames ont été laissées à sécher à température ambiante.

j. Identification moléculaire

i. Extraction d'ADN

La récolte des amibes libres cultivées sur gélose a été réalisée en raclant délicatement la surface du milieu, après humidification préalable à l'aide d'eau physiologique, afin de détacher les différentes formes d'amibes. La suspension obtenue a été transférée dans des tubes Eppendorf stériles, puis soumise à plusieurs lavages successifs avec du tampon PBS (Phosphate Buffered Saline) pour éliminer les impuretés et les résidus du milieu de culture. Chaque lavage consistait en une centrifugation de la suspension cellulaire, suivie de la récupération du culot, qui était ensuite remis en suspension dans du PBS stérile, avant d'être recentrifugé. Cette étape a été répétée deux à trois fois. L'ADN a ensuite été extrait selon la méthode classique au phénol-chloroforme, permettant une purification efficace du matériel génétique.

1.1.1. Choc thermique

Le choc thermique appliqué aux amibes libres consiste à les soumettre à une variation rapide de température afin de fragiliser leur membrane cellulaire. La lyse des amibes libres par azote liquide repose sur une congélation pendant 30 secondes des cellules à $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, suivie d'un réchauffement rapide pendant 3 minutes à 100° , ce qui provoque un choc thermique. Ce processus entraîne la rupture mécanique des membranes des amibes libres, facilitant ainsi la libération de leur contenu intracellulaire, notamment l'ADN.

1.1.2. Méthode phénol chloroforme

La méthode classique au phénol-chloroforme a été choisie pour sa capacité à éliminer efficacement les protéines, les lipides et autres contaminants, tout en assurant une bonne récupération de l'ADN. (Annexe 2).

1.2. Le dosage de l'ADN

Le dosage de l'ADN extrait des amibes libres a été effectué dans le but de déterminer la concentration et d'évaluer la qualité du matériel génétique obtenu, en vue de son utilisation dans les analyses moléculaires, notamment la PCR. La quantification a été réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre Nano Drop (Thermo Scientific) figure 15 en déposant 1 à 2 μL de chaque échantillon sur la cellule de lecture. Cet appareil génère automatiquement un spectre d'absorbance, permettant une visualisation graphique de la qualité de l'échantillon et la détection d'éventuelles contaminations (protéines, solvants, etc.).

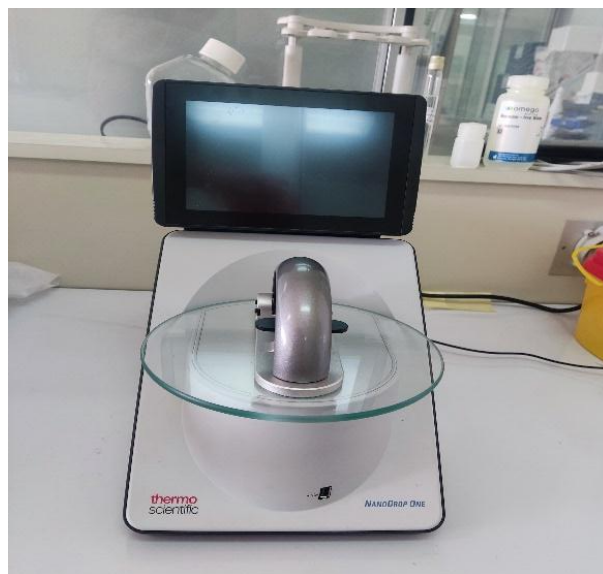


Figure 15 : photo d'un spectrophotomètre Nano Drop (Thermo Scientific) (originale IPA)

1.3. Polymerase chain reaction PCR

La réaction de polymérase en chaîne (PCR) est une technique biochimique réalisée *in vitro*, permettant l'amplification exponentielle d'un fragment spécifique d'ADN présent dans une matrice. Grâce à sa haute sensibilité, elle permet la détection et l'identification précise des différentes espèces d'amibes libres à partir de leur matériel génétique. Dans cette étude, des mélanges réactionnels (mix PCR) ont été préparés en utilisant des amorces spécifiques pour les genres *Acanthamoeba spp* (JDP Acanthamoeba) (JDP1, JDP2) et *Naegleria* (PLFW *Neagleria*), selon des volumes et concentrations détaillés dans l'annexe 3 (tableau 2) et l'annexe 4 (tableau 3) respectivement. Un volume de 5 μ L d'ADN extrait a été ajouté à chaque réaction, portant le volume final à 25 μ L. La PCR a été réalisée en temps réel à l'aide d'un thermocycleur *Proflex™* figure 16, en suivant le programme thermique décrit dans l'annexe 5 (tableau IV) et l'annexe 6 (tableau V) respectivement.



Figure 16 : photo d'un thermocycleur Proflex™ (originale, IPA)

Résultats

1. Résultats de l'échantillonnage

Dans le but de rechercher et d'identifier les amibes libres présentes dans les eaux des fermes d'élevages de la région de Tizi-Ouzou, nous avons réalisé 39 prélèvements (26 prélèvements d'eau et 13 écouvillons) dans 7 communes dans la région de Tizi-Ouzou. Les prélèvements ont été traités par la suite à l'Institut Pasteur d'Alger puis mis en culture pour l'isolement et l'identification des différentes espèces d'amibes libres. L'origine des prélèvements proviennent à partir des eaux des puits (18 prélèvements) et des eaux de conduite (8 prélèvements) où on a prélevé de la source initiale et du bassin où s'abreuvent les animaux.

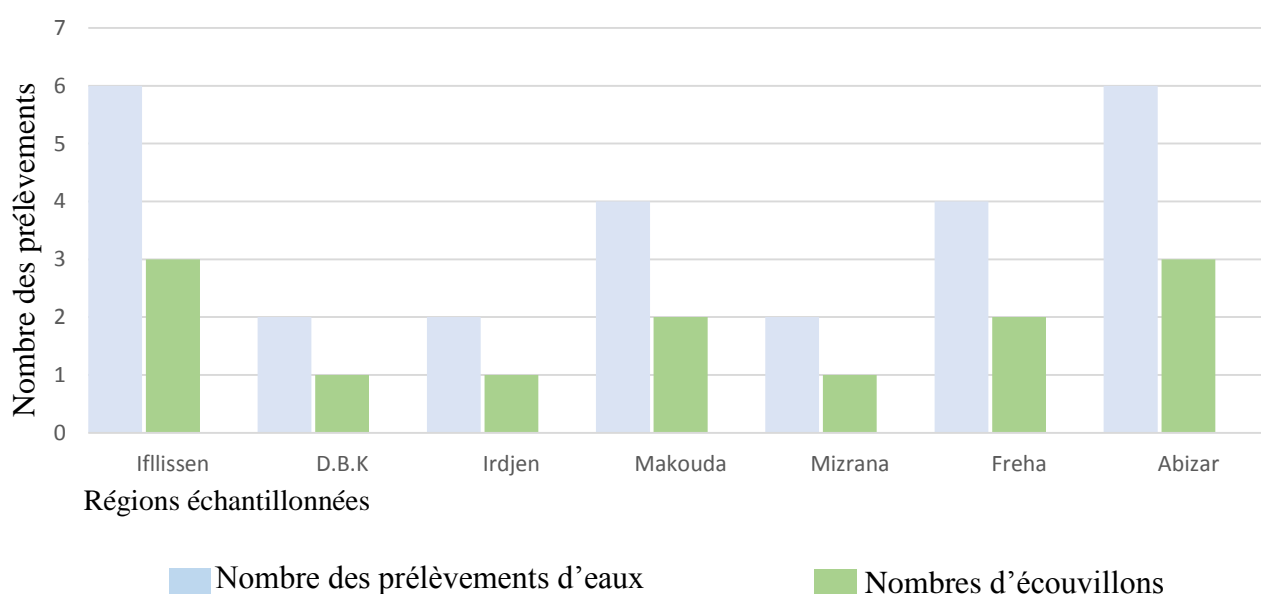


Figure 17 : Histogramme représentatif des régions échantillonnées et de nombre des prélèvements pour chaque région.

2. Résultats des paramètres physico-chimiques : pH et température

Deux paramètres physico-chimiques de l'eau ont été mesurés lors de l'échantillonnage : le pH et la température. La moyenne des résultats des températures varie d'une région à une autre entre 19,6°C (Makouda) et 26,1°C (Freha), les variations sont modérées. Les valeurs de pH vont de 5,9 (DBK) à 7,53 (Iflissen). La majorité des échantillons sont neutres à légèrement acides. La totalité des résultats de ces paramètres sont mentionnés dans (annexe 1).

3. Résultats des cultures des échantillons filtrés et des écouvillons

Parmi les 13 fermes incluses dans l'étude, la présence d'amibes libres a été détectée dans 12 d'entre elles.



Figure 18 : Diagramme des pourcentages de cultures positives en fonction du type et de l'origine du prélèvement

Les résultats en pourcentage des cultures positives, en fonction du type et de l'origine du prélèvement, ont révélé que la majorité des prélèvements positifs provenaient des eaux de conduites (62%). Par ailleurs, 33% des prélèvements d'eaux de puits se sont avérés positifs, tandis que pour les prélèvements de biofilm, le taux de positivité est de 46%. Ces résultats sont représentés dans (figure 18).

2. Identification morphologique

3.1. Identification au microscope inversé

Afin de surveiller l'émergence des plages amibiennes, des observations ont été effectuées au 3ème jour ainsi qu'au 7ème jour pour les cultures incubées à 30°C et 37°C. Des plages amibiennes sont apparues autour du filtre et sur toute la boîte dans le cas des biofilms.

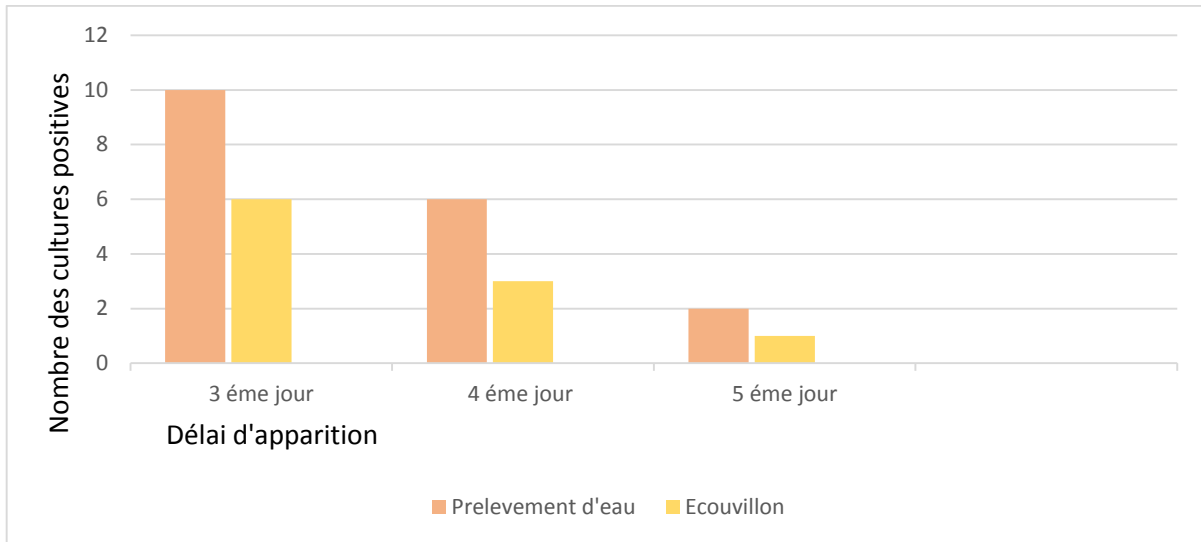


Figure 19: Histogramme représentatif des résultats de cultures d'amibes libres positives en fonction du délai d'apparition des positifs dans les boîtes incubées à 37°C.

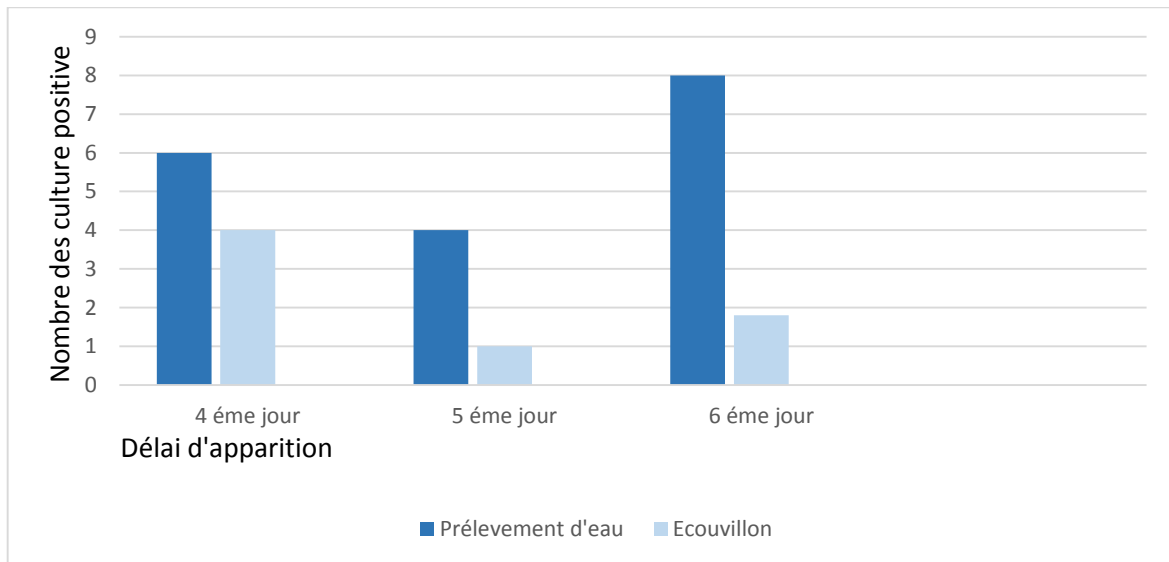


Figure 20: Histogramme représentatif des résultats de cultures positives de FLA en fonction du délai d'apparition des positifs dans les boîtes incubées à 30°C.

L'observation a révélé que l'apparition des plages amibiennes est plus lente dans les boîtes incubées à 30°C comparativement à celles incubées à 37°C. En effet, à 30°C, les premières plages n'apparaissent qu'à partir du 4^{ème} jour d'incubation (figure 20), tandis qu'à 37°C elles sont visibles dès le 3^{ème} jour et continuent de se développer jusqu'au 5^{ème} jour (figure19).

Cette observation nous a permis aussi de suivre l'apparition des contaminations tel que les champignons, bactéries et levures qui était plus rapide et qui envahissent toutes la boîtes.

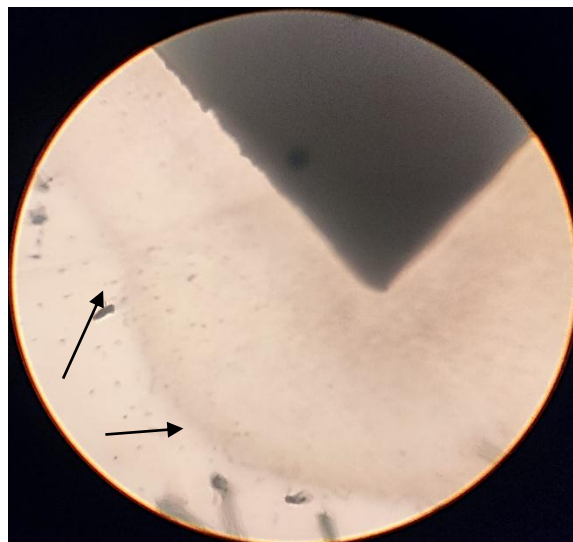


Figure21 : Résultat de l'Observation d'une plage de kystes des amibes libres sous microscope inversé Grx200(Originale)

3.2. Résultats de culture d'*Escherichia coli*

Afin d'assurer une source nutritive pour les cultures d'amibes libres, une souche de *E. coli* a étéensemencée dans un milieu nutritif et incubé pendant 24h à 37°C. Après 24h, une pousse importante des colonies a été remarquée puisensemencé sur des boites de géloses qui ont été utilisé pour les cultures des FLA.

3.3. Contrôle au microscope inversé des cultures de repiquage

Les cultures de repiquage nous a permet de récolter les kystes afin d'augmenter la charge parasitaire de la culture initiale ainsi l'élimination des contaminations ce qui augmente la purification cette dernière. L'apparition débute dès le 2^{ème} jour et accroissement a été observé de 4 à 5 jours.

3.4. Identification morphologique au microscope optique des boites de cultures des prélèvements

Dans le but d'identifier les différents genres d'amibes libres dans les cultures incubées à 30°C et à 37°C, une observation au microscope optique avec grossissement Gx400 a permis de visualiser des cultures avec différentes charges parasitaires : présence d'amas de kystes et d'autre cultures présence de kystes séparé ainsi que des cultures avec absence de kyste. Cette observation a permis aussi d'identifier différents formes (ronds, ovales, étoilés et irréguliers) et différents tailles (petites, moyennes, grandes) avec observation des membranes extérieurs bien définis.

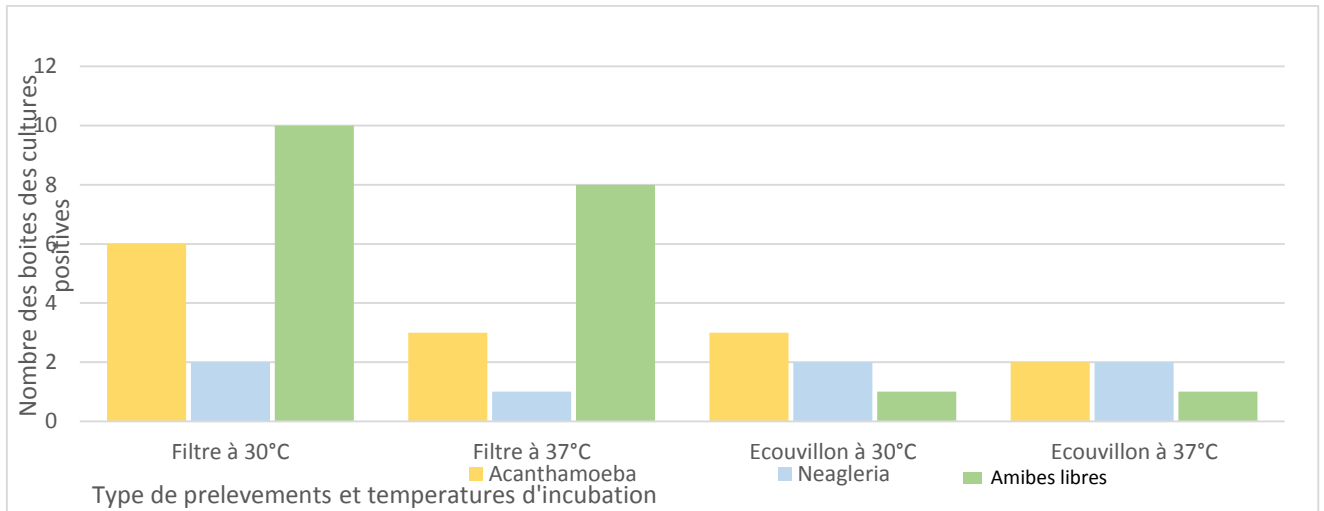


Figure 22 : Histogramme représentatif des résultats d'identification morphologique des amibes libres en fonction des types de prélèvements et des températures d'incubation des cultures.

En se basant sur les clés d'identification morphologiques des amibes libres nous avons pu identifier le genre d'*Acanthamoeba* comme l'espèce la plus fréquemment isolé avec 14 prélèvements positifs (6 cultures de filtre à 30°C, 3 cultures de filtre à 37°C, 3 cultures d'écouvillons à 30°C et 2 cultures d'écouvillons à 37°C) tandis que le genre *Neagleria* a été identifié dans 7 prélèvements (2 cultures de filtre à 30°C, une culture de filtre à 37°C, 2 cultures d'écouvillons à 30°C et 2 cultures d'écouvillons à 37°C). Dans 20 prélèvements nous n'avons pas pu identifier les genres exacts d'amibes libres. Ces résultats sont représentés dans (figure 22).

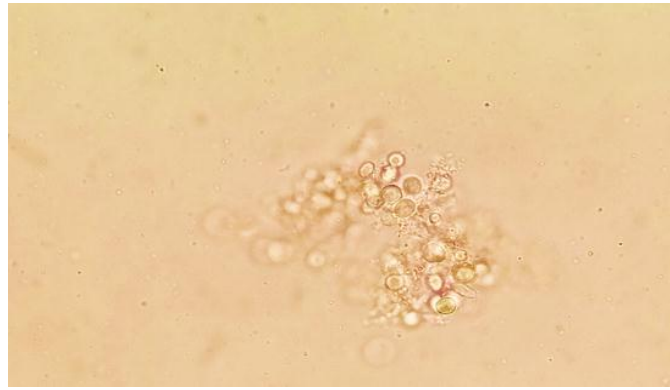


Figure 23 : Observation au microscope optique des kystes de genre *Neagleria* au grossissement X400 (Originale)

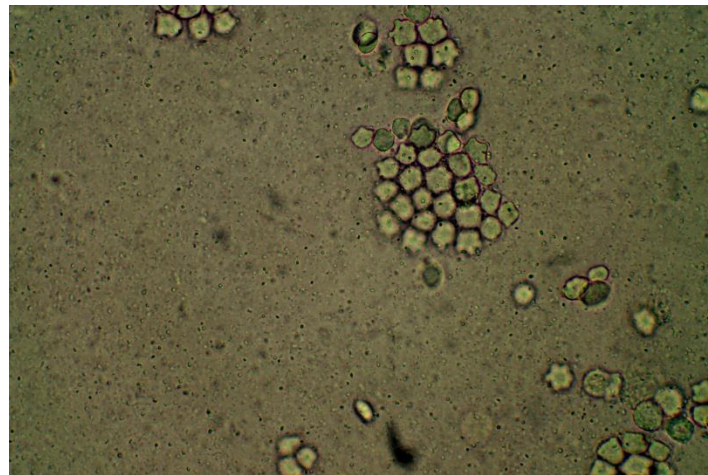


Figure 24 : Observation au microscope optique des amas de kystes de genre *Acanthamoeba* au grossissement x400 (Originale)

4. Test de flagellation

Les kystes d'amibes libres se transforment en formes végétatives grâce à un test de flagellation. Cette transformation est observée au microscope (Grx400) après trois incubations à 37°C : deux de 10 minutes et une de 30 minutes. Les kystes évoluent en trophozoïtes pour *Acanthamoeba* et en formes flagellées pour *Neagleria*.

Un test de flagellation a été effectué sur un total de 30 échantillons. Parmi ces échantillons, 9 ont montré une transformation en forme végétative, tandis que les 21 autres n'ont pas présenté cette transformation.

L'observation après les deux premières incubations n'a pas montré de transformation en forme végétative, mais a révélé des amas de kystes non désenkystés. En revanche, l'observation de la troisième incubation a permis de constater la transformation en formes trophozoïtes avec présence de pseudopodes épineux permettant la locomotion. Ce test n'a pas permis d'observer la transformation des kystes en forme flagellée.

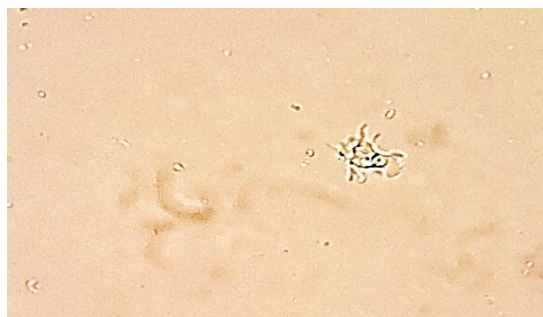


Figure 25 : Observation au microscope optique de la forme végétative après le test de flagellation au grossissement x400 (Originale)

5. Coloration au Giemsa

L'observation des frottis colorés au Giemsa sous microscope optique avec un grossissement de Grx400 a permis de mettre en évidence la présence de kystes d'amibes libres ainsi que l'étude de leurs morphologies. La coloration des kystes d'amibes libres du genre *Acanthamoeba* se caractérise par une forme ronde ou légèrement polygonale et une double paroi épaisse qui prend une teinte bleu intense à violet, tandis que le cytoplasme apparaît bleu violacé. Les kystes du genre *Naegleria* présentent une forme ronde à ovale, une paroi kystique lisse et mince qui apparaît bleu clair, et un cytoplasme de couleur bleu pâle (figure 21).

L'observation a permis l'identification des formes d'*Acanthamoeba spp*, ainsi d'autres formes d'amibes libres différentes des *Acanthamoeba*.

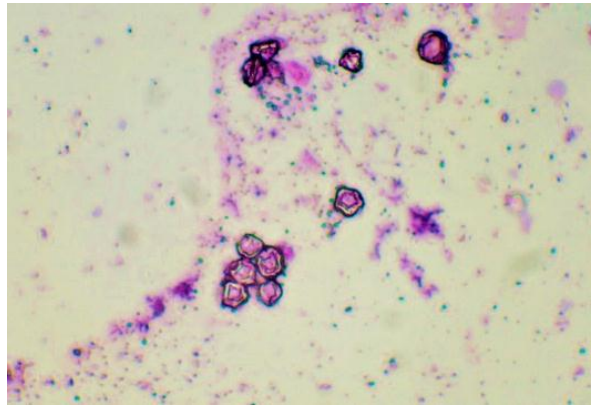


Figure 26 : Observation au microscope optique de kystes d'amibes libres après coloration au Giemsa avec grossissement Grx400. (Originale)

6. Résultats de l'identification moléculaire

6.1. Résultats de l'électrophorèse sur gel d'agarose en utilisant le protocole JDP *Acanthamoeba*

L'amplification par PCR réalisée sur 30 échantillons à l'aide des amorces spécifiques JDP1 et JDP2 a été suivie d'une migration sur gel d'agarose. La lecture du gel a révélé la présence de 17 bandes fluorescentes indiquant un résultat positif et confirment la présence d'ADN d'*Acanthamoeba*. Les autres échantillons n'ont montré aucune bande, ce qui suggère une absence d'ADN cible. Quelques échantillons ont montré de smears ce qui indique une contamination par les protéines et d'ARN.

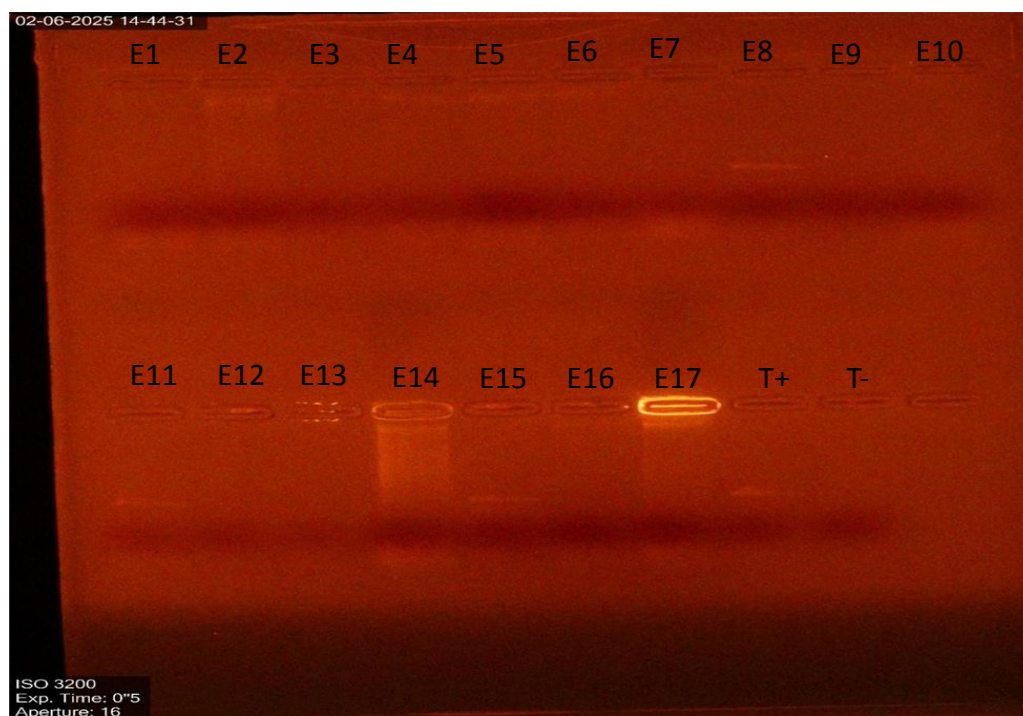


Figure 17 : Résultats des PCR *Acanthamoeba* sur gel d'agarose à 1,5% des prélèvements (E1 à E10, E12 à E17, T+, T-)

6.2. Résultats de l'électrophorèse sur gel d'agarose en utilisant le protocole PLFW *Neagleria*

Les résultats d'amplification par PCR à l'aide des amorces spécifique à *Neagleria* (Neag1 et Neag2) réalisée sur 30 échantillons suivie d'une migration sur gel d'agarose ont montré la présence de 6 bandes fluorescentes indiquant la présence d'ADN de *Neagleria*. Pour certains échantillons l'apparition de smears indique une contamination par les protéines et d'ARN.

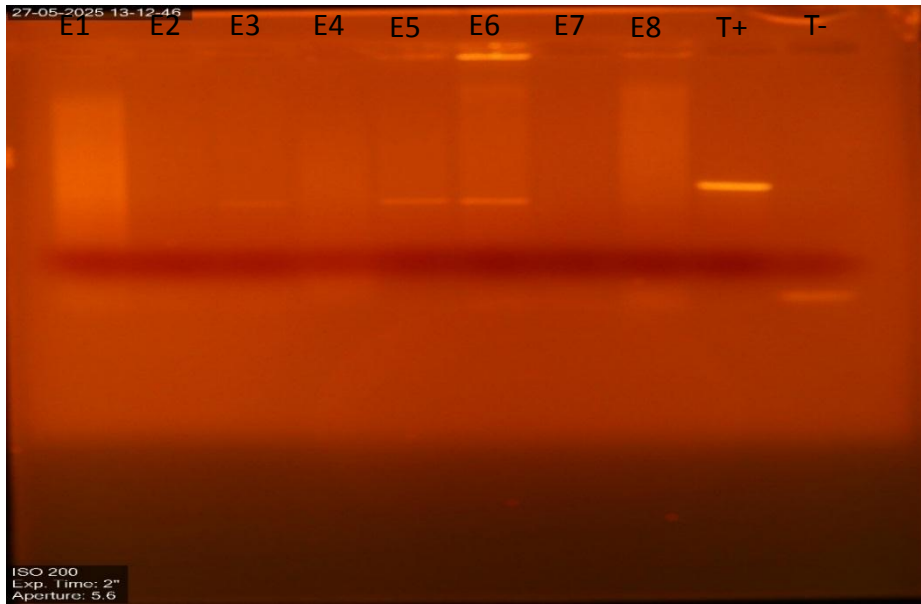


Figure 18 : Résultats des PCR *Naegleria* sur gel d'agarose à 1,5% des prélèvements (E1 à E8, T+, T-)

Discussion

La présente étude a été menée dans le but d'explorer la présence et l'identification des amibes libres dans les eaux utilisées au sein des fermes d'élevages afin d'évaluer les risques potentiels pour la santé humaine et animale. Bien que de nombreuses études aient porté sur la qualité microbiologique de l'eau en milieu agricole, la présence des amibes libres notamment les espèces pathogènes reste sous-estimée et peu documenté surtout dans les fermes d'élevages dans les régions rurales où l'eau est souvent utilisée sans traitement préalable.

L'échantillonnage a été effectué dans plusieurs fermes d'élevages dans la région de Tizi-Ouzou. Les prélèvements ont été pris sur différents types de sources d'eau utilisée pour l'abreuvement notamment l'eau des puits, l'eau de conduites ainsi que celle des bassins d'abreuvement. Dans la présente étude un volume de 1,5 litre d'eau a été prélevé pour chaque échantillon, ce qui varie par rapporte aux autres études où un volume de 500ml a été pris chaque prélèvement. (Coşkunet *al.*,2013). et 250 ml (Moulahem et al,2015). Des prélèvements à l'aide des écouvillons ont été réalisée en écouvillonnant l'intérieur des robinets trouvés dans ces fermes d'élevage, une étude a montré la même procédure d'échantillonnage des biofilm (Alida et *al.*, 2013).

Afin de concentrer les amibes libres présentes dans les échantillons d'eau, une filtration a été faite à l'aide d'une rampe de filtration en utilisant un filtre de 0.45 µm de porosité. Ce choix méthodologique est similaire à celui utilisé par Khan *et al.* (2013). Par contre Moulahem *et al* (2015) ont utiliser le filtre de 1,2 µm dans leur étude

Pour cultiver les amibes libres, nous avons utilisé un milieu de gélose non nutritive (agar-agar) tapissé d'une suspension d'*Escherichia coli* tuée par chauffage, servant de source de nutriments. Cette méthode nous a donné de bons résultats. Elle est couramment utilisée dans la littérature, a montré son efficacité dans plusieurs études, notamment celle de Fani *et al.* (2022).

Parmi les facteurs importants dans l'isolement et la croissance des amibes libres, la température d'incubation est un élément fondamental. Dans notre étude les boites de cultures d'amibes libres ont été incubées à deux températures différentes, 30°C et 37°C. Ce sont des températures idéales qui favorisent le développement des FLA. Les mêmes températures ont été utilisées dans l'étude de Üstüntürk (2020).

Dans le cadre de cette étude, les échantillons analysés provenaient de différentes sources d'eau : l'eau de conduite, les eaux de puits, ainsi que des prélèvements effectués par écouvillonnage. Les résultats ont montré que 5/8 échantillons provenant de l'eau de conduite étaient positifs, de même que 6/18 échantillons issus des eaux de puits, et enfin 6 échantillons sur 13 prélevés par écouvillonnage ont également révélé une présence d'amibes libres. Ces observations

contrastent avec celles rapportées par une étude faite par Montalbano *et al.* (2015), où le taux de positivité pour l'eau du robinet était seulement de 17,8 % et 45,9 % pour les eaux de puits.

L'observation directe au microscope optique nous a permis d'identifier les genres *Acanthamoeba* et *Naegleria*. Le genre *Acanthamoeba* se distingue par la présence d'une double paroi polygonale ou en forme d'étoile, caractéristiques morphologiques également utilisées comme clés d'identification par Nourouzi *et al.* (2021). Des frottis ont ensuite été réalisés, suivis d'une coloration au Giemsa, afin de mieux visualiser cette double paroi ainsi que le cytoplasme coloré. Contrairement à notre étude, où les deux genres ont été identifiés, Moulahem *et al.* (2015) n'a rapporté que la présence du genre *Acanthamoeba*.

Des tests de flagellations ont été aussi réalisés pour nous permettre d'observer la transformation des kystes d'amibes libres en forme trophozoïtes pour le genre *Acanthamoeba* et en forme flagellée pour le genre *Neagleria*. Dans la présente étude, le test a permis la transformation des kystes seulement en formes trophozoïtes et pas en formes flagellées. En Egypte ce test a été aussi réalisé par Nageeb *et al.* (2022) et a permis l'obtention des formes flagellées et des formes trophozoïtes.

Dans la majorité des résultats obtenus dans la recherche et l'identification des amibes libres dans l'eau des puits et réservoir domestique destinés à un usage ménager, les kystes d'*Acanthamoeba* est souvent l'espèce la plus communément trouvée avec 30% et 8% pour le genre *Neagleria* d'après l'étude de Farzana *et al.* (2013). Les résultats de notre étude sur les eaux des puits ainsi les eaux stockées dans des réservoirs destinés à l'abreuvement des animaux ont également démontré une importante présence de genre *Acanthamoeba* avec 41% des résultats positifs et 20% de genre *Neagleria*.

L'identification moléculaire des amibes libres par PCR permet une détection précise grâce à l'utilisation d'amorces spécifiques. Dans notre étude, nous avons utilisé les amorces JDP1 et JDP2, spécifiques au genre *Acanthamoeba*, ainsi que d'autres amorces ciblant le genre *Naegleria*. Ce protocole a également été adopté dans l'étude de Norouzi *et al.* (2021). Sur un total de 30 échantillons, nous avons appliqué deux protocoles PCR avec les amorces JDP pour *Acanthamoeba*, ce qui nous a permis d'identifier 17 échantillons positifs. et le protocole PLFW *Neagleria* qui a donné 6 prélèvements positifs. .. De manière comparable, Di Filippo *et al.* (2015) ont rapporté dans leur étude une détection positive pour *Acanthamoeba* chez 18 échantillons sur 46 (39,1 %) en utilisant également le protocole PCR avec les amorces JDP.

Toutefois, leur étude a permis d'identifier, par PCR, non seulement les genres *Acanthamoeba* et *Naegleria*, mais aussi *Vermamoeba*, ce qui témoigne d'une diversité plus étendue d'amibes libres dans les échantillons analysés.

Conclusion

La région de Tizi-Ouzou se distingue par une activité importante d'élevage, notamment de bovins, ovins et caprins, avec un grand nombre de fermes réparties dans les zones rurales. Dans ces exploitations, les éleveurs utilisent principalement des eaux de puits et de conduites pour abreuver les animaux, mais aussi, dans certains cas, pour des usages domestiques tels que la cuisine ou l'hygiène, ainsi que comme eau potable. Cependant, ces eaux ne font généralement l'objet d'aucun traitement ni d'analyse microbiologique, ce qui peut représenter un risque pour la santé humaine et animale. En effet, des études ont montré que ces milieux aquatiques peuvent contenir des protozoaires appelés amibes libres, dont certaines espèces des genres *Acanthamoeba* et *Naegleria* sont pathogènes. C'est dans ce contexte que s'inscrit la présente étude, dont l'objectif principal est de rechercher et d'identifier la présence d'amibes libres dans les eaux utilisées dans les fermes de la région de Tizi-Ouzou, en se basant sur des méthodes morphologique et moléculaire.

Les échantillons d'eau ainsi que les écouvillons prélevés ont été traités puis ensemencés sur un milieu de culture à base de gélose blanche enrichie en *Escherichia coli* morte, utilisée comme source de nutrition, qui ont été par la suite incubés à deux températures différents 30 °C et 37 °C

Les résultats ont révélé un taux de positivité de 76 % dans les échantillons prélevés sous forme de biofilm. L'ensemble des échantillons provenant des eaux de conduite se sont révélés positifs, indiquant une contamination totale de cette source. En comparaison, les prélèvements issus des eaux de puits ont montré un taux de positivité de 55 %

L'identification morphologique a révélé une prédominance du genre *Acanthamoeba*, représentant la majorité des formes observées par rapport au genre *Neagleria*. D'autres formes atypiques d'amibes libres ont également été identifiées, bien qu'en moindre proportion. Par ailleurs, une coloration au Giemsa a été réalisée afin d'améliorer la visualisation des structures, en particulier la paroi des kystes, facilitant ainsi leur différenciation.

L'étude moléculaire a été réalisée sur un total de 30 échantillons. L'extraction de l'ADN a été effectuée à l'aide de la méthode au phénol-chloroforme, suivie d'un dosage pour évaluer la concentration en acides nucléiques. Par la suite, une amplification par PCR a été menée en utilisant deux protocoles spécifiques : le protocole JDP ciblant le genre *Acanthamoeba* et le protocole PLFW *Neagleria* ciblant le genre *Neagleria*. Les résultats obtenus par PCR ont confirmé ceux de l'identification morphologique, renforçant ainsi la fiabilité des observations initiales

Nos investigations ont permis la mise en évidence du genre *Naegleria* dans les eaux de conduite utilisées dans les fermes ce qui met en lumière un risque sanitaire important, d'autant plus que ces eaux sont souvent perçues comme sûres en raison de leur origine contrôlée. Ce constat souligne la nécessité d'intégrer des analyses microbiologiques ciblées dans les processus de filtration ou de traitement de l'eau, afin d'assurer l'élimination efficace de ces protozoaires.

La présente étude a permis de pallier le manque de données locales sur la qualité parasitologiques des eaux utilisées dans les fermes de la région de Tizi-Ouzou. La détection de genres pathogènes tels que *Acanthamoeba* et *Naegleria* met en évidence un risque sanitaire important, tant pour la santé humaine que pour celle des animaux, surtout dans un contexte où ces eaux sont employées à la fois pour l'abreuvement du bétail et pour des usages domestiques. Face à ce constat, il est impératif de mettre en œuvre des mesures préventives, telles que le traitement de l'eau par filtration ou désinfection, le contrôle microbiologique régulier des sources utilisées, ainsi que la sensibilisation des éleveurs et des populations rurales aux dangers potentiels. En fournissant des données précises et en attirant l'attention sur une problématique peu étudiée, cette recherche constitue une base solide pour améliorer les pratiques sanitaires en milieu rural et pour développer des stratégies de surveillance adaptées aux réalités locales.

Références bibliographiques

Açıkalın Coşkun, K., Özçelik, S., Tutar, L., Elaldı, N., & Tutar, Y. (2013, July 22). Isolation and identification of free-living amoebae from tap water in Sivas, Turkey.

Adl, S. M., Bass, D., Lane, C. E., Lukeš, J., Schoch, C. L., Smirnov, A., Agatha, S., Berney, C., Brown, M. W., Burki, F., Cardenas, P., Cepicka, I., Chistyakova, L., Del Campo, J., Dunthorn, M., Edvardsen, B., Eglit, Y., Guillou, L., Hampl, V., Heiss, A. A., Hoppenrath, M., James, T. Y., Karnkowska, A., Karpov, S., Kim, E., Kolisko, M., Kudryavtsev, A., Lahr, D. J. G., Lara, E., Le Gall, L., Lynn, D. H., Morrow, C., Park, J. S., Pawlowski, J. W., Powell, M. J., Richter, D. J., Rueckert, S., Torruella, G., Youssef, N., Zlarogursky, V., & Zhang, Q. (2019). Revisions to the classification, nomenclature, and diversity of eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 66(1), 4–119.

Adl, S.M., Simpson, A.G.B., Lane, C.E., Lukes, J., Bass, D., Bowser, S.S., Brown, M.W., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenrath, M., Lara, E., Le Gall, L., Lynn, D. H., McManus, H., Mitchell, E.A.D., Mozely-Stanridge, S.E., Schoch, C.L., Smirnov, A & Spiegel, F. W. (2012). The revised classification of eukaryotes. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 59(5), 429-493.

Al-Aboody, B. A., Altooma, M. A. M., Al-Badran, A. I., & Baqer, N. N. (2024, June 15). Morphological and molecular investigation of free-living amoeba *Sappinia* spp. isolated from environmental and clinical samples in Thi-Qar province-southern Iraq. *Parasites & Vectors*, 17(1), Article 150.

Al-Aboody, B. A., Altooma, M. A. M., Al-Badran, A. I., & Baqer, N. N. (2024, June 15). Morphological and molecular investigation of free-living amoeba *Sappinia* spp. isolated from environmental and clinical samples in Thi-Qar province-southern Iraq. *Bioscience Journal*, 40(2), Article 17.

Andrea Güémez et Elisa García,(2021a), Primary Amoebic Meningoencephalitis by *Naegleria fowleri*: Pathogenesis and Treatments.

Andrea Güémez et Elisa García,(2021b), Primary Amoebic Meningoencephalitis by *Naegleria fowleri*: Pathogenesis and Treatments.

Antonio Peña-Fernández, Raoul E. Guetiya Wadoum and Umar Anjum (2023) .Human Pathogenic Free-Living Amoebas in Faeces from Cows and Pigs from Bombali and Tonkolili Districts, Sierra Leone

Ashford, H. R. (2022). Biofilms. In M. H. Z. Abdin, A. A. Al-Khalidi, & M. S. Alam (Eds.), *Microbial Physiology and Biochemistry Laboratory* (pp. xxx–xxx). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822563-9.00068-8>

Bhosale, N. K., & Parija, S. C. (2021). *Balamuthia mandrillaris* : An opportunistic, free-living ameba - An updated review. *PubMed*, 11(2), 78-88

Bonilla-Lemus, P.; Rojas-Hernández, S.; Ramírez-Flores, E.; Castillo-Ramírez, D.A.; Monsalvo-Reyes, A.C.; Ramírez-Flores, M.A.; Barrón-Graciano, K.; Reyes-Batlle, M.; Lorenzo-Morales, J.; Carrasco-Yépez, M.M. Isolation and Identification of *Naegleria* Species in Irrigation Channels for Recreational Use in Mexicali Valley, Mexico. *Pathogens* 2020, 9, 820.

- Brown, M., Spiegel, F. W., & Silberman, J. D. (2007, November 1). *Amoeba at attention: Phylogenetic affinity of Sappinia pedata. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 54(6), 485–493.
- Buonaccorsi, J. N., & Ledebor, N. A. (2011, janvier 1). Answer to Photo Quiz: Balamuthia mandrillaris. *Journal of Clinical Microbiology*.
- Carsten Balczun and Patrick L. Scheid(2017a). Free-Living Amoebae as Hosts for and Vectors of Intracellular Microorganisms with Public Health Significance .*Viruses*
- Carsten Balczun and Patrick L. Scheid(2017b). Free-Living Amoebae as Hosts for and Vectors of Intracellular Microorganisms with Public Health Significance .*Viruses*
- Chelkha, N., Hasni, I., Louazani, A. C., Levasseur, A., La Scola, B., & Colson, P. (2020, April 3). Vermamoeba vermiformis CDC-19 draft genome sequence reveals considerable gene trafficking including with candidate phyla radiation and giant viruses. *Scientific Reports*, 10(1), 6050.
- Delafont, V., Rodier, M. H., Maisonneuve, E., & Cateau, E. (2018, May 8). Vermamoeba vermiformis: A free-living amoeba of interest. *Microbial Ecology*, 76(3), 693–703.
- Elodie Maisonneuve,(2017). Interactions amibes libres / micro-organismes : préférence trophique et étude comparative avec les macrophages
- Estelle, C., Yann, H., et Marie-Hélène R., (2014).Les amibes libres: Un danger méconnuFree living amoebae: an unrecognized risk.
- Fani, M., Fuerst, P. A., Mosayebi, M., Javadi, A., Harandi, M. F., Saraei, M., Badri, M., & Hajjalilo, E. (2022). Molecular identification and phylogenetic analysis of free-living amoeba in the water resources of Arak, Iran. *Parasitology Research*, 20(7), 1051–1063.
- Fouque E, Yefimova M, Trouilhé M-C, Quellard N, Fernandez B, Rodier MH, Thomas V, Humeau P, Héchard Y (2015) Morphological study of the encystment and excystment of Vermamoeba vermiformis revealed original traits. *J Eukaryot Microbiol* 62:327–337.
- Fouque, E., Yefimova, M., Trouilhé, M.-C., Quellard, N., Fernandez, B., Rodier, M.-H., Thomas, V., Humeau, P., & Héchard, Y. (2015, May 1). Morphological study of the encystment and excystment of Vermamoeba vermiformis revealed original traits. *Parasitology Research*, 114(5), 1733–1741.
- Fučíková K, Lahr DJG (2016) Uncovering cryptic diversity in two Amoebozoan species using complete mitochondrial genome sequences. *J Eukaryot Microbiol* 63:112–122. <https://doi.org/10.1111/jeu.12253>
- Guerlotté, J. (2015). Les amibes libres, un cheval de Troie pour les bactéries pathogènes (Période : septembre 2015 à novembre 2015). Université des Antilles - ISYEB, UMR 7205 CNRS MNHN UPMC EPHE.
- H. Trabelsi, F. Dendana, A. Sellami, H. Sellami, F. Cheikhrouhou, S. Neji, F. Makni, A. Ayad i.(2012) .Pathogenic free-living amoebae: Epidemiology and clinical reviewLes amibes libres pathogènes : *revue épidémiologique et clinique*.
- Kang H,Sohn HJ,Seo GE,Seong GS,Ham AJ,Park AY,et al.,Molecular detection of free living amoebae from

- Namhangang(southernHanRiver)inKorea.ScientificReports.2020;10:335.Available:https://doi.org/10.1038/s41598-019-57347-1
- Khan NA. (2006). *Acanthamoeba: biology and increasing importance in human health.Curr Opin Infect Dis*, 19(2):129–134. https://doi.org/10.1097/01.qco.0000216626.22939.1a
- Khan, K. M. (2006b). *Acanthamoeba : biology and increasing importance in human health. Fems*
- Laurie, M. T., White, C. V., Retallack, H., Wu, W., Moser, M. S., Sakanari, J. A., Ang, K., Wilson, C., Arkin, M. R., & DeRisi, J. L. (2018, juin). Functional assessment of 2 177 U.S. and international drugs identifies the quinoline nitroxoline as a potent amoebicidal agent against the pathogen *Balamuthia mandrillaris*. *mBio*, 9(5), e02051-18.
- Lee, D. I., Park, S. H., Kang, S. A., Kim, D. H., Kim, S. H., Song, S., Lee, S. E., & Yu, H. S. (2022, August 1). Free-living amoeba *Vermamoeba vermiformis* induces allergic airway inflammation. *Korean Journal of Parasitology*, 60(4), 229–236.
- Maciver, S.K.; Piñero, J.E.; Lorenzo-Morales, J. Is *Naegleria fowleri* an Emerging Parasite? *Trends Parasitol.* 2020, 36, 19–28
- Marciano-Cabral F, Cabral G. (2003). *Acanthamoeba spp. as agents of disease in humans.Clin Microbiol Rev*, 16(2):273–307. https://doi.org/10.1128/CMR.16.2.273-307.2003
- María Reyes-Batlle , Ines Sifaoui, Rubén L. Rodríguez-Expósito, José E. Piñero and Jacob Lorenzo-Morales .(2022) . New Insights in *Acanthamoeba*
- Maryantia, E., & Haslinda, L. (2022a,b,c). Epidemiology of pathogenic free-living amoeba. *International Journal of Tropical Disease & Health*, 43(11), 12–20.
- Masoomeh Jalilehvand , Elham Hajjalilo , Yasaman Ghiasi , Saba Rostamian , Fatemeh Taherkhani , Fatemeh Kazemi , Sima Hashemipour , Milad Badri , Behzad Bijani , Amir Javadi , Mehrzad Saraei , Sepideh Hajian , Peyman Heydarian, Ali Sarbazi Golezari ,(2022). Isolation and Identification of Free Living Amoeba from Patients and Contact Lens Users in Iran. *Iran J Parasitol: Vol. 17, No. 2, Apr-Jun 2022, pp.167-173*
- Mohamed Seghir Benterki , Ammar Ayachi, Omar Bennoune , Estelle Régoudis et Michel Pélandakis,(2016). Meningoencephalitis due to the amoeboflagellate *Naegleria fowleri* in ruminants in Algeria
- Moker H. M.et Muslim A. M.,(2018a) . Isolation of *Balamuthia mandrillaris* (Free Living Amoeba) from Shatt Al-Arab River in Basrah, South of Iraq .
- Moker H. M.et Muslim A. M.,(2018b) . Isolation of *Balamuthia mandrillaris* (Free Living Amoeba) from Shatt Al-Arab River in Basrah, South of Iraq
- Montalbano Di Filippo, M., Santoro, M., Lovreglio, P., Monno, R., Capolongo, C., Calia, C., Fumarola, L., D'Alfonso, R., Berrilli, F., & Di Cave, D. (n.d.). Isolation and molecular characterization of free-living amoebae from different water sources in Italy.
- Nageeb, M. M., Eldeek, H. E. M., Attia, R. A. H., Sakla, A. A., Alkhalil, S. S., & Farrag, H. M. M. (2022). Isolation and morphological and molecular characterization of waterborne free-

living amoebae: Evidence of potentially pathogenic Acanthamoeba and Vahlkampfiidae in Assiut, Upper Egypt.

Namrata K Bhosale et Subhash Chandra Parija ,(2021a). Balamuthia mandrillaris: An opportunistic, free-living ameba – An updated review .11(2):78–88. doi: 10.4103/tp.tp_36_21

Namrata K Bhosale et Subhash Chandra Parija ,(2021b). Balamuthia mandrillaris: An opportunistic, free-living ameba – An updated review .11(2):78–88. doi: 10.4103/tp.tp_36_21

Naveed Ahmed Khan(2006). Acanthamoeba : biologyand increasing importance in human health .Fems

Norouzi, M., Saberi, R., Niyiyati, M., Lorenzo-Morales, J., Mirjalali, H., Fatemi, M., Javanmard, E., & Karamati, S. A. (2021). Molecular identification of pathogenic free-living amoebae from domestic biofilm samples in Iran: A risk factor for Acanthamoeba keratitis.

Ovrutsky, A. R., Chan, E. D., Kartalija, M., Bai, X., Jackson, M., Gibbs, S., Falkinham, J. O. III, Iseman, M. D., Reynolds, P. R., McDonnell, G., & Thomas, V. (2013, May). Co-occurrence of free-living amoebae and non-tuberculous mycobacteria in hospital water systems and preferential growth of Mycobacterium avium in Acanthamoeba lenticulata.).

Page, F. C. (1967). Taxonomic criteria for limax amoebae, with descriptions of 3 new species of Hartmannella and 3 of Vahlkampfia. *Journal of Protozoology*, 14(4), 499–521.

Park, J. S. (2016, January 31). First record of potentially pathogenic amoeba Vermamoeba vermiformis (Lobosea: Gymnamoebia) isolated from a freshwater of Dokdo Island in the East Sea, Korea. *Animal Systematics, Evolution and Diversity*, 32(1), 1–6.

Pengsart, W., Tongkrajang, N., Whangviboonkij, N., Sarasombath, P. T., & Kulkeaw, K. (2022, June 27). Balamuthia mandrillaris trophozoites ingest human neuronal cells via a trogocytosis-independent mechanism. *Parasites & Vectors*, 15(1), Article 220.

Reyes-Batlle, M., Niyiyati, M., Martín-Navarro, C. M., López-Arencibia, A., Valladares, B., Martínez-Carretero, E., Piñero, J. E., & Lorenzo-Morales, J. (2015, October 28). Unusual Vermamoeba vermiformis strain isolated from snow in Mount Teide, Tenerife, Canary Islands, Spain. *Parasites & Vectors*, 8, 557.

Samba-Louaka, A., Delafont, V., Rodier, M.-H., Cateau, E., & Héchard, Y. (2019, July 1). Free-living amoebae and squatters in the wild: Ecological and molecular features. *FEMS Microbiology Reviews*, 43(4), 389–404.

Scheid, P. (2019, April). Vermamoeba vermiformis - A free-living amoeba with public health and environmental health significance. *Environmental Health Perspectives*, 127(4), Article 040502.

Scheid, P. L. (2018). Free-living amoebae and their multiple impacts on environmental health. In Elsevier Inc. (Ed.). Central Military Hospital Koblenz; University of Koblenz-Landau.

Schuster FL, Visvesvara GS. (2004). *Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals.*Int J Parasitol, 34(9):1001–1027.

Siddiqui, R., Makhlof, Z., & Khan, N. A. (2021, May 13). *The increasing importance of Vermamoeba vermiformis. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 68(5), 12857.

- Siddiqui, R., Makhlof, Z., Maciver, S. K., Alharbi, A. M., & Khan, N. A. (2024, June 1). *Sappinia* spp.: An update. *Microbial Pathogenesis*, 177, Article 100095.
- Tyml, T., Dykova, I., 2018. *Sappinia* sp.(Amoebozoa: Thecamoebida) and *Rosculus* sp. (SAR: Cercozoa) isolated from King Penguin guano collected in the Subantarctic (South Georgia, Salisbury Plain) and their coexistence in culture. *J. Eukaryot. Microbiol.* 65 (4), 544–555
- Üstüntürk-Onan, M. (2020). Isolation and identification of free-living amoebae isolated from well water in Istanbul.
- Visvesvara GS, Moura H, Schuster FL. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007;50:1-26
- Visvesvara, G. S., Moura, H., & Schuster, F. L. (2007). Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 50(1), 1–26. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00232.x>.
- Wylezich, C., Kudryavtsev, A., Michel, R., Corsaro, D., & Walochnik, J. (2015, septembre 18). Electron microscopical investigations of a new species of the genus *Sappinia* (Thecamoebidae, Amoebozoa), *Sappinia platani* sp. nov., reveal a dictyosome in this genus. *Acta Protozoologica*, 54(1), 45–51.
- Yousuf, F. A., Siddiqui, R., Subhani, F., & Khan, N. A. (2013). Status of free-living amoebae (*Acanthamoeba* spp., *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris*) in drinking water supplies in Karachi, *Pakistan*.
- Yuehua Wang , Linzhe Jiang , Yitong Zhao , Xiaohong Ju , Le Wang , Liang Jin, Ryan D. Fine and Mingguang Li,(2023a). Biological characteristics and pathogenicity of *Acanthamoeba*.
- Yuehua Wang , Linzhe Jiang , Yitong Zhao , Xiaohong Ju , Le Wang , Liang Jin, Ryan D. Fine and Mingguang Li,(2023b). Biological characteristics and pathogenicity of *Acanthamoeba*.
- Zheng, J., Tan, M., Chen, J. H., Li, C. Y. V., Meng, F. J., Wang, L., & Liao, J. Y. (2022, November 15). Diagnosis of cutaneous *Balamuthia mandrillaris* infection via next-generation sequencing in a Chinese woman. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*.
- Montalbano Di Filippo, M., Santoro, M., Lovreglio, P., Monno, R., Capolongo, C., Calia, C., Fumarola, L., D'Alfonso, R., Berrilli, F., & Di Cave, D. (2015). Isolation and molecular characterization of free-living amoebae from different water sources in Italy. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(5), 3417–3427
- Moulaheem, T., Meradji, A., & Bouhouche, I. (2015). Recherche des amibes libres dans l'eau. *Journal algérien de médecine*, 23(2), 86–88

Annexes

Annexe 1

Résultats des paramètres physico-chimiques (ph et température) des prélèvements d'eaux.

régions	Échantillons	températures	pH
Iflissen	Echantillon 1	21,7	6,21
	Echantillon 2	22,1	7,53
	Echantillon 3	21,3	7,35
	Echantillon 4	22,5	6,75
	Echantillon 5	21,8	6,41
	Echantillon 6	22,4	6,47
DBK	Echantillon 1	21,1	5,9
	Echantillon 2	20,9	6,30
Irdjen	Echantillon 1	20,8	7,11
	Echantillon 2	20,7	7,18
Makouda	Echantillon 1	19,8	6,87
	Echantillon 2	19,6	7,36
Mizrana	Echantillon 1	20,3	7,25
	Echantillon 2	20,5	7,35
Freha	Echantillon 1	22,1	6,25
	Echantillon 2	22,2	6,46
	Echantillon 3	26,1	6,40
	Echantillon 4	22	7,06
Abizar	Echantillon 1	21,1	6,60
	Echantillon 2	21,2	7,48
	Echantillon 3	21,2	6,15
	Echantillon 4	20,2	6,95
	Echantillon 5	21	7,37
	Echantillon 6	20,6	20,6

Annexe 2

Après lyse cellulaire dans un tampon contenant du SDS et de la protéinase K, 300 µL de phénol : chloroforme : isoamyl-alcool (25:24:1) ont été ajoutés à l'échantillon. Le mélange a été vortexé énergiquement jusqu'à l'apparition d'un aspect blanc trouble, signe d'une bonne émulsification, puis centrifugé à 13 000 tours/min pendant 10 minutes. La phase aqueuse (surnageant) a été soigneusement récupérée et transférée dans un nouveau tube Eppendorf, dans lequel 200 µL de NaCl ont été ajoutés afin de favoriser la précipitation de l'ADN. Ensuite, 500 µL d'éthanol absolu froid ont été ajoutés, et le mélange a été incubé pendant 2 heures à -20 °C. Après incubation, une centrifugation à 12 000 tours/min pendant 10 minutes a permis la formation d'un culot d'ADN. Le surnageant a été jeté, et le culot lavé avec 500 µL d'éthanol à 70 %, suivi d'une nouvelle centrifugation de 10 minutes à 12 000 tours/min. Enfin, le surnageant a été éliminé et le culot laissé sécher à l'air libre avant d'être resuspendu dans de l'eau distillée stérile ou du tampon TE.

Annexe 3Tableau II : JDP *Acanthamoeba*

Mix	N=1 μ L
H2O PCR GRADE	11.2
AMORCE R	1
AMORCE F	1
TAMPON	2.5
MgCL2	2.5
dNTP	2.5
Taq	0.3
Echantillon (ADN)	4

Amorce R : 59_GGCCCAGATCGTTTACCGTGAA

Amorce F : 59_TCTCACAAGCTGCTAGGGACTCA

Annexe 4Tableau III : PLFW *Neagleria*

MIX	N=1 μ L
H2O PCR grade	6.3
Amorce R	1
Amorce F	1
Tampon	2.5
MgCL2	2.5
Enhancer	4
dNTP	2.5
Taq	0.2
Echantillon (ADN)	5

Amorce R : 5-TTTCTTTTCCTCCCCTTATTA-3

Amorce F : 5-GAACCTGCGTAGGGATCATT-3

Annexe 5Tableau IV : tableau des températures du protocole JDP *Acanthamoeba*

	Température	temps
Dénaturation :	95°	5min
Amplification (40 cycles)	96°	30 s
	58°	60 s
	72°	30 s
Elongation	72°	7 min

Annexe 6Tableau V : tableau des températures du protocole PLFW *Neagleria*

	Températures	temps
Dénaturation	94°	5 min
Amplification (40 cycles)	94°	30 s
	55°	30 s
	72°	45 s
Elongation	72°	5min

Résumé

Ce projet de fin d'études examine la qualité sanitaire des eaux utilisées dans les fermes d'élevage de Tizi-Ouzou en étudiant les amibes libres (AL), protozoaires responsables de maladies graves telles que la méningoencéphalite amibienne primitive à *Naegleria fowleri* et l'encéphalite granulomateuse amibienne à *Acanthamoeba* spp. Des prélèvements effectués dans des puits et conduites d'eau ont permis d'identifier les kystes d'amibes par observation microscopique, coloration et tests de flagellation. L'identification moléculaire, réalisée par extraction d'ADN et PCR, a confirmé la présence d'*Acanthamoeba* dans 56,7 % des échantillons et de *Neagleria* dans 20 %. Au total, 12 des 13 fermes échantillonnées ont montré une contamination par des AL, attestant de leur large distribution. Par identification morphologique, *Acanthamoeba* était présente dans 41 % et *Neagleria* dans 20 % des échantillons. Sur les 8 échantillons d'eau de conduite, 5 étaient positifs ; sur les 18 issus des puits, 6 étaient contaminés ; et sur les 13 biofilms prélevés, 6 contenaient des AL. Les résultats soulignent l'importance de surveiller ces organismes dans les systèmes hydriques pour prévenir les risques sanitaires liés à leur présence.

Mots-clés : Amibes libres, *Acanthamoeba*, *Neagleria*, eaux des fermes d'élevage, Tizi-Ouzou,

Abstract

This final year project examines the sanitary quality of water used in livestock farms in Tizi-Ouzou by studying free-living amoebae (FLA), protozoa responsible for serious diseases such as primary amoebic meningoencephalitis caused by *Naegleria fowleri* and granulomatous amoebic encephalitis caused by *Acanthamoeba spp.* Samples taken from wells and water pipes allowed the identification of amoebic cysts through microscopic observation, staining, and flagellation tests. Molecular identification, carried out by DNA extraction and PCR, confirmed the presence of *Acanthamoeba* in 56.7% of the samples and *Naegleria* in 20%. In total, 12 out of the 13 sampled farms showed contamination by FLA, attesting to their widespread distribution. Through morphological identification, *Acanthamoeba* was present in 41% and *Naegleria* in 20% of the samples. Of the 8 tap water samples, 5 were positive ; of the 18 from wells, 6 were contaminated; and of the 13 biofilms collected, 6 contained FLA. The results highlight the importance of monitoring these organisms in water systems to prevent health risks associated with their presence.

Keywords: Free-living amoebae, *Acanthamoeba*, *Naegleria*, livestock farm water, Tizi-Ouzou.