

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE MOULOU D MAMMERI DE TIZI OUZOU
FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES



Département des Sciences Biologiques

En partenariat avec l'Institut Pasteur d'Alger

Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du Diplôme Master

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Parasitologie

Recherche des amibes libres dans les kératites des yeux chez les porteurs de lentilles de contact à Tizi Ouzou

➤ Présenté par : **Mlle HADDAG DIT HADDADOU Lyza**

Mlle BENCHAOUI Fatiha

Soutenu le 11/07/2023 devant le jury composé de :

Présidente : Mme BOUKHEMZA N	Professeur	FSBSA /UMMTO
Promotrice : Mme LAAMA EDDAIKRA N	Maitre de recherche	IPA
CO-promoteur : Mr BOUKHEMZA M	Professeur	FSBSA/UMMTO
Examineur : Mr MOULOUA	Maitre de conférence	FSBSA/UMMTO

Remerciements

Je remercie chaleureusement, ma chère maman qui m'a tant aidée qui a été toujours à mes côtés malgré tous les obstacles, merci pour ta compassion et ton amour que j'ai ressenti à chaque instant, et bien sûr à mes frères **Tahar, Ramadhan, Bilal, Said** et ma sœur **Lilia**, qui m'ont toujours soutenue.

Je souhaite tout d'abord exprimer ma profonde gratitude à ma promotrice **EDDAIKRA N** maître de recherche de laboratoire à l'Institut Pasteur d'Alger.

Je la remercie aussi énormément pour sa patience, ses conseils, son soutien et sa disponibilité, qui m'a permis de réaliser ce mémoire.

Je voudrais vivement remercier monsieur **BOUKHEMZA M** mon Co- promoteur pour ses précieux conseils qui m'ont beaucoup aidé ; et d'avoir dirigé ce travail de recherche.

Je voudrais vivement remercier madame **BOUKHEMZA N**, de présider le jury de ce travail.

Je remercie particulièrement monsieur **MOULOUA** d'avoir contribué à ce travail.

Je remercie très spécialement mon ange **MANO** qui m'a donné l'impulsion pour oser me lancer dans cette aventure.

À ma belle **LYZA** qui a toujours été avec moi sans condition qui m'a appris la joie de vivre malgré les difficultés.

À **NADJET** qui a toujours cru en moi, merci pour ton enthousiasme, tes encouragements merci de me pousser à toujours aller plus loin. Merci pour ton amitié si rare qui me fait grandir chaque jour.

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

FATIHA

Dédicaces

Je tiens à dédier ce modeste travail ma famille et mes amies, eux qui ont tant sacrifié, tant souffert, tant fait pour faire de moi la personne que je suis présentement.

Tous les mots de toutes les langues ne pourront jamais exprimer ma gratitude à leur égard, Dieu vous bénisse et vous garde pour nous.

A mes très chers frères et sœurs qui m'ont soutenu et qui m'ont toujours donné le meilleur d'eux même.

A Mme Eddaikra N. maitre de recherche de laboratoire à l'institut pasteur d'Alger.

A tous ceux qui me sont chers dont je n'ai pas cité le nom mais qui ont une place dans mon cœur.

FATIHA

Remerciements

Je remercie tout d'abord Dieu le tout puissant de m'avoir donné le courage et l'endurance pour réaliser ce que j'ai pu réaliser jusqu'à aujourd'hui et d'avoir fait de moi la meilleure version de moi-même. C'est grâce à lui que ce présent travail a vu le jour.

Je tiens à remercier en premier lieu ma promotrice madame **LAAMA EDDAIKRA N** maître de recherche de laboratoire à l'Institut Pasteur d'Alger de nous avoir assisté jusqu'à la dernière minute pour la réalisation de ce mémoire. Je la remercie aussi pour sa patience et sa gentillesse avec nous.

Je tiens aussi à remercier profondément monsieur **BOUKHEMZA M** Co-promoteur, Professeur à la Faculté des Sciences biologiques à l'université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou pour avoir dirigé ce travail de recherche et d'avoir cru en ma binôme et moi en nous envoyant à l'IPA vous avez fait de nous ce qu'on est aujourd'hui.

Je suis sensible à l'honneur que me fait Mme **BOUKHEMZA N** de présider le jury de ce travail. Vous nous avez toujours donné des conseils précieux.

Je suis ravie que monsieur **MOULOUA**, me fasse l'honneur de faire partie du jury de ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de mes chaleureuses salutations.

Un énorme Merci à madame **BENABOU A** qui nous a traité comme ses filles et pour son soutien tout au long de notre stage à l'IPA.

Je remercie aussi mademoiselle **DEKKAR M** de nous avoir soutenu et accompagné toute la durée de stage.

Sans oublier la meilleure des binômes, ma très chère amie **BENCHAOUI F** avec qui on a traversé tout les hauts et les bas.

Mes remerciements s'adressent aussi à tous les membres de laboratoire d'Eco-épidémiologie Parasitaire Et Génétique des populations ainsi que tous mes professeurs de cette année qui m'ont aidée et soutenue.



LYZA

Dédicaces

Je dédie ce mémoire a :

A la plus belle des âmes à la meilleure **maman** au monde **FATOU** , si aujourd'hui ta fille est arrivé jusqu'à ce niveau c'est bien grâce a tout tes efforts et tes sacrifices, merci d'avoir cru en moi et d'être toujours derrière moi à me pousser pour donner le meilleur de moi-même , merci d'avoir apporté que de la joie dans ma vie, sans doute maman tu es la plus douce des femmes sur terre, tu seras toujours ma fierté je t'aime maman.

A la prunelle de mes yeux, à celui qui sera toujours mon premier amour : au meilleur **papa** du monde **HAND**. Je te remercie papa d'être le pilier sur lequel toute la famille repose je te remercie d'être l'homme le plus généreux et courageux qui puisse exister, malgré toutes les responsabilités et charges que tu assumes, je suis fière de toi papa j'espère que tu l'es toi aussi je t'aime d'un amour fou.

Grosse dédicace vous mes deuxièmes parents tata **DALILA** et tonton **MOHAND** qui m'ont encouragé du début jusqu'à la fin depuis toute petite je vous aime beaucoup le bien que vous m'avez fait je ne saurai jamais vous le rendre.

A mes chères sœurs, mes complices, meilleures amies **LINYA** et **LOULOU DJ** vous deux êtes le plus beau cadeau que maman et papa puisse m'offrir, vous avez été la pour moi dans les hauts et les bas Dieu puisse vous garder a mes cotés pour qu'on vieillisse ensemble.

A mes deux frères **AMAR** et **LOUNES** merci d'être les épaules sur lesquelles je repose je vous souhaite bonheur, prospérité et réussite, je vous aime énormément.

A toi tata **MALIKA** tu as été la première dans tout je suis fière de toi et du chemin que tu as fait malgré tout ce que tu as traversé tu as su te relever a chaque fois, tu es le meilleur des exemples je t'aime.

A toi mamie **FERROUDJA** je sais que tu aurais été super fière de moi en me voyant avec ma tenue de soutenance mais ce n'est pas grave j'espère que la ou tu es est une meilleure place qu'ici bas, repose en paix .

SOMMAIRE

Remerciements

Dédicaces

CHAPITRE I : INTRODUCTION.....	1
CHAPITREII : Généralités.....	2-9
1. AMIBES LIBRES PATHOGENES :.....	2
1.2. <i>ACANTHAMOEBA</i>	2
1.2.1. MORPHOLOGIE.....	3
1.2.2. CLASSIFICATION.....	5
2. PATHOGENICITE.....	5
2.1. KERATITES AMIBIENNES.....	6
2.2. ENCEPHALITE GRANULOMATEUSE AMIBIENNE	7
2.3. CYCLE DE VIE.....	8
2.4 PREVENTION	8
1.3. <i>NEGLERIA FOWLERI</i>	9
CHAPITRE III : MATERIELS ET METHODES	10-17
1. ECHANTILLONNAGE.....	10
2. FILTRATION.....	13
3. CULTURE ET REPIQUAGE.....	14-15
4. IDENTIFICATION MORPHOLOGIQUE.....	15
5. IDENTIFICATION MOLECULAIRE	16-17
CHAPITRE IV : RESULTATS.....	18-29
CHAPITRE V : DISCUSSION	30-32

CHAPITRE VI CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	33-34
CHAPITRE VII : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	35-38
CHAPITRE VIII : ANNEXES	39- 50

Liste des figures

Figure 1. A/ Trophozoïte d'*Acanthamoeba* sous microscope à contraste

Figure 2.B/ Kyste d'*Acanthamoeba* en MET

Figure 3. Kystes d'*Acanthamoeba* représentant les différents groupes morphologiques I (a), II (b) et III (c) en microscope à contraste d'interférence .

Figure 4. infection de l'œil par *acanthamoeba*.

Figure 5. Encéphalite granulomateuse amibienne

Figure 6. Cycle de vie d'*Acanthamoeba spp*

Figure 7. *Naegleria fowleri*: (a) trophozoïte, (b) a flagellate, and (c) a kyste.

Figure 8 : schéma résumant l'échantillonnage

Figure 9 : schéma résumant l'identification morphologique .

Figure 10 : schéma résumant l'identification moléculaire.

Figures 11 et 12 : Représentant la stérilisation.

Figure 13 : Membrane de filtration millipore d'une porosité de 0,45µm.

Figure 14 : (a) Photo de la pompe de filtration et (b) photo de la membrane de filtration.

Figure 15 : Schéma récapitulatif de l'utilisation de la membrane de filtration

Figure 16 : Schéma de la procédure d'ensemencement et photo du Milieu de culture des amibes libres.

Figure 17 . mélange BROMOPHENOL/ ADN.

Figure 18 . Spot du mélange dans les puits de la cuve.

Figure 19 . Tampon de lyse des amibes.

Figure 20 . Protéïnase k et le RNase carrier.

Figure 21 et 22 : histogramme du nombre et du pourcentage de filtre et d'écouvillons recensés par opticiens et ophtalmologue.

Figure 23 . histogramme des types de lentilles par opticiens et ophtalmologues.

Figure 24 . Schéma représentant le résultat de la lecture des boîtes sous Microscope.

Figure 25. gelose nutritive .

Figure 26 . stries d'*Escherichia coli* sur gelose .

Figure 27 . Quadrillage de la cellule thomas .

Figure28. cellule thomas .

Figure29. colorant GIEMSA .

Figure 30. carte géographique des régions échantillonnées.

Figure 31. Plage de kystes d'amibes sous microscope inversé G×40.

Figure 32. Plage de kystes d'amibes dépassant le filtre sous microscope inversé G×40.

Figure 33. Observation des liquides versés directement sur G.N sous microscope inversé G×40

Figure 34. Observation d'écouvillonnages sous microscope inversé G×40.

Figure 35. Kystes d'amibes libres sous microscope optique observé au Gr 40x.

Figure 36. Observation des kystes à double paroi sous microscope optique grossissement 40x après coloration.

Figure 37. bande d'ADN sous fluorescence.

Figure 38 : Distributions des cultures positives de filtre à 30°C en fonction du temps de J1 à J10.

Figure 39 : Distributions des cultures positives de filtre à 37°C en fonction du temps de J1 à J10.

Figure 40: Distributions des cultures positives des écouvillons à 30°C en fonction du temps de J1 à J10.

Figure 41 : Distributions des cultures positives des écouvillons à 37°C en fonction du temps de J1 à J10.

Figure 42 : schéma représentant le résultat de la lecture des boîtes sous Microscope.

Figure 43 : *Acanthamoeba* avec endocyte en forme d'étoile

Figure 44 : (a) kyste à paroi mince , (b) kyste à paroi double et épaisse .

Figure 45 : charge des boîtes à filtre repiquage 1.

Figure 46 : charge des boîtes à écouvillon repiquage 2.

Figure 47 : Résultats des 6 échantillons testés en JDP avec les Ct obtenues.

Figure 48 : Heat map des températures de fusion obtenues pour *Acanthamoeba* spp à partir des isolats des lentilles (de A à K correspond de lent 1 à 11).

Figure 49: Distribution des formes de kystes d'amibes dans les filtres et écouvillons.

Liste des tableaux :

Tableau 1.représentatif des groupes d'espèces d'*Acanthamoeba*..

Tableau2 . types de prélèvement recueillis à Tizi Ouzou

Tableau3 . nombre et type d'échantillons par villes.

Tableau4 . volumes de la préparation TAMPON de Lyse.

Tableau5 . Volumes de la préparation MASTER MIX.

Tableau6 . Composition du mix PCR avec volumes.

Tableau 7. nombre d'échantillons par lieu d'échantillonnage.

Tableau 8 : formes retrouvées par échantillon.

Tableau 9 : Résultats des Ct obtenus aux cours de nos PCR en temps réel

Liste des schémas :

Schéma 1. Résumant l'utilisation de la membrane de filtration

Schéma 2.Milieu de culture des amibes libres

Schéma 3. Résultat de la lecture des boites sous M.I.

Liste des sites web internet :

WEB 1. (<http://www.cdc.gov/parasites/acanthamoeba/biology.html>)

Web 2(<https://www.humeau.com/cellule-de-thoma-simple-18100571114.html>)

Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

AGE : l'encéphalite granulomateuse

ALib : Amibes libres

ANN : agar non nutritive

ATCC: American type culture collection

B

B.H.I.B : Bouillon cœur-cervelle

E

E. Coli : Escherichia coli

EGA : l'encéphalite granulomateuse amibienne

F

FLA: free living amoeba

G

GB : gélose blanche

GN : gélose nutritif

L

LCR : liquide céphalo-rachidien

P

PAM : méningo-encéphalite amibienne primaire

PCR : Polymerase Chain Reaction

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

SNC : système nerveux central

T

TBE : Tris, Borate, EDTA

TE : tris, EDTA

INTRODUCTION

L'environnement renferme une multitude de protozoaires parmi lesquels se trouvent les amibes libres, ainsi nommées parce qu'elles sont capables de vivre de manière autonome, contrairement aux amibes parasitaires qui nécessitent la présence d'un hôte.

Les amibes libres (Free Living Amoeba) sont des protozoaires unicellulaires eucaryotes, omniprésents dans les sols et les habitats aquatiques et qui accomplissent tout leur cycle de vie sans hôte, se nourrissent de bactéries, des champignons et des algues.

Les amibes changent de forme constamment elles sont retrouvées sous deux formes, la forme végétative qui est la forme pathogène ainsi que la forme kystique qui est la forme de résistance. Ces formes apparaissent selon les conditions du milieu où elles existent. (Bory de Saint-Vincent 1822). Elles sont capables de former des kystes (structures à parois multiples) qui résistent à des conditions environnementales défavorables permettant leur dissémination par l'eau, l'air, le vent ou les animaux. Cette structure non active non pathogène offre une grande ténacité. La forme trophozoite qui leur permet à la fois de ramper sur le support et de capturer des proies microscopiques, c'est la forme active et infectieuse.

La prise de conscience de la nocivité de certaines amibes libres tient à la survenue de pathologie très rare notamment oculaire. Parmi la multitude d'espèces existantes, seules quatre espèces amibiennes sont responsables de pathologies humaines. Une de ces espèces est nommée *Acanthamoeba*, est responsable d'encéphalites amibiennes granulomateuses (EGA) et de kératites amibiennes (KA), chez les porteurs de lentilles de contact. Elles peuvent conduire à la mort pour l'EGA, et la cécité pour la KA. Elle représente un réel danger pour la santé publique.

En Algérie nous ne possédons pas de données sur les amibes libres dans le cadre des kératites et des porteurs de lentilles de contact. Le but de notre travail est de déterminer l'ampleur du risque sanitaire liée aux amibes libres dans les liquides de conservation des lentilles de contact de vision ou esthétiques, ainsi que dans les biofilms des boîtiers de lentilles. Pour notre enquête, nous avons fait un échantillonnage chez les ophtalmologues et opticiens de la wilaya de Tizi Ouzou.

Notre travail comporte deux parties. Une première partie théorique relative aux amibes libres et plus particulièrement *Acanthamoeba*. La deuxième partie concerne notre méthodologie, les résultats obtenus que nous analysons et discutons. Et enfin la conclusion de ce travail de recherche original.

GENERALITES

Les amibes libres sont des organismes unicellulaires eucaryotes, de taille comprise entre 10 et 60µm, vivant de façon indépendante. Le mot amibe dérive du grec amoibè qui signifie "changer" car elles changent de forme. Ces microorganismes généralement anaérobiques et non photosynthétiques, sont très répandues dans les différents compartiments de l'environnement ; milieu humide, riche en matières organiques, dans les sols, les milieux aquatiques naturels, artificiels ainsi que dans l'air (Rivera *et al.*, 1987).

1. Les amibes libres pathogènes

Sur la centaine d'espèces d'amibes libres que l'on connaît, *Acanthamoeba* est l'espèce la plus fréquente responsable de pathologie grave ou bénigne pour l'homme ainsi que *Negleria* ; ces deux espèces sont qualifiées d'organismes amphizoïques car ils ont la capacité d'exister à la fois en tant qu'amibes libres et en tant que pathogène, parmi les maladies provoquées par ces deux espèces : la kératite amibienne, l'encéphalite granulomateuse amibienne et la méningo encéphalite amibienne.

2. *Acanthamoeba*

Acanthamoeba est une amibe libre de l'environnement, elle est cosmopolite et se retrouve dans des habitats extrêmement variés incluant la poussière, les sols, l'eau douce et saumâtre, les boues d'épuration, les déchets industriels, les réseaux sanitaires, les systèmes de chauffage, climatiseurs, aquariums, piscines et toute autre source hydrique. Les premiers cas qui ont clairement établi qu'*Acanthamoeba* était l'agent causal de la maladie chez l'homme ont été signalés au début des années 1970 en République de Corée le premier cas suspect de méningo-encéphalite.

Acanthamoeba peut être associée au matériel médical ophtalmologique notamment chez les porteurs de lentilles de contact esthétiques ou de vision y compris chez les personnes ayant des infections oculaires. (Visvesvara & Schuster, 2008). Leur reproduction est asexuée s'effectuant généralement par division binaire (Ramesh *et al.*, 2005) ; (Fritz *et al.*, 2010).

Ayant deux formes l'une kystique (forme inactive) et une forme végétative (forme active) ces microorganismes ne passent pas par le stade flagellé. Les *Acanthamoeba* sont redoutables d'autant plus qu'elles sont capables d'héberger des microorganismes pathogènes pour l'homme telles que *Legionella*, *Mycobacterium*, *Vibrio cholerae*, *Listeria*, *Chlamydia*, ou encore *Helicobacter pylori* (Greub & Raoult, 2004). La nutrition se fait par deux moyens la phagocytose, permet à l'amibe d'ingérer des particules et la pinocytose qui permet aux amibes d'ingérer des liquides ou des éléments nutritifs dissous.

2.1. MORPHOLOGIE

2.1.1. LES TROPHOZOITES

C'est la forme pathogène ou infectieuse qui apparaît lorsque les conditions deviennent favorables. Elles ont une forme ronde d'un diamètre de 14 à 40 μm , ornée de pseudopodes épineux (*acanthopodia*) et présentent un noyau pourvu d'un volumineux nucléole et une vacuole contractile. Le noyau contient un gros nucléole central à coloration dense son cytoplasme est finement granuleux et présente plusieurs mitochondries, ribosomes, une vacuole digestive, et une vacuole contractile (l'expulsion d'eau pour la régulation osmotique). (Schuster and Visvesvara, 2004); (Trabelsi *et al.*, 2012). Les trophozoites des amibes se déplacent par des mouvements amiboïdes provoqués par la déformation de la membrane plasmique (Figure 1).



Figure 1: Photo d'un trophozoïte d'*Acanthamoeba* sous microscope à contraste. (Khan , 2009)

2.1.2. LES KYSTES

Les kystes à double paroi (endocyte et ectocyste), de forme ronde à polygonale ovale ou sphérique, mesurent 10 à 15 μm . Ils présentent des pores qui sont recouverts de bouchons ou opercules convexes-concaves qui sont la jonction de l'ectocyste et de l'endocyste. Ces pores permettant à l'amibe dormante d'émerger et de reprendre la croissance trophique plusieurs années après l'enkystement. La paroi externe est caractérisée par des plis et des ondulations (figure2). Le kyste des *Acanthamoeba* peut avoir plusieurs formes. C'est la forme non pathogène qui peut résister à des conditions extrêmes.

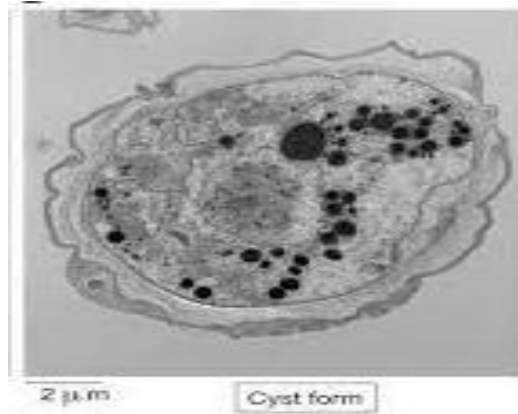


Figure 2:Photo d'un Kyste d'*Acanthamoeba* en MET. (Khan, 2009)

Acanthamoeba est classé en trois groupes en fonction de la taille et de la forme de kyste :

Le group I: se compose d'espèces caractérisées par de gros kyste et trophozoites avec des endocystes et des ectocystes étoilés qui peuvent être lisses ou rugueux. (Figure 3), (tableau 1).

Le group II : l'ectocyste est rugueux et épais, tandis que l'endocyste peut être polygonal, triangulaire, ovale ou arrondi. (Figure 3), (tableau 1).

Le group III : l'ectocyste est mince et ondulé, tandis que l'endocystes est généralement arrondi. (Castrillon and orazco, 2013).(Figure 3), (tableau 1).

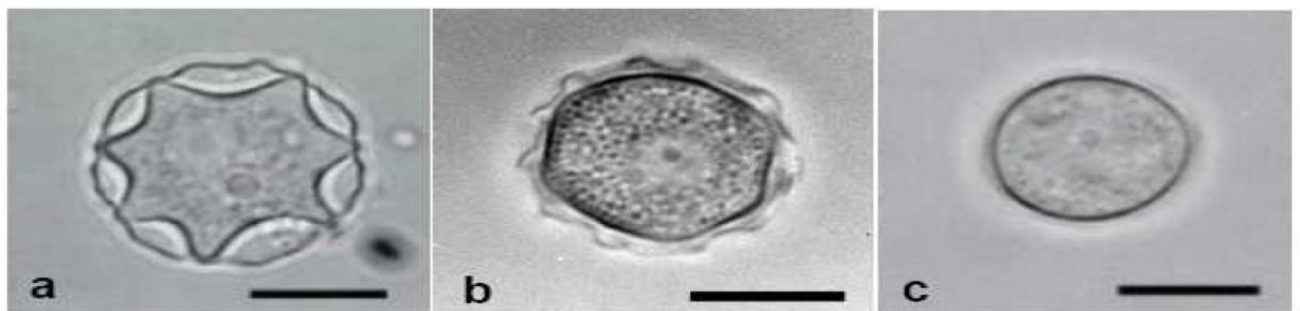


Figure 3 : Kystes d'*Acanthamoeba* représentant les différents groupes morphologiques I (a), II (b) et III (c) en microscope a contraste de phase. (Lorenzoet al., 2015) .

Tableau 1 représentatif des groupes d'espèces d'*Acanthamoeba*.

Group I	Group II	Group III
<i>A. astronyxis</i> T7	<i>A. castellanii</i> T4	<i>A. culbertsoni</i> T10
<i>A. comandoni</i> T9	<i>A. divionensis</i>	<i>A. healyi</i> T12
<i>A. echinulata</i>	<i>A. griffini</i> T3	<i>A. jacobsi</i>
<i>A. pearcei</i> T3	<i>A. hatchetti</i> T11	<i>A. lenticulata</i> T5
<i>A. tubiashi</i> T8	<i>A. lugdunensis</i> T4	<i>A. palestinensis</i> T2
	<i>A. mauritaniensis</i> T4	<i>A. pustulosa</i> T2
	<i>A. polyphaga</i> T4	<i>A. royeba</i> T4
	<i>A. quina</i>	
	<i>A. rhyssodes</i> T4	
	<i>A. stevensoni</i> T11	
	<i>A. triangularis</i> T4	

2.3. Classification des *Acanthamoeba*

EMBRANCHEMENT : EUCARYOTES

PHYLUM : AMOEBOZOA

CLASSE : DISCOSEA

GENRE : ACANTHAMOEBA

2.4. PATHOGENICITE

Le genre *Acanthamoeba* est responsable de kératites amibiennes (KA) de mauvais pronostic et difficiles à traiter si le diagnostic est tardif et les lésions profondes. Ces kératites touchent préférentiellement les porteurs de lentilles. Il est également responsable, ainsi que l'amibe *Balamuthia mandrillaris*, de l'encephalite granulomateuse amibienne (GAE) d'évolution chronique et d'infections disséminées chez les patients immunodéprimés. Le diagnostic de cette pathologie se fait souvent post mortem. D'autres affections telles que des otites, des ulcères cutanés, des myocardites, des pneumonies... peuvent être incriminées à *Acanthamoeba*. Plusieurs facteurs de risque sont associés à ce parasite : le manque d'hygiène (Brennan, 2002), la baignade ou le lavage des yeux avec des lentilles de contact, l'utilisation de chlorure de sodium pour la désinfection et le nettoyage des lentilles de contact, étant donné que les *Acanthamoeba* sont très résistants au chlore, les ablutions, les personnes présentant une infection ou allergie oculaire, les immunodéprimés éventuellement les atteints du SIDA, les personnes âgées... (Radford *et al.*, 1995, 1998) ; (Seal *et al.*, 1999).

2.4.1. Kératite amibienne

La KA à *Acanthamoeba* est une maladie cornéenne douloureuse et grave qui menace la vue et peut même conduire à la cécité (figure4). Elle survient chez des personnes immunodéprimées mais rarement chez les personnes en bonne santé (Visvesvara *et al.*, 2007) ; (Dart *et al.*, 2009). Elle provoque des symptômes différés : sensation de corps étranger, Baisse de l'acuité visuelle, Douleurs oculaire, Rougeur et larmoiement, photophobie, ulcération cornéenne. Initialement, les lésions sont dendritiformes et rappellent celles de la kératite à herpès simplex. On observe ensuite des infiltrats diffus dans le stroma et, quelquefois, une lésion en forme d'anneau caractéristique. Une uvéite antérieure est habituellement aussi présente. Elle peut s'aggraver et évoluer vers l'encéphalite granulomateuse. Le diagnostic est compliqué par l'apparition fréquente d'infections bactériennes secondaires. La KA est signalée pour la première fois aux Etats-Unis (Jager & Stamm, 1972).

2.4.2. Kératite amibienne chez les porteurs de lentilles de contact

Lorsque la lentille est placée sur la cornée, les amibes peuvent s'établir dans la flore conjonctive. Plus tard, elle peut envahir le stroma cornéen à travers l'épithélium, entraînant une infection. Les effets cytopathogènes d'*Acanthamoeba* sur les cellules de l'hôte nécessitent l'adhésion de l'amibe aux cellules de l'hôte la sécrétion de protéases et la phagocytose. L'adhésion est l'une des étapes cruciales de la pathogénicité des amibes, car les amibes non pathogènes présentent une diminution significative de l'adhésion à l'hôte.

Malgré la large distribution environnementale d'*Acanthamoeba* l'incidence de la maladie est relativement faible, ce qui est particulièrement dû à l'insuffisance d'hôtes sensibles, c'est-à-dire d'hôtes qui ne sont pas en mesure de se défendre contre la maladie. Des consommateurs de lentilles de contact et des personnes immuno-compromises, à savoir patients atteints du sida et de diabète. (Niyiyati & Rezaeian, 2015)

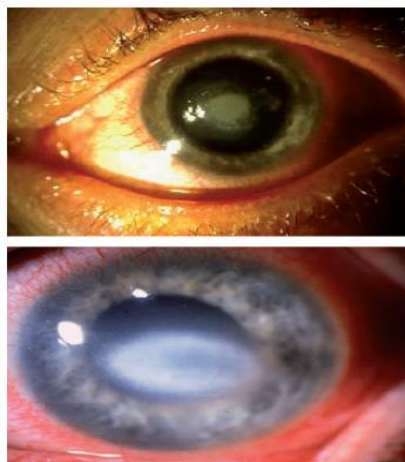


Figure 4. Infection de l'œil par *Acanthamoeba*. (Bouheraoua *et al.*,2014)

2.4.3. Encéphalite granulomateuse amibienne (EGA)

C'est une infection opportuniste, insidieuse et chronique du système nerveux central. Des cas humains ont été signalés en Australie, en Europe, en Afrique, Amérique du Sud et des États-Unis. (Huebner *et al.*, 2011)

C'est une maladie qui présente une mortalité élevée malgré une faible incidence (Visvesvara *et al.*, 2007) ; (Visvesvara et Schuster, 2008) ; (Diaz, 2010).

Un grand nombre de personnes sont exposées, mais les infections sont rares. Une infection apparaît généralement chez les personnes immunodéprimées ou dont l'état de santé est fragile. Les amibes à l'origine de l'encéphalite amibienne granuleumateuse sont *Acanthamoeba* et *Naegleria*. *Balamuthia mandrillaris* peut néanmoins infecter des personnes en bonne santé. Les amibes pénètrent probablement à travers la peau ou les poumons par inhalation de kystes en suspension dans l'air ou bien par la voie oculaire pour les porteurs de lentilles de contact de vision ou même colorées et se propagent au niveau du cerveau par la circulation sanguine pour rejoindre le système nerveux central entraînant des nécroses hémorragiques (figure 5). Les symptômes de l'encéphalite amibienne granuleumateuse apparaissent progressivement : Confusion, maux de tête et convulsions sont fréquemment signalés. Les personnes peuvent présenter une fièvre légère, une vision trouble, des modifications de la personnalité et des problèmes d'élocution, de coordination ou de vision. Une paralysie peut s'installer d'un seul côté du corps ou du visage.

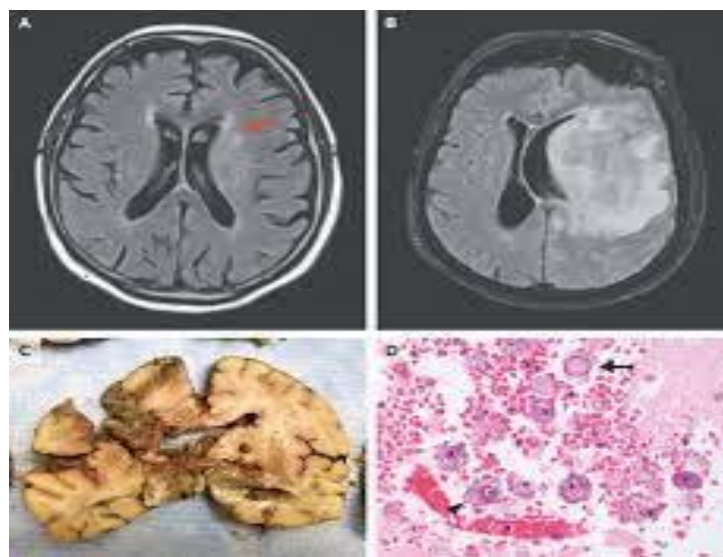


Figure 5 : Photo d'un cerveau après encéphalite granulomateuse amibienne. (a) anomalie du signal non stimulant dans le lobe frontal paramédian gauche sous imagerie par résonance magnétique IRM, (b) deuxième IRM 02 jours plutard révèle une grande lésion du lobe frontal pariétal et temporal avec effet de masse, (c) nécrose léquéfactive décès du patient au bout du 9eme jour, (d) kystes et trophozoites sous microscope. (Ramesh *et al.*, 2005 ; Fritz *et al.*, 2010).

2.5. Cycle de vie d'un kyste d'*Acanthamoeba* après infection

Le cycle de vie de l'*Acanthamoeba* se compose de deux étapes. Un trophozoite reproducteur qui se nourrit activement et un stade de kyste latent avec une activité métabolique minimale (Siddiqui et Khan, 2012 ; Lorenzo *et al.*, 2015). *Acanthamoeba* nécessite une porte d'entrée, oculaire ou cutanée, nasale (figure 6). (SAADNI, 2019-2020).

Après le port de lentille de contact les amibes se retrouvent entre la lentille et l'œil à travers laquelle elles passent vers la voie sanguine pour accéder au système nerveux central après aggravation. (Martinez & Janitschke, 1985).

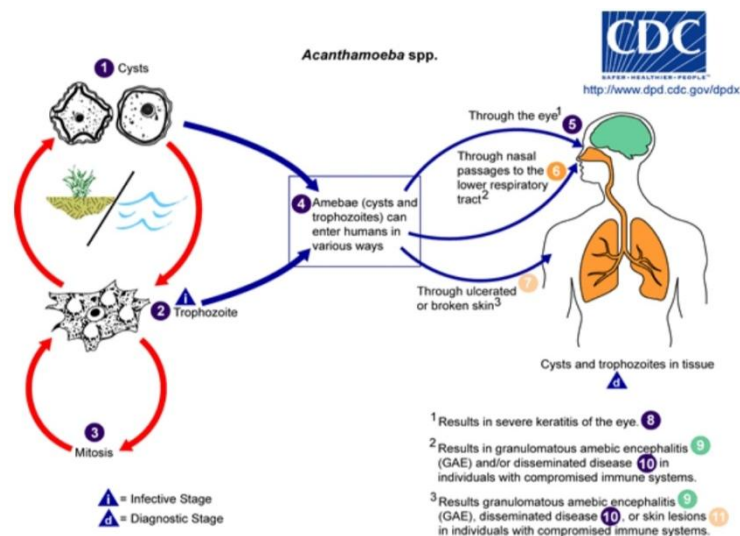


Figure 6 : Cycle de vie d'*Acanthamoeba*. (WEB1)

2.6. Prévention

Pour prévenir la kératite amibienne, les lentilles de contact doivent être nettoyées et stockées selon les recommandations des professionnels de santé et des fabricants. Les mains doivent être soigneusement lavées avant de les manipuler. La solution doit être maintenue fraîche, ne pas être réutilisée. L'eau du robinet ne doit jamais être utilisée pour nettoyer. Les solutions non stériles pour lentilles de contact ne doivent pas être utilisées. Le port de lentilles de contact pendant la baignade ou la douche doit être évité.

3. *Naegleria fowleri*

Naegleria fowleri est une amibo-flagellée, vivant librement et se nourrissant des bactéries. Elle est présente dans des milieux hydriques et bio films, C'est l'agent responsable de la méningo-encéphalite amibienne primitive (MEAP) aiguë, fulminante et mortelle pour l'homme (Butt, 1966) ;(Jonckheere, 2002). Elle est sensible au PH extrême, séchage, et ne peut pas survivre dans l'eau de mer. Elle est trouvée sous deux formes : Forme arrondie (poire) mesurant environ 10 a 25 μm de diamètre ; c'est la forme végétative dite aussi active (figure 6). Dans les Condition défavorables, le trophozoïte s'enkyste (Martinez *et al*, 2016). Une forme sphérique à paroi lisse et un diamètre de 8 a 12 μm . La paroi du kyste est percée d'un ou deux pores plats, obstruée de mucus, a travers lequel le trophozoïte émerge (Martinez *et al*. 2016). C'est la forme inactive (figure 6).La division du noyau s'effectue à l'intérieur de l'enveloppe nucléaire, c'est une promitose. (Vahlkampf, 1905) ; (Jadin, 1972).

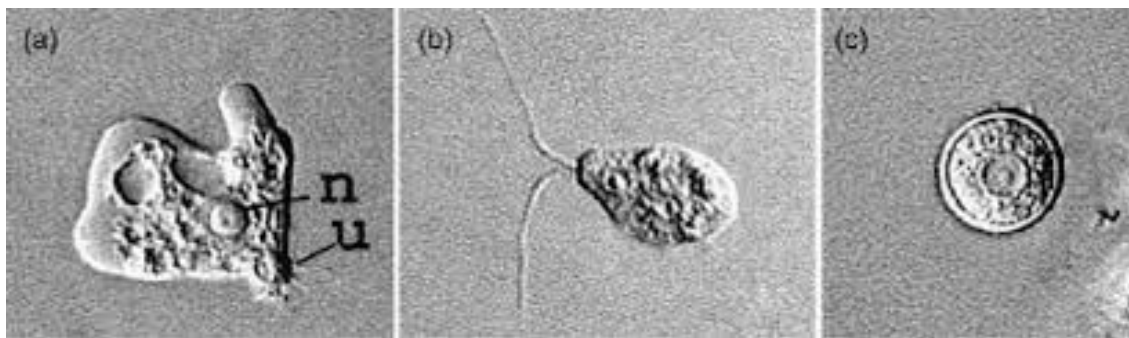


Figure 7:Photo des différentes formes de *Naegleria fowleri*:

(a) trophozoïte, (b) flagelle du trophozoïte, et (c) kyste.(Moura & Schuster, 2007).

MATERIELS & MEHTODES

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire d'éco-épidémiologie parasitaire et du laboratoire de bactériologie traitement des eaux au sein de l'institut pasteur d'Alger à Dely Brahim durant une période s'étalant du 30 janvier 2023 au 30 juin 2023.

Ce travail est une étude prospective qui a pour objectif la recherche et l'identification des amibes libres dans les liquides de conservation des lentilles de contact colorées ou de correction, ainsi que dans les écouvillonnages des biofilms du boîtier de ces dernières.

1. MATERIEL

1.1. ECHANTIIONNAGE

Afin de réaliser cette étude sur les amibes libres nous avons sollicité 30 cabinets d'ophtalmologie et d'optométrie soit 19 ophtalmologistes et 11 opticiens qui nous ont aidé à récolter 31 échantillons durant cette période de stage (tableau 1). Nous avons récolté un total de 19 prélèvements chez les opticiens, et 12 chez ophtalmologistes à différents endroits au niveau de la wilaya de Tizi-Ouzou (tableau 2, figure 8).

Au niveau de la ville de Tizi-Ouzou, nous avons réuni 24 échantillons, 03 à Azazga, 02 à Mekla, 01 à Freha, 01 à Ouaguenoun (tableau 3), (figure 30). Parmi ces prélèvements, nous avons 31 échantillons de solutions de rinçage et 22 écouvillons après raclage du biofilm des étuis de lentilles. Parmi les types de lentilles, nous avons 01 Lentille colorée et 30 lentilles de correction. Ces prélèvements ont été transportés au niveau du laboratoire sans dépasser les 24 h qui suivent.

Tableau 2 : Types de prélèvement recueillis à Tizi Ouzou au cours de notre enquête.

Lieu du prélèvement	Type de prélèvement	Nombre de prélèvement
Cabinets d'ophtalmologie 19	Filtres	13
	Ecouvillons	09
Opticiens 11	Filtres	18
	Ecouvillons	14

Tableau 3 : Nombre et type d'échantillons collectés par villes.

Ville d'échantillonnage	Nombre d'échantillons	Type d'échantillons	Type de lentilles
Tizi ousou	24	Filtre /Ecouv	Colorée /de vision
Azazga	03	Filtre /Ecouv	De vision
Mekla	02	Filtre /Ecouv	De vision
Freha	01	Filtre /Ecouv	De vision
Ouaguenoun	01	Filtre/Ecouv	De vision

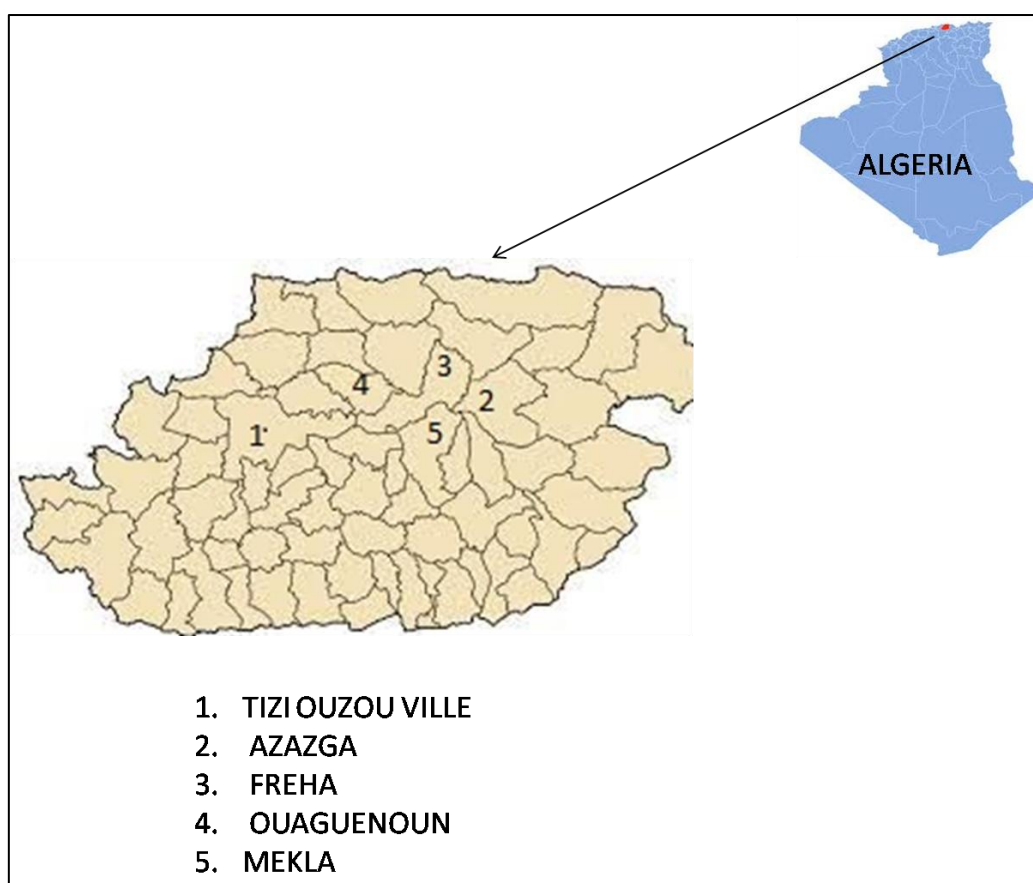


Figure 30 : carte géographique des régions de TIZI OUZOU échantillonnées.

2. METHODES

Des prélèvements contenant la solution de rinçage des lentilles (avant et après usage) ont été récupérés dans des flacons stériles en verre ainsi que des écouvillons après raclage du biofilm des étuis chez des opticiens et cabinets d'ophtalmologistes se situant au niveau de la wilaya de Tizi-Ouzou.(Annexe 9)

Ces échantillons ont été transportés par la suite au laboratoire du traitement des eaux pour les filtrer et leur incubation, puis au laboratoire d'éco-épidémiologie parasitaire pour être mis en culture a des différentes températures. Les cultures positives ont été traitées par multiples méthodes pour les identifications morphologiques (figure9) et moléculaires (figure 10) qui résume les étapes de notre méthode.

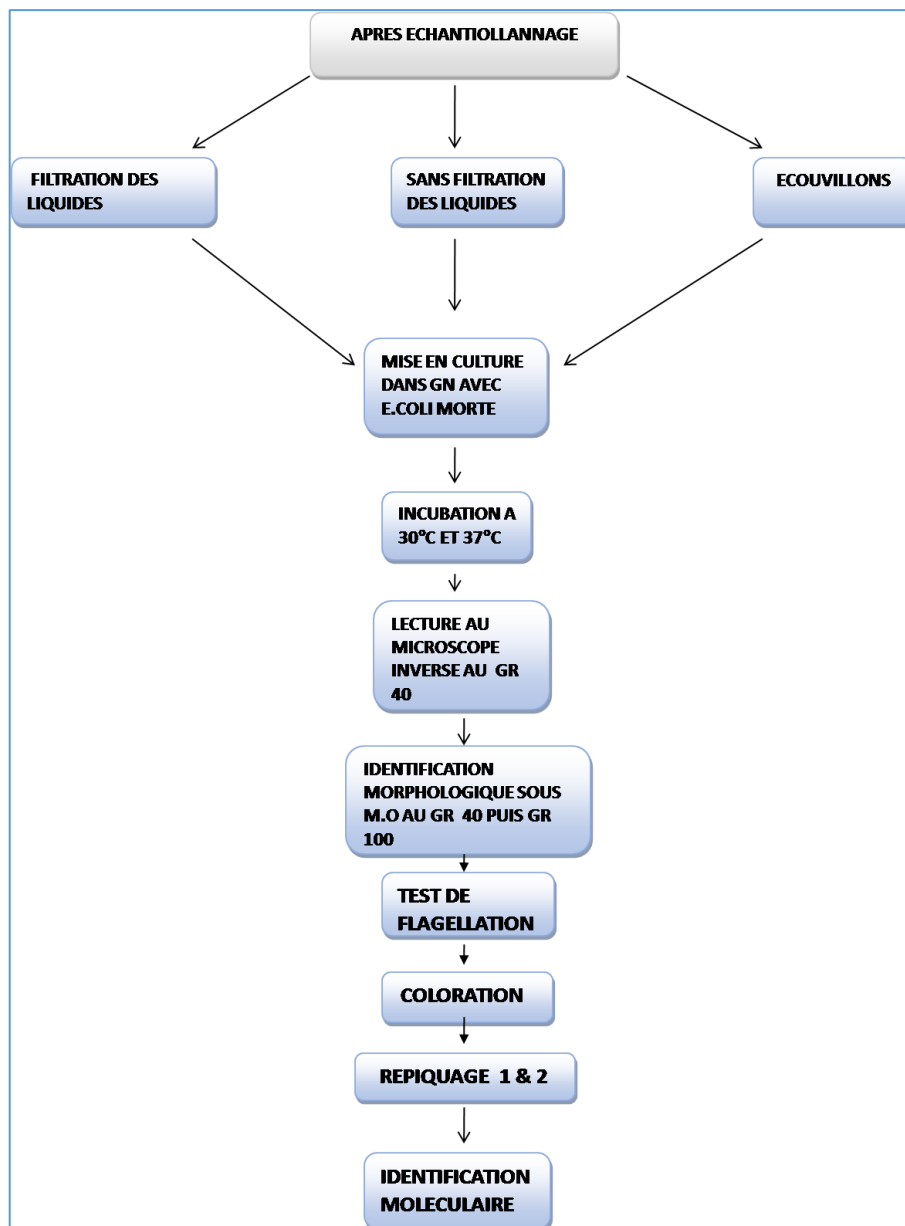


Figure 9: Schéma récapitulatif de la méthodologie

2.1. FILTRATION

Dans cette étape deux méthodes ont été testées pour isoler les amibes à partir des liquides de lentilles de contact : une avec filtration et une seconde sans filtration. Notre objectif était de comparer les résultats des échantillons et voir quelle technique donne un meilleur rendement ; certaines solutions ont été filtrées avant la mise en culture, alors que d'autres ont été directement versé sur le milieu de culture. Des volumes différents de 5, 8, 9, 10, 20ml d'échantillons ont été filtré a l'aide d'une membrane placée sur une rompe de filtration s'ouvrant et se fermant avec des robinets liés eux a une pompe à vide qui aspire le filtrat. Le processus comporte plusieurs étapes (figure 11, 12, 13, 14.)

La stérilisation : on verse de l'alcool sur les postes de filtration à utiliser qu'on flambe à l'aide d'un bec benzène à flamme bleue et on laisse agir, on répète l'opération deux à trois fois jusqu'à ce que la rampe soit bien stérile.

Le refroidissement : on place des entonnoirs stériles sur les rampes puis on verse de l'eau distillé par-dessus pour les refroidir.

La membrane : on enlève les entonnoirs on place une membrane de $0.45\mu\text{m}$ de porosité sur le site de filtration. Puis filtre les liquides récupérés chaque un dans un site à part.

2.1.1. Avec filtration

Une filtration sur membrane est un procédé de séparation physique se déroulant en phase liquide. Le but est de purifier, fractionner ou concentrer des espèces dissoutes ou en suspension dans un solvant au travers d'une membrane d'une porosité de $0,45\mu\text{m}$. Cette opération s'est déroulée au laboratoire des eaux au service bactériologie de l'IPA 24h après la collecte de nos échantillons (annexe 1). Les filtres sont récupérés grâce à une pince stérile ; coupés en 4 dans une boîte pétri à l'aide des ciseaux stérilisés ; et mis en culture 2 filtres dans chaque boîte.(figure 15).

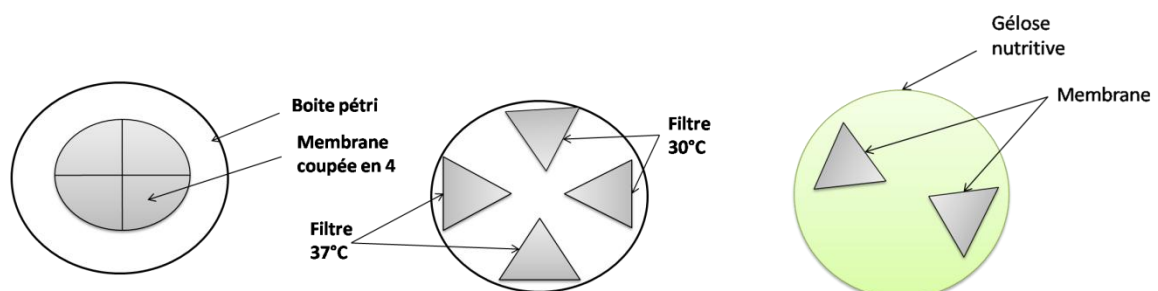


Figure 15 : Schéma récapitulatif de l'utilisation de la membrane de filtration.

2.1.2. Sans filtration

Dans cette étape, les échantillons sont directement versés sur le milieu de culture 24h après la collecte. Près d'un bec benzène on verse les volumes récupérés puis à l'aide d'une pipette pasteur on forme un râteau avec lequel on étale la solution sur l'ensemble de la boîte jusqu'à épuisement.

2.1.3. Ecouvillonnage

A l'aide des écouvillons, on racle généreusement le biofilm des étuis des lentilles et les imbibe de la solution présente à l'intérieur. Une fois raclé, on ajoute 1ml d'eau physiologique dans le tube porteur d'écouvillon ce qui permet de garder en vie les amibes ainsi qu'éviter l'assèchement de l'échantillon. Une fois au laboratoire on réalise des stries du haut jusqu'au bas de la boîte sans trop les serer.

2.2. ISOLEMENT DES AMIBES LIBRES ET CULTURE

Dans le cas des amibes libres qui ne sont pas trop exigeants la culture se fait sur gélose nutritive (GN). Elle peut être **directe** : mise en culture des solutions de lentilles directement sur milieu préparé, ou bien **après filtration** : mise en culture des solutions après les avoir filtré. (annexe 1)

Le milieu de culture doit être préparé auparavant et conservé Annexe (2).

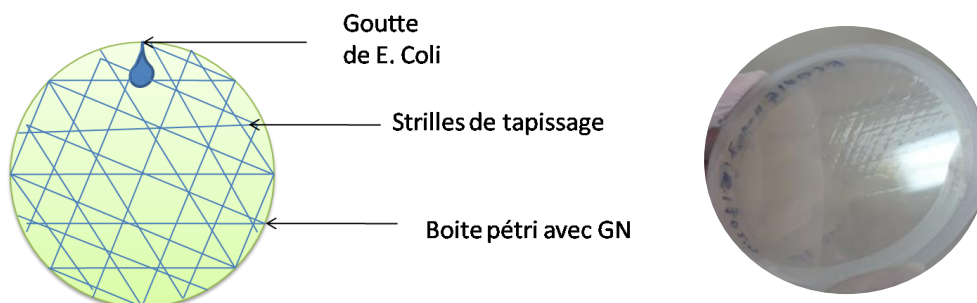


Figure 16 : Schéma de la procédure d'ensemencement et photo du Milieu de culture des amibes libres.

2.3. INCUBATION

Les prélèvements sont versés et déposés respectivement dans les boîtes portant déjà le nom du prélèvement, la date et la température d'incubation. Tous les échantillons filtrés, sans filtre, ou écouvillons doivent être incubés aux deux températures ; chaque prélèvement doit contenir une boîte cultivée à 30°C une autre à 37°C sur une période de 20 jours.

2.4. LECTURE SOUS MICROSCOPE INVERSE

La lecture se fait sous microscope inversé tous les deux à trois jours pendant 20 jours pour suivre l'évolution de la culture et évaluer la présence des kystes d'amibes au grossissement $\times 200$ et $\times 400$ en balayant tout le long des angles (figure 17) de la membrane découpée, tout le long de la boîte concernant les sans filtres et écouvillons .

2.5. REPIQUAGE

C'est une action de prélever une partie d'une culture puis, la transplanter sur un milieu neuf ou elle continue à croître. Son but est d'isoler les kystes et éliminer les levures et champignons ou tout autre germe qui peuvent être source d'une contamination. Le nombre de repiquage peut varier d'un échantillon à un autre tout dépend de la charge de la boîte en kyste ainsi que les contaminations.

Les prélèvements chargés en kyste et n'ayant pas de contamination n'ont pas besoin d'être repiqué. Dans ce cas 2 grattages ont été réalisés un premier et un deuxième repiquage pour chaque une des boîtes incubées à 30 et à 37°C. Pour les boîtes contenant des filtres, on gratte les angles internes, pour les boîtes des solutions et d'écouvillonnage on gratte toute la surface. Le grattage des boîtes s'est fait en utilisant deux méthodes le grattage à l'aide d'un râteau et le grattage à l'aide d'une lame tout en y ajoutant quelques gouttes d'eau physiologique. La même méthode d'observation sous microscope inversé que les boîtes mères a été utilisée.

2.6. IDENTIFICATION MORPHOLOGIQUE

2.6.1. Lecture sous microscope optique

Tous les prélèvements filtres, biofilms, solutions originales, repiqués ont été observés et identifiés en se référant aux clés d'identification (GARCIA *al.*, 2013). Près d'un bec on verse quelques gouttes d'eau physiologique et racle toute la surface des boîtes délicatement à l'aide d'une lame de manière à récupérer le maximum d'amibes sans trop percer la gélose. Avec une pipette pasteur on prélève le liquide raclé dépose une goutte entre lame et lamelle qu'on observe sous microscope optique sous grossissement $\times 400$ puis $\times 1000$ avec une goutte d'huile à immersion.

2.6.2. Identification

Les prélèvements ayant des kystes sont positifs, ceux n'ayant pas de kyste sont négatifs. Les formes kystiques trouvées diffèrent d'une boîte à une autre.

2.6.3. Test de flagellation

Cette étape est réalisée après la lecture dans le cas où il y a présence de kyste pour leur permettre de se transformer en forme végétative et pouvoir observer ainsi les flagelles pour le type *Naegleria* et pseudopodes pour les autres types d'amibes. Pour cela, il faut verser 5 ml d'eau distillé sur GN, racler et récupérer ensuite dans un tube à essai afin de récolter les FLA puis incuber à 37°C pendant 10 min deux fois puis 30 min respectivement. A chaque fin d'incubation, on prélève une goutte de la suspension et

observe sous microscope optique Gr×400 pour suivre l'évolution et la transformation des kystes en forme trophozoïtes.

2.6.4. Coloration

Préparer une solution de 1ml du colorant MAY GRUNWALD GIEMSA mélangé à 9ml d'eau de robinet qu'on filtre. Fixer entre temps les lames observées sous M.O avec de l'alcool et laisser sécher sur un porte lame. Verser délicatement la solution de coloration au milieu de la lame où la goutte d'échantillon a été posé. Laisser colorer 30 min. Rincer les étalements goutte à goutte avec de l'eau du robinet puis sécher à l'air libre pendant 24h.

2.7. IDENTIFICATION MOLECULAIRE

2.7.1. Récolte des amibes libres des milieux de cultures

Pour réaliser cette étape plusieurs procédures sont faites. On commence par racler la gélose de l'ensemble des boîtes avec une lame et de l'eau physiologique. Récupérer le mélange dans un tube conique et centrifuger à 25 °C à 5500 tours pendant 15 minutes. Mettre le culot dans des microtubes de 1,5 ml et le surnageant dans des tubes à vis pour les conserver à -4°C. Un dénombrement a été réalisé à l'aide d'une cellule Thomas (Annexe 3).

2.7.2. Extraction de l'ADN

Cette opération commence par un choc thermique qui nous permet de casser la paroi des amibes pour isoler leur ADN. Placer les microtubes des culots récoltés dans de l'azote liquide à -196°C pendant 1min puis dans un bain sec à 55°C pendant 2min faire un cycle de 5 fois laissé over night à 55°C. Pour la lyse des parasites : 200 µl tampon lyse ont été additionnés de 20 µL de protéinase K, et mélangé dans un tube conique (tableau 4 annexe 4). La précipitation et lavage ont été faits selon la procédure du kit d'extraction Omega®. (Annexe 4)

2.7.3. Analyse qualitative de l'ADN

Dans une éprouvette mélanger 10ml de TBE avec 90 ml d'eau distillé pour obtenir un volume de 100ml auquel sera rajouté 0.8g d'agarose. La solution a ensuite été mise dans micro-onde pendant 1min en faisant des pauses toutes les 30 secondes pour remuer le mélange et éviter de le déborder ou brûler, 6 µl de BET ont été rajoutés à la solution après refroidissement. Verser dans la cuve de l'électrophorèse après avoir placé les pinces puis laisser le tout solidifier.

Sur une feuille d'aluminium on place un volume 2.5µL de bleu de bromophenol auquel on rajoute un volume de 5µl d'ADN qu'on mélange pour spotter ensuite dans les puits de la cuve, brancher au générateur réglé à 85 Volt pendant 30 min (figure 17 et 18).

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

2.7.4. LA PCR en temps réel

Nous avons ciblé au cours de nos PCR *Acanthamoeba* dans un premier temps, puis *Naegleria*. Un mix PCR des amorces sens et antisens a été préparé avec des volumes et concentration précise. Nous avons utilisé un **MASTER MIXSYBR GREEN** qui contient la Taq polymérase et les dNTP, ainsi qu'un colorant qui se lie à chaque nouvelle copie d'ADN double brin (Annexe 6). Au fur et à mesure que la PCR progresse, d'autres amplicons sont créés. Le colorant SYBR Green I se lie à tous les ADN double brin, l'intensité de fluorescence augmente proportionnellement à la quantité de produits de PCR générés. Elle est mesurée en temps réel. Nous avons testé 11 de nos échantillons (figure 19 et figure 20).

3. 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.

RESULTATS

Afin de rechercher et identifier les amibes libres présentes dans les liquides de rinçage des lentilles de contact dans la wilaya de Tizi Ouzou, nous avons effectué 31 prélèvements de solutions et d'écouvillonnages qui ont été traité au niveau du laboratoire d'éco-épidémiologie parasitaire et d'analyse des eaux 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 spécialement les *Acanthamoeba*. Pour cela nous avons sollicité (30) cabinets soit (19) ophtalmologistes et (11) opticiens qui nous ont aidé a récolter ces prélèvements durant cette période de stage de 7 mois. Au total, nous avons collecté (19) prélèvements chez les opticiens dont (19) sont des liquides,(13) des écouvillons ; (12) échantillons chez ophtalmologistes dont (12)sont des liquides et (09) des écouvillons à différents endroits de la wilaya de Tizi-Ouzou dont Tizi Ouzou ville ,Azazga, Freha, Mekla, Ouaguenoun.

1. Résultats de l'échantillonnage

Les résultats des cultures positives en fonction du type et de l'origine du prélèvement, ont montré que la majorité des prélèvements provenaient des cabinets d'opticiens avec 18 solutions de rinçage soit 54.83% des liquides et 14 écouvillonnages du biofilm des boitiers de lentilles (figure21) soit 60.86%comparé 13 liquides de rinçage soit 41.93 %et 09 écouvillons soit 39.13 %chez les ophtalmologues (figure22).

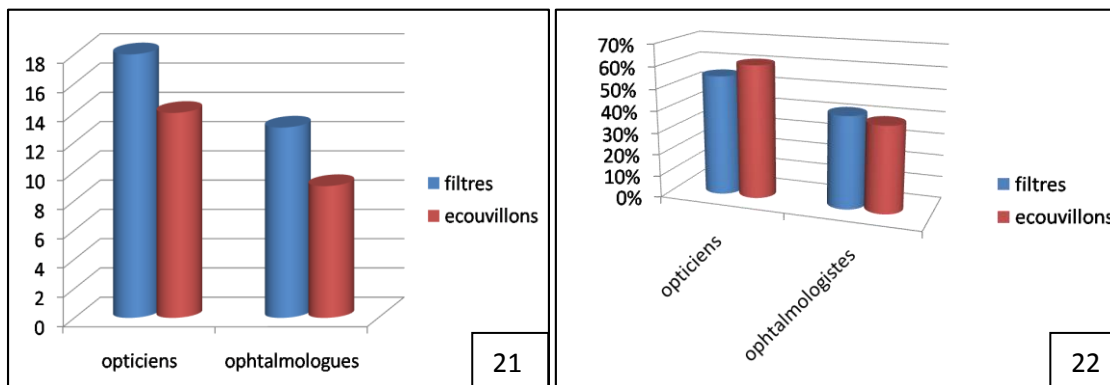


Figure 21 et 22 : Histogramme du nombre et du pourcentage de filtre et d'écouvillons récoltés chez les opticiens et ophtalmologues.

Le nombre et le type de lentilles lui aussi diffèrent entre les opticiens et les ophtalmologistes.

Pour les lentilles de visions, on a pu avoir 13 chez les ophtalmologues dont 09 sont en silicone, 3 hydrogels, 1 torique comparé à 18 chez les opticiens 16 de vision, 2 colorées dont 16 en silicone, 1 hydrogel, et 1 torique (figure 23).

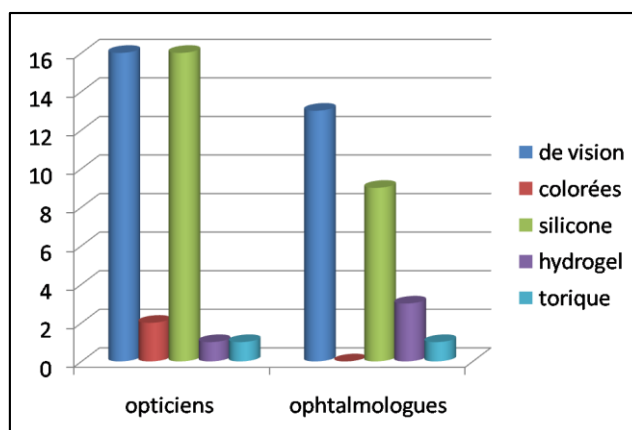


Figure 23 : Histogramme des types de lentilles par opticiens et ophtalmologues.

2. Résultat des lectures sous microscope inversé :

Après une observation des boîtes tous les 2 jours sur une période de 20 jours nous avons pu suivre l'évolution des kystes/ plages d'amibes dans les deux températures 30 et 37°C.

Les formes kystiques sont aperçues dès les 4 et 5 jours d'incubation pour les deux conditions de température utilisées à savoir 30°C et 37°C pour les boîtes contenant des filtres ou des liquides versés directement sur milieu de culture (figure 42). Cependant, pour les écouvillons, l'apparition des kystes commence du 4 ou 5^{ème} jour pour les boîtes incubées à 30°C ainsi que 7 et 8^{ème} jour pour les boîtes incubées à 37°C. Dès le troisième jour, on observe la formation des plages de couleur brune avançant de l'angle du filtre vers le milieu de la boîte tandis qu'elles sont éparpillées partout dans la boîte pour les prélèvements sans filtre et écouvillons. La durée de la formation des plages et leurs tailles nous informent sur la charge des kystes amibiens. Plus on a des grandes plages brunâtres en une période de temps courte plus la charge en kystes sera importante et vice-versa. La quantité amibienne diffère d'une boîte à l'autre selon le volume de l'échantillon, le type de l'échantillon, la température d'incubation, ainsi que la durée d'incubation.

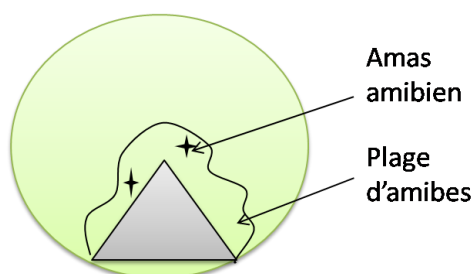


Figure 42 : schéma représentant le résultat de la lecture des boîtes sous Microscope

Les plages d'amibes sont apparues sur l'ensemble du filtre mais encore plus sur l'angle du milieu pour toutes les boîtes (figure 31), (figure 32); des amas éparpillés de kystes d'amibes sont notamment apparus sur toute la boîte pour les bio films et liquides versés directement sur milieux de culture (figure 33 et 34)

Filtre à 30°C

Une analyse statistique par ANOVA à 1 facteur sur la cinétique de croissance jusqu'au 10^{ème} jour pour les cultures des filtres incubés à 30°C. L'analyse a montré qu'il y avait une différence fortement significative $p < 0,0001$ (****).

Le post test de Tukey qui a comparé les séries de données a montré qu'il n'y avait pas de différence entre J4 et J5, J6 et J7, et J8 et J9 (figure 38).

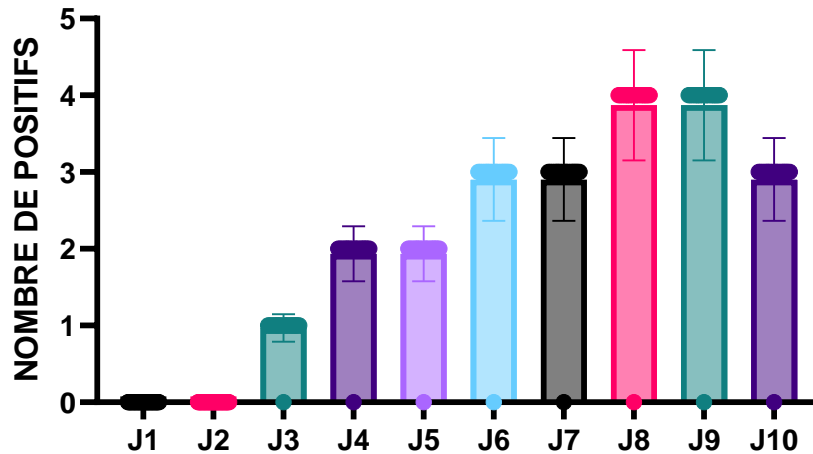


Figure 38 : Distributions des cultures positives de **filtre à 30°C** en fonction du temps de J1 à J10.

Filtre à 37°C

Une analyse statistique par ANOVA à 1 facteur sur la cinétique de croissance jusqu'au 10^{ème} jour a été réalisé pour les filtres incubés à 37°C. L'analyse a montré qu'il y avait une différence fortement significative $p < 0,0001$ (****).

Le post test de Tukey qui a comparé les séries de données a montré qu'il n'y avait pas de différence entre J3 et J4, J5 et J6, J7 et J8 (figure 39).

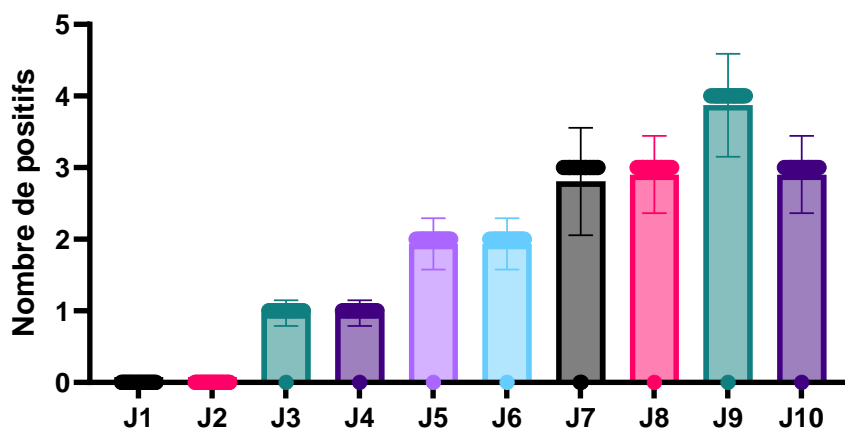


Figure 39 : Distributions des cultures positives de **filtre à 37°C** en fonction du temps de J1 à J10.

Écouvillon à 30°C

Pour les cultures d'écouvillons à 30°C, l'analyse statistique par ANOVA à 1 facteur de la cinétique de croissance jusqu'au 10^{ème} jour a montré qu'il y avait une différence fortement significative $p < 0,0001$ (****).

Le post test de Tukey qui a comparé les séries de données a montré qu'il n'y avait pas de différence entre J3 et J4, J5 et J6, et J8, J9 (figure 40).

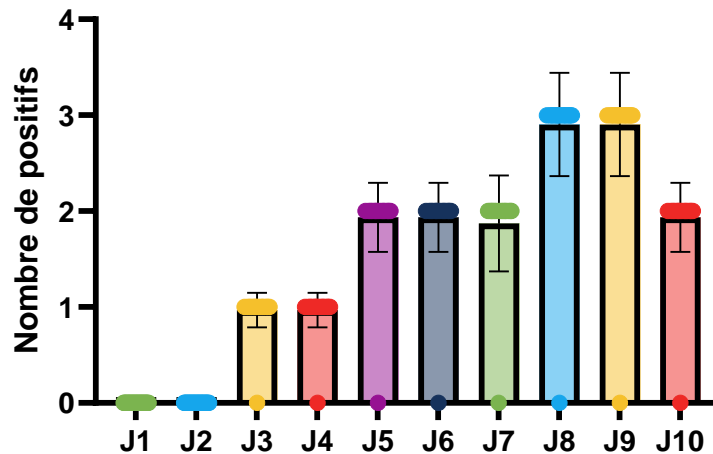


Figure 40: Distributions des cultures positives des écouvillons à 30°C en fonction du temps de J1 à J10.

Écouvillon à 37°C

L'analyse statistique par ANOVA à 1 facteur sur la cinétique de croissance jusqu'au 10^{ème} jour pour les écouvillons incubés à 37°C a montré qu'il y avait une différence fortement significative $p < 0,0001$ (****) aussi.

Le post test de Tukey qui a comparé les séries de données a montré qu'il n'y avait pas de différence entre J3 et J4, J5 et J6, J8 et J9 (figure 41).

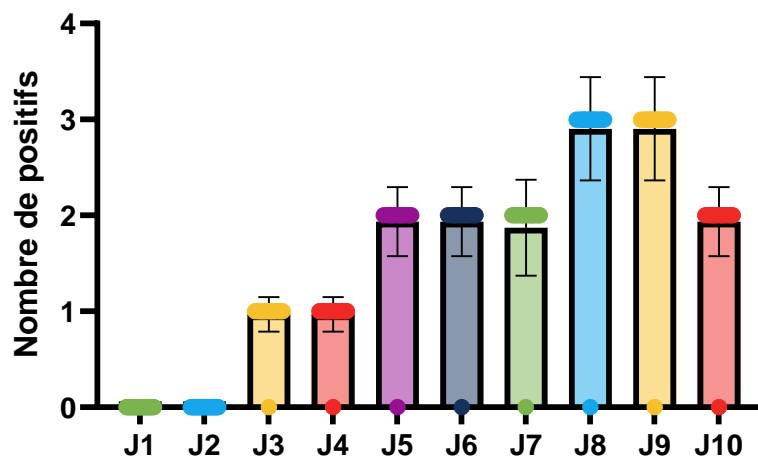


Figure 41 : Distributions des cultures positives des écouvillons à 37°C en fonction du temps de J1 à J10.

3. Résultats de lecture sous microscope optique

Les cultures ambiennes sont identifiées au microscope à l'aide de leurs caractéristiques morphologiques de leurs kystes et trophozoïtes en utilisant la taxonomie de Page (Garcia *al.*, 2013).

Une partie de gélose qui contient les kystes des amibes libres a été raclé et déposé sur une lame avec une goutte d'eau distillé et a été recouverte d'une lamelle et observée sous microscope optique e à grossissement 40x et 100x. L'observation a été réalisée pour tous les prélèvements des filtres et biofilms liquides et repiquages en se référant aux clés d'identification.

Les observations au microscope des boites incubé à 30°C ont montré différentes formes de kystes ronds à paroi épaisse (figure 35) et dense ainsi que des amibes libres a paroi mince regroupés en amas ou séparés Des kyste bourgeonnants et des formes en étoiles sont notamment observés. (figure 43 et 44).

Les autres cultures à température 37°C ont permis l'observation des amibes libres séparés en petite quantités. Les boites n'ont donné des résultats morphologiques qu'à partir du 7^{ème} et 8^{ème} jour d'incubation pour les boites de 37°C.

Les observations ont permis d'identifier les kystes d'*Acanthamoeba* à cause de sa double paroi avec un pourcentage de 100% qui est donc la totalité des boites. Nous avons réalisé une identification morphologique pour 31 échantillons (de AMBO 1 jusqu'à AMBO 31) pour toutes les boites incubées à 30°C et à 37°C.

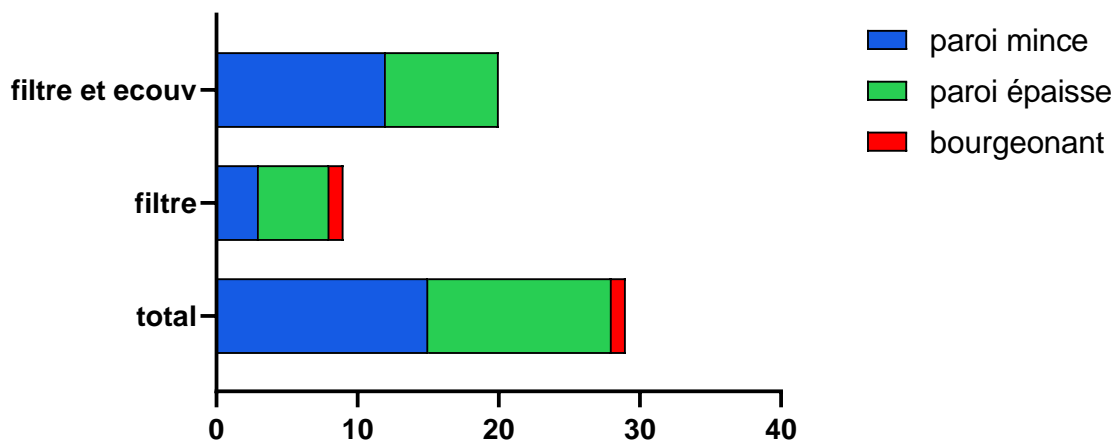


Figure 49: Distribution des formes de kystes d'amibes dans les filtres et écouvillons.

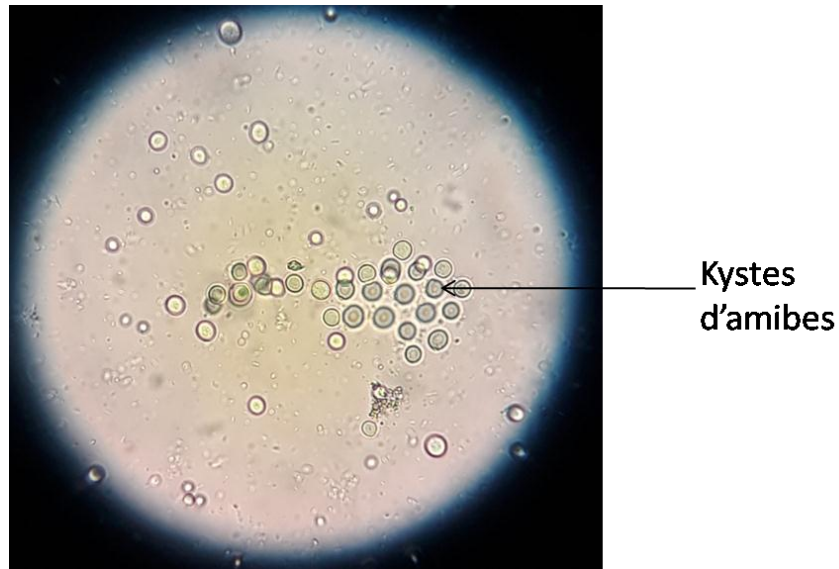


Figure 35 : Kystes d'amibes libres sous microscope optique observé au Grx400 (Originale)

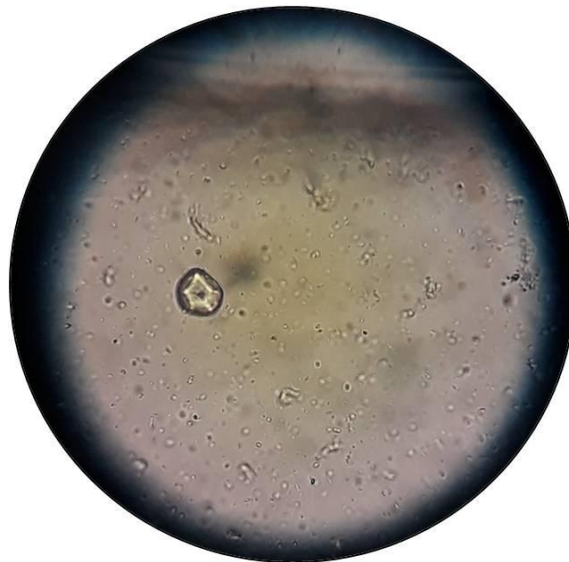


Figure 43 : *Acanthamoeba* avec endocyste en forme d'étoile. (Originale)

4. Résultats du test de flagellation

Le contrôle sous microscopea donné les résultats suivants :

Après 10 min à 37 °C : aucun changement, formes kystiques bien rondes paroi bien définie. Après 10min supplémentaires à 37°C : aucun changement formes kystiques bien rondes paroi bien définie. Après 30 min à 37°C : aucun changement. Après une heure à 60°C : bourgeonnement des kystes paroi ondulée.

Le test de flagellation nous a permis de voir le debut de formation des pseudopodes.

A défaut de temps Le test n'a pas été réalisé pour 26 échantillons, il a été réalisé uniquement pour 5 échantillons (AMBO 1, AMBO2, AMBO 3, AMBO 6, AMBO8).

Figure 31.Plage de kystes d'amibes sous microscope inversé G×40. (Originale)

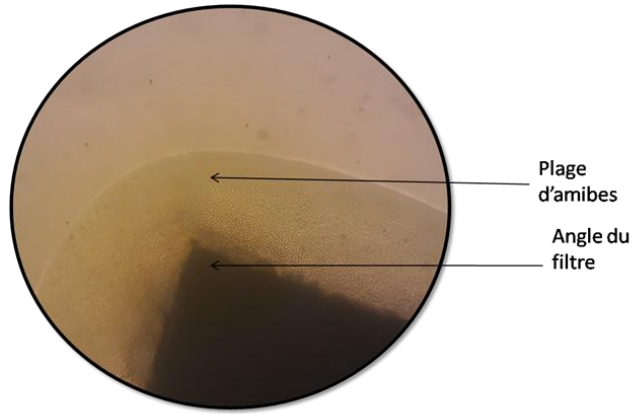


Figure 32 : Plage de kystes d'amibes dépassant le filtre sous microscope inversé G×40. (Originale)

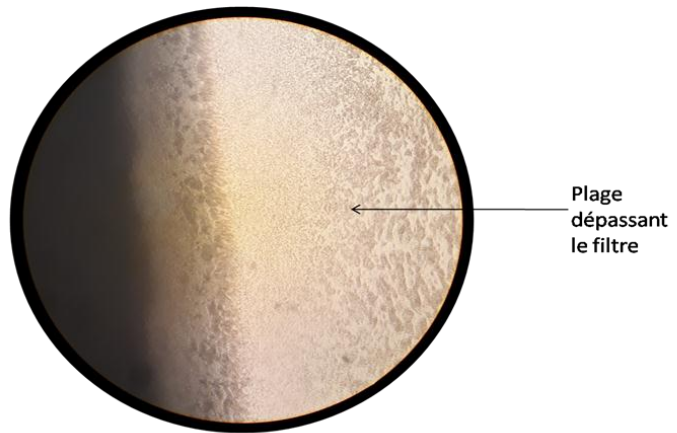


Figure 33 : Observation des liquides versés directement sur G.N sous microscope inversé G×40. (Originale)

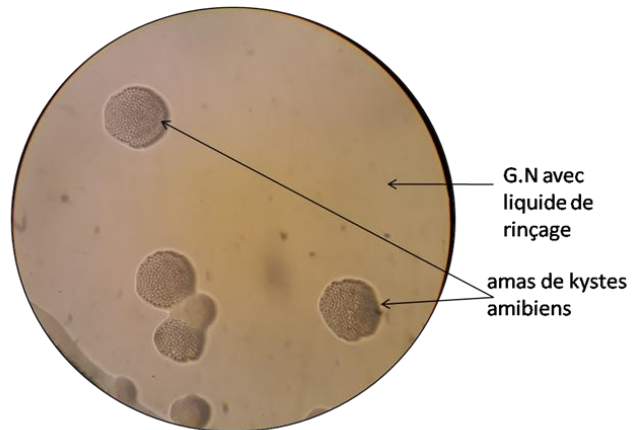
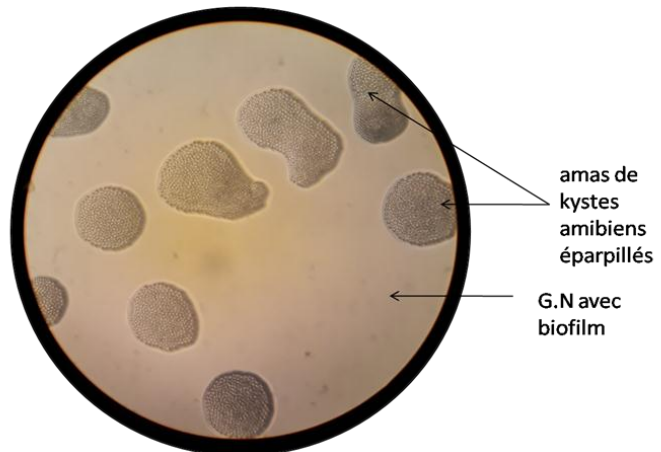


Figure 34 : Observation d'écouvillonnage sous microscope inversé G×40. (Originale)



5. Résultats de la Coloration Giesma

Nos résultats ont montré que c'est une bonne coloration pour les amibes libres. La coloration 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 (figure 36). Elle a été réalisée pour 5 cinq de nos échantillons observés sous microscope (AMBO1, AMBO2, AMBO 3, AMBO6, AMBO 8) qui sont tous des cultures à filtre et à qui on a déjà réalisé un test de flagellations. .

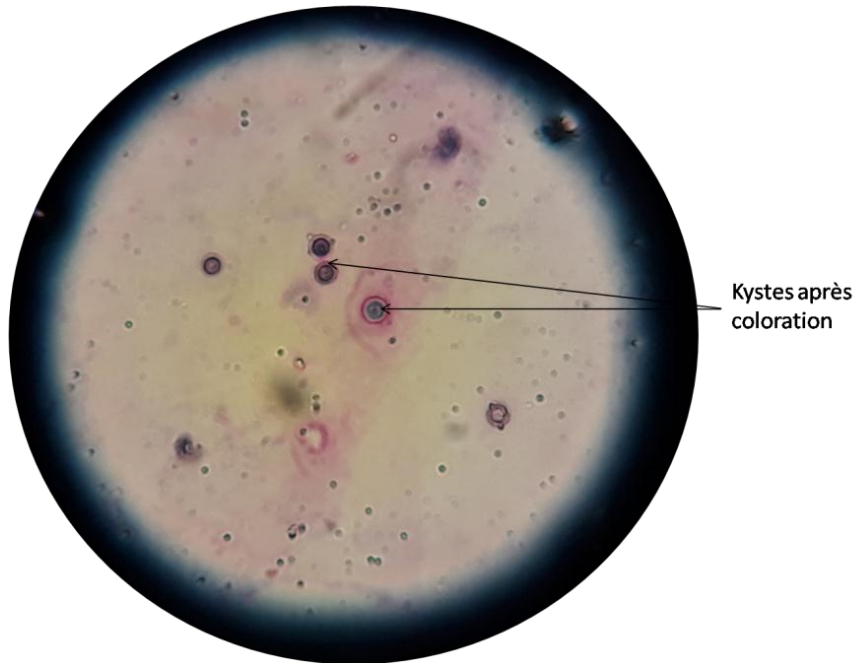


Figure 36 : Observation des kystes à double paroi sous microscope optique au grossissement 40x après coloration. (originale)

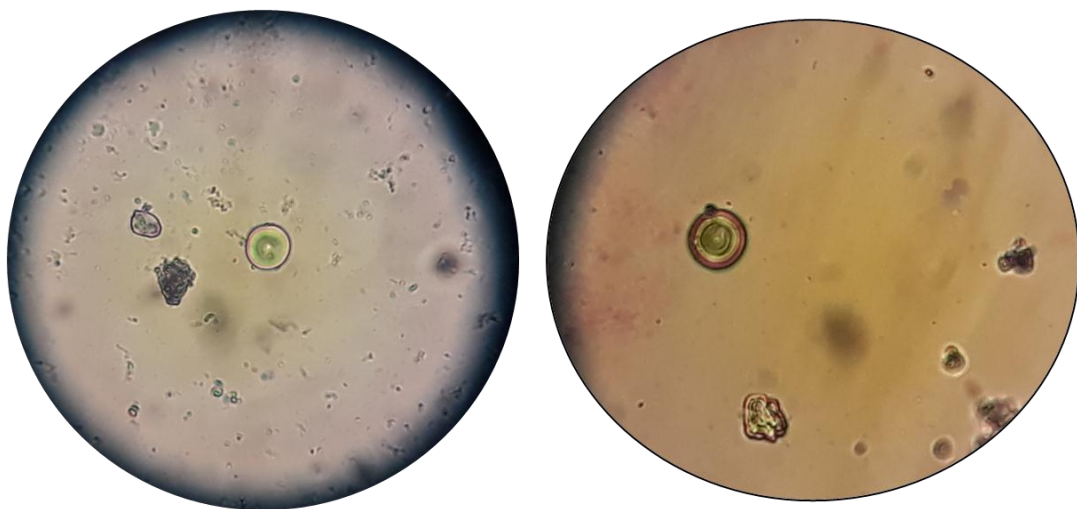


Figure 44 : (a) kyste à paroi mince , (b) kyste à paroi double et épaisse . (Originale)

5. Résultat des repiquages :

Le repiquage des boites a été effectué dans le but d'isoler les amibes et diminuer les contaminations pour améliorer leur rendement et charge.

Un premier repiquage a été réalisé pour des boites incubées à 30 et 37°C. Nous avons remarqué que la charge d'amibe dans les boites à filtre et solutions a augmenté, pendant que celle des écouvillons a diminué. Le deuxième repiquage n'a été réalisé que pour les boites incubées à 30°C. La charge des amibes a diminué dans le deuxième repiquage.

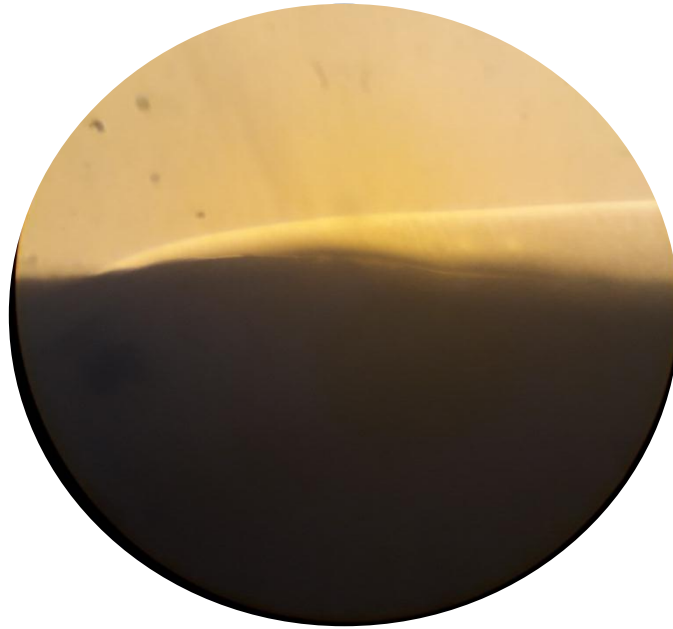


Figure 45 : charge des boites à filtre repiquage 1.
(Originale)



Figure 46 : charge des boites à écouvillon repiquage 2.
(Originale)

6. Résultat de l'identification moléculaire

Pour les 11 échantillons étudiés le gel a permis d'obtenir des bandes fluorescentes foncé et claires correspondant aux charges en ADN (figures 37). Nos extraits ne présentaient pas de trainés, ce qui indique une absence de contamination par les protéines et ARN.

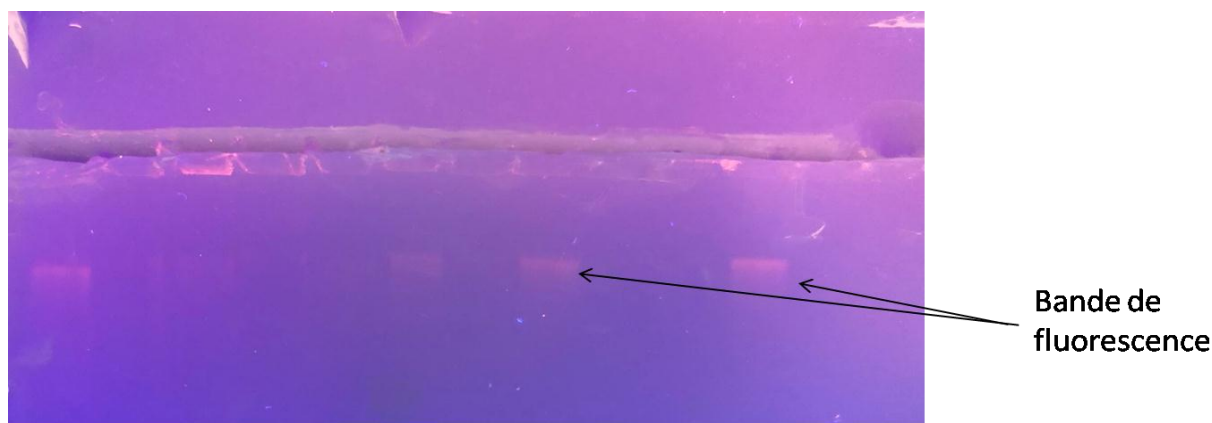


Figure 37 : bande d'ADN sous fluorescence UV.(originale)

Sur les 11 échantillons extraits, nous avons amplifié en PCR temps réel en utilisant le colorant Syber green, 11 échantillons avec l'amorce IDP spécifique au genre *Acanthamoeba*

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

Les résultats des amplifications spécifiques à *Acanthamoeba* avec l'amorce JDP sur 11 échantillons sont regroupés dans la figure 47. Ils montrent que les 6 échantillons sont positifs.

Les Ct obtenus figurent dans le tableau 09 Ils montrent que nos échantillons avaient des concentrations variables sachant que Ct sont inversement proportionnels aux concentrations.

Tableau 09 : Résultats des Ct obtenus aux cours de nos PCR en temps réel

Echantillon	Lent 1	Lent 2	Lent 3	Lent 4	Lent 5	Lent 6	Lent 7	Lent 8	Lent 9	Lent 10	Lent 11
Ct (°C)	30.89	30.27	30.60	29.14	29.56	25.12	26.24	29.16	23.83	27.08	27.15
Tm	80.09	79.87	80.37	79.73	79.14	78.67	79.51	79.14	79.57	79.75	79.98

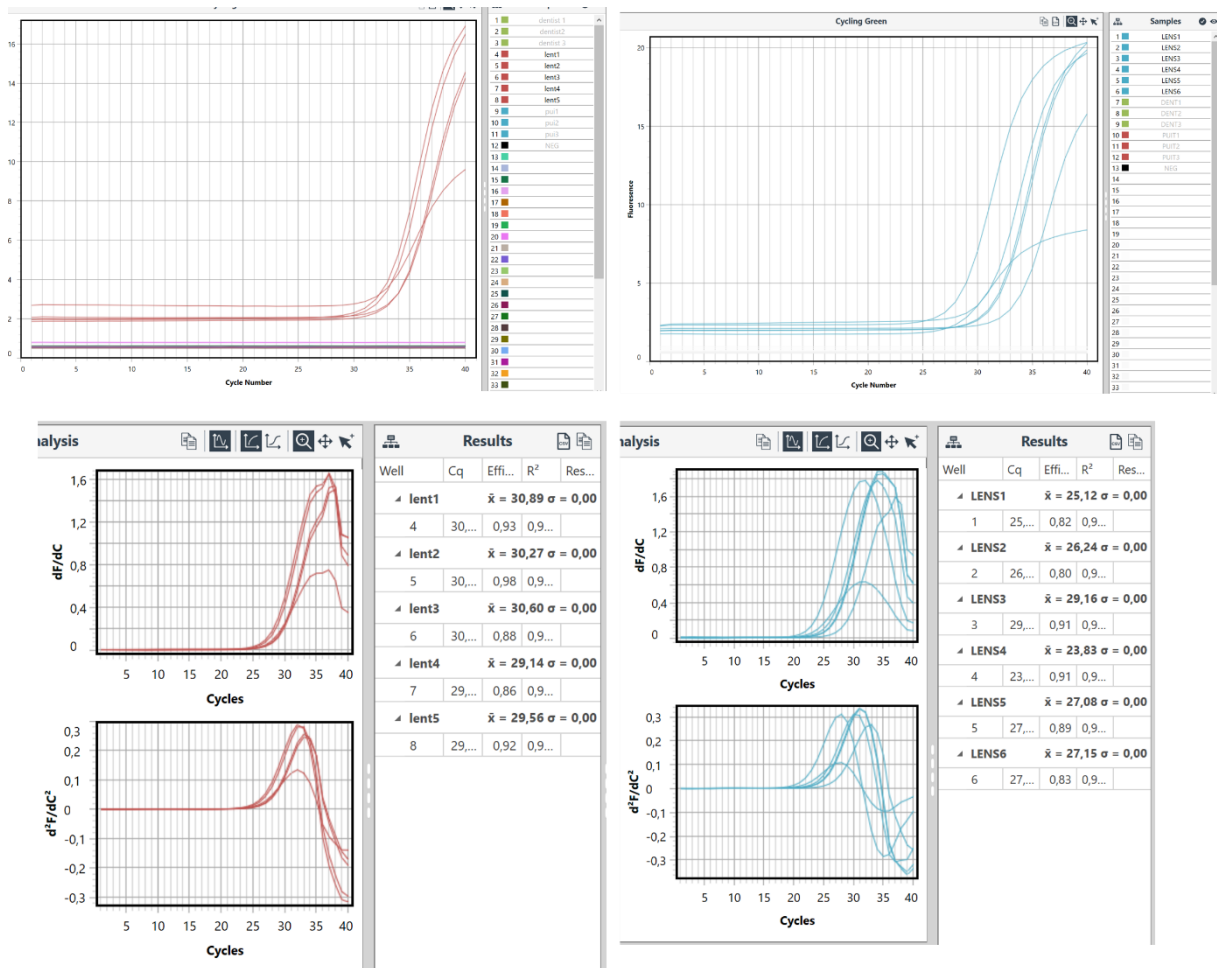


Figure 47 : Résultats des 6 échantillons testés en JDP avec les Ct obtenues

Les résultats des fusions post PCR permettant de distinguer les variabilités dans les produits PCR sont dans la figure . Les catégories d'espèces obtenues en fonction de la température de Melting ont donné une heatmap (figure 47). Nous pouvons distinguer 3 catégories qui avoisines 3 températures, à savoir : 79,0 ;79,5 et 80,00 °C.

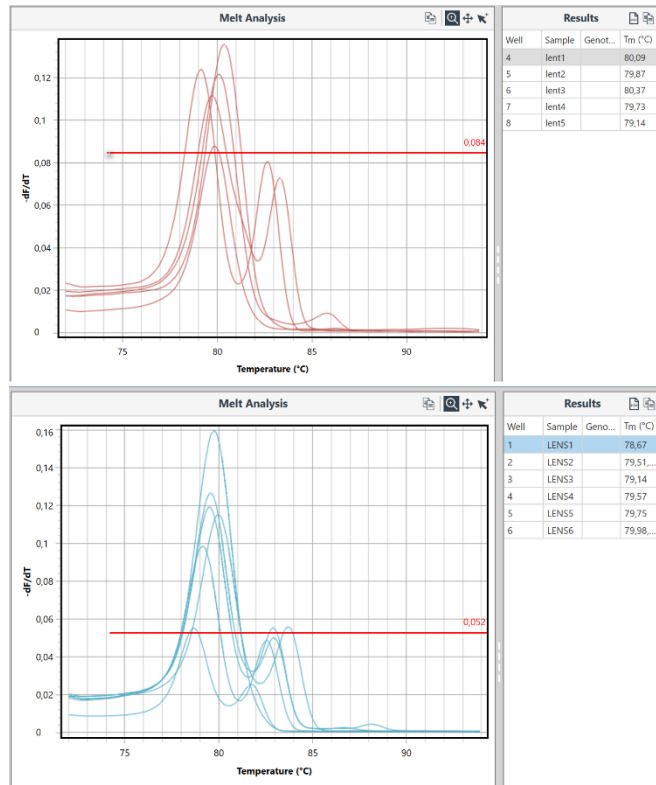


Figure 48 : Heat map des températures de fusion obtenues pour *Acanthamoeba* spp à partir des isolats des lentilles (de A à K correspond de lent 1 à 11)

DISCUSSION

Ce travail de recherche a permis de réaliser un premier état des connaissances sur les amibes libres de liquide de lentille de contact chez les porteurs de lentilles dans la wilaya de Tizi Ouzou. En effet, l'étude de ces microorganismes et les conséquences graves que certaines espèces peuvent entraîner, n'avaient encore jamais été véritablement abordées. Il est apparu important de développer un axe de recherche sur ces amibes libres afin de mieux comprendre les risques de leur présence dans notre environnement.

Concernant les différentes mises au point développées par notre travail, plusieurs paramètres ont été traités, parmi eux le volume d'échantillonnage.

Pour notre enquête nous avons utilisé 5, 8, 9, 10, 20 et 40ml pour les échantillons. Nous n'avons pas trouvé de volumes correspondant dans la littérature ayant cité les volumes de solution de lentille après rinçage traité. Concernant la filtration, un critère important qui est la taille des pores des filtres de 0,45 μm utilisé, a aussi un impact sur les résultats. Des auteurs tel que Schuster (2007) ont utilisé la même porosité à savoir 0,45 μm . Alors que d'autres auteurs tel que Gabriel et col, (2019), et Niuuati et col, (2015), ont utilisé une membrane de 0,22 μm .

La membrane 0,45 μm nous a permis d'obtenir un meilleur rendement donc augmente la charge amibienne. De plus, les germes associés tel que les légionelles seront concentrées par ce type de filtration.

Sur les 31 échantillons de liquides et écouvillon de différents points de prélèvement ophtalmologistes et opticiens, nous avons obtenu 96,77% de positifs après 20 jours d'incubation à 30°C et 37°C. Cette période et température d'incubation est similaire à celle retrouvée par les études de Moulahem et col (2014) et Rivera et col (2007). En revanche, Sente, et col. (2016) ont fait une incubation à 30°C uniquement et la lecture pendant 7 jours. Alors que Zago & Martinez, ont incubé leurs prélèvements à 22°C et 24°C sur une période de lecture de 10 jours.

Aucune différence n'a été remarquée entre les lentilles de vision et les lentilles esthétiques (AMBO 18 & AMBO19) qu'elles soient des filtres ou des écouvillons ou qu'elles soient incubées à 30°C ou bien à 37°C.

La coloration utilisée pour les kystes d'amibes dans notre étude est la coloration de Giemsa. Elle nous a permis une bonne coloration de la double paroi d'*Acanthamoeba*. Une association entre deux colorations est retrouvée chez certains auteurs (EL Sayed, Hikal. 2015). La première au Giemsa qui a donné des résultats de visibilité de positifs de 44% sur l'ensemble des échantillons et une deuxième coloration à l'iode qui a donné une meilleure visibilité soit 92% des kystes d'*Acanthamoeba*.

Dans notre étude nous avons centrifugé nos échantillons à 5500 Tr /min pendant 15 minutes car les kystes étaient trop résistants comparé à une centrifugation à 2500 Tr/min pendant 10min. utilise par (Seal *et al.*,1992).

Nous avons utilisé un milieu de culture qui est la gélose nutritive tapissée de *E. coli* morte (ATCC 25922) comme la methode décrite par NEFF. (1957) et Visvesvara et col (1993) pour la croissance des amibes libres.

D'autres auteurs ont utilisé des *E coli* vivantes comme source nutritive avec le milieu d'agar non nutritive (ANN) comme milieu de culture pour les amibes libre. (Visvesvara *et al.*, 1993 ;Mohammadie *et al.*, 2016 ; Hajialilo *et al.*,2016). Cependant l'inconvénient majeur est que *E coli* peut envahir la culture et ne permet pas la purification des kystes.

Notre étude ayant montré que Les échantillons incubé a 30°C évoluent plus rapidement avec une charge amibienne très importante que les échantillons incubé à 37°C .La température d'incubation est aussi un éléments nécessaire dans l'isolement et la culture et l'augmentation des quantités d'amibes libres. La plupart des auteurs s ont utilisé des températures d'incubation qui varie entre 30°C et 37°C (Wink et al. 2011 ; Marciano-Cabral et al., 2010) similaire aux températures qu'on a utilisé. Par contre, d'autres auteurs ont utilisé une température de 25°C, et ont eu une faible positivité (Jeong et Yu, 2005).En effet l'incubation à 30°C a permis d'obtenir un taux de positivité plus élevé.

La durée d'incubation est aussi variable. L'apparition des amibes est estimé dans certains articles à 3 jours d'incubation (Marciano-Cabral *et al.* 2010) et de 4 à 5 jours (Carent *et al.*, 2020). Cette dernière étude a eu des résultats similaires aux notre.

Les repiquages 1 et 2 avec de l'eau physiologique, nous ont aussi permis l'augmentation de la charge amibienne et de réduire les contaminations.

L'identification morphologique des amibes libres est basé généralement sur la morphologie des kyste et des trophozoites (Barbeau et buhler, 2001 ; Jeong et Yu, 2005 ; Seal et al. 1992) et les résultats ont montré que c'était *Acanthamoeba* avec sa double paroi avec le test de flagellation pour les formes trophozoites (Edagawa *et al.* 2009 ; Niyiyati *et al.*, 2012 ; Coskun et al., 2013). Ces deux méthodes ont été utilisées par notre étude pour l'identification des genres d'amibes libres. Le test de flagellation a par ailleurs très bien étudié et l'observation dans le temps nous a permis d'observer la transition de la forme kystique vers des bourgeonnements. *Acanthamoeba* est définie comme l'espèce la plus trouvé par les articles.

Par rapport à l'identification moléculaire, nous avons commencé par une extraction des ADN, suivi par une PCR en temps réel dirigé contre les amorces JDP1 et JDP2.

Pour bien avoir des résultats parfait d'ADN et PCR on a opté pour un gel de qualité pour l'identification moléculaire et a été observe par l'électrophorèse avec le bleu de

bromophenol comme la technique d' (Edagawa et col. 2009) et nous avons confirmé les résultats avec un dosage d'ADN.

Nos résultats de PCR et de Melting, ont permis de distinguer 3 groupes qui pourraient correspondre aux espèces *d'Acanthamoeba*.

CONCLUSION

L'objectif de notre étude, c'est la recherche et l'identification des amibes libres chez les porteurs de lentille de contact de vision ou esthétiques récoltées chez des ophtalmologistes et des opticiens dans la région de Tizi Ouzou. Cette identification a été faite après isolement et culture, avec des méthodes morphologiques et moléculaires.

Notre travail de recherche nous a permis d'initier pour la première fois en Algérie, et plus spécialement dans la wilaya de Tizi Ouzou, une étude sur les amibes libres présentes dans les différents types de liquide de conservation des lentilles.

Notre premier objectif a été la récolte des prélèvements de solution de lentilles, et des écouvillonnages des boîtiers de ces dernières pour réaliser une enquête au niveau du laboratoire d'Eco-épidémiologie de l'institut pasteur d'Alger à Dely Ibrahim. Pour cela nous avons apporté 31 échantillons dans 5 régions différentes de la wilaya de Tizi Ouzou.

Le deuxième objectif de notre étude, visait à l'identification morphologique des amibes. A cet effet, nous avons mis en culture nos prélèvements de filtres et écouvillons incubés à des températures différentes 30°C et 37°C, pour suivre leurs évolutions sous microscope inversé directement dans le milieu de culture et sous microscope optique pour observer la morphologie des kystes. Nos résultats ont montré qu'une durée de 3 à 4 jours était idéale pour obtenir des résultats positifs, et que les deux températures étaient nécessaires à une bonne identification. Par ailleurs, les écouvillonnages des biofilms présents dans les boîtes de conservation des lentilles semblent aussi très efficaces.

On a également réalisé une coloration au GIEMSA pour une meilleure observation et un repiquage 1 et 2 ainsi qu'un dénombrement. L'identification morphologique a montré que l'amibe majoritaire est à 100% *Acanthamoeba* avec 96.77% d'échantillons positifs soit 30 prélèvements. .

Le troisième objectif de ce travail était l'identification moléculaire qui a ciblé l'amorce JDP spécifique au genre *Acanthamoeba*. Sur les 11 échantillons amplifiés en temps réel, nous avons obtenus 100% de positifs. Par ailleurs, Nos PCR ont été suivies de fusions qui ont permis de distinguer 3 groupes. Ces derniers pourraient correspondre aux espèces. Ce travail doit être complété par des séquençages pour étudier la phylogénie de ces espèces.

Notre travail a contribué à ouvrir la voie de la recherche sur les amibes libres dans la wilaya de Tizi Ouzou et à tracer le chemin de futurs projets d'étude sur les amibes libres qui pourront apporter de nouveaux éléments pour comprendre l'origine, le développement et les mécanismes de virulence de ce pathogène, afin d'éviter ces maladies causées par cette amibe.

En conclusion, nos résultats montrent qu'il est conseillé d'éduquer les gens sur la dangerosité des amibes libres pour les personnes qui portent des lentilles de contact.

Donc il est très important de respecter les règles d'hygiène : l'utilisation de produit de lentille de bonne qualité, évité de laver la lentille avec de l'eau de robinet, ne pas dormir avec ces lentilles et surtout les changer régulièrement.

BIBLIOGRAPHIE

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Murti C.R .et Shukla OP. (1984). Differentiation of pathogenic amoebae: encystation and excystation of *Acanthamoeba culbertsoni*-a model. *J.Biosci.* (6):475–489.

Visvesvara. Et Schuster .(2008). Amibes libres pathogenes :Clinical Microbiology Newsletter . *Elsevier* .151-155

Ramesh et al. (2005). Les amibes libres pathogènes des eaux chaudes de la Guadeloupe : étude écologique caractérisation moléculaire et prophylaxie des zones de baignade.

Jager B. V. et W. P. Stamm. (1972). Brain abscesses caused by free-living amoeba probably of the genus *Hartmannella* in a patient with Hodgkin's disease. *Lancet* *ii*: 1343–1345.

Niyiyati M . et Rezaeian M.(2015). Current status of *Acanthamoeba* in Iran: a narrative Review article. *Iran J Parasitol.*10(2):157-63.

Bhagwandeem S. B ., R. F. Carter.,K. G. Naik .et D. Levitt. (1975). A case of hartmannellid amebic meningo encéphalites in Zambia. *Am. J. Clin.Pathol.* 63:483–492.

Siddiqui .et Khan 2012 ; Lorenzo-Morales et al. 2015.

Dr. SAADNI.F . Cours destiné aux 3èmes années Médecine 2019-2020.

Martinez. A.J. et K. Janitschke . (1985) . *Acanthamoeba* , An opportunistic microorganism: a review. *Infection* 13:251–256.

Butt .C. Baro.C., et R. W. Knorr. (1968). *Naegleria* sp. identified in amebic encephalitis. *Am. J. Clin. Pathol.* (50):568–574.

Callicott.J. H.Jr. (1968). Amebic meningoencephalitis due to free-living amebas of the *Hartmannella -Acanthamoeba-Naegleria* group. *Am. J. Clin. Pathol.* (49):8491.

Calore.E. J. Cavaliere., et N. M. Calore. (1997). Cerebral amebiasis in the acquired immunodeficiency syndrome. *Acta Neurol. Belg.* (97):248–250.

Cerva.L. et K. Novak. (1968). Amoebic meningo encephalitis: 16 fatalities.*Science.* (160):92-75.

Cerva.L., C. Serbus, et. V. Skocil. (1973). Isolation of limax amoebae from the nasal mucosa of man. *Folia Parasitol.* Prague. (20):97–103.

Fowler.M., et R. F. Carter. (1965). Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* sp.: a preliminary report. *Br. Med. J.* 5464:740–742.

Visvesvara. et H. W. Lischner. (1992). Disseminated *Acanthamoeba* infection in a child with symptomatic human immunodeficiency virus infection. *Pediatr. Infect. Dis. J.* (11):404–407.

Jager. B. V., et W. P. Stamm. (1972). Brain abscesses caused by free-living amoeba probably of the genus *Hartmannella* in a patient with Hodgkin's disease. *Lancet ii*:1343–1345.

Martinez, A. J, C. A. Garcia ,M. Halks-Miller.; et R. Arce-Vela. (1980). Granulomatous amebic encephalitis presenting as a cerebral mass lesion. *Acta Neuropathol.* Berlin.(51):85–91.

Martinez, A. J, A. E. Guerra, J. Garcia-Tamayo, G. Cespedes, J. E. Gonzalez-Alfonzo., et GS. Visvesvara. (1994). Granulomatous amebic encephalitis: a review and report of a spontaneous case from Venezuela. *Acta Neuropathol.* Berlin. (87):430–434.

Martinez.A. J., et K. Janitschke. (1985). *Acanthamoeba*, an opportunistic microorganism: a review. *Infection* .(13):251–256.

Martinez.A. J , S. M. Markowitz.,et R. J. Duma. (1975). Experimental pneumonitis and encephalitis caused by *Acanthamoeba* in mice: pathogenesis and ultra structural features. *J. Infect. Dis.* (131):692–699.

Martinez. A. J , C. Sotelo-Avila, J. Garcia-Tamayo, J. T. Moron, E. Willaert., et W. P. Stamm. (1977). Meningoencephalitis due to *Acanthamoeba* sp. Pathogenesis and clinico-pathological study. *Acta Neuropathol.* Berlin.(37):183–191.

- Patras.D ., et J. J. Andujar.** (2016). Meningoencephalitis due to Hartmannella *Acanthamoeba*. *Am. J. Clin. Pathol.* (46):226–233.
- Willaert, E., et A. R. Stevens.** (2005). Indirect immunofluorescent identification of *Acanthamoeba* causing meningoencephalitis. *Pathol. Biol. Paris* (24):545–547.
- Willaert.E., A. R. Stevens., et G. R. Healy.** (2006). Retrospective identification of *Acanthamoeba culbertsoni* in a case of amoebic meningoencephalitis. *J. Clin. Pathol.* (31):717–720.
- .Willaert.E , A. R. Stevens.,et R. L. Tyndall.** (1978). *Acanthamoeba royreba* sp. n. from human tumor cell culture. *J. Protozool.* (25):1–14.
- Winiecka-Krusnell. J., et E. Linder.** (2001). Bacterial infections of freeliving amoebae. *Res. Microbiol.* (152):613–619.
- Winiecka-Krusnell, J. K. Wreiber, A. von Euler, L. Engstrand., et E. Linder.** (2002). Free-living amoebae promote growth and survival of *Helicobacter pylori*. *Scand. J. Infect. Dis.*(34):253–256.
- Wright, J. L., K. Redhead., et H. Maudsley.** (1981). *Acanthamoeba castellanii*, a predator of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* (125):293–300.
- Wright.P,D. Warhurst., et B. R. Jones.** (1985). *Acanthamoeba* keratitis successfully treated medically. *Br. J. Ophthalmol.* (69):778–782.
- Yagita, K ., et T. Endo.** (1990). Restriction enzyme analysis of mitochondrial DNA of *Acanthamoeba* strains in Japan. *J. Protozool.* (37):570–575.
- Yang. S., et C. Villemez.** 1994. Cell surface control of differentiation in *Acanthamoeba*. *J. Cell. Biochem.* (56):592–596.
- Hajjalilo .E , Behnia. M, Tarighi .F.**(2016). Isolation and genotyping of *Acanthamoeba* strains (T4, T9, and T11) from amoebic kerritis patients in Iran. *ParasitolRe.*

Burton J. Bogitsh, Thomas.N. Oeltmann, in Human Parasitology 5ed.(2019)
Castrillon, J. C., et L. P. Orozco. (2013). *Acanthamoeba* spp. As opportunistic pathogen parasites. *Rev.Chilena.Infectol.*, (30): 147-155.

Jacob Lorenzo-Morales, Antonio Ortega-Rivas, Pilar Foronda, Enrique Martínez ., et Basilio Valladares. (2005). Isolation and identification of pathogenic *Acanthamoeba* strains in Tenerife, Canary Islands, Spain from water sources (95):273–277.

Visvesvara, G. S., Moura, H., and Schuster, F. L. (2007). Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 50, 1–26.

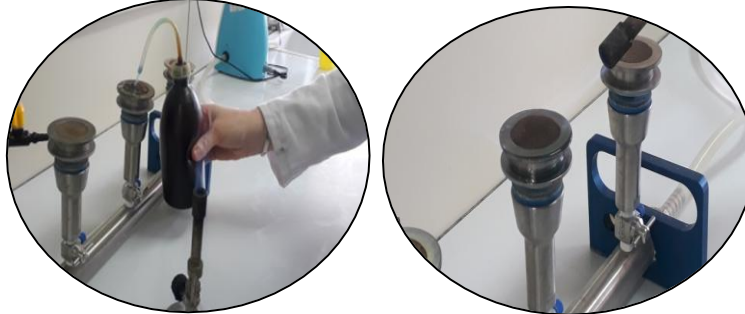
Armand.B, Motazedian.M.H , Asgari.Q.(2016). Isolation and identification of pathogenic free-living amoeba from surface and tap water of Shiraz City using morphological and molecular methods. *Parasitol. Res.* 115, 63–68.

Abedkhozasteh. H , Niyiyati.M., Rahimi. F,Heidari, M.Farnia,,et Rezaeian, M. (2013). First Report of *Hartmannella* keratitis in a Cosmetic Soft Contact Lens Wearer in Iran. *Iranian Journal of Parasitology*, 8(3) 481-485.

ANNEXES

Annexe 1

- La stérilisation du site de filtration avec bec benzène et de l'alcool avant l'utilisation.



Figures 11 et 12 Représentant la stérilisation.

- Le refroidissement des sites avec de l'eau distillé avant de verser les liquides de rinçage de lentilles. (originale)



Figure 13. Membrane de filtration millipore d'une porosité de $0,45\mu\text{m}$. (originale)

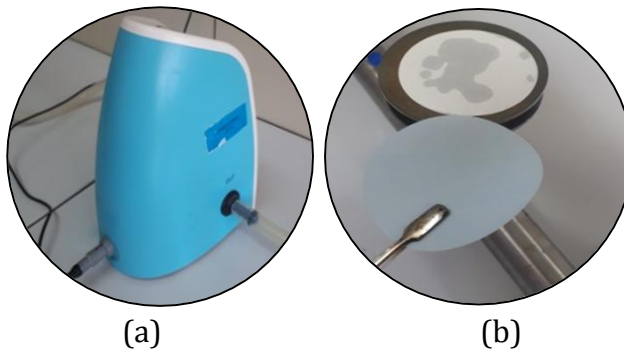


Figure 14 : (a) Photo de la pompe de filtration et (b) photo de la membrane de filtration. (originale)

Annexe 2

Préparation du milieu de culture de amibes :

- Faire fondre au bain marie des flacons de GN selon le besoin (figure 25).
- Verser jusqu'à 4ml de gélose dans des boites pétri près d'un bec.
- Refermer les boites et laisser gélifier.
- Conserver dans une chambre froide à (-4°C).

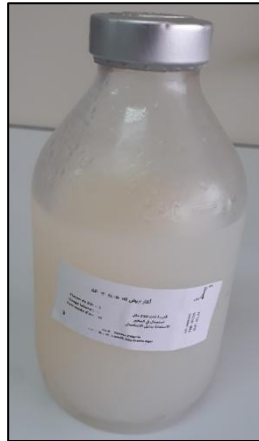


Figure 25: gélose nutritive. (originale)

En cas d'utilisation :

- Sortir les boites les sécher à 30°C ou à 37°C.

Tapisser ensuite

d'*Escherichia coli* (ATCC 25922) morte en formant des stries serrées en forme de (+) puis de (×) sur l'ensemble de la boite avec une pipette pasteur près d'un bec (figure26).

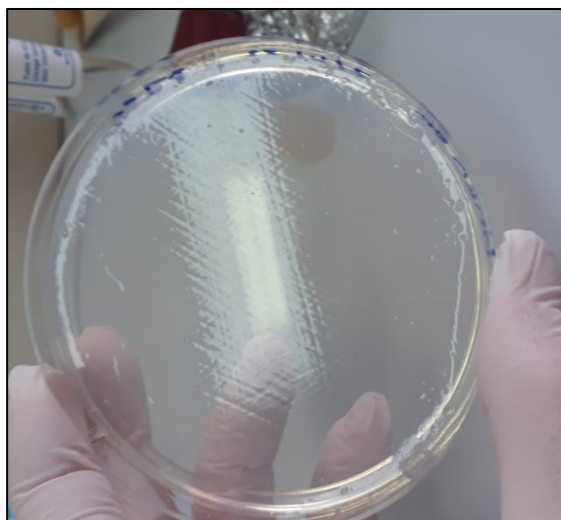


Figure26: stries d'*Escherichia coli* sur gélose. (originale)

Annexe 3

Comptage des Amibes Libres

Un dénombrement a été réalisé à l'aide d'une cellule Thomas pour compter le nombre d'amibes libres présent dans une goutte du culot pour chaque échantillon soit 146 échantillons au total. La cellule de Thomas contient un quadrillage présentant 16 grands carrés de 16 petits carrés d'une profondeur de 0.1mm. Le principe consiste à déposer entre cette cellule et lamelle une goutte du culot puis compter entre les carrés les amibes (Figure 27).

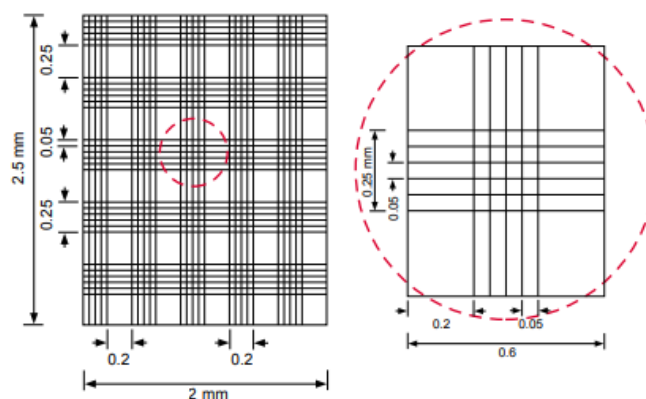


Figure 27 : Quadrillage de la cellule thomas (WEB 2)

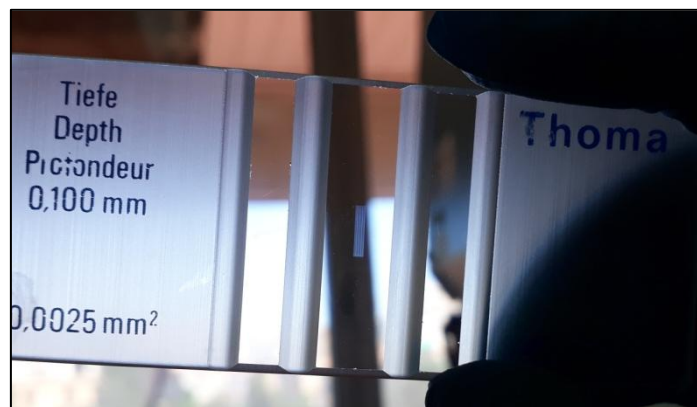


Figure28 : cellule thomas.(originale)

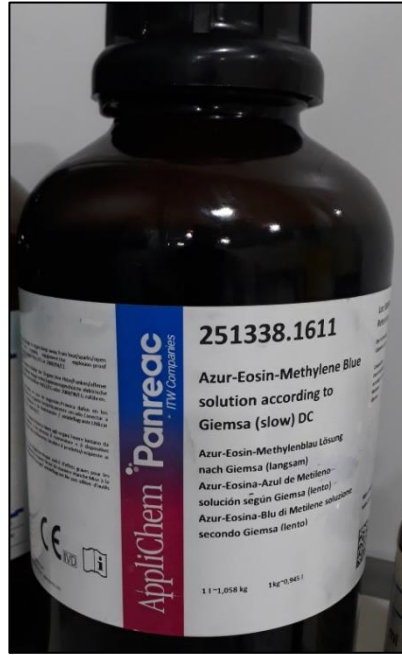


Figure29 : colorant GIEMSA. (Originale)

Annexe 4

Préparation du tampon de lyse et du kit de la PCR pour l'identification moléculaire.

Tableau 4. Volumes de la préparation TAMPON de Lyse pour 11 échantillons à extraire

Buffer	Volume n= 96	volume n= 11
TNA lysis buffer	26.4 ml	3.025 ml
Carrier RNA	105µl	12.03µl

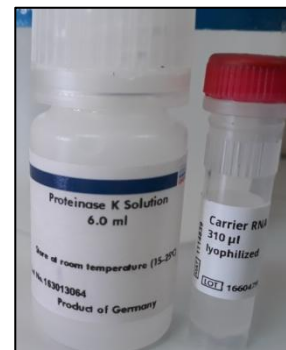
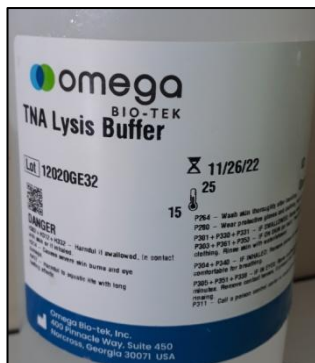


Figure19 .Tampon de lyse des amibes.(originale)**Figure20**. Protéinase k et le RNase carrier.(originale)

- Précipitation et lavage

Préparer le mélange de BINDING MASTER MIX pour 11 échantillons

- Vortexer le MAG-BIND PARTICLES RQ pour remettre complètement suspension.
- Ajouter 280µl de BINDING MASTER MIX
- Mélanger en pipetant de haut en bas 10 fois. S'assurer que MAG-BIND PARTICLES RQ est complètement remis en suspension dans le mélange avant l'utilisation.
- Vortexer pendant 10min ou bien 30secondes toutes les 2min pendant 10min.
- Organiser sur un plateau.

Annexe 5

Analyse qualitative de l'ADN

- Dans une éprouvette verser 10ml de TBE.
- Ajouter 90 ml d'eau distillé pour obtenir un volume de 100ml.
- Mettre 0.8g d'agarose dans le mélange.
- Faire chauffer la solution au micro-onde pendant 1min en faisant des pauses toutes les 30 secondes pour remuer le mélange et éviter de le déborder ou brûler
- 6 µl de BET ont été rajouté à la solution après refroidissement.
- Verser dans la cuve de l'électrophorèse après avoir placé les pinces puis laisser le tout solidifier.

Sur une feuille d'aluminium on place

- Un volume 2.5µL de bleu de bromophenol auquel on rajoute un volume de 5µl d'ADN qu'on mélange.
- Spotter dans les puits de la cuve, brancher au générateur réglé à 85 Volt pendant 30 min.

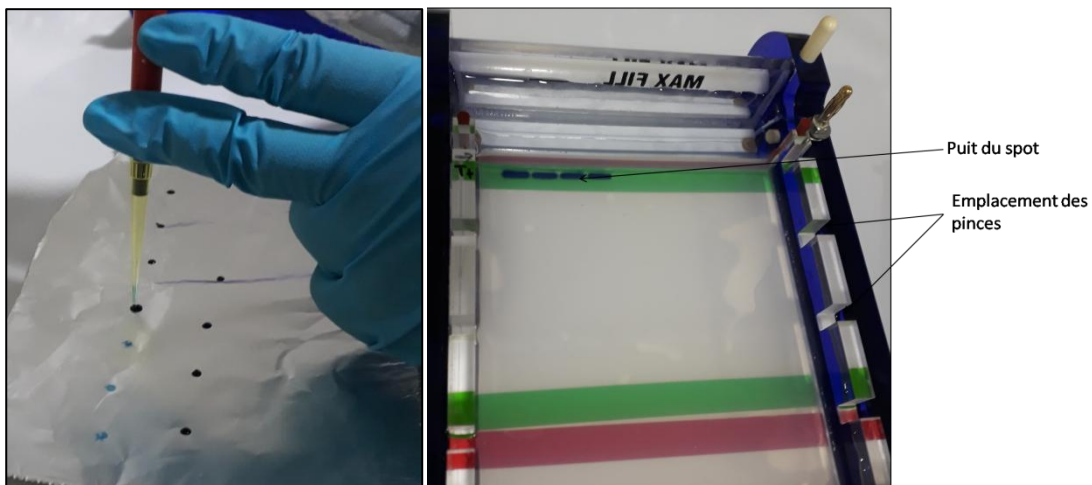


Figure17 .mélange BROMOPHENOL/ ADN.(originale).**Figure18** . Spot du mélange dans les puits de la cuve.(originale)

Buffer	Volume n= 96	volume n= 11
100% isopropanol	30ml	3.43 ml
MAG-BIND PARTICLES RQ	530 μ l	60.11 μ l

Tableau 5. Volumes de la préparation MASTER MIX.

- Placer le plateau sur un séparateur magnétique et laisser reposer à température ambiante jusqu'à ce que les particules MAG-BIND RQ soient complètement éliminées de la solution.
- Aspirer et jeter le surnageant sans toucher les particules MAG-BIND et retirer la plaque du dispositif de séparation magnétique.
- Ajouter 350 μ l RMP BUFFER (tampon) dilué avec 100% d'isopropanol et vortexer pendant 5min pour mélanger remettre sur la plaque magnétique laisser reposer à température ambiante jusqu'à ce que les particules MAG-BIND RQ soit complètement éliminées de la solution.
- Aspirer et jeter le surnageant sans toucher les particules MAG-BIND.
- Retirer la plaque du dispositif magnétique puis rajouter 350 μ l d'éthanol à 80% vortexer pendant 5min pour mélanger.
- Placer le plateau sur un séparateur magnétique et laisser reposer à température ambiante jusqu'à ce que les particules MAG-BIND RQ soient complètement éliminées de la solution.
- Aspirer et jeter le surnageant sans toucher les particules MAG-BIND.

Ajouter 50 μ L de ARNase FREE water, vortexer pendant 10 min .

- placer sur le dispositif magnétique Laisser reposer a température ambiante. Transférer e surnagent clarifié dans des microplaques et stocker (figure 30).

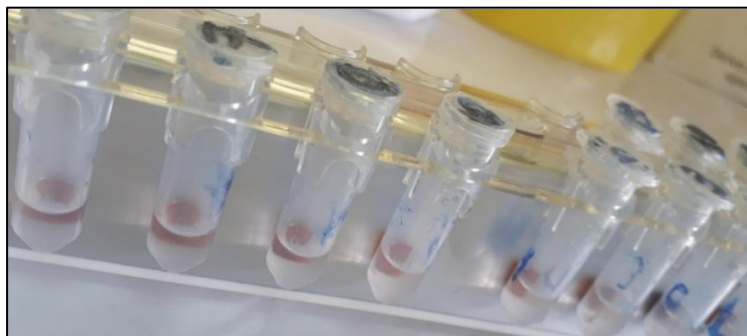


Figure 30. Plateau d'échantillons sur dispositif magnétique.(originale)

Annexe 6

Le colorant SYBR est mélangé avec les amorces JDP1 et JDP2, à de l'H₂O, échantillon (ADN) avec des volumes et concentrations précises.

Préparer les quantités pour 14 échantillons dont 11 sont les échantillons d'ADN, un témoin positif et un témoin négatif.

MIX	N= 1	N=14
SYBR	12µL	168µL
AMORCE R	2µL	28µL
AMORCE F	2µL	28µL
H ₂ O	7.1µL	99.4µL
ECHANTILLON (ADN)	1.9µL	26.6µL
VT (MIX+ADN)	25µL	350µL

Tableau6 : Composition du mix PCR avec volumes.

Annexe 7

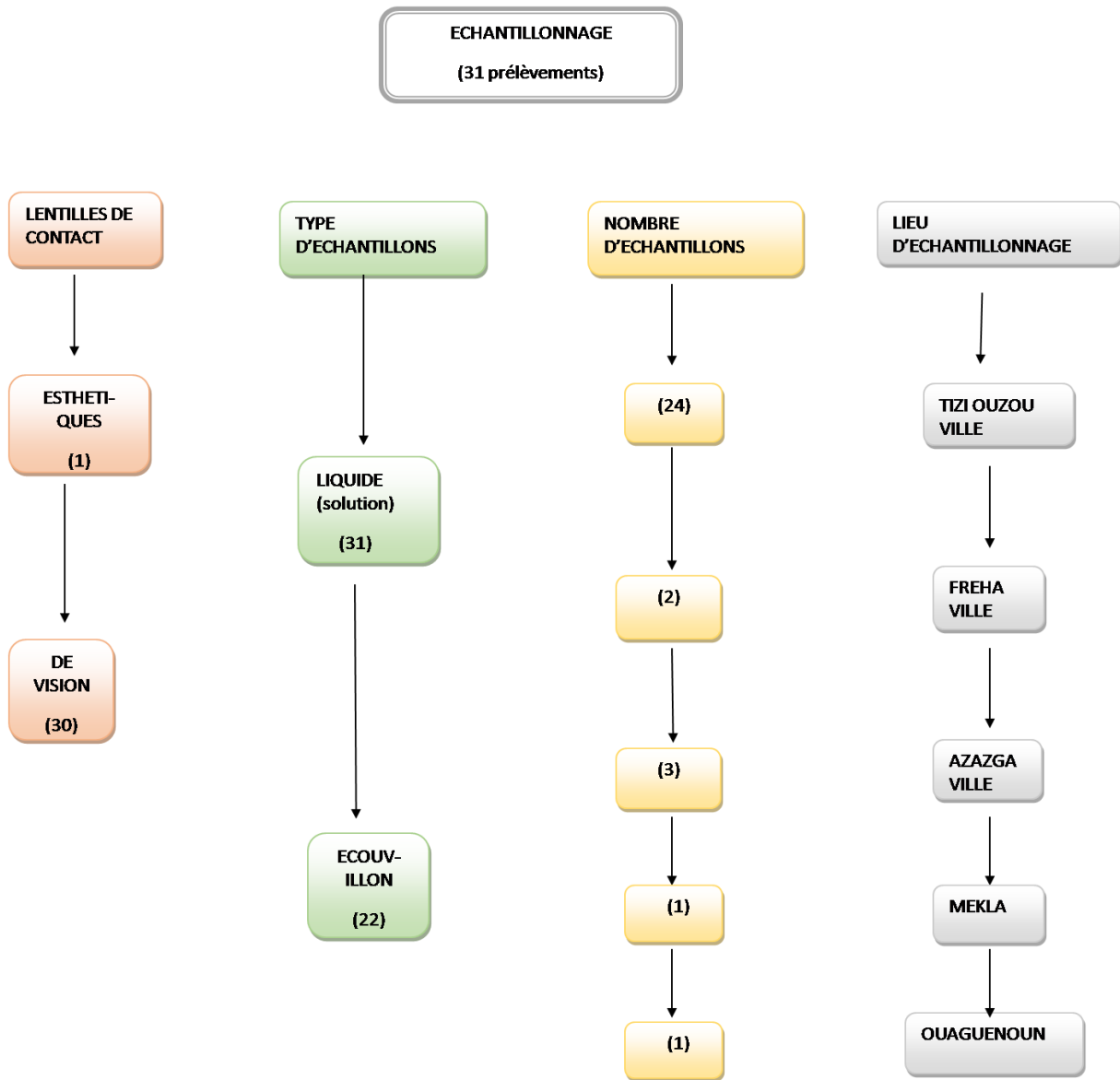


Figure 8 : schéma résumant l'échantillonnage

Annexe 8

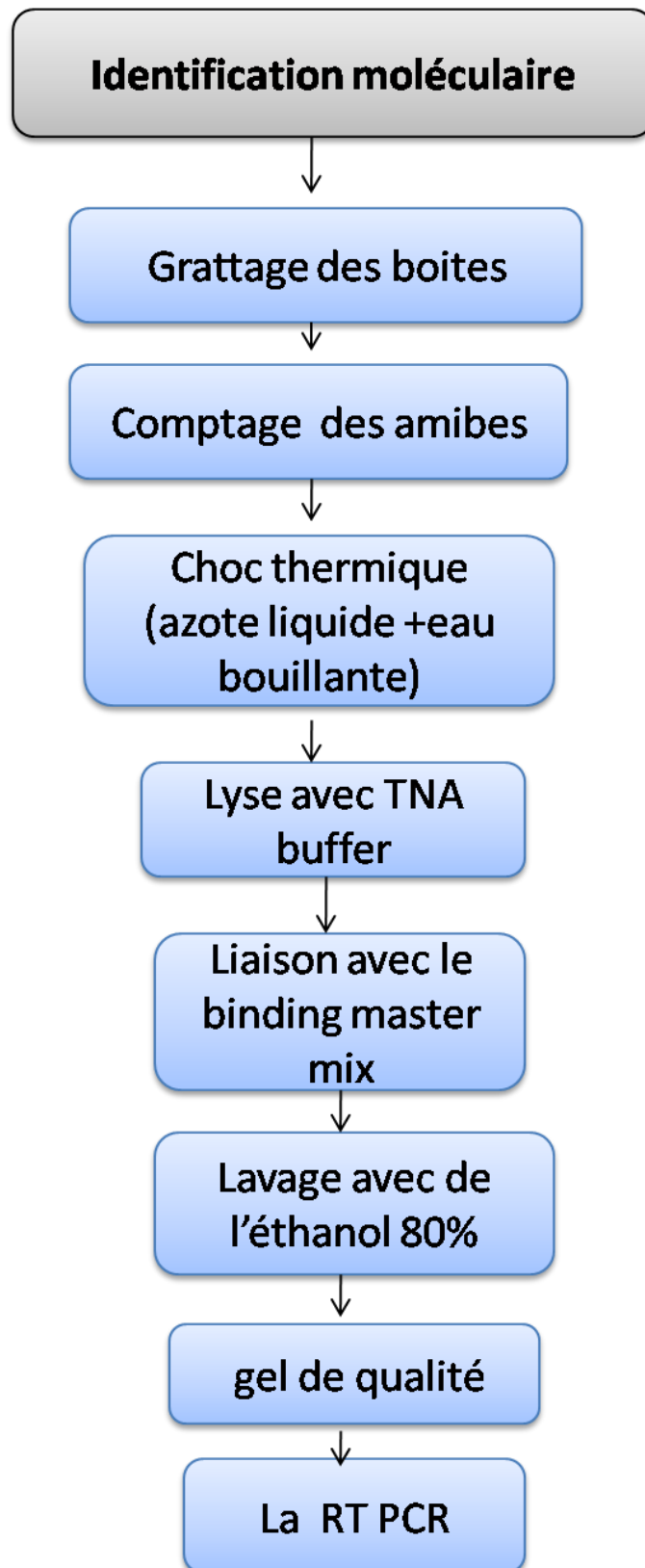


Figure 10 : schéma résumant l'identification moléculaire

Annexe 9

Type du cabinet	Type d'échantillons	Lieux d'échantillons	Nombres d'échantillons
OPHTALMO	/	TIZI OUZOU	0
OPTICIEN	/	TIZI OUZOU	0
OPHTALMO	/	TIZI OUZOU	0
OPHTALMO	/	TIZI OUZOU	0
OPHTALMO	/	TIZI OUZOU	0
OPTICIEN	/	TIZI OUZOU	0
OPHTALMO	/	TIZI OUZOU	0
OPHTALMO	FILTRE/ECOUV	TIZI OUZOU	10
OPTICIEN	/	TIZI OUZOU	0
OPHTALMO	/	TIZI OUZOU	0
OPHTALMO	/	AZAZGA	0
OPHTALMO	FILTRE/ECOUV	MAKLA	02
OPHTALMO	/	TIZI OUZOU	0
OPHTALMO	/	TIZI OUZOU	0
OPHTALMO	/	TIZI OUZOU	0
OPTICIEN	/	TIZI OUZOU	0
OPTICIEN	FILTRE/ECOUV	TIZI OUZOU	10
OPHTALMO	/	TIZI OUZOU	0
OPHTALMO	/	TIZI OUZOU	0
CLINIQUE	/	TIZI OUZOU	0
CLINIQUE	/	TIZI OUZOU	0
OPHTALMO	/	AZAZGA	0
OPHTALMO	/	AZAZGA	0
OPTICIEN	FILTRE/ECOUV	AZAZGA	2
OPHTALMO	/	AZAZGA	0

OPTICIEN	FILTRE/ECOUV	AZAZGA	1
OPTICIEN	FILTRE/ECOUV	OUAGUENOUN	1
OPTICIEN	/	TIZI OUZOU	0
OPTICIEN	FILTRE/ECOUV	TIZI OUZOU	04
OPTICIEN	FILTRE/ECOUV	FREHA	1

Tableau 7 : nombre d'échantillons par lieu d'échantillonnage.

Annexe 09

Nom du prélèvement	Température d'incubation		Les formes observées
	30°C	37°C	
AMBO1	FILTRE	FILTRE	Kyste bourgeonnant
AMBO2	FILTRE	FILTRE	kyste à paroi mince
AMBO3	FILTRE	FILTRE	kyste à paroi mince
AMBO4	FILTRE	FILTRE	Kyste à paroi épaisse
AMBO5	FILTRE	FILTRE	Kyste à paroi épaisse
AMBO6	FILTRE	FILTRE	Kyste étoilé
AMBO7	FILTRE	FILTRE	Perdu
AMBO8	FILTRE	FILTRE	Kyste à paroi épaisse
AMBO9	FILTRE	FILTRE	Kyste à paroi mince
AMBO10	FILTRE+ECOUV	FILTRE+ECOUV	Kyste à paroi épaisse
AMBO11	FILTRE+ECOUV	FILTRE+ECOUV	Kyste à paroi épaisse
AMBO12	FILTRE+ECOUV	FILTRE+ECOUV	Kyste à paroi mince
AMBO13	FILTRE+ECOUV	FILTRE+ECOUV	Kyste à paroi épaisse
AMBO14	FILTRE+ECOUV	FILTRE+ECOUV	Kyste à paroi mince
AMBO15	FILTRE	FILTRE	Kyste à paroi épaisse
AMBO16	FILTRE+ECOUV	FILTRE+ECOUV	Kyste à paroi mince
AMBO17	FILTRE	FILTRE	Kyste à paroi épaisse
AMBO18	FILTRE+ECOUV	FILTRE+ECOUV	Kyste à paroi épaisse
AMBO19	FILTRE+ECOUV	FILTRE+ECOUV	kyste à paroi mince
AMBO20	FILTRE+ECOUV	FILTRE+ECOUV	Kyste à paroi épaisse
AMBO21	FILTRE+ECOUV	FIMTR+ECOUV	kyste à paroi mince
AMBO22	FILTRE+ECOUV	FILTRE+ECOUV	Kyste à paroi épaisse
AMBO23	FILTRE+ECOUV	FILTRE+ECOUV	Kyste à paroi mince
AMBO24	FILTRE+ECOUV	FILTRE+ECOUV	Kyste à paroi mince
AMBO25	FILTRE+ECOUV	FILTRE+ECOUV	kyste à paroi mince
AMBO26	FILTRE+ECOUV	FILTRE+ECOUV	Kyste à paroi épaisse
AMBO27	FILTRE+ECOUV	FILTRE+ECOUV	kyste à paroi mince
AMBO28	FILTRE+ECOUV	FILTRE+ECOUV	kyste à paroi mince
AMBO29	FILTRE+ECOUV	FILTRE+ECOUV	Kyste à paroi épaisse
AMBO 30	FILTRE+ECOUV	FILTRE+ECOUV	Kyste à paroi mince
AMBO31	FILTRE+ECOUV	FILTRE+ECOUV	Kyste à paroi mince

Tableau 8 : formes retrouvées par échantillon

Résumé

Les amibes libres sont des microorganismes unicellulaires, ubiquitaires qui se retrouve dans l'environnement hydrique, exceptionnellement au niveau des liquides de lentille de contact. Elles peuvent être responsables de pathologie humaine ; comme la kératite amibienne et la méningo-encéphalite causées par plusieurs espèces comme *Acanthamoeba*. Notre intérêt c'est porté sur les amibes libres dans les liquides de conservation des lentilles de contact par échantillonnage des solutions de rinçage et des raclages de biofilms des étuis à lentilles chez des ophtalmologistes et des opticiens dans différentes régions de la wilaya de Tizi Ouzou. Sur les 32 prelevements réalisés, nous avons obtenus 98% de positifs sur la base de l'identification morphologique. L'identification moléculaire du genre *Acanthamoeba* a été confirmé pour 11 échantillons.

Mots- clés : Amibes libres, *Acanthamoeba*, lentille de contact, PCR en temps réel