

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### Étude ultrastructurale de deux souches belge et mexicaine de *Naegleria lovaniensis* (Stevens, de Jonckheere, Willaert, 1980)

Vercruysse, Catherine

*Award date:*  
1988

*Awarding institution:*  
Universite de Namur

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

ETUDE ULTRASTRUCTURALE DE DEUX  
SOUCHES BELGE ET MEXICAINE DE  
NAEGLERIA LOVANIENSIS (STEVENS, DE  
JONCKHEERE, WILLAERT, 1980).

**VERCRUYSSSE Catherine**

**1987-1988**

Promoteur: JADIN J.M.

Membres du jury: DE JONCKHEERE J.F.

DELVILLE-MERCIER J.

DEVOS P.

STROOT P.

**Faculté Universitaire Notre-Dame de la Paix  
Faculté des sciences**

rue de Bruxelles 61, B-5000 NAMUR

Tél. 081- 22.90.61 Télex 59222 facnam-b Téléfax 081-23.03.91

**ETUDE ULTRASTRUCTURALE DE DEUX SOUCHES BELGE ET MEXICAINE  
DE *N. LOVANIENSIS* (STEVENS, DE JONCKHEERE, WILLAERT).**

**VERCRUYSSSE Catherine**

Résumé.

Nous avons étudié par la technique du microscope électronique à transmission et à balayage l'ultrastructure de deux souches de *Naegleria lovaniensis* (STEVENS, DE JONCKHEERE, WILLAERT, 1980) dont l'une est une souche isolée en Belgique et l'autre au Mexique.

Les structures cellulaires sont similaires dans les deux souches. Les caractéristiques structurales sont surtout représentées par une double citerne perinucléaire de RER et par des extrusions développées par la membrane nucléaire. Ces structures sont très fortement développées chez la souche mexicaine.

Les deux souches forment des kystes alors qu'il est mentionné que la souche mexicaine n'en forme pas.

Nous souhaitons poursuivre l'étude de la flore associées des *Naegleria*.

Abstract.

In this paper we mean to follow data given by many workers on the free-living amoeba. We report personal observations on the ultrastructure of two different strain of *Naegleria lovaniensis* (STEVENS, DE JONCKHEERE, WILLAERT, 1980), one isolated in Belgium and the other in Mexico.

The cellular structure are similar in both strains. Structural characteristic are mainly represented by a double perinuclear cisterna and by RER bounded vesicles which develop and which contain nuclear material. These structures are more developed in the mexican strain.

We obtain cyst formation in both strains, although the absence of cyst formation was mentioned for the mexican strain.

We are mainly interested about the associated flora of *Naegleria*.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Septembre 1988

Unité de Parasitologie

Promoteur: Dr J.M. JADIN

Je désire au terme de ce mémoire présenter mes plus vifs remerciements

au Docteur J.M. JADIN qui m'a guidé et conseillé tout au long de ce travail;

au D.Sc. J.F. DE JONCKHEERE de l'Institut d'Hygiène et d'épidémiologie de l'Etat  
à Bruxelles pour les souches de *Naegleria* qu'il a mises à ma disposition;

au Révérend Père P. DEVOS, au Professeur E. FEYTMANS et le D. Sc E. DEPIERREUX,  
aux Professeurs R. WATTIAUX et A. DEPELCHIN qui m'ont permis l'accès à leur laboratoire;

au Professeur R.LELOUP pour son accueil dans son laboratoire interfacultaire de  
microscopie électronique et à Madame Ch. CHAPEAU-DEVIGNON et Monsieur Y. HOUBION pour  
leur disponibilité et aide précieuse;

à Monsieur J. COLLET pour l'iconographie de ce mémoire;

à Mademoiselle M.C. WILEM Lic. Sc. pour sa collaboration et sa sympathie;

à ma famille pour son soutien durant ces années d'études.

## LEXIQUES DES ABREVIATIONS.

Appareil de GOLGI:	G
Autophagosome:	Au
Bactérie:	B
Concanavaline A:	Con A
Corps générateur:	Cg
Corps noir:	C.n
Espace kystique:	Ek
Endokyste:	En
Exokyste:	Ex
Extrusion nucléaire:	Ext
Globule lipidique:	Gl
Macrobodv:	Mb
Matériel mucoïde:	M.Mc
Membrane cellulaire:	Mbr
Membrane nucléaire:	Mb.n
Méningo-Encéphalite Amibienne Primitive	MEAP
Milieu de culture (Serum, caséine, glucose, extrait de levure).	SCGYEM
Mitochondrie:	M
Mucus:	Mc
Noyau:	N
Nucléole:	Nu
Paroi:	Pa
Pore:	P
Plaque de matériel de l'endokyste:	PI
Pseudopode:	Ps
Ribosome	R
Reticulum endoplasmique rugueux:	RER
Souche belge:	S.b
Souche mexicaine:	S.m
Structure fibrillaire:	Fi
Unité internationale:	U.I
Uropode:	Ur
Vacuole alimentaire:	Va
Virus like particle:	VLP
Vacuole pulsatile:	Vp

Remarque: Le trait en dessous de chaque micrographie électronique à transmission représente 0.5  $\mu\text{m}$  et à balayage 10  $\mu\text{m}$ .

## TABLE DES MATIERES.

<b><u>OBJECTIF.</u></b>	1
1. Introduction.	1
2. But poursuivi.	1
<b>CHAPITRE 1: <u>INTRODUCTION</u></b>	3
<b>1.1 Considération taxonomique.</b>	3
1.1.1 Classification de SINGH.	3
1.1.2 Classification d'ALEXEIEFF	4
<b>1.2 Le genre <i>Naegleria</i>.</b>	5
<b>1.3 Ultrastructure comparative des différentes espèces de <i>Naegleria</i>.</b>	6
1.3.1 Observation en contraste de phase.	6
1.3.1.1 La forme amibienne	6
1.3.1.2 La forme kystique	7
1.3.1.3 La forme flagellée	7
1.3.2 Observation en microscopie électronique de la forme trophozoïte.	8
1.3.2.1 En microscopie à transmission	8
1.3.2.2 En microscopie à balayage.	14
1.3.3 Observation en microscopie électronique de la forme kystique.	14
1.3.3.1 En microscopie à transmission.	14
1.3.3.1.1 La paroi et les pores.	14

1.3.3.1.2	L'organisation interne du trophozoïte enkysté.	15
1.3.3.2	En microscopie à balayage.	17
1.3.4	Observation en microscopie électronique de la forme flagellée.	17
1.3.4.1	En microscopie à transmission.	17
1.3.4.2	En microscopie à balayage.	18
1.3.5	Conclusions.	18
1.4	<b>La méningo-encéphalite amibienne primitive.</b>	19
1.4.1	Signes cliniques.	19
1.4.2	Contamination.	19
1.4.3	Thérapeutique.	20
1.5	<b>Mécanisme de la virulence.</b>	21
1.6	<b>Les amibes vecteurs de bactéries et de virus.</b>	21
1.7	<b>La dispersion des amibes.</b>	22
1.8	<b>Lutte.</b>	24
	<b>CHAPITRE 2 : <u>MATERIEL ET METHODES.</u></b>	25
2.1	<b>Les protozoaires.</b>	25
2.2	<b>Entretien des souches.</b>	25
2.2.1	Boîte de culture.	25
2.2.2	Milieu de culture.	26
2.2.3	Repiquage des souches.	26
2.2.4	Mise au point des techniques de culture.	27

2.3	<b>Etude des amibes en microscope à contraste de phase.</b>	27
2.4	<b>Etude des amibes en microscopie électronique.</b>	28
2.4.1	En microscopie à transmission.	28
2.4.2	En microscopie à balayage.	29
2.5	<b>Transformation des amibes en forme flagellée.</b>	30
2.6	<b>Transformation des trophozoïtes en forme kystique.</b>	30
	<b>CHAPITRE 3. <u>RESULTATS.</u></b>	31
3.1	<b>Observations en microscopie optique.</b>	31
3.1.1	De la forme trophozoïte.	31
3.1.2	De la forme kystique.	32
3.1.3	De la forme flagellée.	33
3.2	<b>Observations en microscopie électronique.</b>	34
3.2.1	De la forme trophozoïte de <i>Naegleria lovaniensis</i> souche belge (S.b).	34
3.2.1.1	En microscopie à transmission.	34
3.2.1.2	En microscopie à balayage.	37
3.2.2	De la forme trophozoïte de <i>Naegleria lovaniensis</i> souche mexicaine (S.m).	38
3.2.2.1	En microscopie à transmission.	38
3.2.2.2	En microscopie à balayage.	40
3.2.3	De la forme kystique de <i>Naegleria lovaniensis</i> souche belge (S.b).	40
3.2.3.1	En microscopie à transmission.	40



3.2.3.2	En microscopie à balayage.	42
3.2.4	De la forme kystique de <i>Naegleria lovaniensis</i> souche mexicaine (S.m)	42
3.2.4.1	En microscopie à transmission.	42
3.2.4.2	En microscopie électronique à balayage.	46
<b>3.3</b>	<b>Etude biométrique.</b>	<b>46</b>
3.3.1	Diamètre intérieur des kystes.	47
3.3.1.1	Statistique descriptive.	47
3.3.1.2	Test de t de STUDENT.	47
3.3.2	Diamètre intérieur des pores.	48
3.3.2.1	Statistique descriptive.	48
3.3.2.2	Test de t de STUDENT.	48
3.3.3	Epaisseur de la paroi.	49
3.3.3.1	Statistique descriptive.	49
3.3.3.2	Test de t de STUDENT.	49
<b>CHAPITRE 4.</b>	<b><u>DISCUSSIONS. ET CONCLUSIONS</u></b>	<b>51</b>
4.1	Observations en microscopie optique.	51
4.2	Observations en microscopie électronique à transmission.	52
4.2.1	De la forme trophozoïte.	52
4.2.2	De la forme kystique.	53
4.2.3	De la forme flagellée.	55
4.3	En microscopie à balayage.	55
4.4	Résultats numériques.	55

4.5 Flore virale et bactérienne associées. 55

BIBLIOGRAPHIE. 57

Admirons la remarquable coordination des mouvements des amibes...Il y en a quelque milliers par centimètre cube {de terre}, elles creusent le sol, rencontrent des bactéries, s'en repaissent et après quelques heures, se divisent pour donner des cellules filles...

Leur comportement est assez riche pour qu'il permette d'illustrer et de rassembler en ensemble cohérent les thèmes généraux autour desquels s'organise ce livre{ sur la recherche et l'université}...

A. DEVAQUET.

L'amibe et l'étudiant, 1988.

## **OBJECTIF.**

### **1. Introduction**

L'amibiase intestinale due à *Entamoeba histolitica* est bien connue de tous; c'est une infestation à point de départ intestinal essentiellement chronique évoluant par épisodes aigus ou subaigus et à détermination métastatique. L'amibiase intestinale a une variabilité d'expression très complexe et est aussi déroutante que sa lésion élémentaire est simple.

Dans ce présent travail, nous avons étudié des amibes appartenant à un tout autre groupe zoologique. Il s'agit d'amibes du genre *Naegleria*, des amibes libres présentent dans l'eau et l'air.

### **2. But poursuivit.**

Les amibes libres ont suscité un intérêt croissant au cours des deux dernières décennies depuis la découverte du pouvoir pathogène pour l'homme de *Naegleria fowleri* et de différentes espèces d'*Acanthamoeba*, agent de la Méningo-Encéphalite Amibienne Primitive.

Plusieurs facteurs contribuent à rendre nécessaires de nouvelles études de ces amibes:

- le fait qu'il n'existe pas de thérapeutique active dans les cas de MEAP déclarées.

- la pollution des eaux, de l'air et du sol qui témoignent de la détérioration de notre environnement, ces amibes sont très nombreuses dans les eaux chaudes rejetées par les centrales nucléaires.

- l'engouement du public pour les baignades et les sports nautiques qui augmente le risque d'infestation.

- la multiplicité des amibes rencontrées dans notre environnement.

Les amibes *Naegleria* méritent donc largement des nouvelles études approfondies de leur aspect morphologique, biologique (en tant que vecteur de bactéries et de virus) et biochimique.

Nous nous sommes intéressés à leur ultrastructure. Le genre *Naegleria* dont cinq espèces ont été décrites, représente une homogénéité morphologique très marquée. Néanmoins nous avons essayé de mettre en évidence des caractères morphologiques propres à l'espèce *N. lovaniensis*.

Nous allons aussi au cours de ce travail mesurer le pouvoir de phagocytose et de conservation des virus par les souches d'amibes, dans l'hypothèse de trouver un rôle de vecteur de virus joué par ces protozoaires.

## CHAPITRE 1. INTRODUCTION

### 1.1 Considération taxonomique.

Les zoologistes nomment "amibes" un ensemble systématique hétérogène où ils relèguent la plupart des protistes à mouvements amiboïdes. Beaucoup d'amibes sont des formes rampantes de Flagellés incolores (Zooflagellés). Que les amibes constituent un ensemble hétérogène artificiel, on ne peut en douter mais cela n'a pas beaucoup d'importance à notre point de vue (GRASSE P.P, 1963).

C'est en 1841 que DUJARDIN donna la première description de l'amibe *limax*. De nombreux auteurs ont ensuite décrit des espèces nouvelles et proposé des classifications de ces unicellulaires.

Deux classifications s'opposent:

#### 1.1.1 Classification de SINGH (1952).

Cette classification, établie par SINGH (1952) et revue par SINGH et DAS (1970), divise l'ordre des *Amoebida* en deux familles :

- a. Les *Hartmannellidae* caractérisées par la disparition du noyau au cours de la mitose.
- b. Les *Schyzopyrenidae* caractérisées par la persistance du noyau lors de la division.

Cette classification rejette le genre *Naegleria*, celles-ci sont considérées comme des *Schyzopyrenidae* et les *Acanthamoeba* sont des *Hartmannella*. Les difficultés de mise en évidence des changements au cours de la mitose rendent cette classification complexe.

### 1.1.2 Classification d'ALEXEIEFF (1912).

La classification d'ALEXEIEFF (1912) revue par VOLKONSKY (1931) et que PAGE a remaniée en (1967) est préférée de la plupart. Selon PAGE les Rhizopodes sont des êtres unicellulaires caractérisés par leur cytoplasme nu, et dépourvus de tout organite locomoteur. Leur principale caractéristique est le mouvement amiboïde qui se manifeste par la faculté d'émettre des pseudopodes, c'est-à-dire des expansions cytoplasmiques temporaires, qui ne sont jamais anastomosées, servant à la fois à la locomotion et à la capture de proies par phagocytose.

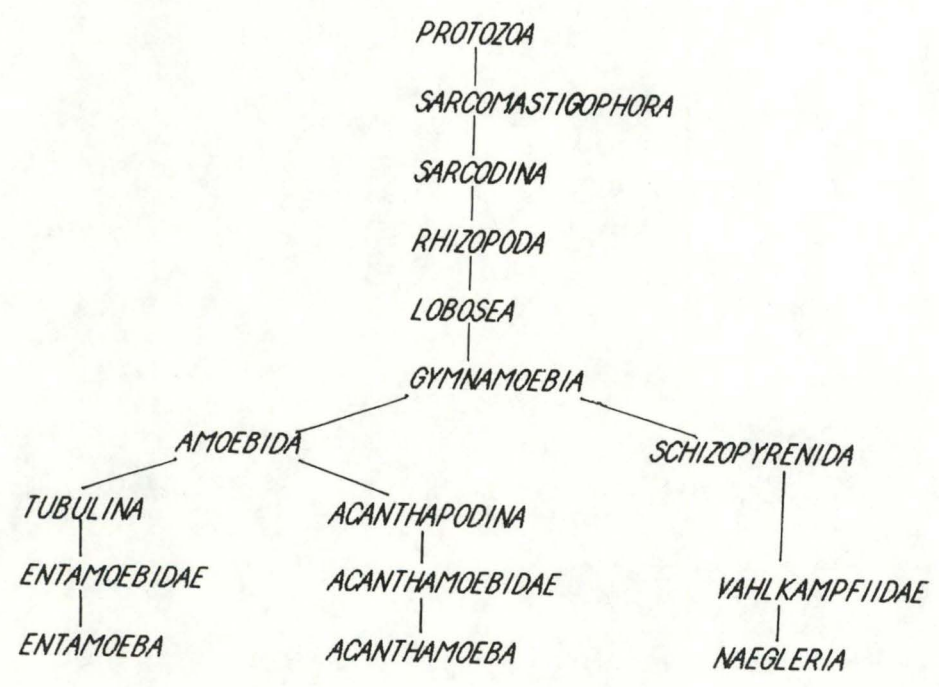
La super classe des rhizopodes comprend la classe des *Lobosae* (pseudopodes lobés) et la classe des *Arcapoxymixae* (pseudopodes réticulés).

Les amibes du genre *Naegleria* font partie de la sous-classe des *Gymnamoebia*. Ceux-ci se déplacent par un courant protoplasmique avec ou sans pseudopodes. On dit qu'ils se déplacent par pseudopodes si on considère une extrémité naissante à partir de la masse principale. Certains organismes avec des projections sub-pseudopodiales sont aussi classés parmi les *Gymnamoebia*. La présence d'un axopode ou d'un réticulopode exclu un organisme de cette sous-classe. Les *Gymnamoebia* sont hétérotrophes et aucun groupe ne contient de membres autotrophes. Beaucoup de ses organismes ne possèdent pas de stade flagellé, quoique certains en possèdent un transitoire. La plupart sont uninucléés, certains binucléés et très peu multinucléés. Ils peuvent produire des kystes.

Dans cette sous-classe, on distingue l'ordre des *Schizopyrenida* dans lequel la famille des *Vahlkampfiidae* contient les amibes du genre *Naegleria*, appelées aussi amibes *limax*. Elles se déplacent par des éruptions hyaloplasmiques hémisphériques. Elles sont uninucléées, leur division nucléaire est de type promitotique et elles possèdent des mitochondries. Tous les genres de cette famille possèdent un stade flagellé. Les amibes qui n'en possèdent pas sont classées dans le genre *Vahlkampfia*, mais comme il est difficile d'induire la transformation vers le stade flagellé, certaines espèces classées dans le genre *Vahlkampfia* pourraient appartenir à d'autres genres. Les amibes du genre *Naegleria* ont un stade flagellé avec deux flagelles de même longueur, on n'y remarque pas de cytotome et le noyau est antérieur. Le genre *Naegleria* contient certaines espèces pathogènes. Ces amibes possèdent aussi un stade kystique avec des pores (caractéristique du genre *Naegleria*).

On y distingue aussi l'ordre des *Amoebida*. Ses amibes sont uninucléées, possèdent aussi des mitochondries et ne montrent pas de courant cytoplasmique

Sous-règne  
Phylum  
Sous-phylum  
Super-classe  
Classe  
Sous-classe  
Ordre  
Sous-ordre  
Famille  
Genre



bidirectionnel. Leurs pseudopodes se présentent comme une série de prolongements filiformes. On ne connaît aucun stade flagellé.

## 1.2 Présentation du genre *Naegleria*.

SCHARDINGER en 1899 isola et identifia *Naegleria gruberi* à partir des selles d'un malade dysentérique. Considérée longtemps comme espèce type, ce n'est que récemment que quatre nouvelles espèces furent découvertes.

*Naegleria fowleri* (syn: *N. aerobia* (SINGH et al.,1970) ou *N. invades* (CHANG, 1971)) fut isolée en Australie par CARTER en 1970, à partir du liquide cébrospinal d'un patient décédé d'une MEAP. Cette amibe est l'agent étiologique de la MEAP; expérimentalement elle tue les animaux après instillation intranasale ou injection intracérébrale.

En 1973, WILLAERT et LE RAY isolèrent dans une piscine d'Anvers une amibe, *Naegleria jadini*, ayant la même morphologie que *Naegleria fowleri*, mais elle est non pathogène et ne supporte pas cette température.

En 1972, GRIFFIN proposa d'utiliser des températures de tolérance comme critère d'identification des amibes pathogènes et non pathogènes. En effet, *N.fowleri* pousse à 45°C, tandis que *N.gruberi* et *N.jadini* ne poussent pas à 45°C. Cependant, en utilisant les hautes températures DE JONCKHEERE et al en 1977 isolèrent une souche de *Naegleria* dans des eaux thermiques polluées. Cette souche non pathogène possède une structure de pores intermédiaire entre *N.gruberi* et *N.fowleri* et réagit avec des antisérum vis-à-vis de *N.fowleri* de la même façon qu'a l'égard de *Naegleria gruberi*. On l'appela *N.fowleri* non pathogène, séropositive, variant. Par des études plus approfondies on a différencié une nouvelle espèce. En effet, le noyau du trophozoïte est entouré d'une ou plusieurs couches de RER, qu'on ne retrouve pas chez *N.fowleri*. Ces résultats ont aussi été confirmés par des études d'immunoélectrophorèse et d'immunodiffusion. Cette amibe a été appelée *N. lovaniensis* (STEVENS A.R, DE JONCKHEERE J.F., WILLAERT E.,1980)

C'est en 1981 que DE JONCKHEERE décrivit *N. australiensis*, non pathogène pour la souris et ne réagissant pas avec l'antisérum de *N. fowleri*. Cette amibe ne pousse pas à 45°C, mais bien à 42°C. Récemment l'espèce fut divisée en deux sous-espèces dont l'une est très virulente pour la souris (comme *N.fowleri*). Cette sous-espèce possède les propriétés



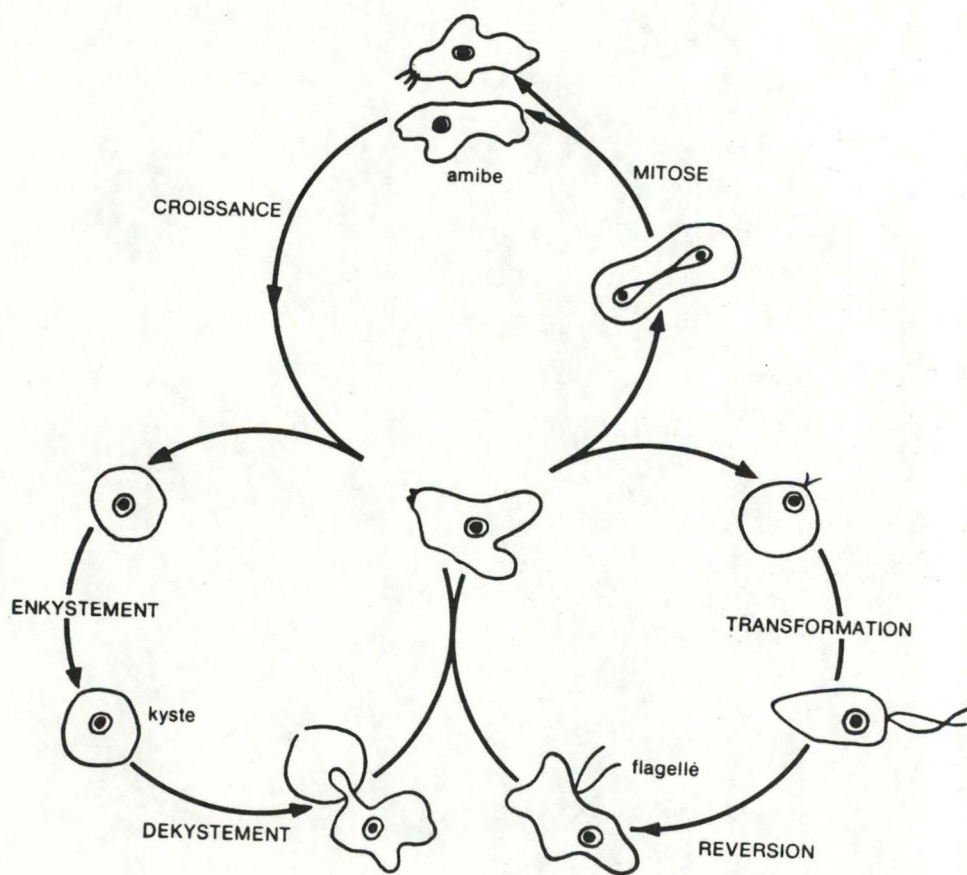


Fig.1.3 Représentation schématique du cycle de *Naegleria* (d'après C. Fulton (1970).

de l'espèce qui sont le maximum de température de croissance à 42°C et une réaction positive avec l'antisérum de *N. australiensis*. On l'appela *Naegleria australiensis italica*. L'autre espèce est nommée *Naegleria australiensis australiensis*.

### 1.3 Ultrastructure comparative des différentes espèces de Naegleria.

Les amibes du genre *Naegleria* se présentent sous trois états (Fig. 1.3) :

1. La forme amibienne, trophozoïte ou végétative.

Durant ce stade l'amibe se nourrit par endocytose, se reproduit par division binaire de type promitotique et se déplace par pseudopodes hyalins.

2. La forme kystique.

Lorsque les conditions du milieu sont hostiles à la survie du trophozoïte, celui-ci se transforme en un kyste de forme ronde.

3. La forme flagellée.

Le trophozoïte peut développer une forme flagellée à deux ou quatre flagelles. Ce stade est transitoire et non obligatoire.

#### 1.3.1 Observation en contraste de phase.

##### 1.3.1.1 La forme amibienne.

*Naegleria fowleri*, *N. gruberi* et *N. jadini* présentent un aspect général comparable (WILLAERT 1976). La forme irrégulière est due à la présence de pseudopodes. Le noyau entouré d'un halo clair, homogène, est une caractéristique constante (RONDANELLI

et al., 1987). L'amibe se déplace par émission de pseudopodes hyalins et projette parfois des prolongements cytoplasmiques diversément orientés.

Sous cette forme, CARTER (1970) a montré que *N. fowleri* se divisait par division de type promitotique, caractérisée par la persistance de la membrane nucléaire et la formation de masses polaires dérivées du nucléole. DAS et al. (1974) l'ont confirmé pour *N. jadini*, de même RAFALKO (1947) chez *N. gruberi*. Des mitoses avortées dues aux conditions artificielles du milieu axénique conduisent à des organismes plurinucléés.

L'endocytose décrite initialement par VAHLKAMPFE (1905), se déroule en plusieurs stades et ne se fait pas en un site spécifique contrairement aux ciliates et aux flagellates (RONDANELLI et al., 1987). Le protozoaire émet des pseudopodes qui entourent et engouffrent le matériel, ils fusionnent; une vacuole de phagocytose se forme (RONDANELLI et al., 1987).

#### 1.3.1.2 La forme kystique.

Elle constitue une forme de résistance quand les conditions du milieu sont hostiles à la survie de la forme végétative. Le processus d'enkystement est lent progressif et stimulé par la forme végétative produisant les molécules nécessaires pour l'organisation de la paroi (PRESTON et al., 1974).

En conditions artificielles, la formation de kyste est perturbée, en effet *Naegleria jadini* ne forme jamais de kyste en milieu axénique (WILLAERT, 1976). Ils sont sphériques, la paroi est très réfringente, lisse et dépourvue de pores. Le noyau présente un gros nucléole central bien visible. Certains kystes présentent jusqu'à sept noyaux (WILLAERT, 1976).

Les kystes de *Naegleria fowleri* n'induisent pas la MEAP, mais ils jouent un rôle important dans l'épidémiologie. En effet, leur paroi leur confère une résistance aux agents chimiques et physiques (DE JONCKHEERE et al., 1976), et ils sont capables d'utiliser les phénomènes atmosphériques pour se déplacer (LASMAN, 1982).

#### 1.3.1.3 La forme flagellée.

Elle est obtenue en condition expérimentale en rendant hypotonique le milieu contenant des formes végétatives, avec de l'eau distillée, ou avec la solution saline de

PAGE (1976).

Les changements morphologiques chez *Naegleria gruberi* ont été décrits par PRESTON et O'DELL en 1973:

- l'amibe interrompt ses mouvements.
- les grands organites prennent une position déterminée:  
Le noyau se stabilise antérieurement sous le corps basal flagellaire.
- le trophozoïte prend une apparence piriforme.
- des nouvelles organelles apparaissent (deux flagelles de même longueur , corps basal et rhizoplaste).

Pour *N. fowleri*, DINGLE et FULTON (1966), remarquent que le trophozoïte s'arrondit au lieu de s'allonger.

#### Conclusion.

On remarque donc que les caractères morphologiques observés en contraste de phase ne permettent pas de différencier les espèces de *Naegleria* entre elles.

### 1.3.2 Observation en microscopie électronique de la forme trophozoïte

#### 1.3.2.1 En microscopie à transmission.

##### La membrane.

La paroi cellulaire est constituée par une membrane unitaire (ROBERTSON, 1964), qui se déforme lors de l'endocytose ( JADIN J.B, 1971). Le trophozoïte émet des pseudopodes qui entourent et engouffrent le matériel. Ceux-ci fusionnent et une vacuole d'endocytose dont la membrane dérive de la membrane cellulaire se forme . Ce phagosome fusionnera avec un lysosome (RONDANELLI et al., 1987).

Le contour du trophozoïte est irrégulier, ce ci est dû à la présence de pseudopodes. Ces derniers sont formés d'un ectoplasme hyalin qui est le constituant principal du pseudopode et d'un endoplasme finement granuleux en continuité avec le cytoplasme

cellulaire. Celui-ci s'écoulera dans le pseudopode avec les organites.

Des études ont montré la présence d'amoebostome (JOHN et al.,1985) en forme d'aspirateur suceur pour la phagocytose . Cette structure a la capacité d'engouffrer des cellules de levure. Des coupes montrent qu'elles sont formées d'un matériel finement granuleux et qu'elles ne contiennent pas de vacuole alimentaire. Des micro-filaments ont pu être observés. Ces amoebostomes se trouvent chez les souches pathogènes de *Naegleria fowleri* et *Naegleria australiensis* et peuvent se trouver chez *N.gruberi*, *N.jadini* et *N. lovaniensis*.

#### Le noyau .

Celui de *Naegleria jadini* renferme un gros nucléole central proéminent. Le double feuillet de la membrane nucléaire est interrompu par des pores.

La membrane externe du noyau de *Naegleria fowleri*, *gruberi* et *jadini* est associée à des ribosomes (CAROSI et al. 1977, STEVENS et al. 1978).

STEVENS et al.(1980) observent chez *Naegleria lovaniensis* une citerne de RER entourant le noyau, ils remarquent aussi des extrusions de l'enveloppe nucléaire entourées de RER et contenant du matériel nucléaire finement granuleux semblable au nucléoplasme et ne contenant jamais de VLP. Des sections longitudinales et transversales de matériel extrudé, entouré de la membrane nucléaire et de la citerne de RER non dilatée, se trouvent dans les environs du noyau. L'espace entre la citerne de RER et la membrane nucléaire ne contient pas de ribosomes. Tant que le matériel extrudé est entouré de RER, il ne s'altère pas et le nucléoplasme reste granuleux.

#### Le système membranaire:

a. Le reticulum endoplasmique rugueux.

Toutes les espèces de *Naegleria* ont des segments de RER dispersés dans le cytoplasme ( STEVENS,1980).

Le RER de *Naegleria gruberi* est parfois associé aux mitochondries et aux globules lipidiques (SCHUSTER, 1975).

Chez *Naegleria jadini* le RER est réuni à la membrane nucléaire et il est associé aux mitochondries et aux globules lipidiques.

Le noyau de la souche type de *Naegleria lovaniensis* est entouré d'une seule couche discontinue de citernes aplaties de RER; d'autres souches montrent plusieurs couches (STEVENS et al. 1980). L'interruption de la citerne de R E R ne correspond pas avec les pores nucléaires.

Les noyaux de *Naegleria fowleri*, *jadini* et *gruberi* sont dépourvus de RER (CAROSI et al., 1977).

b. Le réticulum endoplasmique lisse.

Chez *Naegleria gruberi* il est très représenté.

c. L'appareil de Golgi.

On ne le rencontre pas chez *Naegleria jadini* (WILLAERT, 1976).

Différents auteurs comme VICKERMAN, (1962), SCHUSTER, (1963), MARTINEZ et al. (1971) et CAROSI (1974) déclarent n'avoir observé d'appareil de Golgi chez aucune espèce de *Naegleria*.

STEVENS et al. (1978) ont décrit chez *Naegleria lovaniensis* un composant lié aux membranes comme étant un Golgi primitif. Il n'est pas arrangé en couches parallèles de citernes et de vésicules. Ils remarquent des citernes et des vésicules souvent gonflées dispersées dans le cytoplasme.

Les organites cytoplasmiques.

a. Les mitochondries.

Elles sont l'organite cytoplasmique le plus abondant. Leur matrice est dense aux électrons et criblée de crêtes.

Chez les amibes de l'espèce *jadini*, elles sont en formes d'anneaux, d'haltères, ovalaires ou allongées.

*Naegleria gruberi* présente des mitochondries ovoïdes ou en haltères. On y remarque parfois un cristalloïde.

LASTOVICA (1975) note la présence de mitochondries surtout en forme d'haltères et parfois d'anneaux chez *Naegleria fowleri*.

Selon CAROSI et al. (1977), les mitochondries en forme d'haltères ne peuvent être considérées comme typiques de *Naegleria fowleri*, étant donné qu'on les observe chez *Naegleria jadini* et *gruberi*. De même que la présence de cristaux dans la matrice n'est pas spécifique de *Naegleria gruberi* ( RONDANELLI et al, 1987).

La forme des mitochondries ne permet donc pas de différencier les amibes entre elles , contrairement aux déclarations de VICKERMAN (1962).

#### b. Les vacuoles alimentaires.

SCHUSTER (1975) écrit que chez *Naegleria gruberi* elles sont de forme irrégulière, entourées d'une membrane simple, remplies de débris non identifiables, dispersées dans le cytoplasme.

Les amibes de l'espèce *N. lovaniensis* peuvent contenir des structures laminaires.

#### c. Les vacuoles pulsatiles.

Les amibes cultivées en milieu axénique ne contiennent pas de vacuoles pulsatiles (WILLAERT,1976).

Ses vacuoles sont entourées d'une membrane simple et leur contenu est transparent aux électrons.

Dans le cas de *Naegleria fowleri* (RONDANELLI et al., 1976), elles sont souvent entourées de mitochondries. Elles jouent un rôle dans les rythmes systo-diastoliques des contractions, des petites vacuoles s'agrègent donnant lieu à une grosse vacuole qui gonfle (diastole), ensuite la systole se déroule et le cycle reprend.

*Naegleria gruberi* exhibe des vacuoles pulsatiles en position antérieure uniquement dans la forme flagellée.

### Les inclusions cytoplasmiques.

#### a. Les globules lipidiques.

Ils sont très communs dans ce genre (VICKERMAN, 1962) et entourés d'une membrane simple ( SCHUSTER, 1963).

WILLAERT (1976 ) remarque chez *Naegleria jadini* un arrangement

typique de ses globules autour de la membrane nucléaire, mais ils ne sont pas toujours associés au RER.

SCHUSTER (1975) décrit la même distribution des globules lipidiques associés au RER autour du noyau, chez *Naegleria gruberi*. L'association circulaire du RER aux globules lipidiques est un marqueur important de *Naegleria fowleri* (LASTOVICA, 1975).

b. Les corps noirs liés aux membranes.

STEVENS et al. (1978) les retrouvent dans toutes les espèces de *Naegleria* décrites à cette date. Leur densité ne permet pas de les confondre avec des ribosomes. Leur rôle est inconnu et on les retrouve aussi dans les kystes.

c. Les " RER associated pleiomorphic inclusions".

Cette structure se rencontre uniquement chez *Naegleria australiensis*. La forme la plus simple est une citerne de RER dilatée contenant des granules fortement empaquetés. Ces derniers ressemblent à des ribosomes et la forme la plus typique est une citerne de RER occupée par de larges granules et des granules ressemblant à des ribosomes. Ensuite, la forme se complexifie une grande zone contenant des granules et des longues bandes de différentes épaisseurs denses aux électrons apparaissent. Des observations en microscopie électronique suggèrent le bourgeonnement de ses structures à partir des corps noirs liés aux membranes, mais il est difficile d'établir une relation avec ceux-ci. Elles pourraient avoir un lien avec la lyse étant donné qu'on en rencontre beaucoup chez les amibes en dégénérescence.

d. Les ribosomes.

Des ribosomes libres ou en rosette sont distribués dans le cytoplasme des espèces décrites à cette date (WILLAERT, 1976).

e. Le glycogène.

Il est distribué uniformément sous forme de particules  $\beta$  dans le cytoplasme (SCHUSTER, 1975).



f. Les Virus Like Particles (VLP).

La présence de structure ressemblant à des particules virales chez *Naegleria gruberi* fut mentionnée pour la première fois par SCHUSTER et DUNNEBACKE en 1971. Ses mêmes auteurs montrèrent en 1974 que le développement de ses VLP se réalise en deux étapes. La première est localisée dans le noyau. Les VLP apparaissent à partir d'un corps générateur; on trouve alors dans le nucléoplasme des particules de 100 nm de diamètre. Ces cellules infectées ont un nucléole modérément élargi et présentent dans leur cytoplasme des portions de fibrilles (microtubule like unit). On peut aussi voir des tubes au niveau des pores de la membrane nucléaire (SCHUSTER, 1969), qui sont des moyens de passage des VLP du noyau vers le cytoplasme. Ses tubes ont un diamètre de 10 nm et une longueur de 200 nm. Leur extrémité cytoplasmique s'ouvre dans une vésicule qui, durant un certain temps, peut contenir une VLP sans membrane qui commence alors son développement. La seconde étape est cytoplasmique. On remarque autour des VLP l'organisation d'un corps membranaire inhabituel semblable à une bactérie (bactérium like bodie) (SCHUSTER et DUNNEBACKE, 1971), qui sert à la transmission des VLP. Les VLP seront éjectés et repris par une autre amibe. Les conditions de cultures et, plus spécialement, la température influencent ces structures. En effet les hautes températures perturbent la formation des bactérium like bodies et on rencontre dans le cytoplasme des structures fibrillaires similaires à celles trouvées dans le noyau des cellules infectées. Des changements s'opèrent aussi au niveau du noyau. Les VLP peuvent perdre leur intégrité nucléaire. Le nucléole devient granuleux, les deux feuilletts de la membrane se séparent et l'espace inter-membranaire est occupé par des globules lipidiques. Ces modifications sont des préludes à la lyse. Le nombre de VLP peut aussi augmenter et s'associer sous forme de cristaalloïde. Le noyau peut présenter des portions fibrillaires plus larges, et des signes de dégénérescence.

Parallèlement à ses observations morphologiques, SCHUSTER et DUNNEBACKE en 1971, montrèrent l'effet cytopathogène sur culture de fibroblastes embryonnaires de poulets, d'un agent présent dans le lysat d'amibes; aux hautes températures cet effet disparaît. Mais on ne retrouve pas de V L P dans les cellules en dégénérescence, et d'autres lysats d'amibes *Naegleria* ne contenant pas de V L P ont un effet cytopathogène.

Les agents responsables de cet effet ne sont apparemment pas les V L P. Les VLP pourraient être la manifestation d'un agent infectieux non défini présent dans toutes les souches de *Naegleria*, ou alors leur rôle cytopathogène est peut être tout à fait irréel

(DUNNEBACKE et SCHUSTER, 1972).

Des V L P sont régulièrement rencontrées dans le cytoplasme de *Naegleria jadini* (WILLAERT, 1976), dans le noyau et le cytoplasme de *Naegleria fowleri* (LASTOVICA, 1974).

### 1.3.2.2 En microscopie à balayage.

La forme irrégulière du trophozoïte est due à la présence de pseudopodes et d'uropodes.

*Naegleria fowleri* présente des pseudopodes plus nombreux et plus larges que *Naegleria gruberi* (RONDANELLI et al., 1987).

La conformation des amoebostomes est une évagination dont la lisière est lisse ou rugueuse. Les préamoebostomes sont évaginés mais complètement fermés, ils évoluent vers un amoebostome ouvert (JOHN D. T et al., 1980).

### 1.3.3 Observation en microscopie électronique de la forme kystique.

#### 1.3.3.1 En microscopie à transmission.

##### 1.3.3.1.1 La paroi et les pores.

La paroi qui apparait uniforme en contraste de phase, est formée de deux parties: un endokyste fibrillaire et un exokyste granuleux séparés par un espace de 60 à 90 nm pour *Naegleria gruberi*. Elle a une épaisseur de 100 à 160 nm. La paroi des kystes de *Naegleria fowleri* et *jadini* est constituée d'un seul composant semblable à l'endokyste (SCHUSTER, 1975).

La paroi est régulièrement interrompue par des pores. L'endokyste et l'exokyste de *Naegleria gruberi* y fusionnent.

Les pores sont formés d'un bouchon de mucus et d'une plaque de matériel provenant de l'endokyste. La couche de mucus obturant les pores de *Naegleria fowleri* et *jadini* est plus fine que celle de *Naegleria gruberi* (SCHUSTER, 1975).

La paroi fine et la couche mince de mucus sont deux causes de moindre viabilité des kystes de *Naegleria fowleri* (CARTER et al. 1970).

Lors du désenkystement le matériel du bouchon se dissout et la paroi

devient plus fine ( SCHUSTER ,1963).

Différents auteurs ont étudié la dimension des kystes au sein d'une même espèce:

-Naegleria gruberi.

SCHARDINGER (1899):	de 14 $\mu\text{m}$ à 16 $\mu\text{m}$ .
PAGE (1967):	de 9,9 $\mu\text{m}$ à 14,3 $\mu\text{m}$ .
FULTON (1970):	de 8 $\mu\text{m}$ à 18 $\mu\text{m}$ .

-Naegleria fowleri.

CARTER (1970):	une moyenne de 9 $\mu\text{m}$ .
SINGH et DAS (1970):	dimensions variables
DUMA et al. (1971):	une moyenne de 10 $\mu\text{m}$ .

- Naegleria jadini.

WILLAERT (1976):	de 9 $\mu\text{m}$ à 18 $\mu\text{m}$
------------------	---------------------------------------

Pour comparer des études biométriques, celles-ci doivent être menées dans des conditions de culture identiques (SAYGI ,1971). En effet la taille du trophozoïte et donc celle du kyste varie suivant le milieu de culture.

#### 1.3.3.1.2 L'organisation interne du trophozoïte enkysté.

Le noyau:

Nettement apparent, présente des agrégats de chromatine chez les espèces *N. jadini* et *N. fowleri*. Une caractéristique de ce stade est la formation de tubules au niveau de la membrane nucléaire que l'on rencontre chez *Naegleria fowleri*, *N. Jadini* et *N. gruberi* (SCHUSTER, 1975).

Le système membranaire:

a. Le reticulum endoplasmique rugueux.

*Naegleria gruberi* présente des citernes souvent associées aux mitochondries et globules lipidiques.

L'association du R E R avec les mitochondries et les globules lipidiques chez les kystes vieillissants régresse et finalement le RER disparaît ( SCHUSTER, 1975).

Les organites cytoplasmiques:

a. Les mitochondries.

Leur conformation est comparable à celle de la forme trophozoïte. Dans les kystes matures la matrice des mitochondries est très dense aux électrons et les crêtes sont moins visibles. Les mitochondries des kystes âgés s'arrondissent .

b. Les autophagosomes.

Des autophagosomes en grand nombre, contenant des mitochondries comme principal constituant et du glycogène, sont un des marqueurs typiques de *Naegleria* (SCHUSTER F.L. et SVIHLA G., 1968).

c. Les vacuoles pulsatiles.

Les kystes de *Naegleria fowleri* et *gruberi* présentent un ensemble de petites vacuoles pulsatiles( MARTINEZ, 1981).

### 1.3.3.2 En microscopie à balayage.

L'observation des caractères morphologiques externes des kystes en microscopie à balayage tels que la surface des kystes, la fréquence des pores et leurs caractères morphologiques, peut servir de critère taxonomique pour séparer les différentes espèces de *Naegleria* et *Acanthamaeba* entre elles ( JADIN J.M. et al. ,1974).

Les kystes de toutes les espèces de *Naegleria* ont un aspect sphérique, parfois légèrement ovale. La surface est non plissée, lisse ou finement réticulée. Mais les kystes de *Naegleria gruberi* ont une paroi rugueuse.

On peut observer des pores dont la perforation est bien visible, cependant certains ont encore le bouchon.

Le nombre moyen de pores par kyste est de 7,2 pour *Naegleria gruberi* et de 1,6 pour *Naegleria fowleri* (JADIN J.M. et al., 1974). Les *Naegleria jadini* dont les kystes ressemblent à ceux de *Naegleria fowleri*, ont un nombre moyen de 1.2 pore ( WILLAERT et al., 1973). Mais SCHUSTER (1963), note que des pores peuvent être obturés par des débris.

Le bord des pores est lisse sauf ceux de *Naegleria gruberi* qui présentent une évagination (SINGH et DAS, 1970).

FULTON (1970), et LASTOVICA (1974), ont montré que chez *Naegleria gruberi* il existe des pores de sortie bien définis.

### 1.3.4 Observation en microscopie de la forme flagellée.

#### 1.3.4.1. En microscopie à transmission.

Ce type de microscopie a permis à SCHUSTER en 1963 de montrer que les flagelles, le corps basal et le rhizoplaste ( racine flagellaire), ne sont pas détectés dans le cytoplasme, c'est une structure *ex-novo*. Aucun centriole ou corps y ressemblant n'est rencontré dans la forme trophozoïte (FULTON et DINGLE ,1971).

Les flagelles de *Naegleria gruberi* ont une longueur de 7 à 17  $\mu\text{m}$  et de 0,3 à 0,5  $\mu\text{m}$  de large.

L'axonème central est formé de microtubules associés en un ensemble de 9+2 doublets. Les 9 doublets externes se continuent par le blépharoblaste (sous-unité interne). Tandis que les deux doublets internes s'insèrent en un disque dense aux électrons qui divise l'axonème du blépharoblaste. Celui-ci se trouve à l'apex cellulaire en dessous du

plasmalemme et est connecté par des microtubules avec le rhizoblaste qui est une structure fibreuse, insérée dans une évagination nucléaire de forme triangulaire de 50 à 250 nm de large et de 2 à 3  $\mu\text{m}$  de long.

En étudiant la transformation de *Naegleria gruberi*, RONDANELLI et al. (1987), remarquent que le trophozoïte prend une forme allongée, ensuite le blépharoblaste et le rhizoblaste apparaissent dans le cytoplasme, pour finalement produire les flagelles.

Les mécanismes biologiques qui interviennent dans l'élongation des flagelles ont été étudiés par FULTON et al. (1980). La configuration biochimique se réarrange donnant lieu à un nouveau R N A indispensable pour la synthèse de la tubuline des flagelles.

Aucune division n'a été observée à ce stade; il est éphémère et facilement réversible vers la forme trophozoïte en passant par un intermédiaire amoébo-flagellé.

#### 1.3.4.2. En microscopie à balayage.

Ce type de microscopie permet d'apprécier la morphologie externe du trophozoïte. Celui-ci prend une forme en cigare ou arrondie suivant les espèces, avec deux flagelles. Il ne forme plus de pseudopode.

### 1.3.5 Conclusions.

L'observation en contraste de phase ne permet pas de différencier les espèces de *Naegleria* entre elles.

L'étude de l'ultrastructure par la microscopie électronique à transmission différencie quatre espèces de *Naegleria* entre elles. *Naegleria fowleri* montre du reticulum endoplasmique rugueux associé de façon circulaire aux globules lipidiques. Les globules lipidiques de *Naegleria jadini* sont typiquement associés autour du noyau (CAROSI et al., 1976). Les extrusions nucléaires de *Naegleria lovaniensis* sont un caractère très remarquable. *Naegleria australiensis* se distingue par ses "RER associated pleiomorphic inclusions".

L'étude de la paroi et des pores kystiques en microscopie à balayage de *Naegleria gruberi* nous permet de la discerner des autres espèces de *Naegleria*. Sa paroi est rugueuse et les pores sont évaginés.

## 1.4 La méningo-encéphalite amibienne primitive.

### 1.4.1 Signes cliniques.

L'affection provoquée par les amibes du genre *Naegleria* chez l'homme se traduit par une méningo-encéphalite amibienne primitive (BUTT, 1966). Elle est foudroyante et se caractérise par un début avec céphalées intenses, vomissements, fièvre élevée et un signe de Kernig positif. 16h à 48 h après le début des premiers symptômes le patient perd conscience et l'emploi du respirateur s'impose. Finalement la mort survient entre 30h et 5 jours après la pénétration de l'agent pathogène par voie nasale (JADIN J.B, 1973).

Le liquide rachidien analysé est purulent et dépourvu de bactéries. Il contient un pourcentage élevé de polymorphonucléaires neutrophiles (90%) et parfois des globules rouges et des macrophages. Le tout est mélangé à de nombreuses amibes.

Le diagnostic de la MEAP requiert l'examen sur milieu de culture . L'identification de ces amibes est difficile, ce qui explique le peu de cas décrits. Les amibes sont souvent confondues avec des petits lymphocytes. L'examen du liquide céphalo-rachidien avec un microscope équipé d'une plaque chauffante permet de poser rapidement un diagnostic correct. En effet à 37°C les amibes bougent mais pas les lymphocytes.

### 1.4.2 Contamination.

Cette maladie est contractée presque exclusivement par des jeunes sujets ayant précédemment fréquenté des piscines chauffées (JADIN J.B et al., 1971), des lacs d'eau douce en été (WARHURST et al, 1980) ou s'étant baignés dans une source d'eau chaude. ANDERSON (1973), considère que dans les cas australiens l'eau à usage domestique amenée par pipe-line et maintenue à des températures élevées pendant un parcours de 250 km dans le désert, est à l'origine des MEAP.

Certains auteurs signalent que des patients souffraient de rhinopharyngite ou de trouble de l'olfaction avant de contracter la méningo-encéphalite amibienne primitive (HERMANNE, 1974).

*Naegleria fowleri*, agent de la MEAP, contamine l'organisme par voie nasale sous la forme trophozoïte ( MARTINEZ et al., 1973), ou sous la forme flagellée (SINGH et DAS, 1972). Ses mêmes auteurs considèrent que la forme flagellée est plus pathogène que la

forme amibienne et pensent que l'infection se fait sous la forme flagellée. Elle peut facilement entrer dans le nez avec de l'eau et se transformer ensuite en forme amibienne.

Les kystes ne sont pas pathogènes, mais lors du désenkystement la forme pathogène est libérée (JADIN J.B., 1973), LAWANDE et al. (1979) incriminent notamment l'inhalation des kystes par des vents de sable.

L'une ou l'autre forme se multipliant et traversant la muqueuse olfactive, traverse la lame criblée de l'ethmoïde et parvient au cerveau le long du trajet du nerf olfactif. Ils envahissent alors le tissu cérébral, provoquent une nécrose hémorragique des substances blanche et grise. Les protozoaires s'accumulent dans les espaces périvasculaires (endroit de moindre résistance). Le sang des capillaires favorise leur développement en apportant l'oxygène nécessaire à ses agents aérobies. On ne trouve que des trophozoïtes hématophages, jamais de kystes, alors que dans la méningo-encéphalite amibienne à *Acanthamoeba* les kystes sont présents (JADIN J.B., 1980). On ne rencontre pas d'amibe en dehors du cerveau et du nasopharynx, leur présence ailleurs avec possibilité de myocardite est secondaire (CARTER, 1972).

Diverses hypothèses tendent d'expliquer le pouvoir d'invasion des *Naegleria* au travers de la muqueuse olfactive et leur pouvoir de destruction du cerveau:

- la présence d'une protéine à activité cytopathogène (SCHUSTER et DUNNEBACKE, 1980).
- la phagocytose (BROWN, 1980).
- la production d'enzymes cytolytiques (CHANG, 1979).

### 1.4.3 Thérapeutique.

L'amphotéricine B est la seule substance active sur *Naegleria fowleri*. Elle est amoebocide *in vitro* et protège la souris (DAS et al., 1970). Elle agit sur la perméabilité sélective de la membrane cellulaire. A son contact, les amibes s'arrondissent et ne forment plus de pseudopodes (JOHN, 1982). Hormis deux cas de survie, son emploi a toujours été un échec, de plus cette substance est très toxique pour le sang, les reins et le système nerveux (APLEY et al., 1970).



### 1.5 Mécanisme de la virulence.

Le pouvoir pathogène n'est pas encore bien expliqué actuellement. De nombreux auteurs s'accordent pour déclarer le mécanisme de pathogénécité acquise (JADIN J.B., 1973). Plusieurs facteurs pourraient intervenir dans cette virulence, notamment la faculté du protozoaire à pénétrer et à s'adapter aux températures élevées des mammifères homéothermes, mais surtout le contact répété avec des antigènes humains (CERVA et al., 1968). En effet si le nombre d'usagers s'élève et dépasse la capacité d'épuration, l'eau s'enrichit de déchets humains issus des desquamations de la peau. Les antigènes qui en dérivent constituent une substance nutritive pour les amibes et facilitent le parasitisme car comme l'a dit CAPRON en 1968, un organisme ne peut s'implanter dans un autre que s'il y retrouve des antigènes communs.

Pour que la virulence d'une souche s'établisse dans une piscine il faut que l'eau soit très polluée et que la piscine soit très fréquentée ce qui assure le passage progressif des souches d'un sujet à l'autre (JADIN J.B., 1973).

### 1.6 Les amibes vecteurs de bactéries et de virus.

A côté de leur pouvoir pathogène, *Naegleria fowleri* étant l'agent de la méningo-encéphalite amibienne primitive, il se trouve de nombreuses espèces dont on ne peut sous-estimer le rôle étant donné qu'elles peuvent servir de véhicule aux bactéries et aux virus.

Si l'on met en présence des *Acanthamoeba culbertsoni* et *A. castellanii* avec des mycobactéries isolées chez des lépreux, comme *Mycobacterium obuense* et *M. balnae*, celles-ci les phagocytent et on les retrouve dans les vacuoles digestives en moins de deux heures. Les enzymes détruisent les bactéries mais un grand nombre résiste à l'action des lysosomes et se multiplient dans les phagosomes ou se conservent dans les kystes. Lorsque ses amibes arrivent dans le tube digestif, la plupart sont digérées par le suc digestif mais les bactéries et virus persistent et certaines se multiplient ou s'enkystent. JADIN J.B. et al., en 1977 ont isolé des amibes libres à partir de muqueuses nasales de lépreux notamment

*Vahlkampfia* contenant des *Mycobacterium vaccae obuense*.

Les amibes peuvent donc être des vecteurs de bactéries pathogènes et non pathogènes. On voit donc l'importance des amibes "*limax*" dans l'hygiène alimentaire et la nécessité du contrôle biologique des eaux d'alimentation si souvent contaminées par des protozoaires (JADIN J.B, 1980).

Les mêmes observations ont été réalisées chez *Entamoeba histolytica* (DIAMOND et al., 1972).

Des travaux de SCHUSTER (1969) et de DUNNEBACKE et SCHUSTER (1971) montrent que si on cultive des amibes "*limax*" en présence de cultures tissulaires contaminées par des virus, ceux-ci se multiplient dans les amibes et s'y conservent.

### **1.7 La dispersion des amibes.**

Les amibes *limax*, tout en étant pathogènes, ne sont pas obligatoirement parasites; on les rencontre régulièrement dans notre environnement. Elles vivent essentiellement dans l'eau, les sols humides et dans les matières en décomposition.

L'eau douce constitue le plus grand réservoir d'amibes libres. Plus elle contient de matière organique en suspension et surtout de bactéries, plus les amibes sont nombreuses (ALEXEIEFF, 1912). Leur distribution est cosmopolite. Le premier isolement de *Naegleria* pathogène dans l'environnement a été fait par NELSON en 1972 dans un plan d'eau où avait nagé une victime décédée d'une MEAP.

Par la suite d'autres *Naegleria* ont été mises en évidence dans l'eau de distribution de réseaux belges (JADIN et al., 1972) et australien (ANDERSON et JAMIESON, 1972).

Des isollements ont aussi été réalisés dans l'eau des piscines. Cette eau maintenue entre 25°C et 30°C, constitue le milieu le plus favorable pour la multiplication des amibes. Une eau chauffée, un apport de matière organique important suivant le taux de fréquentation, la présence d'échelles ou de structure poreuses en bois et une mauvaise filtration et chloration sont autant de facteurs favorables à l'enrichissement en bactéries et à la prolifération des amibes (CERVA, 1971).

Tous les auteurs s'accordent pour accuser l'eau des piscines comme

responsable des cas de méningo-encéphalite amibienne primitive. Il faut donc un contrôle sévère au niveau de la fréquentation et filtration (JADIN J.B., 1974).

Des amibes ont été isolées à partir de thermes en Angleterre (WARHURST et al., 1970), de lacs en Floride (WELLINGS et al., 1977), des effluents de centrales thermiques en Belgique (DE JONCKHEERE, 1981) et dans des eaux minérales (JADIN J.B., 1974).

ANDERSON et JAMIESON (1972) ont isolé cinq souches d'amibes sérologiquement apparentées à *Naegleria fowleri* à partir de l'eau d'aquarium de maison. JADIN et al.(1974) ont montré l'existence d'*Acanthamaeba* et de *Naegleria* dans des aquariums et dans l'intestin des poissons. Des amibes *limax* ont aussi été prélevées à partir de selles liquides d'enfants (JADIN J.B. et al., 1973). FRANCK et BOSCH (1972) en retrouvent chez les reptiles et les batraciens .

Certaines conditions doivent être réunies pour que les amibes *limax* se multiplient dans le tube digestif des animaux, par exemple pour un canard domestique, c'est seulement dans le caecum qu'on les retrouvent. CULBERTSON (1971) fait remarquer que le suc gastrique et la bile détruisent les trophozoïtes. Par contre les kystes résistent; ils peuvent traverser en restant intacts le tractus gastro-intestinal.

Des kystes se trouvent dans le sol, dès qu'ils sont en présence d'eau les trophozoïtes et les formes flagellées apparaissent.

KINGSTON et WARHURST (1969) ont isolé des *Hartmannella* et *Naegleria* dans l'air.

L'eau de mer ayant une concentration en chlorure de sodium proche de 40 pour mille *Naegleria fowleri* , qui ne supporte que des concentrations de 5 pour mille, ne s'y trouve pas. De nombreuses variétés de *Vahlkampfia* et *Acanthamaeba* peuvent s'y multiplier (JADIN J.B., 1974).

#### Conclusion.

La dispersion des amibes dans l'air, l'eau, le sol et l'intestin des mammifères, des animaux aquatiques et des oiseaux fait penser à un cycle allant de la terre ou de l'eau aux muqueuses nasales ou digestives. Soit qu'elles s'y multiplient et gagnent le cerveau (*Naegleria fowleri*) ou bien se transmettent d'un animal à un autre, d'un homme à l'autre et alors exaltent leur virulence (JADIN J.B, 1973).

### 1.8 Lutte.

Etant donné la présence des amibes dans l'eau il est nécessaire de l'épurer. Mais les amibes "*limax*" ne sont pas considérées comme un élément de pollution. Le contrôle biologique de l'eau, en plus du contrôle bactériologique, s'impose donc car des amibes pourraient renfermer des bactéries dans leurs vacuoles alimentaires et les libérer lors de leur lyse. JADIN J.B et al.,(1974) ont étudié l'action du chlore actif et de l'acide hypochloreux sur les amibes de l'eau. Les résultats ont montré qu'un minimum de 0.5 mg/ml d'acide hypochloreux est nécessaire pour empêcher le développement des amibes. Toutefois il est indispensable de maintenir le pH de l'eau entre 7.4 et 7.6. De plus la teneur en matière organique ne doit pas être trop élevée car le chlore s'y combine et le taux de chloramine (inactive vis.à.vis des amibes) augmente. Le fer et le manganèse contenus dans l'eau rendent l'action du chlore malaisée en les fixant (Cox, 1967).

L'emploi judicieux du chlore et de ses dérivés doit être prescrit en association avec une filtration. Il faut de préférence utiliser des filtres à diatomées (JADIN J.B., 1973).

## Chapitre 2 : Matériel et méthodes.

### 2.1 Les protozoaires.

Au cours de ce travail nous avons utilisé deux souches de *Naegleria lovaniensis* fournies par le Dr Sc. J. DE JONCKHEERE de l'Institut d'Hygiène et d'Épidémiologie de l'État à Bruxelles. La première souche étudiée est la souche type ( Aq/9/ 1/45D). Elle fut isolée par le Dr Sc. De Jonckheere à partir d'échantillon d'eau d'aquarium belge. Cette souche occupe, d'un point de vue immunologique, une position intermédiaire entre *Naegleria fowleri* et *Naegleria gruberi* . Elle croît axéniquement sur milieu SCGYEM et forme des kystes. Elle est non pathogène pour la souris malgré ses relations étroites avec *Naegleria fowleri*, notamment au niveau écologique. Toutes les tentatives pour la rendre pathogène ont échouées. Sa température maximum de croissance est de 45°C et elle s'agglutine par réaction avec la Con A. On retrouve aussi un effet cytopathogène sur culture cellulaire. La seconde souche utilisée est une souche mexicaine (5M11(50)42) provenant du Dr. Sc. RIVER (Univ. Mexico).

### 2.2 Entretien des souches.

#### 2.2.1 Boîtes de culture.

Les amibes sont cultivées pour l'entretien des souches et le départ des cultures massives dans des tubes stériles à fond conique de 12 ml en polystyrène, à bouchon à vis et disposés sur des portoirs inclinés.

Des flacons stériles, rectangulaires, horizontaux de 250 ml. en polystyrène à bouchon à vis sont utilisés pour la culture en masse.

### 2.2.2 Milieu de culture.

Les deux souches sont maintenues dans une étuve à 27°C dans un milieu liquide axénique contenant du Sérum de veau, de la Caséine, du Glucose et de l'Extrait de levure (SCGYEM),(DE JONCKHEERE, 1977).

#### Composition du milieu axénique liquide:

**Solution 1:** 10 g de caséine purifiée.  
1.325 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

dans 800ml d'eau distillée.

**Solution 2:** 2.5 g de glucose  
0,8 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

dans 80 ml d'eau distillée.

Les solutions 1 et 2 sont autoclavées durant 20 minutes à 120°C.

**Solution 3:** 5 g d'extrait de levure.  
0,2g sulfate de streptomycine .  
200,000 U.I de pénicilline.

Stérilisé sur filtre Seitz.

**Solution 4:** 100 ml de Sérum de veau foetal stérile.

Ces quatre solutions sont mélangées dans un vase de Erlenmeyer stérile et distribuées par 3ml dans des tubes et par 50 ml dans des bouteilles de culture.

### 2.2.3 Repiquage des souches.

Le milieu est repiqué tous les quatre à cinq jours suivant l'abondance de la culture. Pour cela 1 ml de milieu contenant des amibes est prélevé avec une pipette Pasteur stérile dans le fond du tube et inoculé dans 3 ml de milieu neuf. Une goutte de cet *inoculum* est mise entre lame et lamelle pour en vérifier la composition et la stérilité.

#### 2.2.4 Mise au point des techniques de culture.

Pour combattre la contamination par des levures (*Candida albicans*) nous avons ajouté au milieu 0,2 ml de miconazole 10 % . Après 12 heures d'activité, nous filtrons le milieu sur membrane filtrante dont le diamètre moyen des pores est de 1,2  $\mu\text{m}$ . Le filtre contenant les colonies amibiennes est déposé durant 48 heures sur un milieu solide en boîte de Pétri. Ensuite 3 ml de milieu de culture sont versés dans les boîtes et, après légère agitation, le milieu contenant les amibes en suspension est récupéré. L'ensemble des manipulations est réalisé sous conditions stériles.

##### Composition du milieu solide:

10 g de bacto-casitone.  
0,5 g de glucose.  
7,5 g d'agar.  
500 ml d'eau bidistillée.  
pH: 7,0

La solution est stérilisée durant 20 minutes à 120°C et répartie par 5 ml dans des boîtes de Pétri.

#### 2.3 Etude des amibes en microscopie à contraste phase.

Une goutte de milieu de culture est déposée entre lame et lamelle et observée à l'aide du microscope à contraste de phase ( Zeiss) au grossissement de 40 fois ou de 100 fois.

## 2.4 Etude des amibes en microscopie électronique.

### 2.4.1 En microscopie à transmission.

Un culot de 3 ml de milieu de culture contenant les amibes est obtenu par centrifugation dans des tubes à fond conique durant 30 minutes à 2000 RPM.

Fixation: Les culots sont réunis dans des microtubes et sont microfugés durant 5 minutes. Ils sont ensuite fixés dans 0,5 ml de glutaraldéhyde à 2.5% dans du tampon phosphate 0.1M, pH 7.2, durant 2h30 à 4°C.

Lavage n°1: Dans du tampon phosphate 0.1 M, sucrose 0.18 M à pH 7,2, durant 3 fois 10 minutes à 4°C.

Post-fixation: Réalisée dans du tétr oxyde d'osmium 1% dans du tampon phosphate 0.5 M à pH 7.2, durant 1 heure à 4°C.

Lavage n°2: Les culots sont à nouveau lavés dans du tampon phosphate 0.15 M à pH 7.2, durant 1 heure à 4°C.

Déshydratation: Ils sont ensuite déshydratés par passages successifs dans des bains d'alcool de concentrations croissantes.

Alcool 50°: 3 X 10' à 4°C.

Alcool 70°: 3 X 10' à 4°C.

Alcool 90°: 3 X 20' à 4°C.

Alcool 100°: 2 X 10' à température du laboratoire.

Inclusion: Dans de l'oxyde de propylène 3 fois 10 minutes, puis dans un mélange oxyde de propylène/épon durant 2 fois 15 minutes. Le tout est placé dans l'étuve à:

37°C durant 12 heures

45°C durant 24 heures

60°C durant 72 heures.



Coloration: Les coupes semi-fines sont colorées au bleu de toluidine et les coupes ultrafines destinées à la microscopie électronique sont contrastées à l'acétate d'uranyl et au citrate de plomb selon la méthode de MILLONIG (1961) et de REYNOLDS (1963).

Observation: Les grilles sont examinées au microscope électronique à transmission Philips EM 301 sous une différence de potentiel de 60 KV.

#### 2.4.2 En microscopie électronique à balayage.

Les culots sont préparés, microfugés et fixés de la même façon que pour la microscopie électronique à transmission.

Déshydratation: Elle est réalisée par passages dans des concentrations croissantes d'éthanol, puis dans l'acétone 100%.

Ethanol 50°:	1 X 1 h.
Ethanol 70°:	1 X 1 h.
Ethanol 90°:	1 X 1 h.
Ethanol 100°:	1 X 1 h.
Acétone 100%:	2 X 1 h, puis dans le CO <sub>2</sub> liquide.

Déssiccation: Cette dernière opération se fait par l'intermédiaire de l'appareil à point critique. Les cellules à étudier sont imbibées d'acétone et, peu après, du CO<sub>2</sub> liquide prendra la place de cet acétone. Ensuite lorsque l'enceinte de l'appareil est brusquement chauffée, le CO<sub>2</sub> passe en phase gazeuse et disparaît des structures cellulaires dont les parois sont bien rigides.

Ombrage: Les échantillons sont recouverts d'une fine couche d'or par évaporation à l'aide d'un appareil Balzer.

Observation: Examen des spécimens au microscope électronique à balayage JEOL JSM 35.

## 2.5 Transformation des amibes en forme flagellée.

Un culot de 3ml de milieu de culture est réalisé par centrifugation à 2000 RPM durant 30 minutes. Le surnageant est centrifugé dans les mêmes conditions et les culots sont récupérés. Ils sont resuspendus dans 3 ml d'eau distillée ou de solution saline de PAGE pour une durée de 2 à 4 heures à 27°C.

### Solution de PAGE:

1.20 g	de NaCl	dans 100 ml d'eau distillée.
0.04 g	de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ .	dans 100 ml d'eau distillée.
0.04 g	de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ .	dans 100 ml d'eau distillée.
1.42 g	de $Na_2HPO_4$ .	dans 100 ml d'eau distillée.
1.36 g	de $KH_2PO_4$ .	dans 100 ml d'eau distillée.

Prendre 10 ml de chaque solution et porter le volume à 1 litre.

Après 2 à 4 heures les amibes se transforment. Un culot est alors réalisé et traité de la même façon que précédemment.

## 2.6 Transformation des trophozoïtes en forme kystique.

Nous avons aussi utilisé le milieu de culture axénique liquide (SCGYEM) mais en remplaçant la caséine purifiée par de la peptone caséine.

## CHAPITRE 3. RESULTATS.

### 3.1 Observations en microscopie optique.

#### 3.1.1 De la forme trophozoïte.

Le contour cellulaire du trophozoïte est très irrégulier, l'amibe émet pour se déplacer des larges pseudopodes hyalins dans lesquels s'écoulent les organites; elle forme aussi parfois des petits pseudopodes diversément orientés.

Le noyau est l'organite cytoplasmique le plus apparent en microscopie à contraste de phase. On aperçoit de nombreuses granulations et des structures vacuolaires qui se déplacent continuellement. Les nucléoles des deux souches sont ronds alors que celui de la souche mexicaine devrait être rectangulaire ou en forme d'anneau (DE JONCKHEERE, non publié).

### 3.1.2 De la forme kystique.

On obtient des kystes en grand nombre en plaçant les trophozoïtes dans un milieu nutritif défavorable. On observe aussi la formation spontanée de kystes en milieu axénique.

Les kystes sont sphériques, leur paroi est très réfringente. On ne distingue pas de pore. Le noyau paraît clairement, les kystes sont parfois multinucléés (jusque trois noyaux).

### 3.1.3 De la forme flagellée.

C'est en plaçant des formes trophozoïtes ou kystiques dans un milieu hypotonique que nous avons obtenu des formes flagellées. Les kystes placés dans de bonnes conditions se désenkystent et des changements morphologiques s'opèrent au niveau des trophozoïtes.

1. Stabilisation des trophozoïtes et de leurs organites.
2. La forme amibienne s'allonge. On remarque une grosse vacuole contractile en position postérieure, et le noyau en position antérieure.
3. 2 à 4 flagelles antérieurs de même longueur apparaissent animés de mouvements.

Cette transformation se déroule durant 2h à 3h 30.

Ce stade est transitoire, et une réversion s'opère par la suite.

#### 4. Réversion:

Le flagellé perd sa conformation allongée et retrouve sa forme amibienne. Les flagelles sont toujours présents. On nomme cette étape le stade amoébo-flagellé

5. Les flagelles disparaissent et les mouvements amiboïdes reprennent.

## 3.2 Observations en microscopie électronique.

### 3.2.1 De la forme trophozoïte de *Naegleria lovaniensis* souche belge (S.b.).

#### 3.2.1.1 En microscopie à transmission.

##### La paroi.

Le trophozoïte est délimité par une membrane cellulaire, celle-ci est déformée par l'émission régulière de pseudopodes nécessaires au déplacement de l'amibe. Ils sont émis à partir de la masse principale de l'amibe et s'en distinguent par un étranglement. Dans ces pseudopodes se trouvent surtout des mitochondries et des éléments de l'appareil de GOLGI. Par la suite le reste du contenu cytoplasmique s'y écoulera, Fig 3.2.1.1.2, Fig 3.2.1.1.9 et Fig 3.2.1.1.13. Un uropode indique la partie postérieure par rapport à la direction de propagation, son cytoplasme est dépourvu de tout organite cytoplasmique. Fig 3.2.1.1.1

##### Le noyau.

Il est irrégulièrement rond, sa membrane est interrompue par des nombreux pores (la membrane montre des épaisissements) et il renferme un nucléole proéminent, Fig 3.2.1.1.1, Fig 3.2.1.1.2, Fig 3.2.1.1.3, Fig 3.2.1.1.4, Fig 3.2.1.1.6 et Fig 3.2.1.1.13

Le noyau est entouré par une couche discontinue de RER (Fig 3.2.1.1.1, Fig 3.2.1.1.2 et Fig 3.2.1.1.4) ou par des ribosomes libres, Fig 3.2.1.1.3 et Fig 3.2.1.1.13.

Régulièrement, des évaginations de sa membrane entourées de RER s'étendent dans le cytoplasme. Ces extrusions nucléaires ne coïncident pas avec les pores du noyau.

### Le système membranaire.

#### a. Le réticulum endoplasmique rugueux.

Des fragments de citernes de RER sont dispersés dans le cytoplasme, Fig 3.2.1.1.5 . Ils sont fréquemment associés aux mitochondries et aux globules lipidiques, Fig 3.2.1.1.5, Fig 3.2.1.1.10, Fig 3.2.1.1.11, Fig 3.2.1.1.13 et Fig 3.2.1.1.14 .

#### b. L'appareil de GOLGI.

Le cytoplasme des amibes renferme un appareil de GOLGI soit rudimentaire, il est alors formé de tubules et de vésicules dilatées, dispersées dans le cytoplasme, Fig 3.2.1.1.4, Fig 3.2.1.1.8 et Fig 3.2.1.1.9; soit assez développé, il est constitué dans ce cas d'un empilement de saccules et de vésicules situées aux abords du noyau, Fig 3.2.1.1.6 .

### Les organites cytoplasmiques.

#### a. Les mitochondries.

Les mitochondries sont les organites cytoplasmiques les plus abondants. Elles sont réparties aléatoirement dans le cytoplasme, Fig 3.2.1.1.1 et Fig 3.2.1.1.2 .

Leur conformation est ronde (Fig 3.2.1.1.3, Fig 3.2.1.1.5, Fig 3.2.1.1.6, Fig 3.2.1.1.7, Fig 3.2.1.1.8, fig 3.2.1.1.9, Fig 3.2.1.1.10 , Fig 3.2.1.1.12, Fig 3.2.1.1.13, Fig 3.2.1.1.14), allongée (Fig 3.2.1.1.4, Fig 3.2.1.1.6, Fig 3.2.1.1.8, Fig 3.2.1.1.9, Fig 3.2.1.1.12, Fig 3.2.1.1.13), ou en forme d'haltère (Fig 3.2.1.1.4 et Fig 3.2.1.1.9). Des mitochondries en forme d'anneaux entourant des débris de vacuoles alimentaires se retrouvent fréquemment, Fig 3.2.1.1.8 et Fig 3.2.1.1.12. Leur matrice est dense aux électrons et est pourvue de crêtes distribuées au hasard. La section d'une partie de cytoplasme nous a permis d'observer de mitochondries typiques d'une amibe désenkystée , leur matrice est très dense aux électrons et les crêtes ne sont pas visibles (Fig 3.2.1.1.7).

b. Les vacuoles alimentaires.

Elles sont de grandes tailles et remplies de débris denses aux électrons provenant de l'endocytose d'éléments du milieu de culture ou de la lyse d'autres amibes. Leur membrane est analogue à la membrane plasmique dont elle dérivent, Fig 3.2.1.1.1, Fig 3.2.1.1.2, Fig 3.2.1.1.3, Fig 3.2.1.1.4, Fig 3.2.1.1.5, Fig 3.2.1.1.6, Fig 3.2.1.1.8, Fig 3.2.1.1.9, Fig 3.2.1.1.10, Fig 3.2.1.1.11, Fig 3.2.1.1.12, Fig 3.2.1.1.13.

c. Les vacuoles pulsatiles.

Nous n'en avons pas rencontré chez les amibes cultivées en milieu axénique.

Les inclusions cytoplasmiques.

a. Les globules lipidiques.

Ils sont très nombreux, dispersés dans le cytoplasme et souvent associés avec du RER. Ils sont délimités par une membrane, Fig 3.2.1.1.4, Fig 3.2.1.1.11, Fig 3.2.1.1.12.

b. Les figures 3.2.1.1.6 et 3.2.1.1.12 nous montrent beaucoup de corps noirs.

c. Les virus-like-particles, et les structures associées.

Beaucoup de VLP sont dispersés dans le cytoplasme. Le core dense est entouré d'une membrane lisse ou hérissée de pics, Fig 3.2.1.1.13, Fig 3.2.1.1.14. Le nucléoplasme en contient aussi; ces VLP ne sont pas encore entourés d'une membrane.

Le nucléole de ces amibes est bien défini, Fig 3.2.1.1.1 et Fig 3.2.1.1.4 .



d. Les macrobodies.

Leur contenu est dense aux électrons. Aucune membrane apparente ne les délimite, leur taille est variable et ils sont dispersés dans le cytoplasme , Fig 3.2.1.1.3, Fig 3.2.1.1.5, Fig 3.2.1.1.13.

e. Les autophagosomes.

Une section de cytoplasme passe par un autophagosome qui comprend des mitochondries et des segments de RER, Fig 3.2.1.1.11 .

f. Des structures laminaires.

Ce sont des structures inhabituelles qui renferment un élément laminaire, Fig 3.2.1.1.12.

g. Les ribosomes.

De très nombreux ribosomes libres ou en rosette sont dispersés dans tout le cytoplasme.

3.2.1.2 En microscopie à balayage.

La paroi du trophozoïte montre de nombreux replis, l'amibe est de forme allongée ou déformée par des pseudopodes, Fig 3.2.1.2.1 et Fig 3.2.1.2.2 .

Une culture contaminée par des bactéries et des levures a été fixée pour la microscopie électronique à balayage. On peut observer des amibes arrondies montrant des amoebostomes. Le bord de l'évagination est lisse. De nombreuses bactéries ou levures sont accolées à la paroi, Fig 3.2.1.2.3 .

### 3.2.2 De la forme trophozoïte de *Nae.gleria lovaniensis* souche mexicaine (S.m).

#### 3.2.2.1 En microscopie électronique à transmission.

##### La paroi.

Le trophozoïte est aussi entouré par une paroi au contour irrégulier. L'amibe émet des pseudopodes séparés du corps par un étranglement et referme des mitochondries et les constituants de l'appareil de GOLGI. La direction de propagation nous est indiquée par l'uropode qui se trouve dans la partie postérieure. Le cytoplasme de l'uropode ainsi que celui qui lui est adjacent sont dépourvus de tout organite cytoplasmique. L'orientation de déplacement nous est ainsi renseignée par le rassemblement des organites intracellulaires dans une hémisphère de l'amibe , Fig 3.2.2.1.1, Fig 3.2.2.1.2, et Fig 3.2.2.1.3 .

##### Le noyau.

Structurellement identique à celui de la souche belge, il est entouré d'une citerne non dilatée de RER, Fig 3.2.2.1.1, Fig 3.2.2.1.2, Fig 3.2.2.1.3 et Fig 3.2.2.1.4. L'impression qui se dégage est la présence chez la souche mexicaine d'extrusions nucléaires en plus grand nombre que pour la souche type. De nombreuses sections circulaires et longitudinales de ces extrusions se déployant dans le cytoplasme s'y rencontrent. Elles sont entourées de la membrane nucléaire et de la citerne non dilatée de RER. Elles contiennent du matériel finement granuleux analogue au nucléoplasme, Fig 3.2.2.1.1, Fig 3.2.2.1.2, Fig 3.2.2.1.4 et Fig 3.2.2.1.5 .

##### Le système membranaire.

###### a. Le réticulum endoplasmique rugueux.

Des fragments de citerne aplatie apparemment plus longs que ceux de la

souche belge sont dispersés parmi les organites cytoplasmiques ou associés aux mitochondries et aux globules lipidiques, Fig 3.2.2.1.1, Fig 3.2.2.1.3, Fig 3.2.2.1.4, Fig 3.2.2.1.5, Fig 3.2.2.1.6, Fig 3.2.2.1.8.

b. L'appareil de GOLGI.

L'appareil de GOLGI est très rudimentaire. Il est formé de tubules et de vésicules dilatés, disposés çà et là dans le cytoplasme, Fig 3.2.2.1.6, Fig 3.2.2.1.7 .

Les organites cytoplasmiques.

a. Les mitochondries et les vacuoles pulsatiles.

Les mitochondries Fig 3.2.2.1.1, Fig 3.2.2.1.3, Fig 3.2.2.1.5, Fig 3.2.2.1.6, Fig 3.2.2.1.7, Fig 3.2.2.1.8 et les vacuoles alimentaires Fig 3.2.2.1.7 ont les mêmes caractéristiques que la souche belge.

b. Les vacuoles pulsatiles.

Les amibes cultivées en milieu axénique ne contiennent pas de vacuoles pulsatiles. Les trophozoïtes placés en milieu hypotonique en présentent plusieurs. Leur contenu est transparent aux électrons. Elles sont dispersées dans le cytoplasme et les mitochondries ne les entourent pas, Fig 3.2.2.1.1 .

Les inclusions cytoplasmiques.

a. Les globules lipidiques.

Fig 3.2.2.1.1, Fig 3.2.2.1.8 . Rien à signaler de différent par rapport à la souche belge.

b. De nombreux corps noirs s'observent à la figure 3.2.2.1.8.

c. Les virus-like-particles (VLP) et les structures associées.

De nombreuses VLP au core dense délimité par une membrane ont une distribution cytoplasmique, Fig 3.2.2.1.6, Fig 3.2.2.1.8 .

Nous remarquons des structures fibrillaires intranucléaires et intracytoplasmiques, Fig 3.2.2.1.4 .

Un corps générateur se rencontre dans le nucléoplasme de certaines amibes. C'est une structure granuleuse constituée de contours et de replis et qui occupe une grande place dans le nucléoplasme. Elle est moyennement dense aux électrons, 3.2.2.1.1 , Fig 3.2.2.1.2 et Fig 3.2.2.1.3.

d. Les macrobodies, Fig 3.2.2.1.5 et les ribosomes ne diffèrent en rien de la souche belge.

### 3.2.2.2 En microscopie à balayage.

La paroi de l'amibe est plissée et déformée par de nombreux pseudopodes. Les protozoaires prennent aussi des formes allongées. Les uropodes opposés à la direction de propagation sont bien visibles, Fig 3.2.2.2.1 et Fig 3.2.2.2.2 .

## 3.2.3 De la forme kystique de Naegleria lovaniensis souche belge (S.b).

### 3.2.3.1 En microscopie à transmission.

En milieu axénique la souche mexicaine forme spontanément des kystes en nombre plus important que la souche belge.

### La paroi.

Les kystes sont ronds ou parfois légèrement ovales. Leur paroi est très dense aux électrons. Elle est constituée de deux parties, l'endokyste fibrillaire et l'exokyste granuleux. Ceux-ci sont étroitement accolés ( Fig 3.2.3.1.1, Fig 3.2.3.1.2, Fig 3.2.3.1.3, Fig 3.2.3.1.4 ). La paroi est interrompue par des pores. A l'endroit de ceux-ci l'endokyste et l'exokyste montrent une petite évagination et les deux parties y fusionnent (Fig 3.2.3.1.1 et Fig 3.2.3.1.4 ). Les pores sont obturés par un bouchon de mucus, Fig 3.2.3.1.1 .

### Maturation du kyste.

#### a. Kyste jeune.

La membrane du trophozoïte est accolée à la paroi et l'espace kystique est très petit, Fig 3.2.3.1.1, Fig 3.2.3.1.2 et Fig 3.2.3.1.3 .

Le noyau est bien représenté et le nucléole est proéminent. Sa membrane est entourée de ribosomes et forme des canaux qui s'allongent dans le cytoplasme, Fig 3.2.3.1.3 .

Le RER s'étend sous forme de longs rubans et se localise de façon très proche des mitochondries et des globules lipidiques, Fig 3.2.3.1.2 et Fig 3.2.3.1.3 .

Des mitochondries de forme rondes, en haltères, ou allongées sont souvent associées au RER Fig 3.2.3.1.1, Fig 3.2.3.1.2 et Fig 3.2.3.1.3

Des globules lipidiques sont éparpillés dans le cytoplasme ou rassemblés en amas, Fig 3.2.3.1.1, Fig 3.2.3.1.2 et Fig 3.2.3.1.3 .

On retrouve quelques vacuoles alimentaires ( Fig 3.2.3.1.1 et Fig 3.2.3.1.2) et de nombreuses vacuoles pulsatiles, Fig 3.2.3.1.1, Fig 3.2.3.1.2 et Fig 3.2.3.1.3 .

Dans le cytoplasme, sous le pore, nous observons du matériel mucoïde Fig 3.2.3.1. .

#### b. Kyste vieux.

Le trophozoïte est tout à fait rétracté dans le kyste et l'espace kystique

est très grand Fig 3.2.3.1.4.

Le nombre d'organites cytoplasmiques diminue et leur association avec le RER régresse Fig 3.2.3.1.4.

Les mitochondries s'arrondissent et les globules lipidiques fusionnent Fig 3.2.3.1.4.

### 3.2.3.2 En microscopie à balayage.

#### Surface du kyste.

La paroi est non plissée est peu rugueuse.

Les kystes sont ronds ou légèrement ovoïdes.

#### Le bord des pores.

Lisse sans évagination.

#### Nombre moyen de pores.

1 à 4 pores.

Fig 3.2.3.2.1 .

### 3.2.4 De la forme kystique de *Naegleria lovaniensis* souche mexicaine(S.m).

#### 3.2.4.1 En microscopie à transmission.

#### La paroi.

Mêmes caractéristique que pour la souche belge, Fig 3.2.4.1.2, Fig 3.2.4.1.4, Fig 3.2.4.1.7, Fig 3.2.4.1.8, Fig 3.2.4.1.9

### Le pore.

Le pore est obturé par un bouchon de mucus réticulé ou finement granuleux et par une plaque de matériel provenant de l'endokyste, Fig 3.2.4.1.1, Fig 3.2.4.1.2, Fig 3.2.4.1.3, Fig 3.2.4.1.7, Fig 3.2.4.1.8 .

Suivant le degré de maturation du kyste, ces constituants ne se rencontrent pas toujours en même temps. Du matériel mucoïde se trouve parfois dans le cytoplasme sous la paroi, Fig 3.2.4.1.1 et Fig 3.2.4.1 4 .

### Morphologie du trophozoïte enkysté.

#### a. Le noyau.

Il est encerclé par des citernes de RER ou par des ribosomes. Sa morphologie est identique à celle de la forme amibienne. Mais il ne montre plus d'extrusion nucléaire. La membrane nucléaire forme des canaux. Des sections transversales et longitudinales de ses canaux s'observent dans le cytoplasme des kystes jeunes. Fig 3.2.4.1.4 et Fig 3.2.4.1.5 .

#### b. Les organites cytoplasmiques.

Nous retrouvons tous les organites cytoplasmiques présents dans la forme amibienne mais suivant le degré de maturation du kyste nous remarquons une variation de la morphologie des organites.

Le cytoplasme et le nucléoplasme des amibes enkystées renferme des VLP, Fig 3.2.4.1.1, Fig 3.2.4.1.4, et Fig 3.2.4.1.7. Une structure fibrillaire s'observe dans le noyau d'un kyste, Fig 3.2.4.1.4 .

Les macrobodies sont parfois présents en grand nombre et peuvent montrer une organisation sous forme de cristal, Fig 3.2.4.1.6.

c. Les organites cytoplasmiques propres aux formes kystiques

- Les vacuoles pulsatiles.

C'est un ensemble de petites vacuoles pulsatiles faisant partie du complexe vacuolaire. Leur contenu transparent est entouré d'une membrane, Fig 3.2.4.1.4 .

- Les autophagosomes.

Ils sont fréquemment rencontrés chez les amibes enkystées, Fig 3.2.4.1.7.

Maturation du kyste.

a. Kystes jeunes.

La membrane du trophozoïte est accolée à la paroi du kyste, Fig 3.2.4.1.1, Fig 3.2.4.1.4 et Fig 3.2.4.1.5 .

Le noyau est parfois entouré de RER ou de ribosomes, Fig 3.2.4.1.1.

Les mitochondries ont une forme ronde, en anneau ou en haltère. Elles sont associées au RER et leurs crêtes sont bien visibles, Fig 3.2.4.1.1, Fig 3.2.4.1.4, Fig 3.2.4.1.5 .

Des fragments de ruban de citerne RER sont dispersés dans le cytoplasme sous forme libre ou associée, Fig 3.2.4.1.1, Fig 3.2.4.1.4.

Les globules lipidiques sont très nombreux et souvent associés au RER Fig 3.2.4.1.1, Fig 3.2.4.1.4.

Quelques rares vacuoles alimentaires occupent le cytoplasme, Fig 3.2.4.1.1, Fig 3.2.4.1.4 .

Les ribosomes libres ou en rosette sont distribués dans le cytoplasme.



#### b. Kystes vieillissants.

La membrane du trophozoïte se détache de la paroi kystique. L'espace kystique s'agrandit de plus en plus ( Fig 3.2.4.1.7) et finalement le trophozoïte se rétracte à l'intérieur( Fig 3.2.4.1.8). La membrane du trophozoïte est encore attachée par quelques points à la paroi.

Le nombre d'organites cytoplasmiques diminue, Fig 3.2.4.1.7 et Fig 3.2.4.1.8 .

Les mitochondries s'arrondissent, les crêtes sont moins visibles, Fig3.2.4.1.7 et Fig 3.2.4.1.8 .

On remarque très peu de réticulum endoplasmique rugueux et l'association aux organites cellulaires régresse. Fig 3.2.4.1.7 et Fig 3.2.4.1.8 .

#### Kystes en dégénérescence.

En incubant des trophozoïtes dans un milieu nutritif pauvre, nous avons obtenu des kystes en grand nombre. Leur étude en microscopie électronique a permis d'observer des kystes en dégénérescence. Leur paroi nucléaire se dilate, la chromatine du noyau se disloque et s'agrège en paquet. Le cytoplasme présente de nombreux autophagosomes contenant des mitochondries et autres composants du cytoplasme. Les ribosomes se rassemblent en paquet, Fig 3.2.4.1.9 et FIG 3.2.4.1.10 .

#### Kystes vides.

Des coupes sériées ont montré des kystes vides. Le bouchon de mucus et la plaque de matériel de l'endokyste sont absents des pores, Fig 3.2.4.1.11 .

#### Irrégularités de formation des pores.

Il n'est pas rare d'observer des irrégularités dans la formation des pores, ainsi par exemple sur la Fig 3.2.4.1.12 le kyste de droite sur la Fig 3.2.4.1.12 montre une

irrégularité de formation des pores. La plaque de l'endokyste est présente mais le pore est obturé par la paroi.

#### 3.2.4.2 En microscopie électronique à balayage.

##### Surface des kystes.

La paroi est non plissée et plus rugueuse que la souche type. Les kystes sont ronds, parfois légèrement ovales.

##### Les bords des pores.

Ils sont lisses et sans évagination. La perforation des pores est bien visible, dans de rares cas on peut observer le bouchon fermant le pore.

##### Nombre moyen de pores.

De 1 à 3 pores.

Fig 3.2.4.2.1.

### 3.3 Etude biométrique.

Comme nous disposons d'un grand nombre de kystes nous avons pu étudier en microscopie électronique à *transmission*, plusieurs constantes propres aux pores, telles:

- Diamètre intérieur des kystes.
- Diamètre intérieur de l'ouverture des pores.
- Epaisseur de la paroi.

### 3.3.1 Diamètre intérieur des kystes.

#### 3.3.1.1 Statistiques descriptives.

X: moyenne de l'échantillon

n: nombre d'individus par échantillon

S<sup>2</sup>: variance de l'échantillon

	x	n	S <sup>2</sup>
S.b:	7,22µm	55	6,06
S.m :	8,55µm	142	3,4

#### 3.3.1.2 Test de t de STUDENT.

Formules utilisées:

$$S^2_g = \frac{SCE_1 + SCE_2}{n_1 + n_2 - 2}$$

$$t_{obs} = \frac{(x_1 - x_2) - (m_1 - m_2)}{Sg \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

$S^2_g$	tobs	t(197,0.9995)
---------	------	---------------

---

3.35	0.71	3.339
------	------	-------

### 3.3.2 Diamètre intérieur des pores.

#### 3.3.2.1 Statistique descriptive.

	x	n	$S^2$
S.b:	0.725 $\mu$ m	27	0.047
S.m:	0.578 $\mu$ m	38	0.05

#### 3.3.2.2 Test de t de STUDENT.

$S^2_g$	tobs	t(40,0.9995)
---------	------	--------------

---

0.049	0.52	3.551
-------	------	-------

### 3.3.3 Epaisseur de la paroi.

#### 3.3.3.1 Statistique descriptive.

	X	n	S <sup>2</sup>
S.b:	0.29μm	57	0.005
S.m:	0.29μm	179	0.0183

#### 3.3.3.2 Test de t de STUDENT.

S <sup>2</sup> <sub>g</sub>	tobs	t(236,0.9995)
0.0082	0	3.339

En résumé:

-l'étude du diamètre interne des kystes montre qu'il y a apparemment une différence entre les deux de l'ordre de 1 μm, à l'avantage de la souche mexicaine.

-l'étude du diamètre interne des pores met en évidence une différence apparente de  $\varnothing$  5  $\mu\text{m}$  à l'avantage de la souche belge.

-l'étude de l'épaisseur de la paroi des kystes ne montre aucune différence.

Dans les deux premiers cas, l'application du test de t de STUDENT indique que les différences observées ne sont pas significatives.

L'étude de ces trois constantes ne permet pas de dissocier la souche mexicaine de la souche belge.

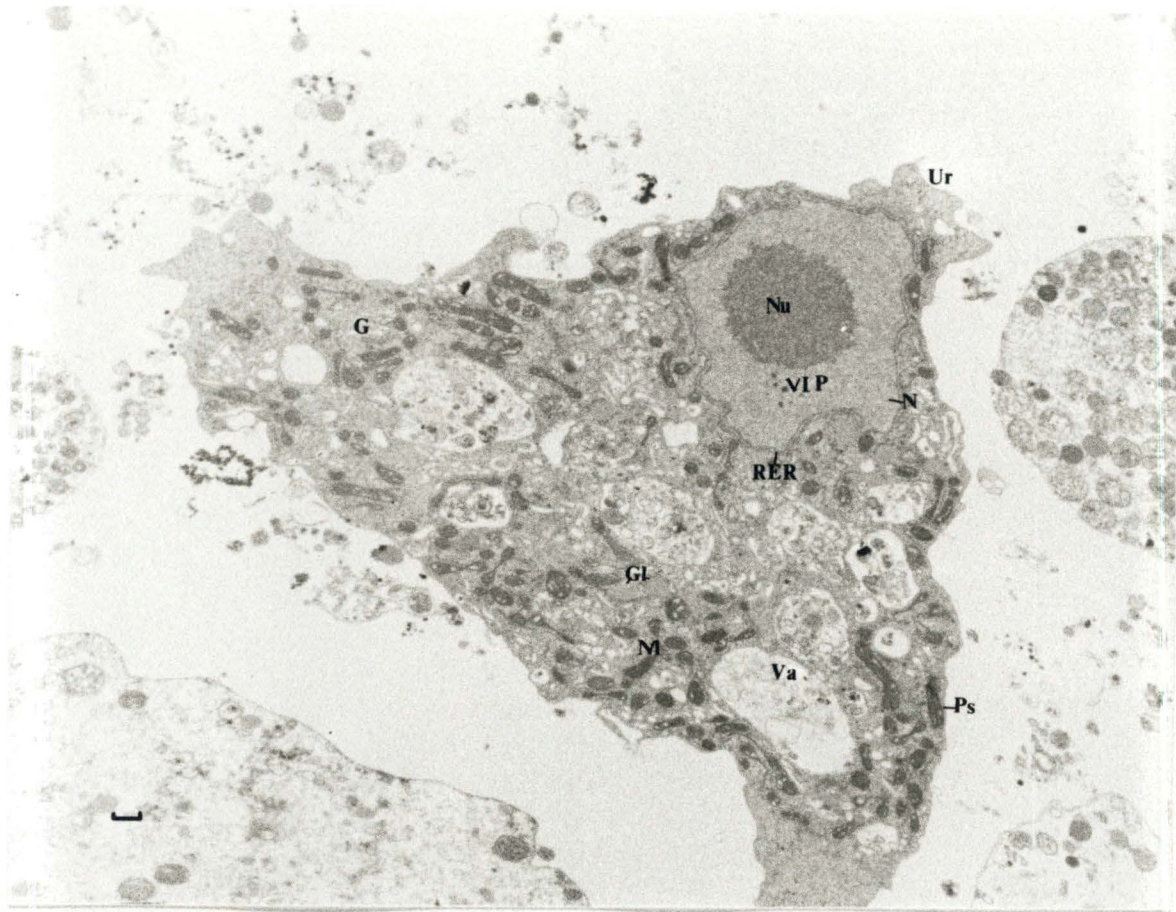


Fig. 3.2.1.1.1:

Organisation générale d'un trophozoïte de *N. lovaniensis* (S.B.).

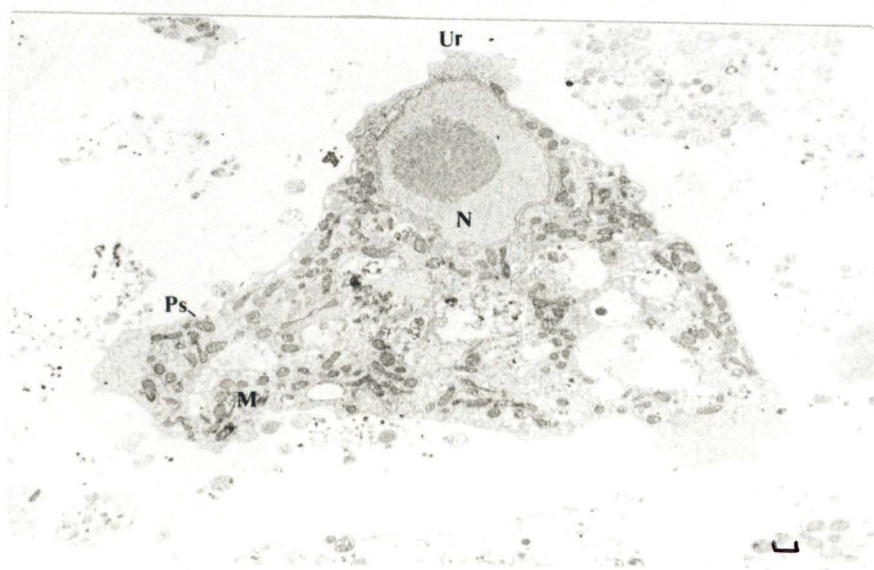


Fig. 3.2.1.1.2

Section d'un trophozoïte de *N. lovaniensis* (S.B.). La paroi au contour irrégulier forme des pseudopodes (Ps) dans lesquels s'écoulent les organites cytoplasmiques notamment des mitochondries (M). Des uropodes (Ur) se trouvent en arrière du noyau (N).

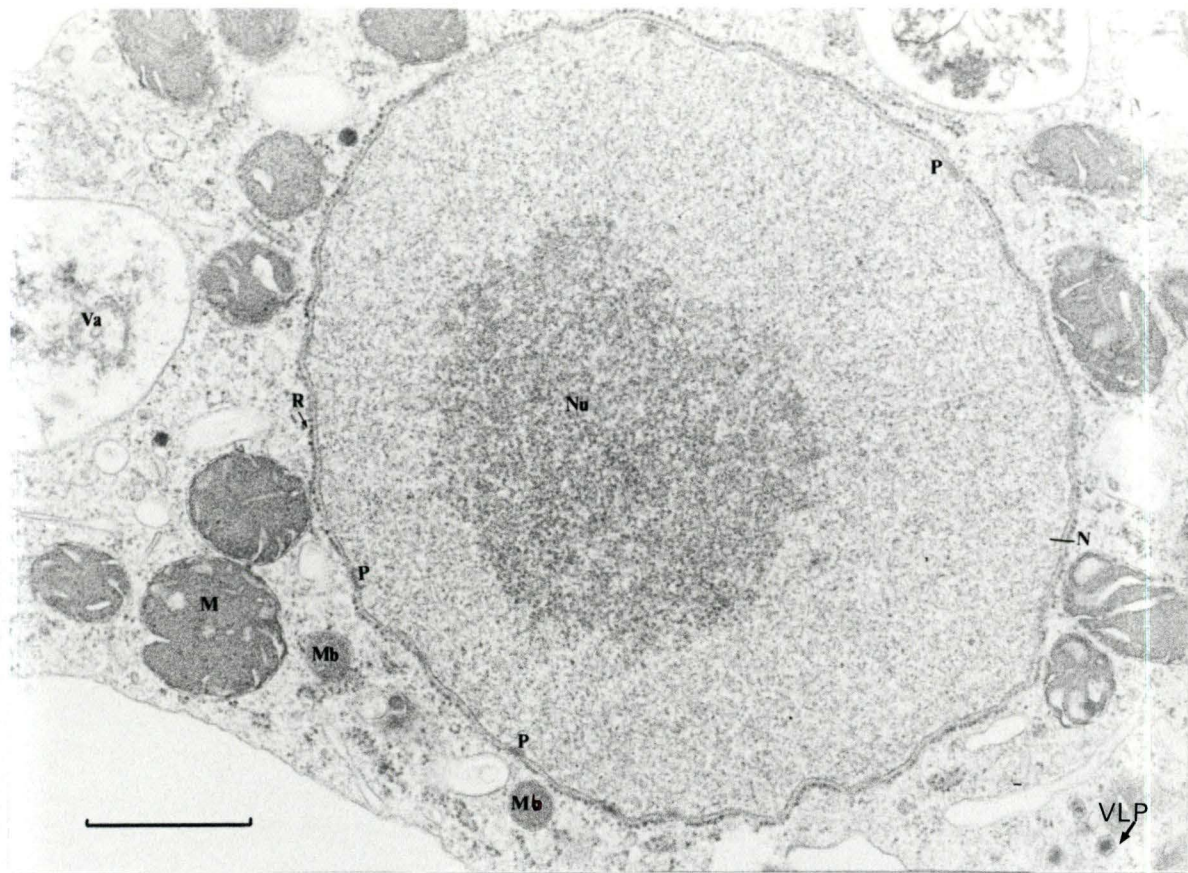


Fig. 3.2.1.1.3

Section au niveau du noyau (N) d'un trophozoïte de *N. lovaniensis* (S.b.), celui-ci est entouré d'une couche de ribosomes (R) et montre un nucléole (Nu) proéminent. La membrane nucléaire est interrompue par des pores (P). Le cytoplasme environnant renferme des mitochondries (M), des vacuoles alimentaires (Va) et des macrobodies (Mb).

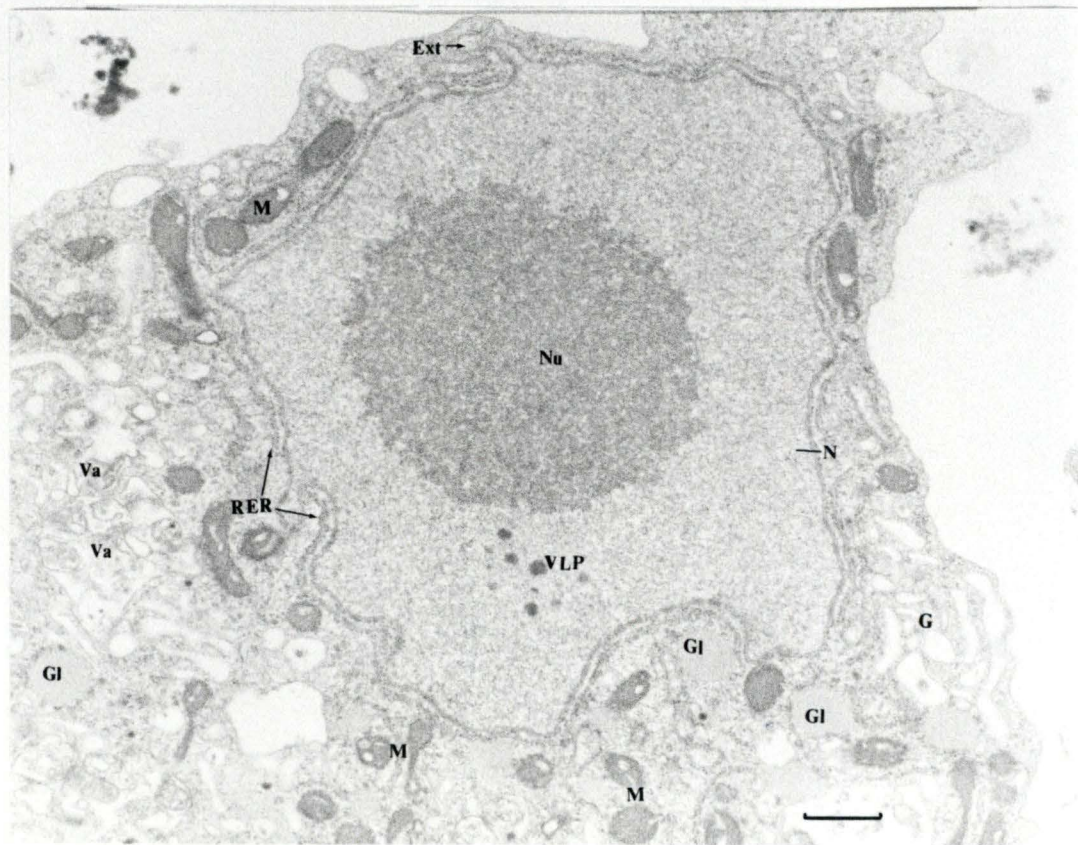


Fig. 3.2.1.1.4

Section d'un trophozoïte de *N. lovaniensis* (S.b.). Le noyau (N) contient un nucléole (Nu) central proéminent et des Y L P. dans le nucléoplasme. Il est entouré par une citerne discontinue de R E R et montre des extrusions (Ext). Les mitochondries (M) et les globules lipidiques (Gl) sont associés ou non au R E R. Le cytoplasme contient aussi un appareil de Golgi (G) et beaucoup de vacuoles alimentaires (Va).



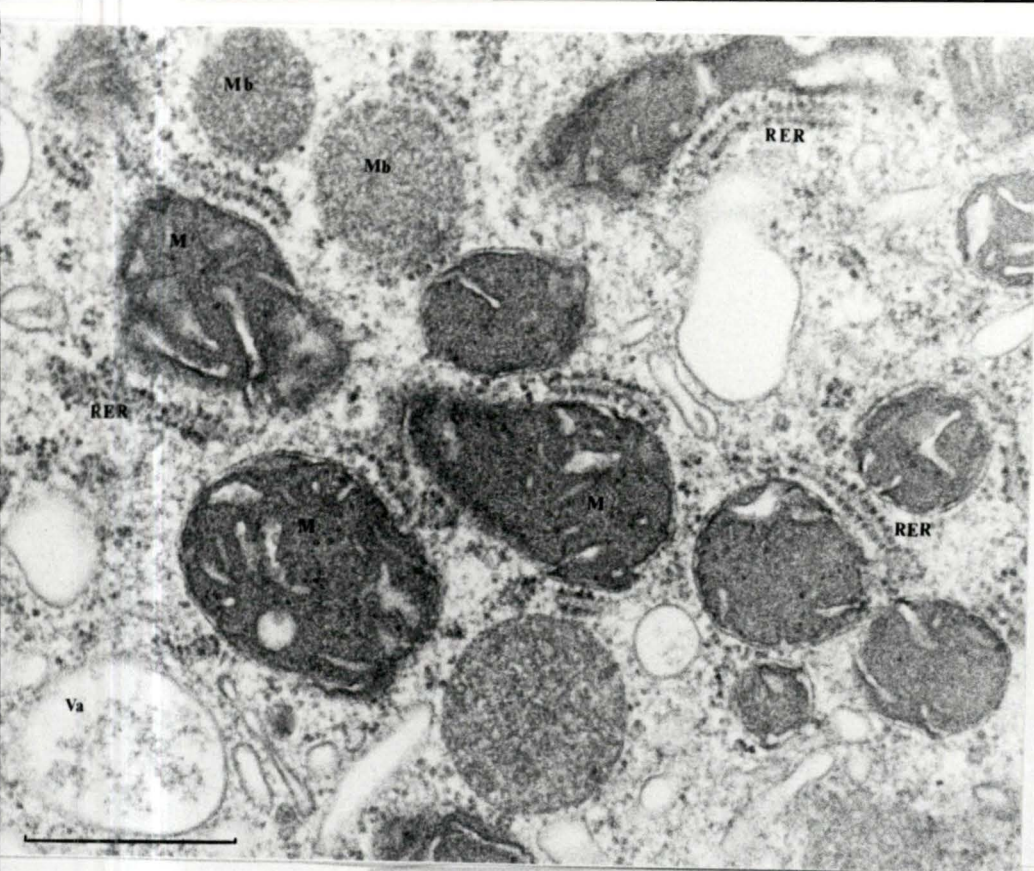


Fig. 3.2.1.1.5

Détail d'une section d'un trophozoïte de *N. lovaniensis* (S.B.). La matrice dense des mitochondries (M) est criblée de crêtes distribuées au hasard. Elles sont associées avec des fragments de citerne de RER. Le cytoplasme contient quelques vacuoles alimentaires (Va) et des macrobodies (Mb).

Fig. 3.2.1.1.6

Section d'un trophozoïte de *N. lovaniensis* (S.B.). Le noyau renferme un nucléole (Nu) proéminent, la membrane nucléaire est régulièrement interrompue par des pores (P). Près de celle-ci se trouve un appareil de Golgi (G). Les mitochondries (M) et les vacuoles alimentaires (Va) sont les organites cytoplasmiques les plus abondants. On trouve quelques (C.N.)

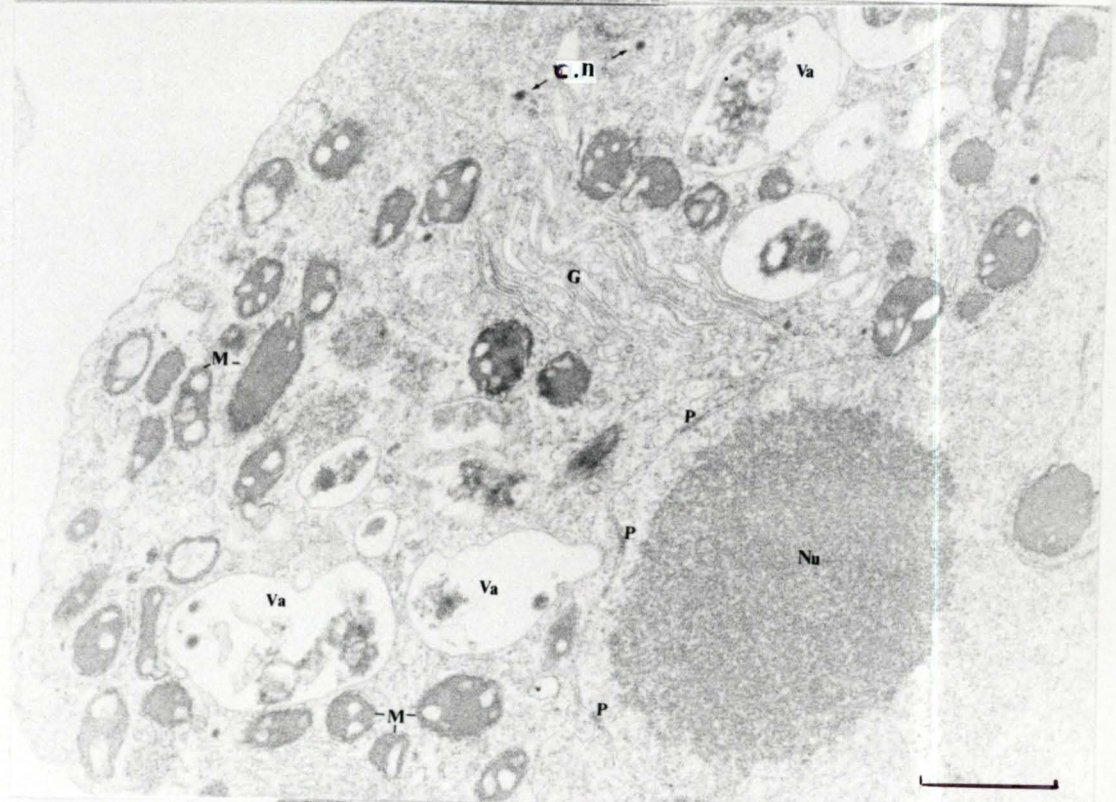
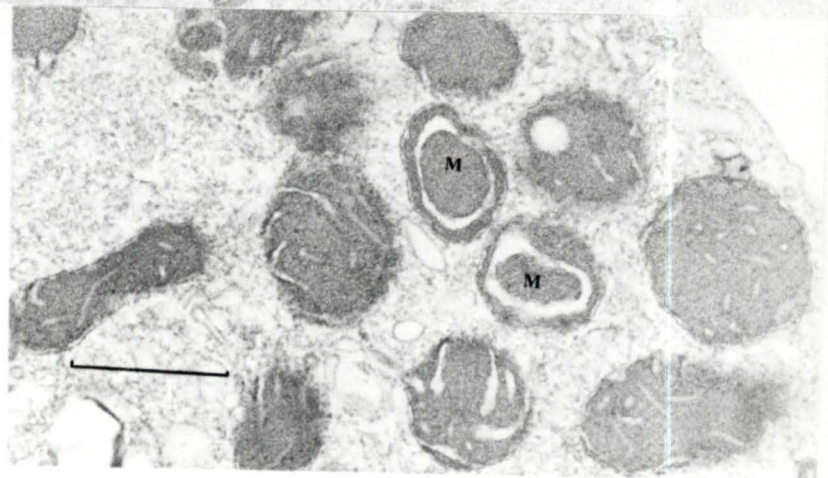


Fig. 3.2.1.1.7

Section d'un trophozoïte de *N. lovaniensis* (S.B.). Cette partie du cytoplasme montre des mitochondries (M) typiques d'une amibe désenkystée.



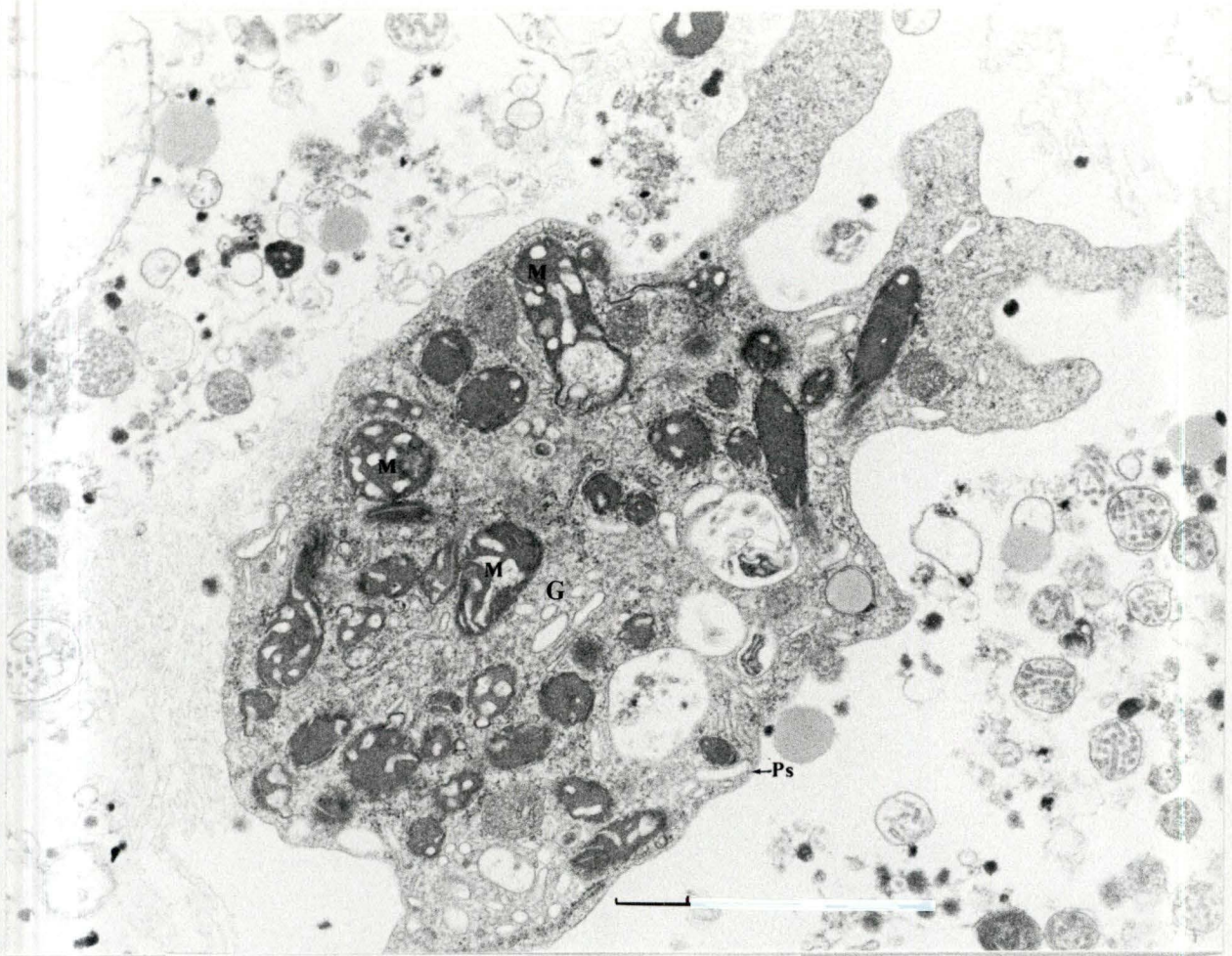


Fig. 3.2.1.1.8

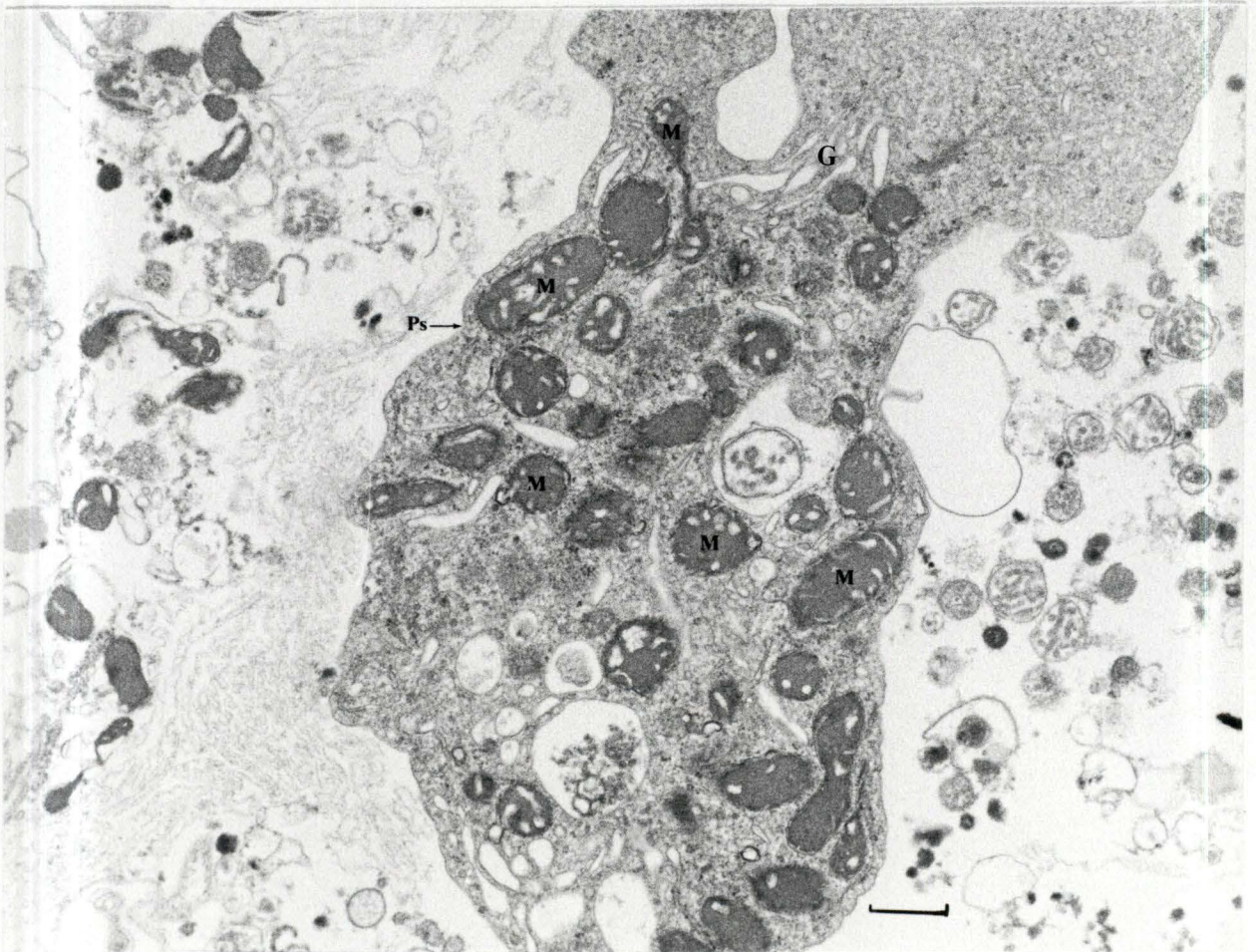


Fig. 3.2.1.1.9

Fig. 3.2.1.1.8 et Fig. 3.2.1.1.9

Section d'un pseudopode de *N. lovaniensis* (S.b.), le cytoplasme est occupé par de nombreuses mitochondries (M) en formes d'anneaux, d'haltères ou rondes.

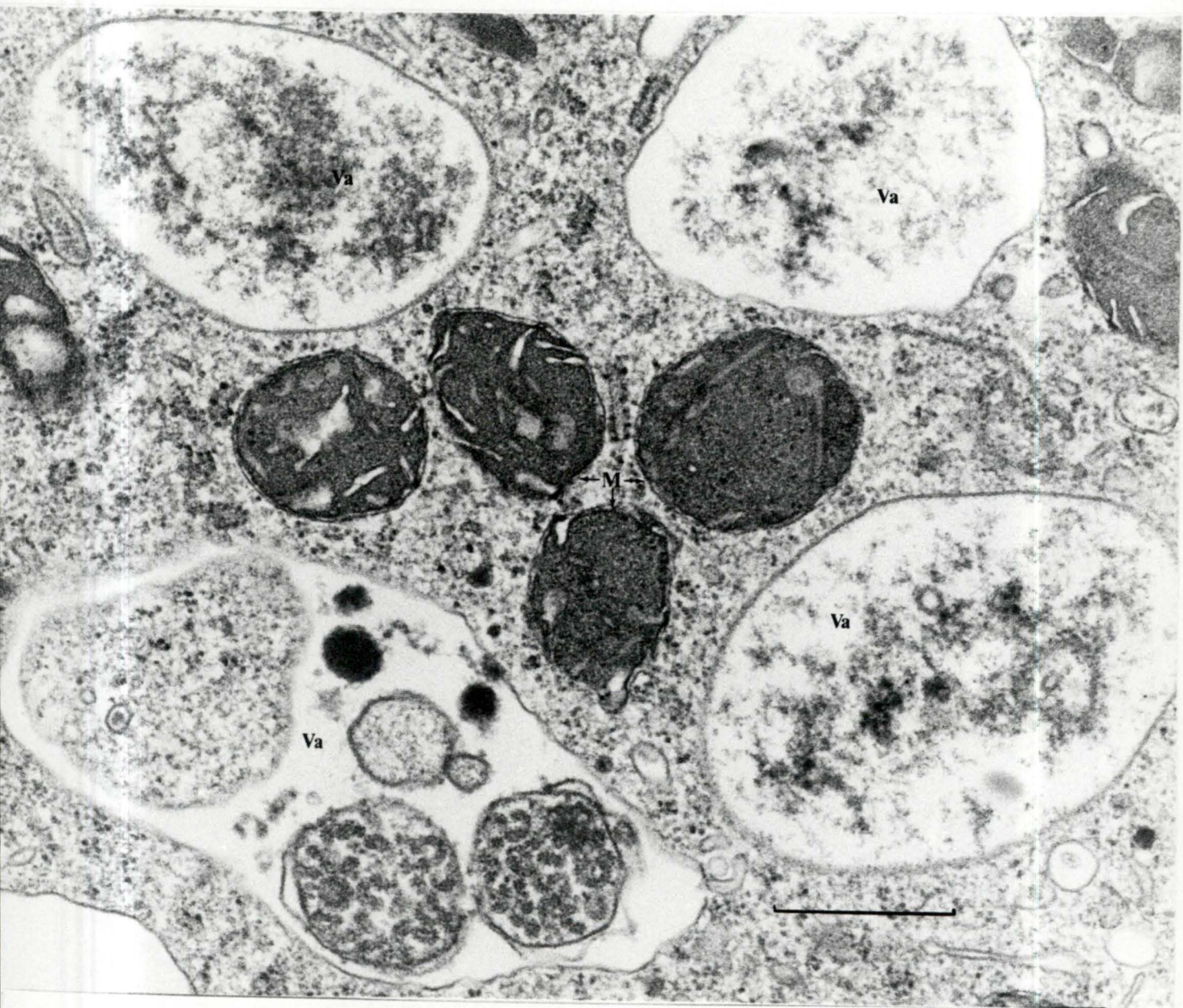


Fig. 3.2.1.1.10

Section au niveau de vacuoles alimentaires (Va) et de mitochondries (M) d'un trophozoïte de *N. lovaniensis* (S.b.). Les vacuoles alimentaires (Va) entourées d'une double membrane contiennent des débris d'amibes lysées.

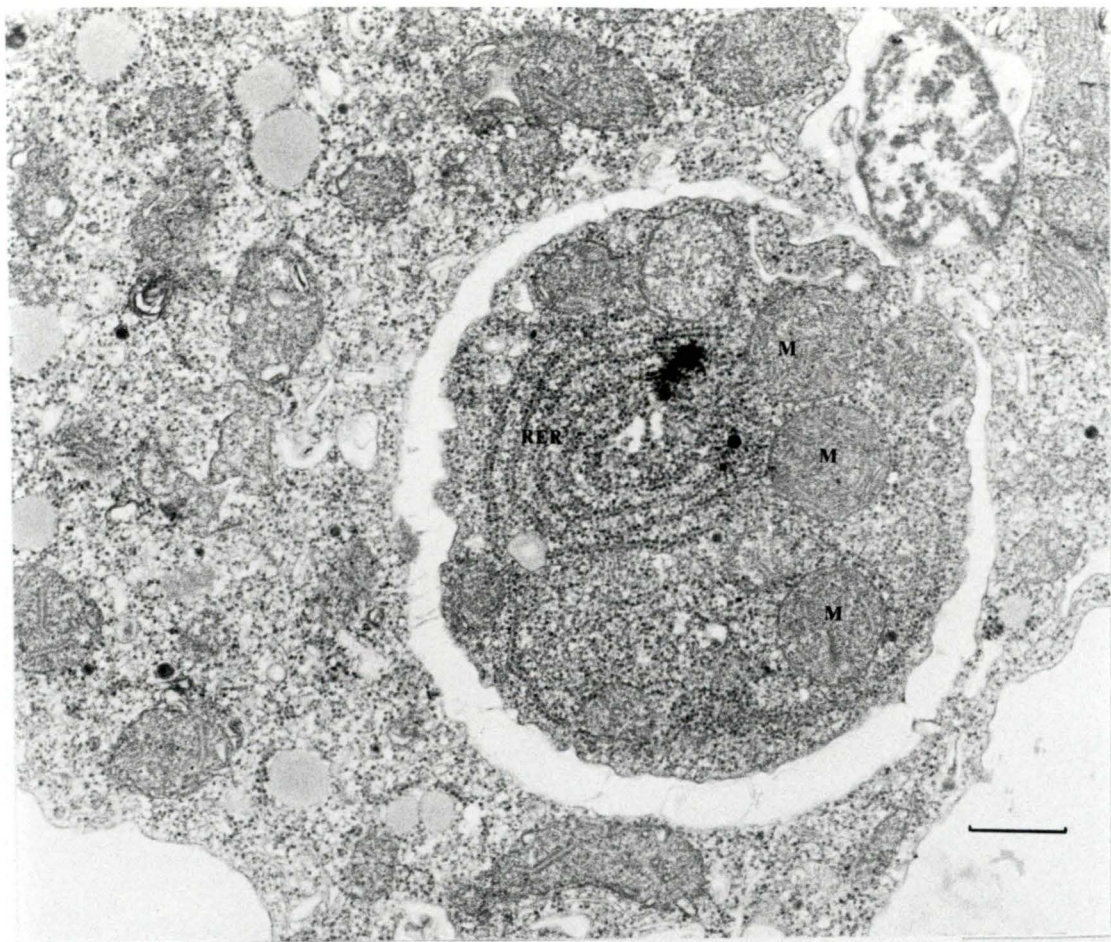


Fig. 3.2.1.1.11

Section au niveau d'un autophagosome de *N.lovaniensis* (*S.b.*), celui-ci contient des segments de R E R , des mitochondries (M) et des globules lipidiques(GI) associés au R E R.

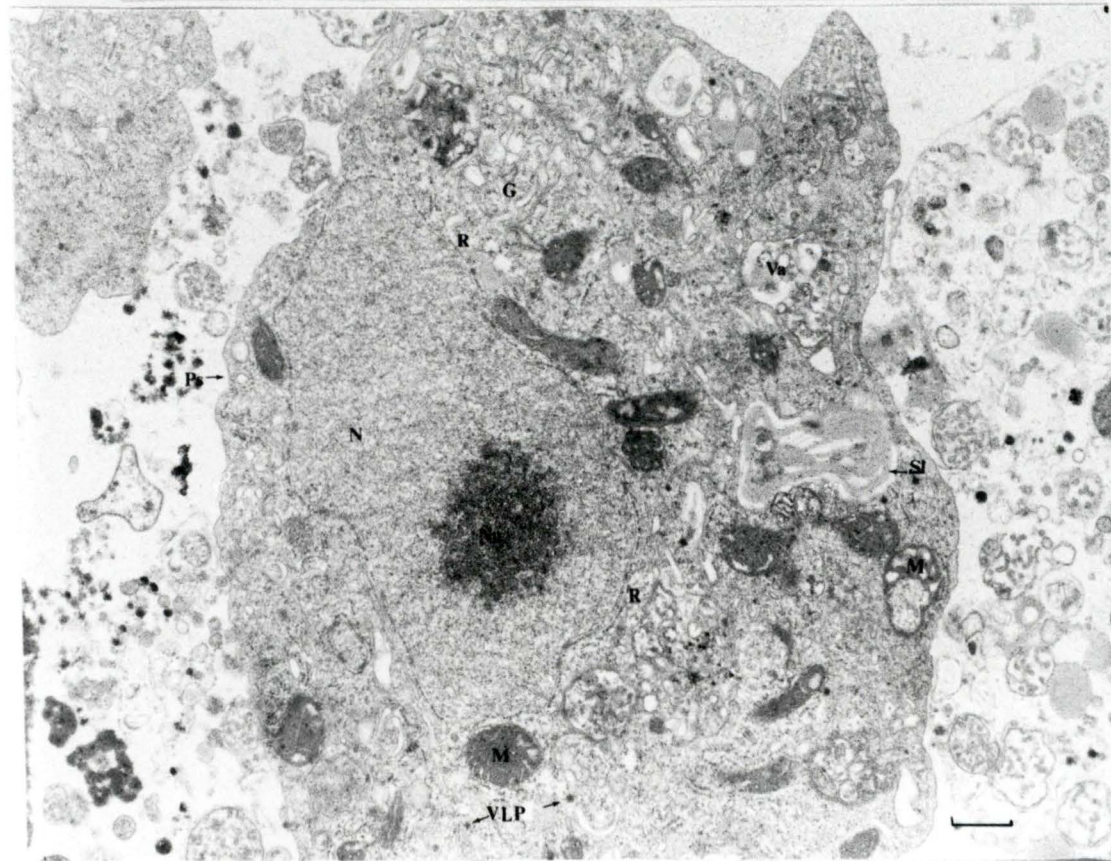


Fig 3.2.1.1.12

Section d'un pseudopode (Ps) de *N. lovaniensis* (*S.b.*). Le noyau (N) contenant un nucléole (Nu) proéminent est entouré d'une couche de ribosomes (R). Le cytoplasme renferme des mitochondries (M) en forme d'haltères, d'anneaux ou ronds. Il montre aussi des vacuoles alimentaires (Va), un appareil de Golgi (G), des V L P et une structure laminaire complexe (Sl).

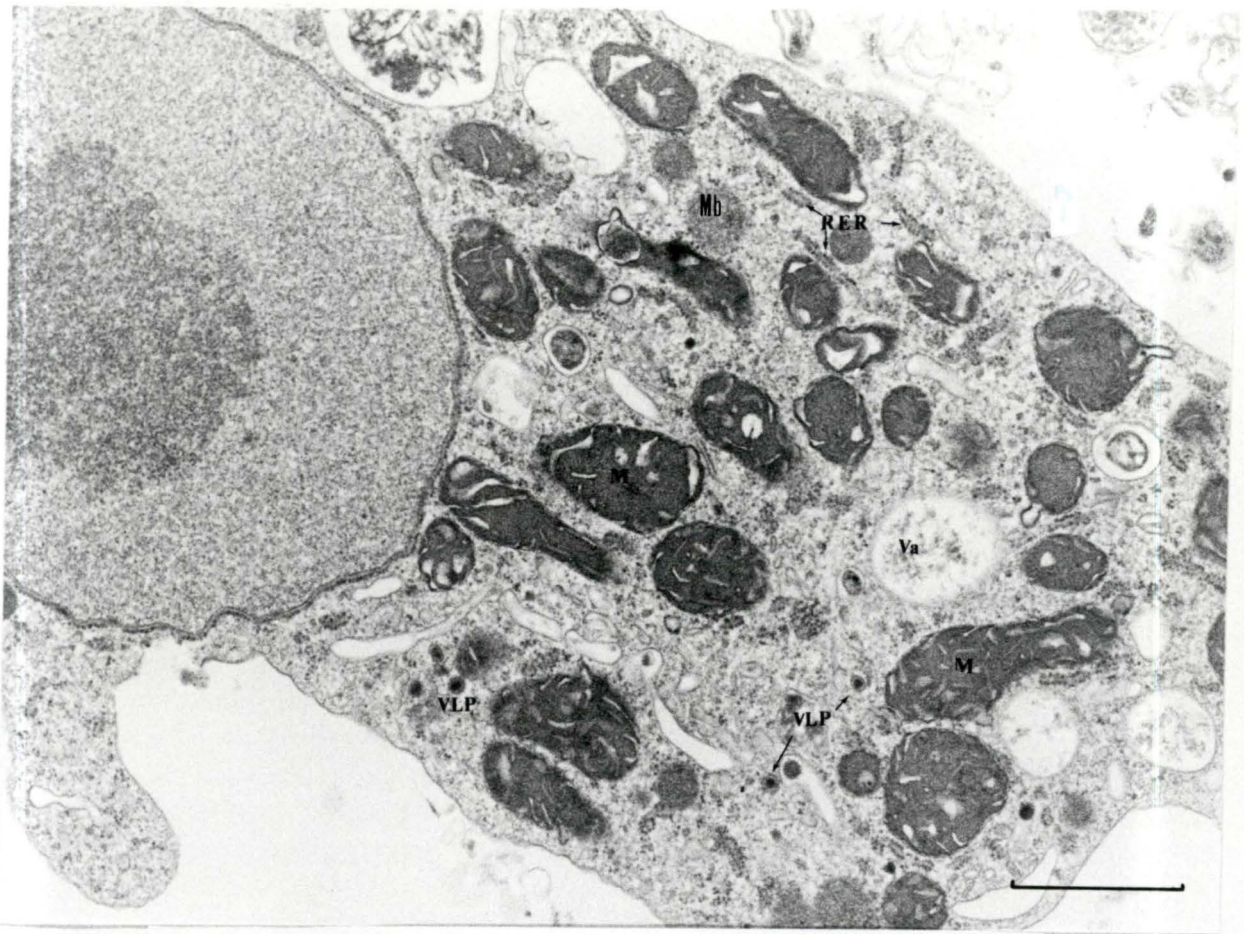


Fig. 3.2.1.1.13

Section d'un pseudopode de *N. lovaniensis* (S.B.). Parmi les mitochondries (M) associées au R E R et les vacuoles alimentaires (Va) on peut voir dans le cytoplasme des Y L P entourés d'une membrane lisse ou hérissée.

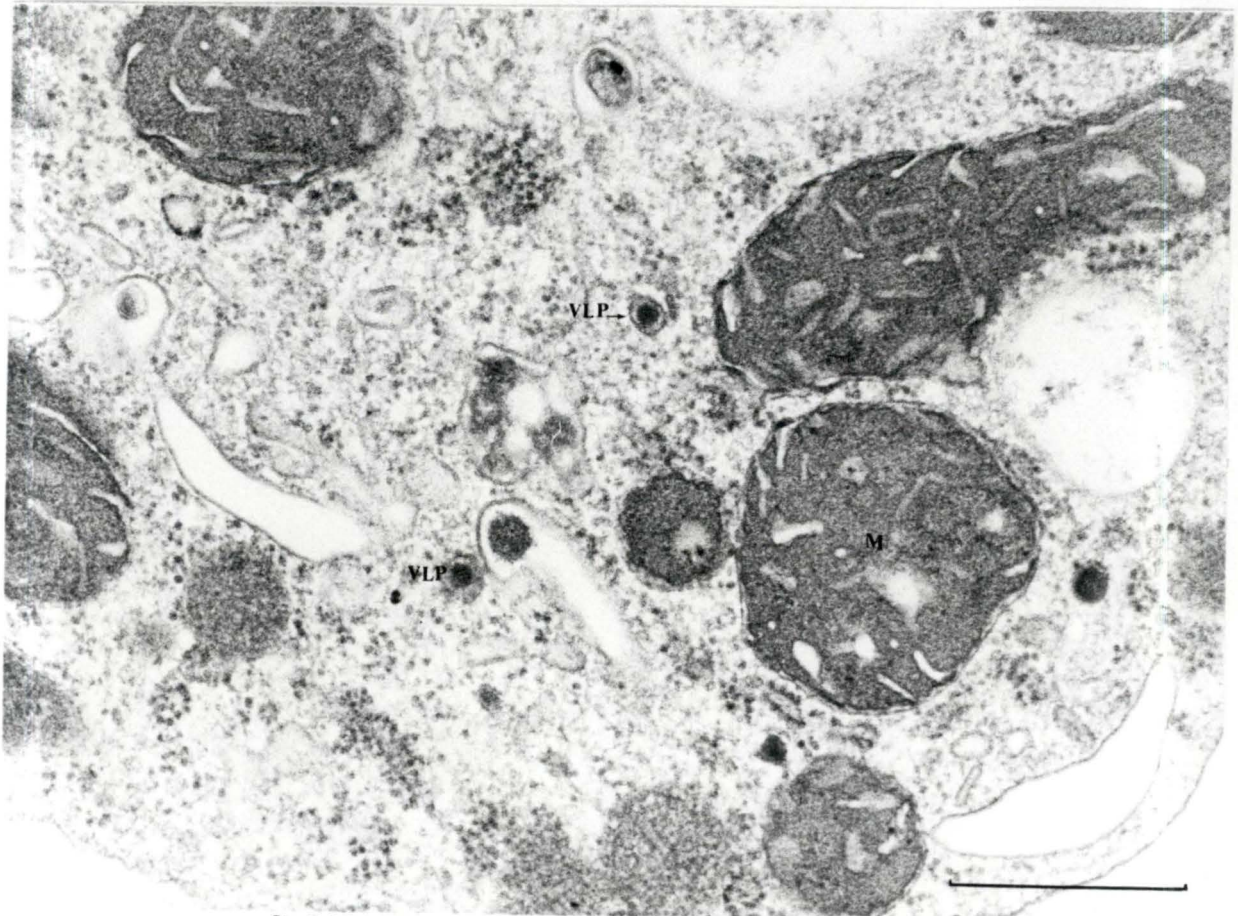


Fig. 3.2.1.1.14

Section du même pseudopode à un grossissement supérieur. La membrane des Y L P entoure un core dense. La matrice mitochondriale (M) est criblée de crêtes distribuées au hasard.

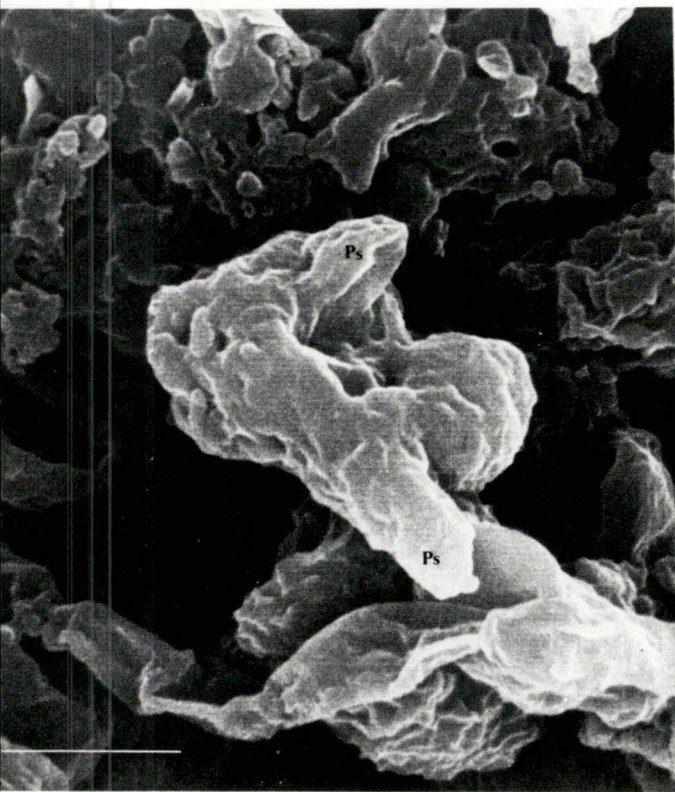


Fig. 3.2.1.2.1

Trophozoïte de *N. lovaniensis* (S.b.) émettant des pseudopodes (Ps).

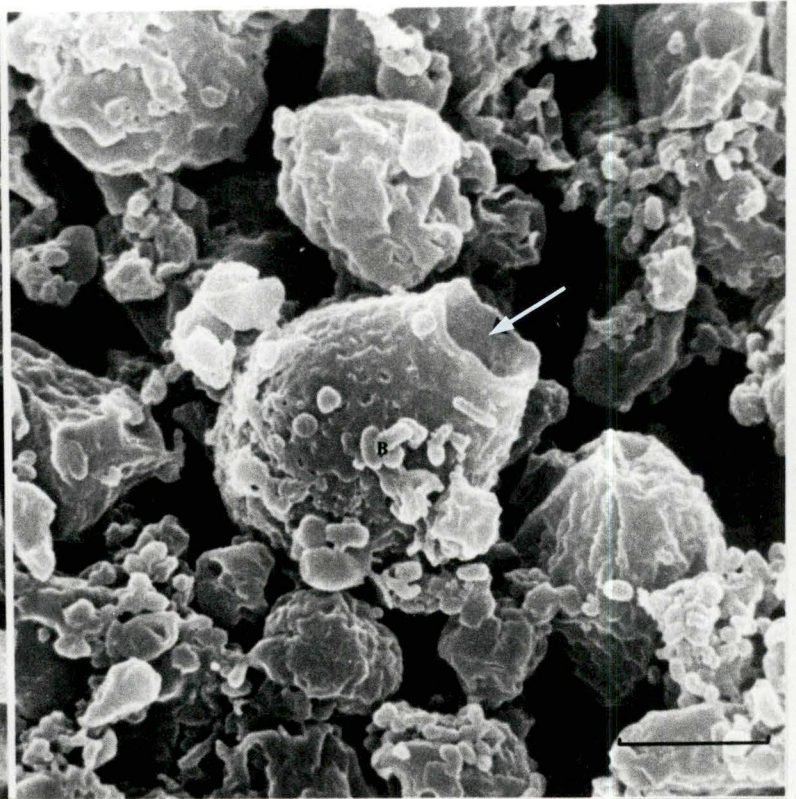


Fig. 3.2.1.2.3

Trophozoïte de *N. lovaniensis* (S.b.), montrant un orifice béant (flèche) dont le diamètre impressionne. C'est une structure tout à fait transitoire. En fait on assiste ici à la formation d'une vacuole alimentaire. Plusieurs bactéries (B) sont accolées à la paroi de l'amibe.



Fig. 3.2.1.2.2

Trophozoïte allongé de *N. lovaniensis* (S.b.), montrant de nombreux replis de la membrane (Mb).

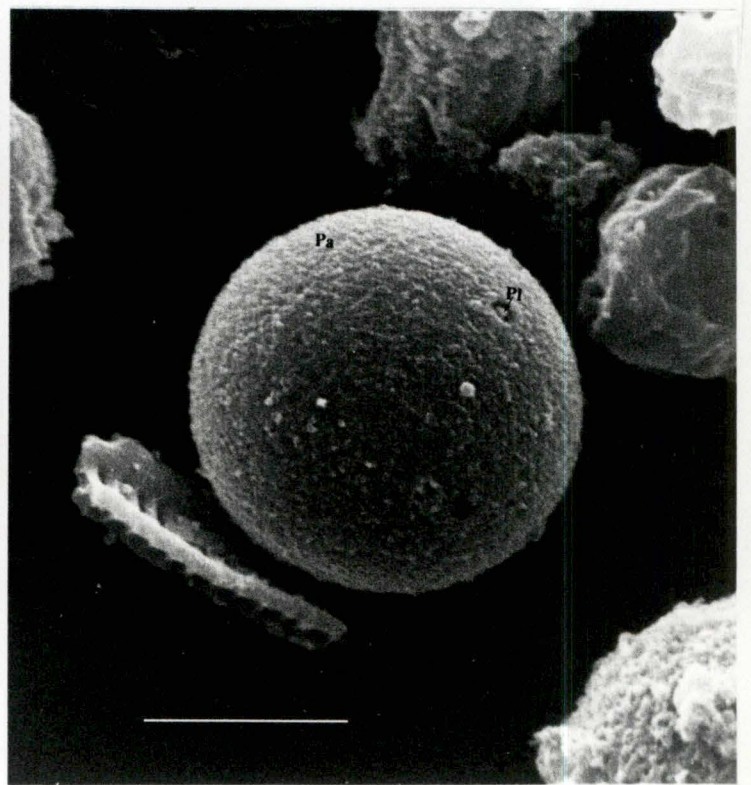


Fig. 3.2.2.1

Kyste de *N. lovaniensis* (S.b.). Sa paroi (Pa) non plissée et rugueuse montre deux pores non évaginés dont un est obturé par la plaque (Pl) de matériel de l'endocyste.

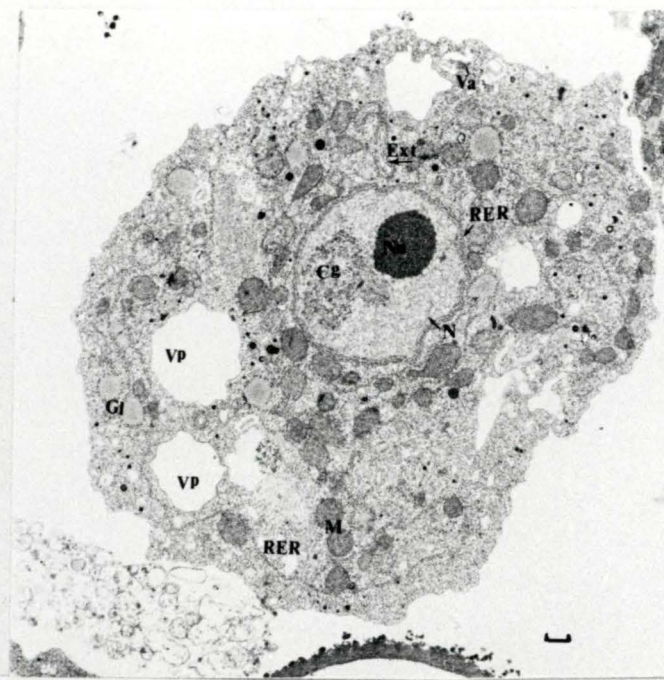


Fig. 3.2.2.1.1

Section d'un trophozoïte de *N. lovaniensis* (*S.m.*), placé dans de l'eau distillée avant d'être fixé. Elle offre à considérer un noyau (N) central renfermant un nucléole (Nu) proéminent dense aux électrons et un corps générateur. La membrane est entourée de R E R. Cette membrane n'est pas droite, elle forme des extrusions (Ext) de matériel nucléaire qui s'enfoncent dans le cytoplasme. Des mitochondries sont dispersées dans le cytoplasme parmi du R E R, des globules lipidiques (Gl), des vacuoles alimentaires (Va) et des vacuoles pulsatiles (Vp).

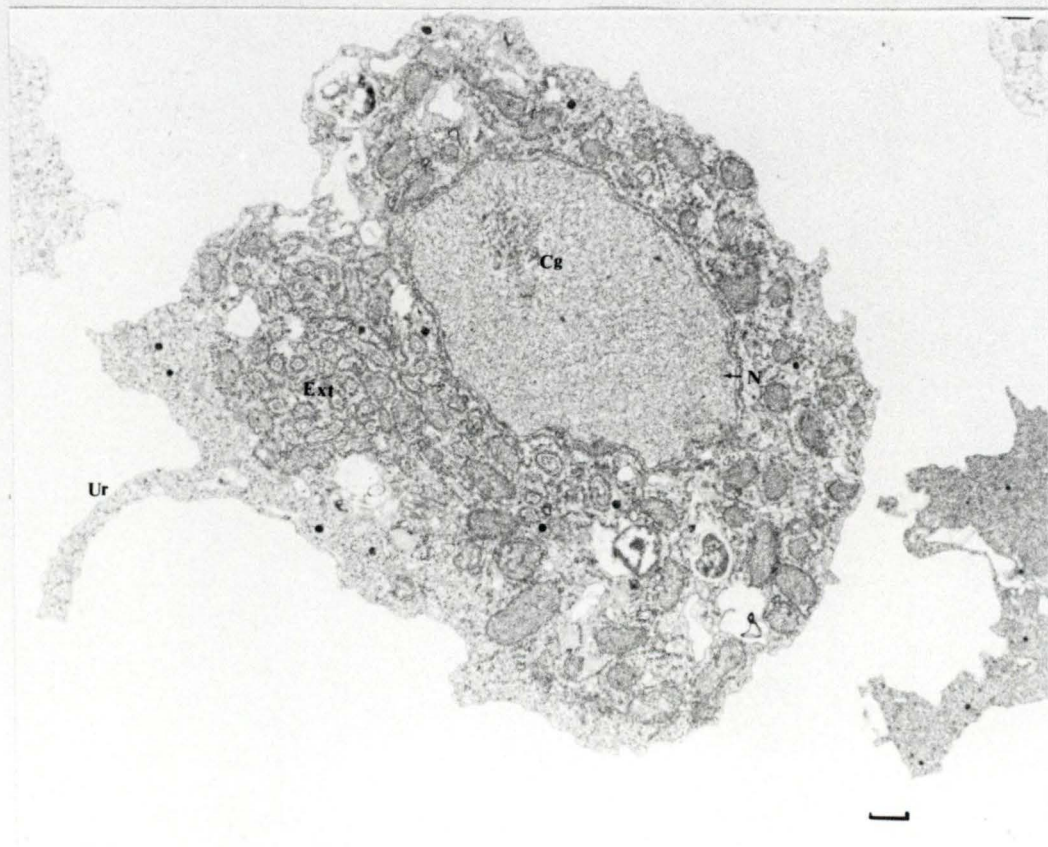


Fig. 3.2.2.1.2

Section d'une amibe *N. lovaniensis* (*S.m.*) présentant un gros noyau (N) dont le matériel chromatique est peu dense aux électrons et dont le nucléoplasme contient un corps générateur (C.g). Cette amibe a été fixée alors qu'elle progressait. Sa partie postérieure est indiquée par un uropode (Ur). Le cytoplasme de l'uropode et celui qui lui est adjacent sont dépourvus de grosses formations cytoplasmiques. La portion cytoplasmique située entre l'uropode et le noyau est riche en extrusions nucléaires (Ext).



Fig. 3.2.2.1.1

Section d'un trophozoïte de *N. lovaniensis* (S.m.), placé dans de l'eau distillée avant d'être fixé. Elle offre à considérer un noyau (N) central renfermant un nucléole (Nu) proéminent dense aux électrons et un corps générateur. La membrane est entourée de R E R. Cette membrane n'est pas droite, elle forme des extrusions (Ext) de matériel nucléaire qui s'enfoncent dans le cytoplasme. Des mitochondries sont dispersées dans le cytoplasme parmi du R E R, des globules lipidiques (Gl), des vacuoles alimentaires (Va) et des vacuoles pulsatiles (Vp).

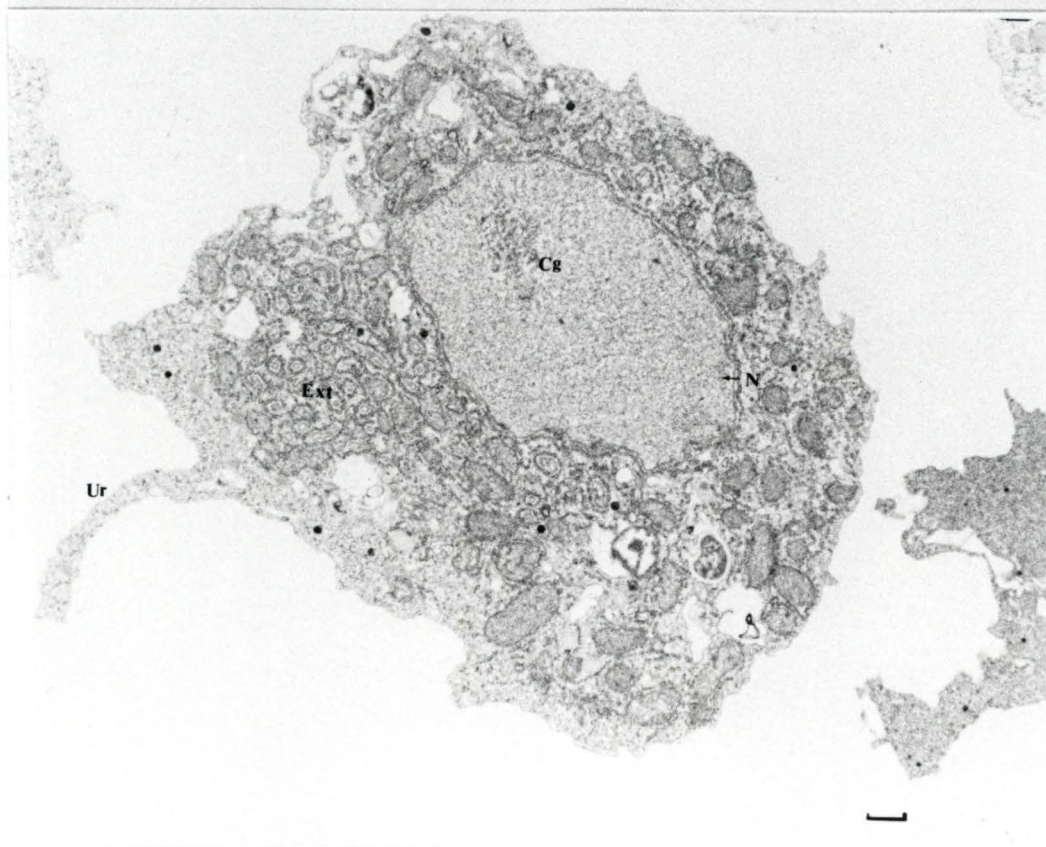


Fig. 3.2.2.1.2

Section d'une amibe *N. lovaniensis* (S.m.) présentant un gros noyau (N) dont le matériel chromatique est peu dense aux électrons et dont le nucléoplasme contient un corps générateur (C.g). Cette amibe a été fixée alors qu'elle progressait. Sa partie postérieure est indiquée par un uropode (Ur). Le cytoplasme de l'uropode et celui qui lui est adjacent sont dépourvus de grosses formations cytoplasmiques. La portion cytoplasmique située entre l'uropode et le noyau est riche en extrusions nucléaires (Ext).



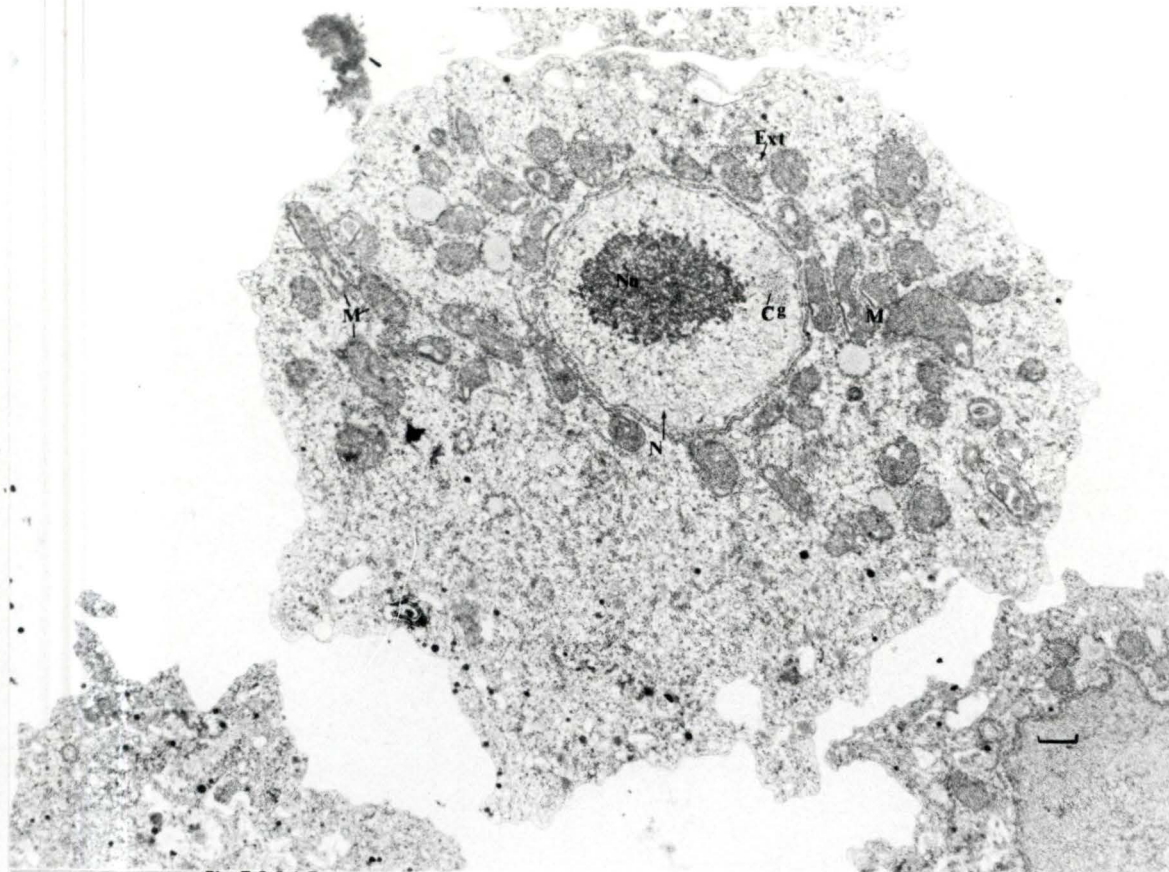


Fig. 3.2.2.1.3

Section d'une amibe de *N. lovaniensis* (S.m.). Le noyau (N) est central et comprend un gros nucléole (Nu) et une petite portion de corps générateur (C.g.). Le cytoplasme renferme peu d'extrusions nucléaires (Ext) mais toutes les mitochondries (M) sont localisées dans une hémisphère de l'amibe indiquant ainsi la direction de progression de l'amibe.

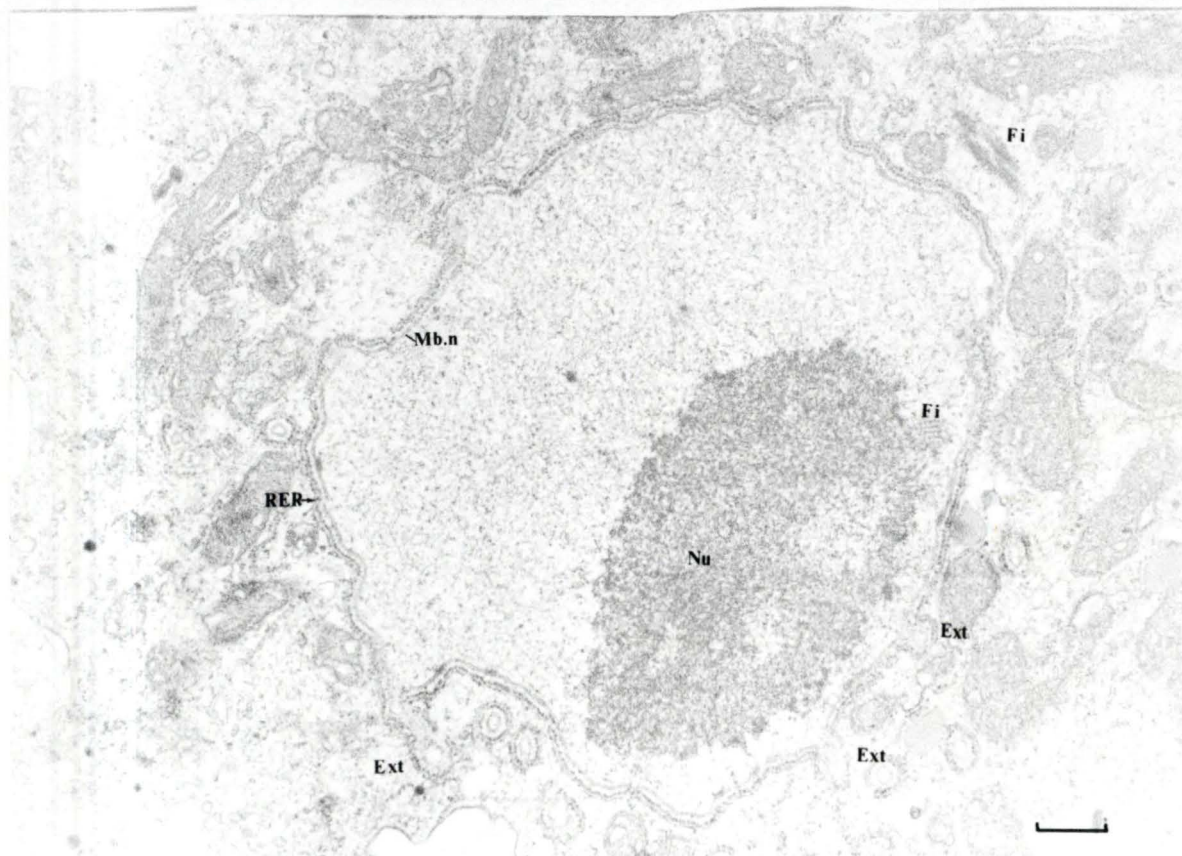


Fig. 3.2.2.1.4

Section d'un trophozoïte de *N. lovaniensis* (S.m.) montrant un important développement des citernes de R E R disposées tout autour de la membrane nucléaire (Mb.N). Celle-ci est fort irrégulière et présente de nombreuses extrusions (Ext) disposées obliquement et perpendiculairement au plan de la coupe. On peut voir une structure fibrillaire (Fi) intranucléaire et intracytoplasmique.

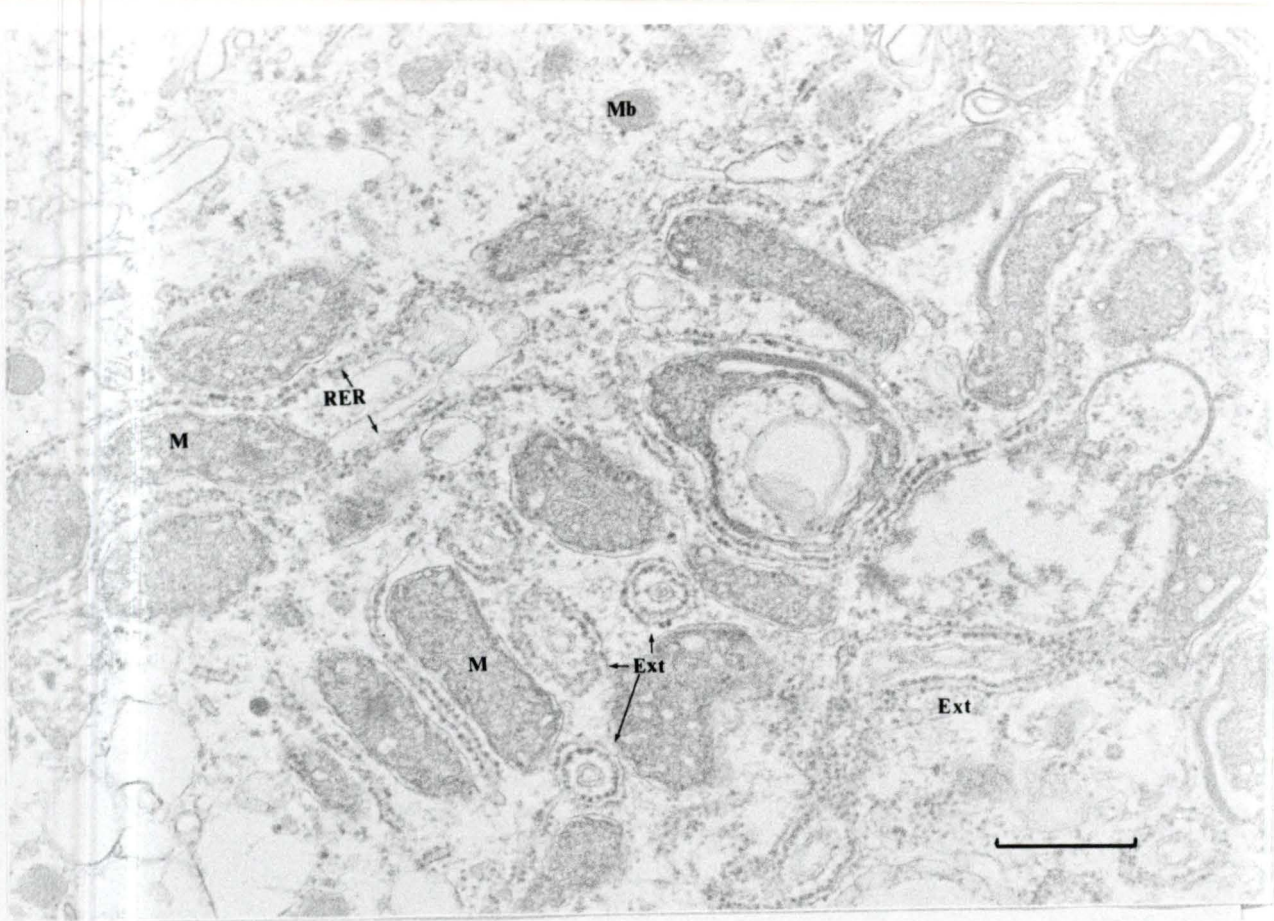


Fig. 3.2.2.1.5

Portion de cytoplasme de trophozoïte de *N. lovaniensis* (S.m.) montrant des sections transversales et circulaires d'extrusions nucléaires (Ext), et des mitochondries (M) associées au RER.

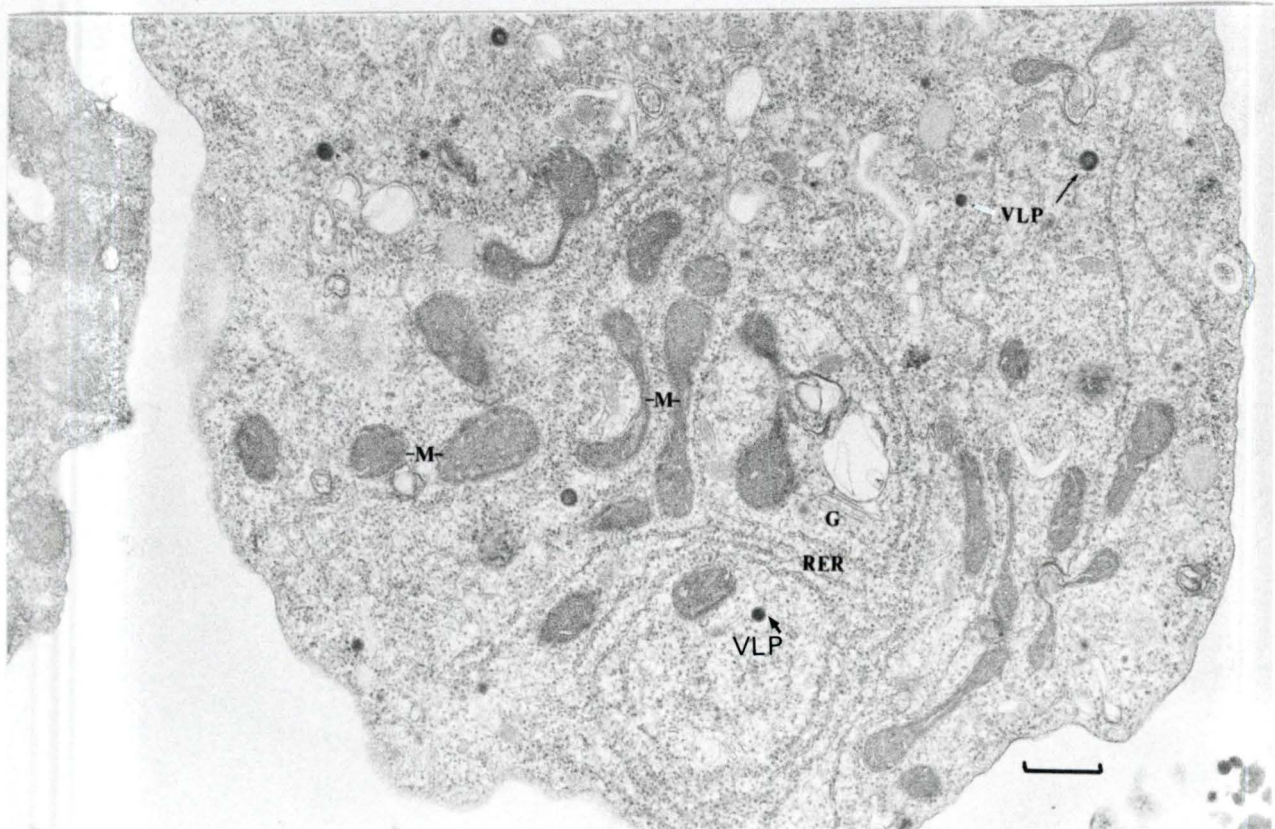


Fig. 3.2.2.1.6

Section d'un trophozoïte de *N. lovaniensis* (S.m.) présentant un ensemble de citernes de RER intracytoplasmiques et un appareil de Golgi (G) très rudimentaire. Elle montre aussi des V.L.P. et de nombreuses mitochondries (M)

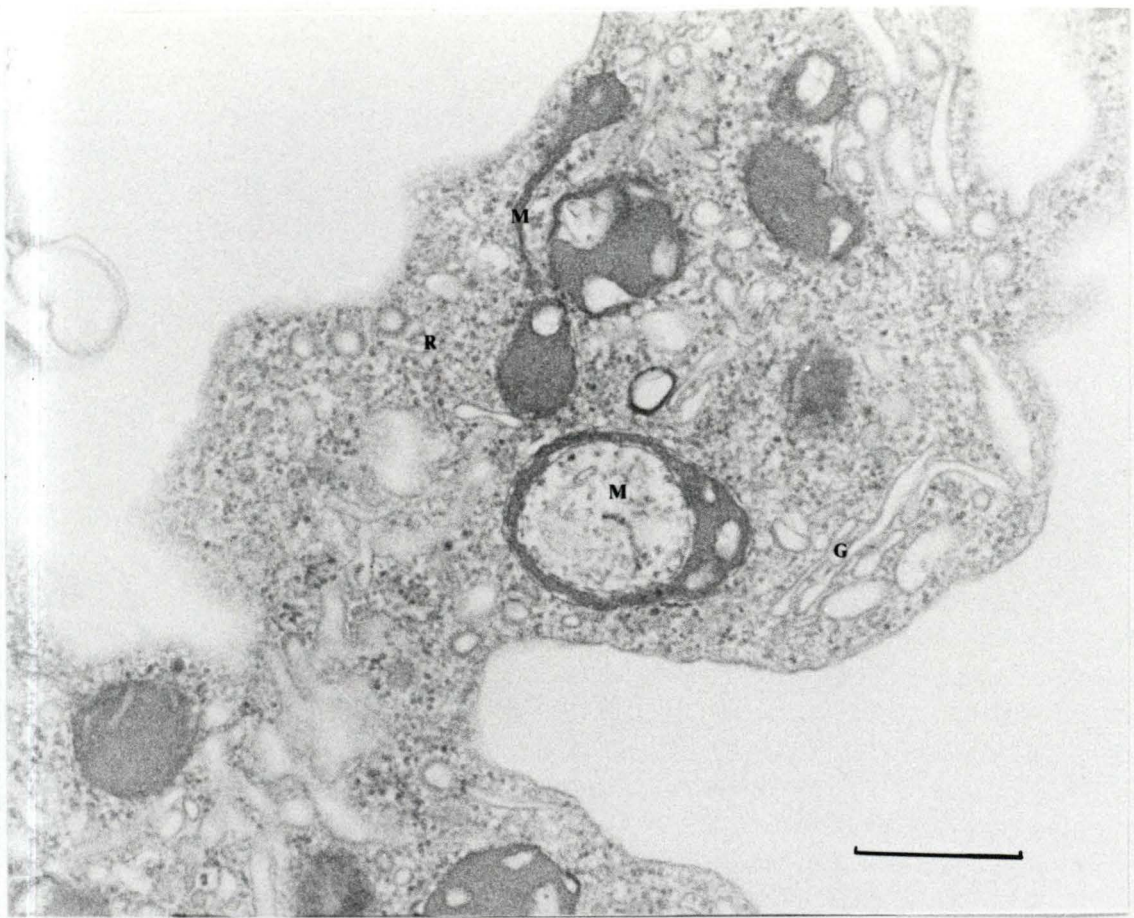


Fig. 3.2.2.1.7

Section d'un pseudopode (Ps) de *N. lovaniensis* (S.m.) enfermant quelques mitochondries (M) en forme d'haltères ou d'anneaux, un appareil de Golgi (G) et de nombreux ribosomes (R).

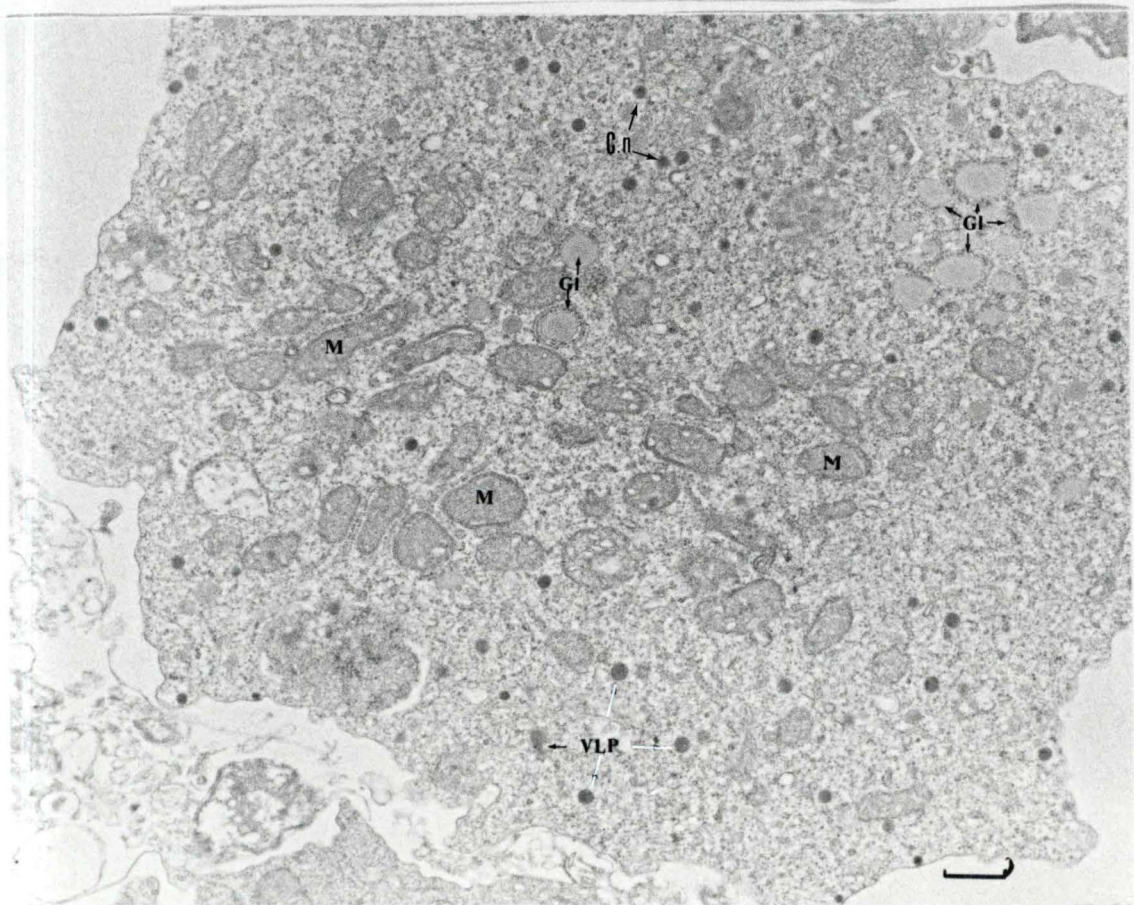


Fig. 3.2.2.1.8

Section d'un pseudopode de *N. lovaniensis* (S.m.). Le cytoplasme contient de nombreuses mitochondries (M), des globules lipidiques (GI) associés ou non au R.E.R. Des C.n. y sont dispersés.

Fig. 3.2.2.2.1

Trophozoïte de *N. lovaniensis* (S.m.), émettant des pseudopodes (Ps).

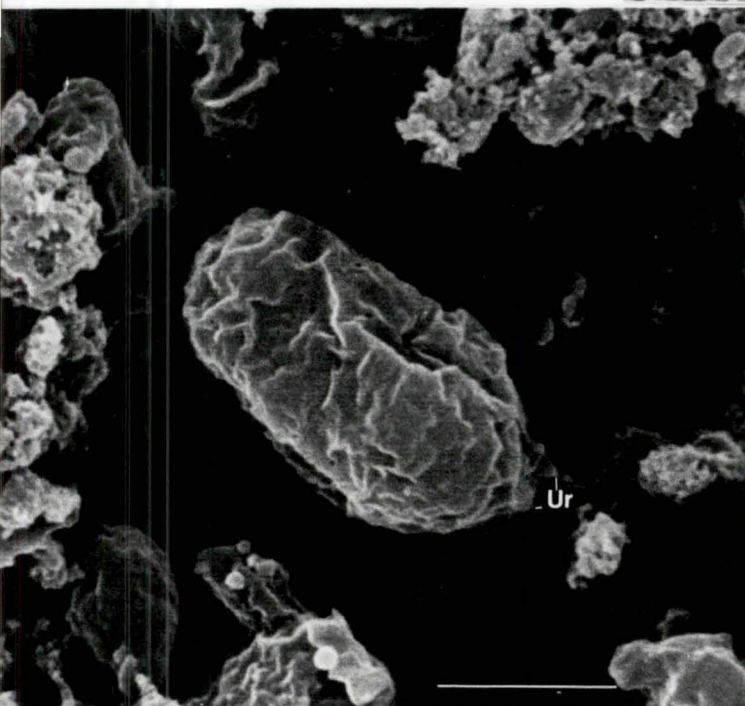
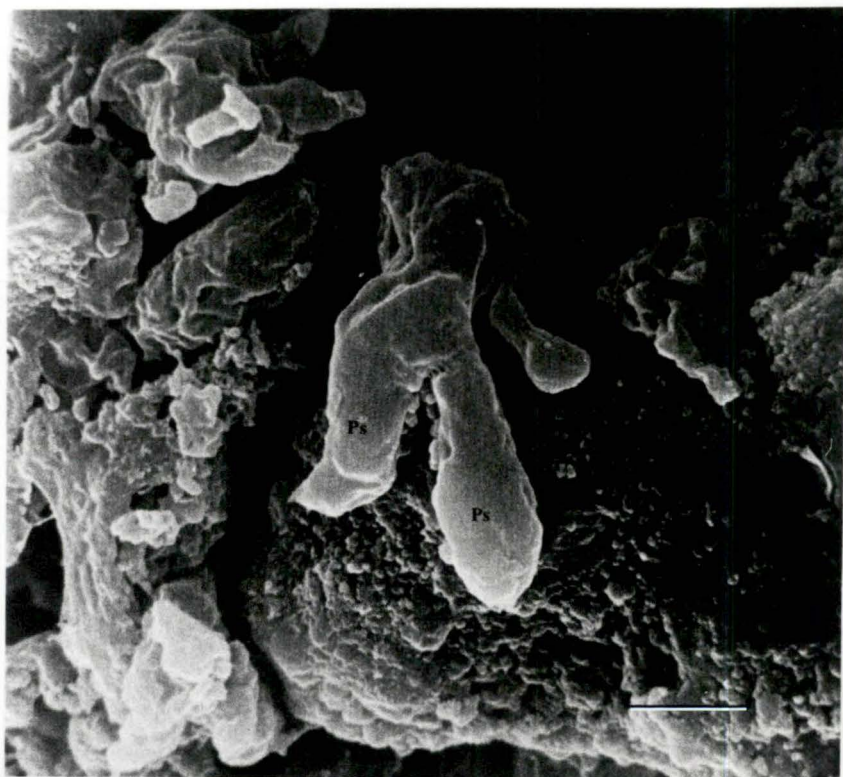


Fig 3.2.2.2.2

Trophozoïte de *N. lovaniensis* (S.m.), s'étirant, s'allongeant, dans la direction opposée à celle où l'on voit deux petits uropodes (Ur).

3.2.4.2.1

Kyste rond de *N. lovaniensis* (S.m.). Sa paroi (Pa) est non plissée et rugueuse, montre un pore (P) non évaginé.

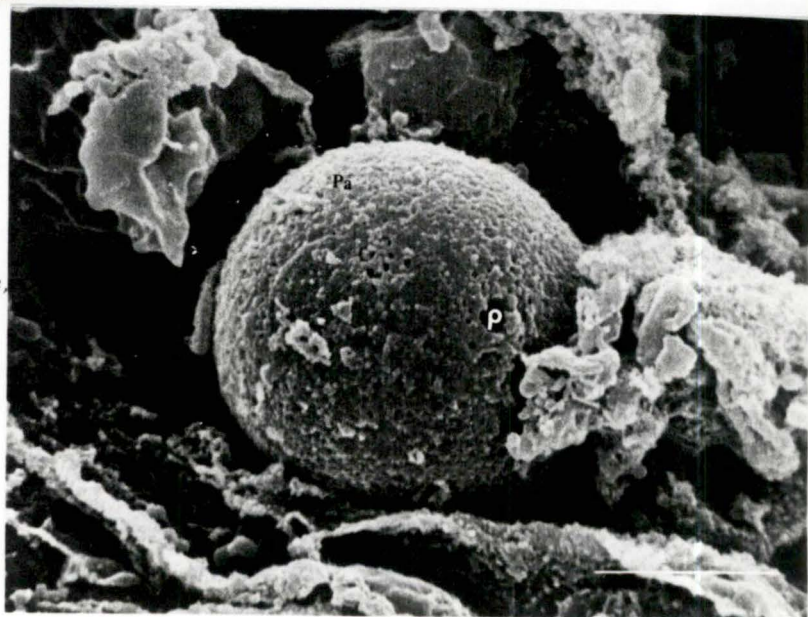




Fig. 3.2.3.1.1

Organisation générale d'un kyste de *N. lovaniensis* (S.b.).

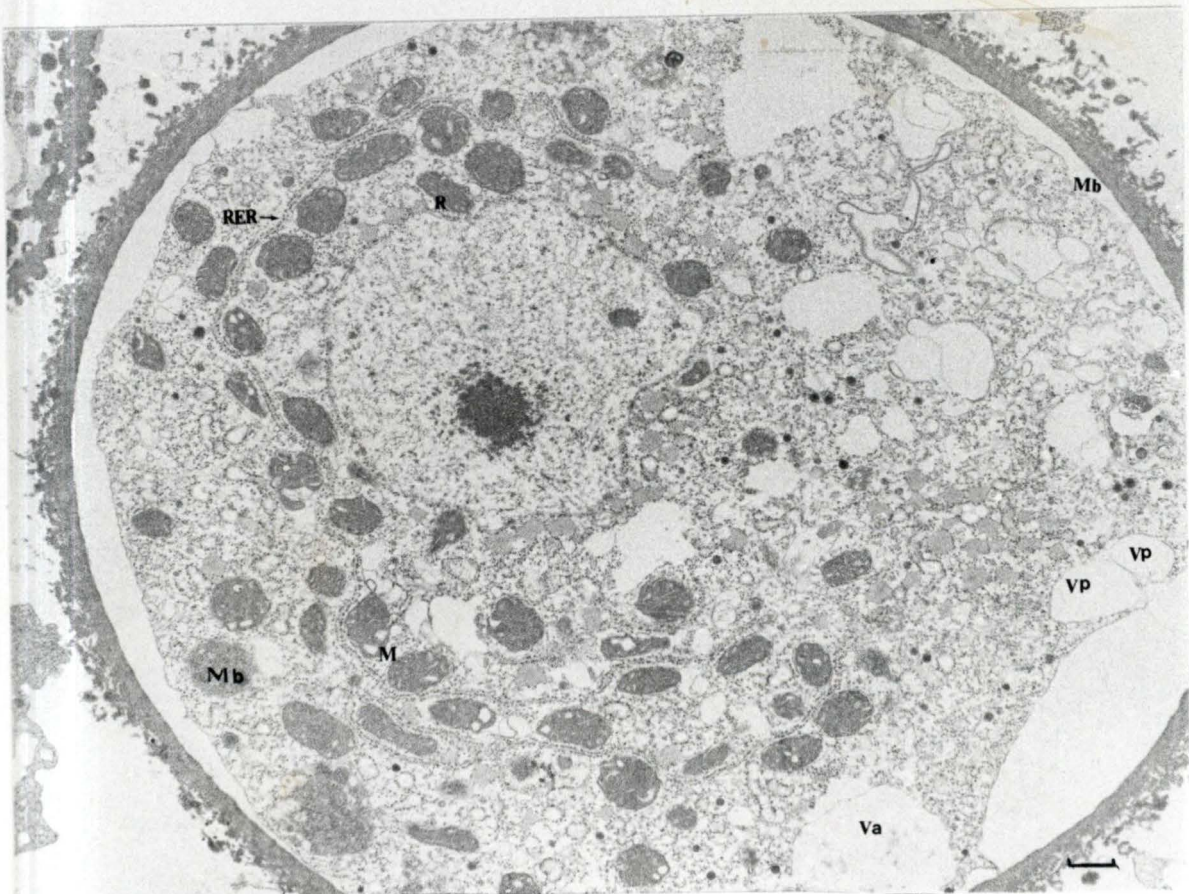


Fig. 3.2.3.1.2

Section d'un kyste de *N. lovaniensis* (S.b.). La membrane (Mb) du trophozoïte est accolée à la paroi du kyste. Les mitochondries (M) de formes rondes ou en haltères sont associées ou non au R.E.R. Sa membrane nucléaire est entourée d'une couche de ribosomes (R). Des petites vacuoles pulsatiles (Yp) et alimentaires (Ya) et des YLP sont distribués dans le cytoplasme.

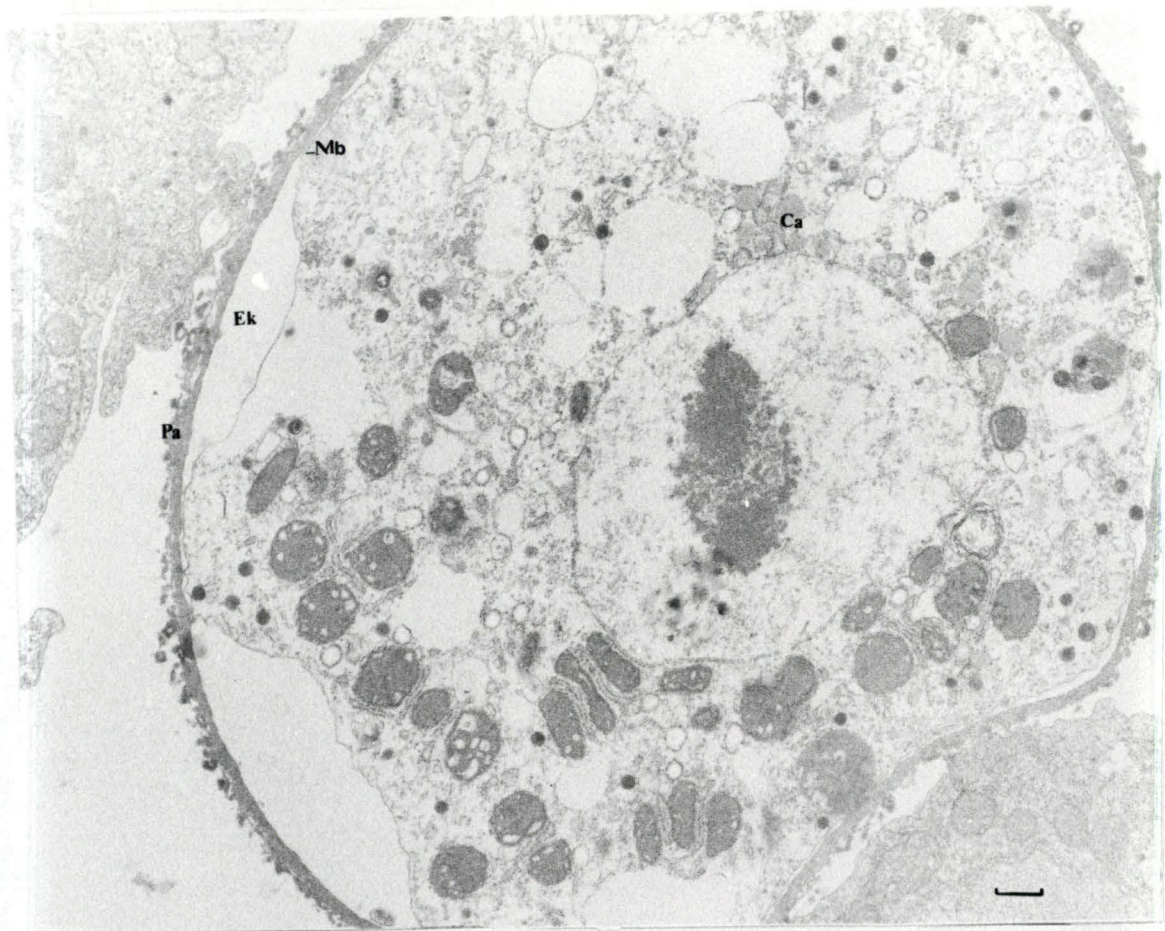


Fig. 3.2.3.1.3

Section d'un kyste jeune de *N. lovaniensis* (S.B.). La membrane (Mb) du trophozoïte est accolée à la paroi (Pa) et l'espace kystique (Ek) est très petit. L'organisation interne du trophozoïte est analogue à la Fig.3.2.3.1.2. La membrane nucléaire forme des canaux qui s'étendent dans le cytoplasme.

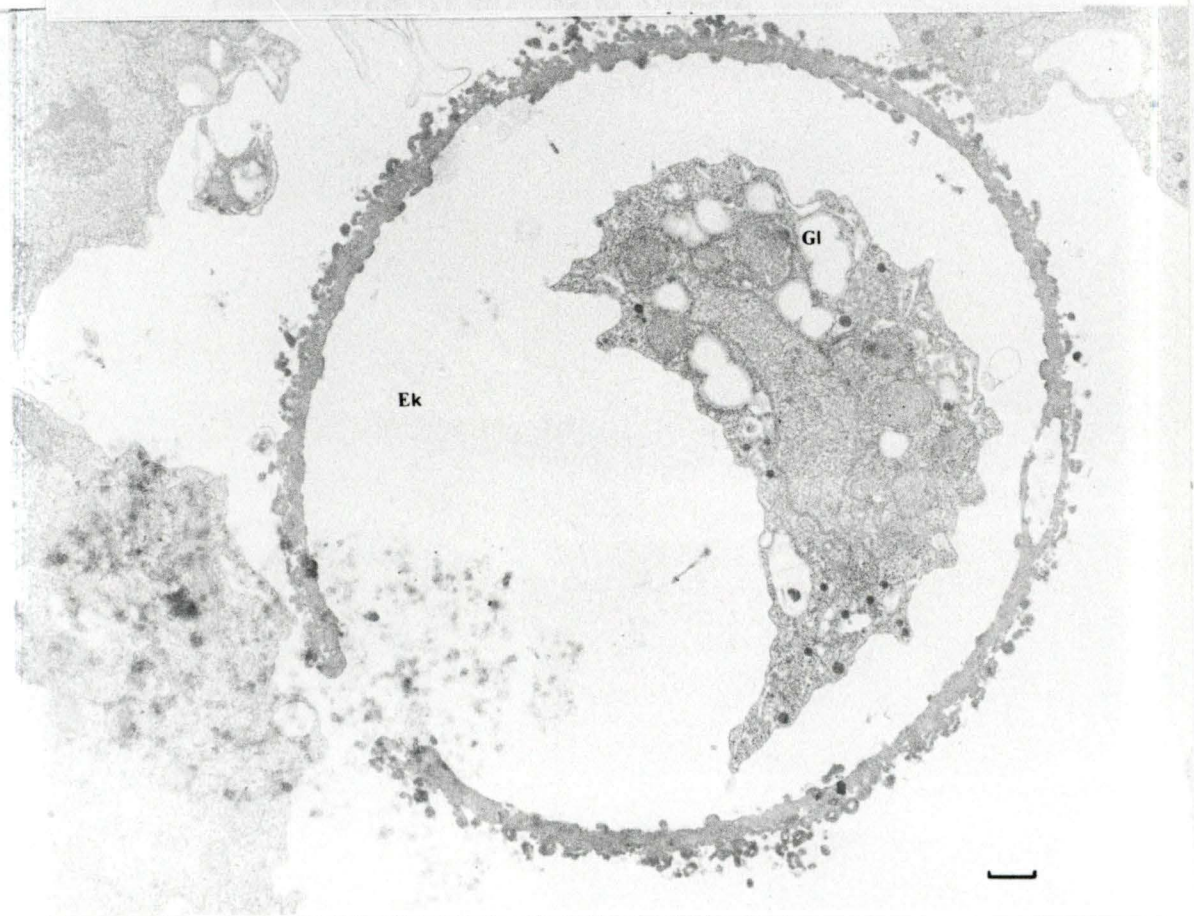


Fig. 3.2.3.1.4

Section d'un kyste vieux de *N. lovaniensis* (S.B.), le trophozoïte est rétracté, l'espace kystique (Ek) est très grand, il y a peu d'organites cytoplasmiques et les globules lipidiques (Gl) fusionnent.

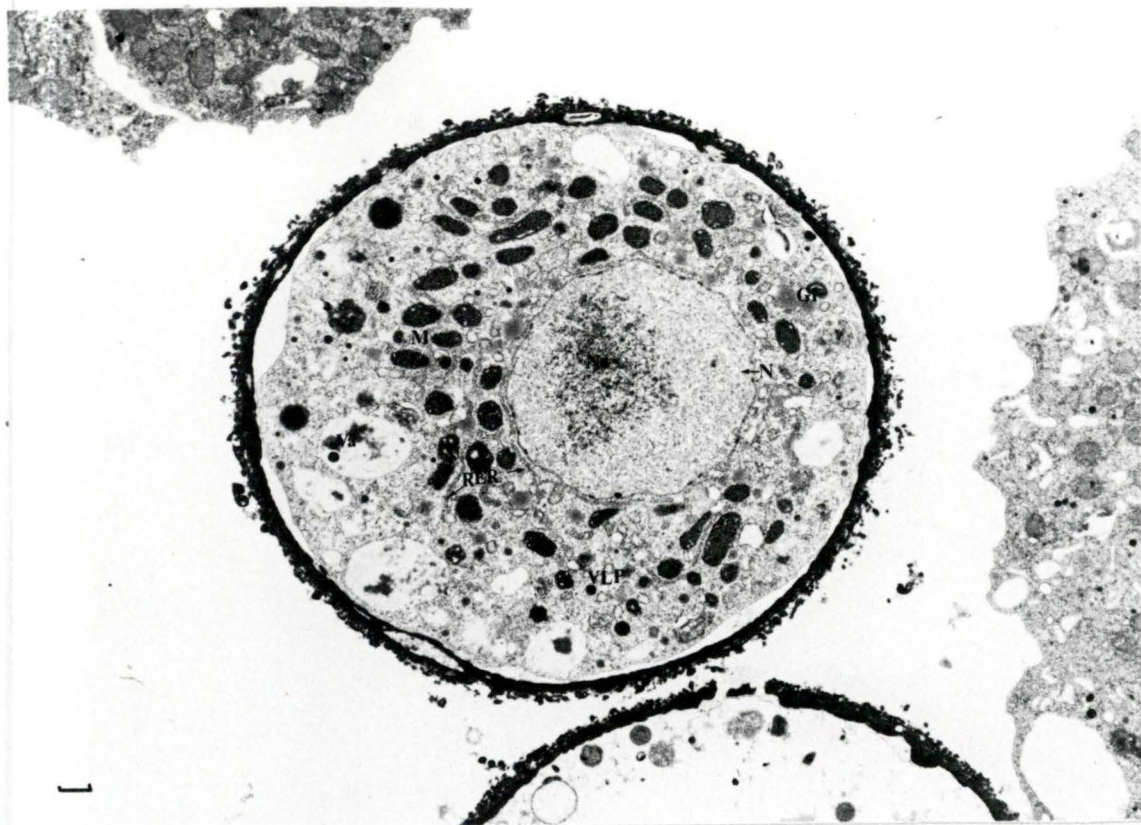


Fig. 3.2.4.1.1

Organisation générale d'un kyste de *N. lovaniensis* (S.m.).



Fig. 4.2.4.1.2

Section d'un pore (P) de kyste de *N. lovaniensis* (S.m.), L'endokyste (En) et l'exokyste (Ex) y fusionnent, on aperçoit le bouchon de mucus (Mc) réticulé.

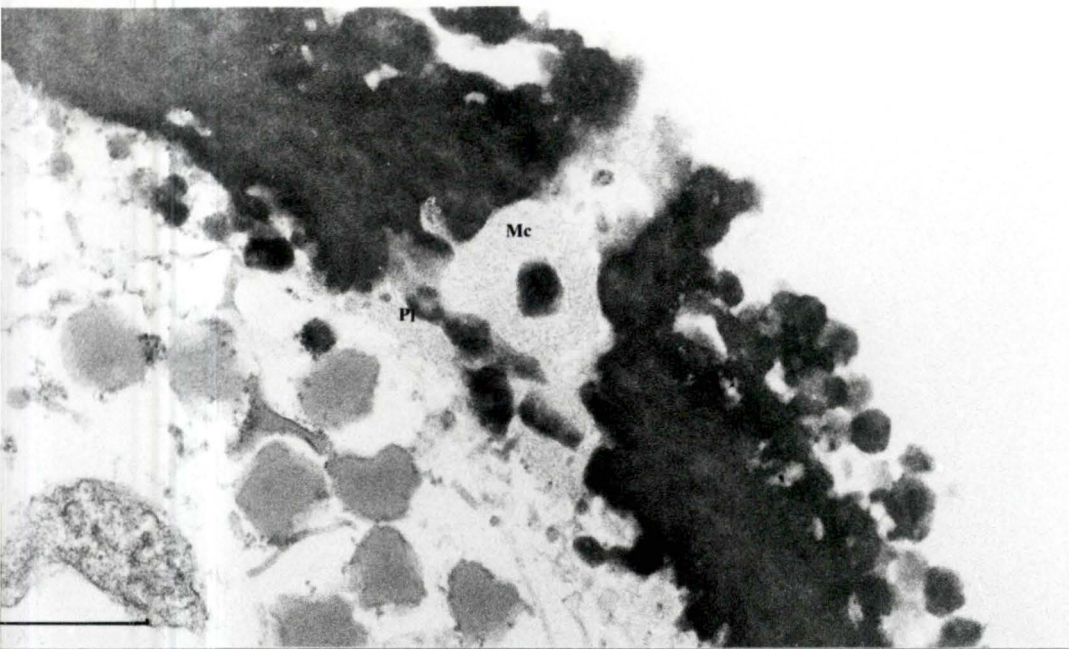


Fig. 3.2.4.1.3

Section au niveau d'un pore de kyste de *N. lovaniensis* (*S.m.*). L'endokyste fibrillaire (En) et l'exokyste (Ex) granuleux y fusionnent. Le pore non évaginé est obturé par un bouchon de mucus (Mc) et un plaque (Pl) de matériel de l'endokyste.

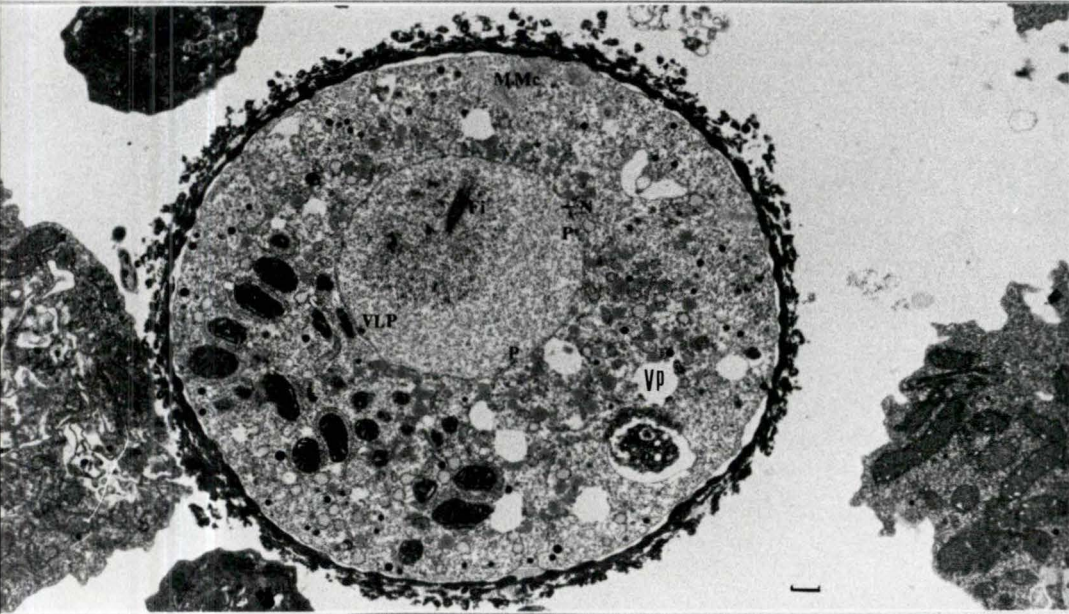
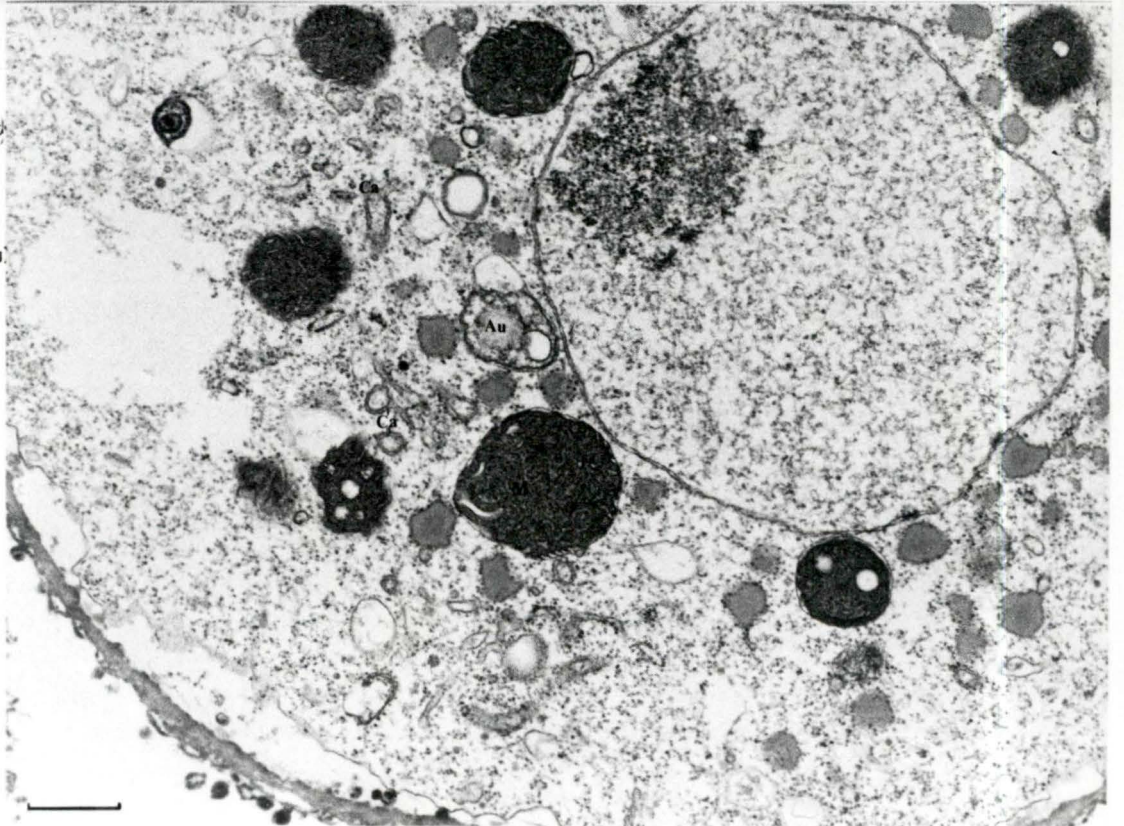


Fig. 3.2.4.1.4

Section d'un kyste de *N. lovaniensis* (*S.m.*). le noyau (N) contient une structure fibrillaire (Fi) et des VLP. La membrane nucléaire régulièrement interrompue par des pores (P) montre des canaux (Ca). Le cytoplasme contient de nombreux organites cytoplasmiques et du matériel mucoïde (M.Mc).

3.2.4.1.5

Section d'un kyste de *N. lovaniensis* (*S.m.*). Des portion de canaux (Ca) se trouvent dans le cytoplasme parmi les mitochondries (M), les globules lipidiques (Gl) et les autophagosomes (Au).





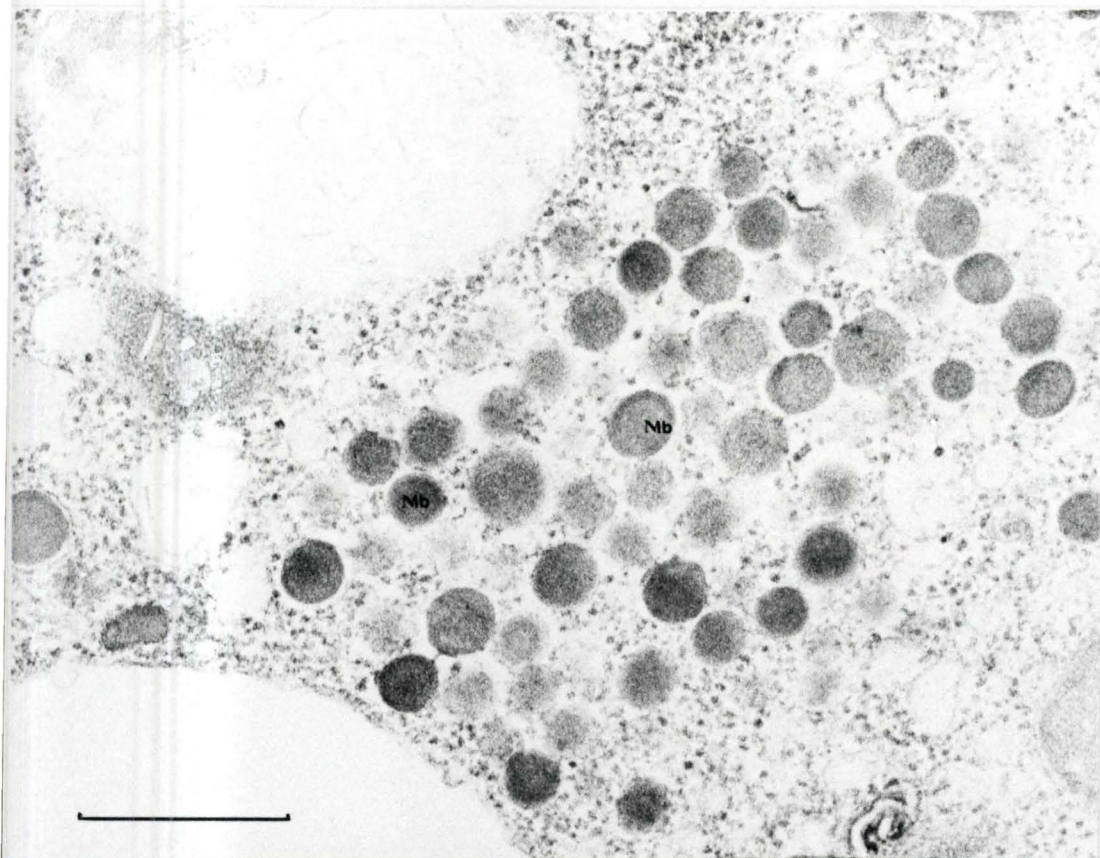


Fig. 3.2.4.1.6

Section de cytoplasme d'un kyste de *N. lovaniensis* (S.m.), les macrobodies sont organisés en cristaux.

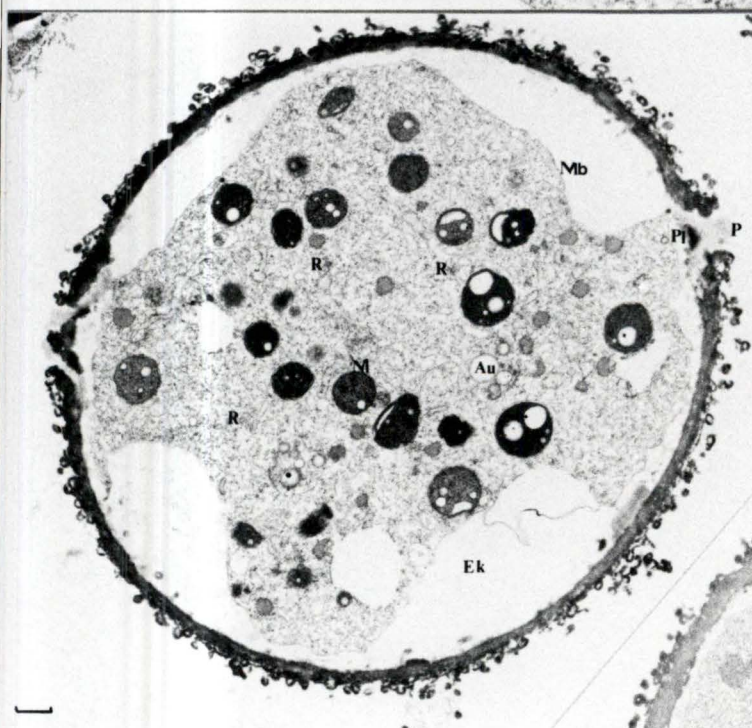


Fig. 3.2.4.1.7

← Section d'un kyste vieillissant de *N. lovaniensis* (S.m.). La membrane (Mb) du trophozoïte se détache partiellement de la paroi (Pa), l'espace kystique (Ek) s'agrandit. Le cytoplasme contient des autophagosomes et des paquets de ribosomes (R). Le nombre d'organites cytoplasmiques diminue, les mitochondries (M) s'arrondissent et on ne voit plus de R E R.

Fig. 3.2.4.1.8

Section d'un kyste vieillissant de *N. lovaniensis* (S.m.) à un stade plus avancé. L'espace kystique s'agrandit. Le cytoplasme est occupé par quelques mitochondries (M) et globules lipidiques (Gl). ↓





Fig. 3.2.4.1.9

Section d'un kyste de *N. lovaniensis* (*S.m.*) placé dans un milieu défavorable. Celui-ci montre de nombreux autophagosomes (Au), la chromatine (Ch) du noyau s'agrége et les ribosomes (R) se rassemblent en poquets.

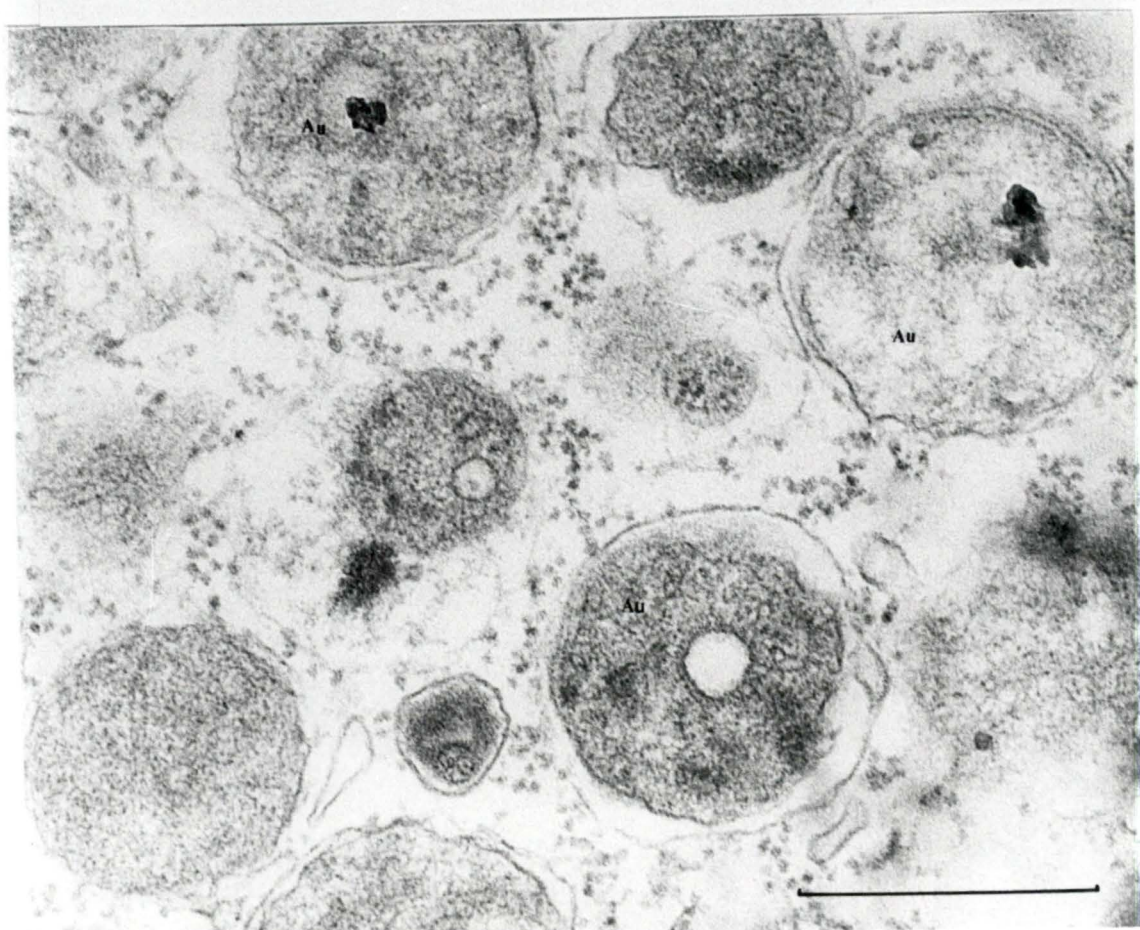


Fig. 3.2.4.1.10

Autophagosomes (Au) d'un kyste de *N. lovaniensis* (*S.m.*) placé dans un milieu défavorable.

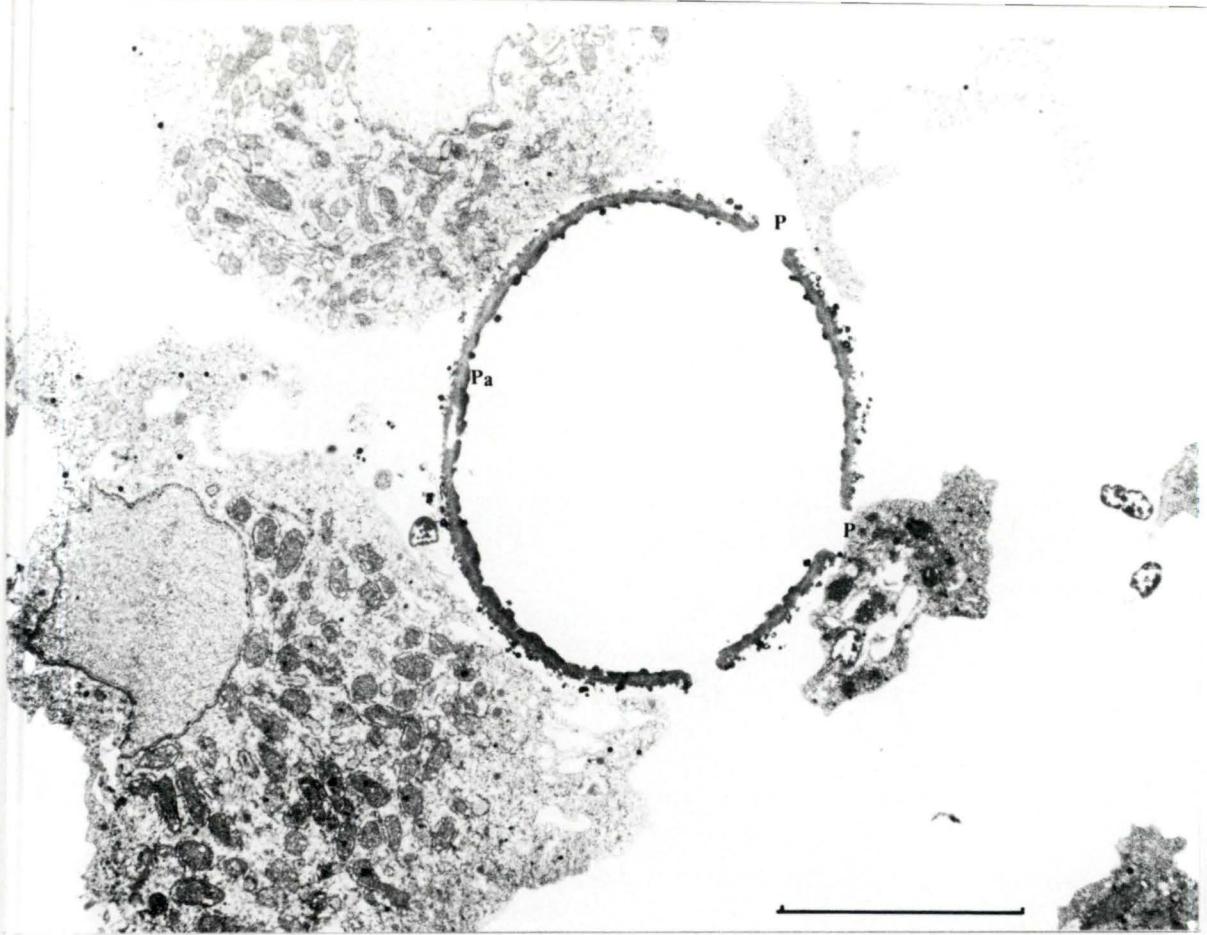


Fig. 3.2.4.1.11

Section d'un kyste vide de *N. lovaniensis* (*S.m.*). Le bouchon de mucus (Mc) et la plaque (Pl) de matériel de l'endokyste sont absents. Il peut s'agir d'une amibe lysée ou d'une incidence de coupe.

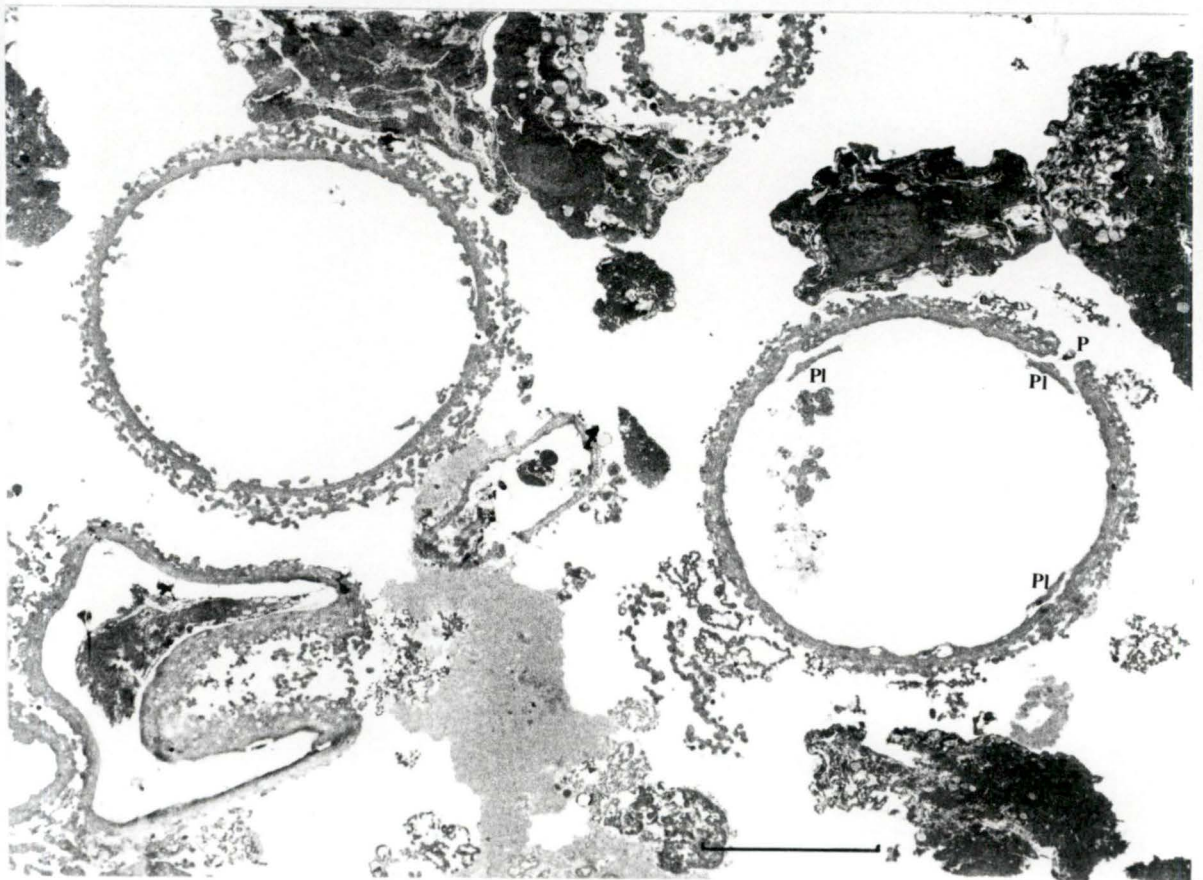


Fig. 3.2.4.1.12

Cette micrographie montre deux kyste de *N. lovaniensis*, dont celui de droite montre des irrégularités de formation des pores. La plaque (Pl) de l'endokyste est accolé à la paroi (P) et le bouchon de mucus est inexistant.

## Chapitre 4. DISCUSSIONS ET CONCLUSIONS.

Nous avons étudié deux souches de *Naegleria lovaniensis*, la première est la souche type, belge, et la seconde est une souche mexicaine qui n'a pas encore été décrite.

Nous avons commencé par une approche en contraste de phase pour nous initier aux différentes formes que ces protozoaires peuvent prendre.

### 4.1 Observations en microscopie optique.

La forme la plus courante en milieu axénique est la forme amibienne qui se déplace en formant des pseudopodes.

Les kystes se rencontrent parfois spontanément ou dans des cultures âgées. Ce sont des formes de résistance aux conditions hostiles du milieu. Nous avons observé la présence de kystes dans la souche mexicaine de *N. lovaniensis* ce qui non seulement n'avait pas encore été signalé mais semblait être une caractéristique de cette souche.

La forme flagellée est obtenue en conditions hypotoniques, elle est transitoire et est nécessaire au déplacement de l'amibe pour la recherche d'un milieu plus enrichi en aliments.

La microscopie optique ne nous a pas permis d'établir d'autre différence entre les souches étudiées et les autres espèces de *Naegleria*.

## 4.2 Observations en microscopie électronique à transmission.

### 4.2.1 De la forme trophozoïte.

L'organisation générale du trophozoïte des deux souches de *Naegleria* est dans l'ensemble identique à celle des autres espèces de *Naegleria*, néanmoins nous observons certaines différences.

La membrane cellulaire présente les mêmes caractéristiques pour les deux souches. Comme les autres espèces de *Naegleria*, celles-ci se déplacent par pseudopodes.

Le noyau présente dans tous les cas un nucléole proéminent et une double membrane interrompue par des pores (WILLAERT, 1976). Le noyau de la souche type n'est pas toujours entouré par une citerne de RER non dilatée comme le mentionne STEVENS et al. (1980), il est alors entouré de ribosomes. Par contre celui de la souche mexicaine l'est toujours. Nous n'observons pas les couches de RER entourant le noyau décrites par STEVENS et al., (1980). Des extrusions nucléaires toujours entourées de RER sont observées dans les deux souches mais sont apparemment plus nombreuses pour la souche mexicaine. En effet nous remarquons des extrusions nucléaires uniquement chez les trophozoïtes dont le noyau est entouré de RER. Le RER entourant le noyau est donc en relation avec ses expansions nucléaires. Ce serait là un mécanisme d'échanges nucléocytoplasmiques.

Des segments de RER sont aussi dispersés dans le cytoplasme (STEVENS et al. 1980), ceux de la souche mexicaine apparaissent plus longs que ceux de la souche type. Comme pour *Naegleria gruberi* (SCHUSTER, 1975) ils sont associés aux mitochondries et aux globules lipidiques.

Un appareil de GOLGI rudimentaire composé de tubules et de vésicules dilatées se trouve dans le cytoplasme. La souche belge présente un appareil de GOLGI assez développé (empilement de saccules et de vésicules non dilatés).

Les mitochondries sont très abondantes et les quatre types de conformations (ronde, en haltère, allongée, en anneau) ont été observées pour les deux souches. Celles-ci ne nous permettent pas de différencier l'une ou l'autre souche ou espèce entre elles.

Les vacuoles alimentaires sont régulièrement rencontrées elles renferment de nombreux débris denses aux électrons.

Comme WILLAERT en 1976 nous n'observons pas de vacuoles pulsatiles en

milieu axénique. Mais des amibes placées en milieu hypotonique en possèdent. Leur contenu est transparent aux électrons et elles ne sont pas entourées de mitochondries comme *Naegleria fowleri* (RONDANELLI et al., 1976). Elles correspondent aux vacuoles pulsatiles de la forme flagellée.

Les globules lipidiques sont présents chez les deux souches étudiées, ils sont dispersés dans le cytoplasme et n'entourent pas spécialement le noyau comme chez *Naegleria jadini* (WILLAERT, 1976) et *Naegleria gruberi* (SCHUSTER, 1975). Leur association avec le RER n'est pas constante comme chez *Naegleria fowleri* (LASTOVICA, 1975).

Comme STEVENS et al. (1978) nous avons observé des corps noirs dans le cytoplasme des deux souches. Leur rôle est inconnu.

Les ribosomes sont dispersés dans le cytoplasme comme dans toutes les espèces.

De nombreux macrobodies sont présents.

Deux stades de développement de virus like particles (VLP) ont été observés chez les deux souches de *Naegleria lovaniensis*. Dans le nucléoplasme, ils ne sont pas encore entourés d'une membrane. Le corps générateur qui les produit se rencontre dans la souche mexicaine de même que la structure fibrillaire qui les envoie dans le cytoplasme. De nombreux VLP sont dispersés dans le cytoplasme. Le core dense est entouré d'une membrane lisse ou hérissée de pics. De tels VLP peuvent être expulsés hors de l'amibe. Nous avons aussi observé une structure fibrillaire dans le cytoplasme caractéristique des souches cultivées à haute température or notre souche était entretenue à 27°C et le noyau de ces souches ne présentait pas de signe de dégénérescence.

Des autophagosomes sont présents.

#### 4.2.2 De la forme kystique.

La paroi des kystes est composée d'un exokyste granuleux et d'un endokyste fibrillaire accolé, non séparé par un espace comme chez *Naegleria gruberi*. Elle est régulièrement interrompue par des pores et on y observe une petite évagination. Comme pour *Naegleria gruberi*, *Naegleria jadini* et *Naegleria fowleri* (SCHUSTER, 1975) le pore est formé d'un bouchon de mucus et d'une plaque de matériel de l'endokyste. Ses deux constituants

ne se rencontrent pas toujours ensemble suivant le degré de maturation du kyste. Nous avons observé du matériel mucoïde dans le cytoplasme; ce matériel y est synthétisé et va vers les pores de la paroi du kyste. Le trophozoïte sécrète donc sa paroi et les constituants des pores.

Le noyau des deux souches présente des canaux en forme de diverticules qui s'étendent à partir de la paroi nucléaire vers le cytoplasme.

Le trophozoïte enkysté passe par plusieurs stades de maturation.

#### Stade 1: kyste jeune.

La membrane du trophozoïte est accolée à la paroi du kyste et l'espace kystique est très petit. L'organisation interne du trophozoïte est analogue à celle de la forme amibienne, on trouve en outre des vacuoles alimentaires formées durant la phase amibienne. On y observe des autophagosomes et diverses vacuoles.

#### Stade 2: Kyste vieillissant.

La membrane du trophozoïte se détache de la paroi du kyste, l'espace kystique s'agrandit de plus en plus. Le trophozoïte se rétracte à l'intérieur du kyste et il reste encore attaché à la paroi par quelques points. Le nombre d'organites cytoplasmiques diminue, les mitochondries s'arrondissent et leurs crêtes deviennent moins visibles.

#### Stade 3: Kyste vieux.

Le trophozoïte est tout à fait rétracté à l'intérieur. Il y a peu d'organites cytoplasmiques et les globules lipidiques fusionnent.

#### -Kystes provenant d'un milieu nutritif pauvre.

La peptone caséine inhibant la croissance des amibes, celles-ci s'enkystent et présentent beaucoup de signes de dégénérescence.

### -Kystes vides.

Des coupes s eries nous ont montré des kystes vides. Ceci nous permet de penser au mode de d enkystement par un pore et non par éclatement de la paroi du kyste.

#### 4.2.3 De la forme flagellée.

Nous avons pu l'observer en microscopie optique mais pas en microscopie électronique. Le mode de fixation est critique et les cellules très fragiles. Il faudrait les fixer avec un fixateur très rapide tel celui de PARDUCZ (1964) au tétroxyde d'osmium et de chlorure mercurique.

### 4.3 En microscopie électronique à balayage.

L'étude morphologique en microscopie à balayage nous a permis d'observer des amoebostomes dont la signification est encore peu claire.

Les kystes des deux souches ont une paroi non plissée comme *Naegleria jadini* et *Naegleria fowleri*. Mais elle est plus rugueuse pour la souche mexicaine que <sup>pour</sup> la souche type. Ces kystes sont ronds et l'on observe un nombre constant de 3 à 4 pores ce qui semble une caractéristique de l'espèce.

Le bord des pores est lisse et on ne voit pas l'évagination que nous observons en microscopie électronique à transmission, on peut donc considérer que les pores ne sont pas évaginés comme ceux de *Naegleria gruberi*.

### 4.4 Résultats numériques.

Les trophozoites ayant été cultivés dans un même milieu nutritif les tailles des kystes sont donc comparables. Le test de t de STUDENT nous permet de réaliser un test d'hypothèse sur les moyennes de deux échantillons dont les moyennes des populations sont inconnues.



Dans tous les cas le  $t$  observé étant plus petit que le  $t$  de STUDENT nous pouvons dire que les deux souches ont les mêmes dimensions pour le diamètre intérieur des kystes, pour le diamètre intérieur de l'ouverture des pores et pour l'épaisseur de la paroi. Il n'est donc pas possible de les différencier sur ce critère morphologique.

#### 4.5 Flore virale ou bactériologique associée.

A propos des amibes dysentériques, il est bien connu qu'une souche contaminante d'*Entamoeba histolytica* est pratiquement un complexe comprenant d'une part un protozoaire, l'amibe, qui est l'élément essentiel, qui apporte son pouvoir pathogène propre, mais variable suivant la souche, et d'autre part une flore bactérienne associée dont la virulence, elle aussi, est variable.

Comme le fait remarquer DESCHIENS (1965) l'intervention de la flore associée est bi-potentielle: d'une part, elle diminue en provoquant son inflammation la résistance de la muqueuse intestinale et favorise ainsi l'installation de l'amibe; d'autre part la flore associée complique par surinfection et suppuration l'action nécrotique de l'amibe.

Par contre, il existe des microorganismes qui, *in vitro*, empêchent fortement la croissance d'*E. histolytica*, il s'agit par exemple, de *Bacillus subtilis* et de *Blastocystis hominis*.

Les autres amibes *Naegleria* fraîchement isolées dans l'eau ou au niveau des muqueuses nasales sont toujours accompagnées d'une flore associée. Les antibiotiques d'usage courant en culture de cellule, tels la pénicilline et la streptomycine suppriment aisément la flore microbienne habituelle mais pas les *Mycobactéries* (JADIN J.B. et WILLAERT, 1975) ou les virus.

L'inventaire de la flore bactérienne associée aux *Naegleria* et aux *Acanthamoeba* est encore mal connue. Mais on connaît déjà de nombreux cas d'isolement de *Mycobacterium leprae* agent de la lèpre, de *M. vaccae obuense*, agent d'ulcère cutané, et de *Legionella pneumophila* agent de la maladie des légionnaires.

Nous souhaitons pouvoir continuer cette étude de la flore associée tant bactériologique que virale.

**BIBLIOGRAPHIE.****- ALEXEIEFF A., 1912.**

Sur les caractères cytologique et la systématique des amibes du groupe limax (*Naegleria* nov. gen. et *Hartmannia* nov. gen.) et des amibes parasites des Vertebres (*Protomoeba*, nov. gen.).

Bull. Soc. Zool. (France), 37, 55-74.

**- ANDERSON K., JAMIESON A., 1972.**

Primary amoebic meningo-encephalitis.

The Lancet, 777, 379.

**- ANDERSON K., JAMIESON A., JADIN J.B., WILLAERT E., 1973.**

Primary amoebic meningo-encephalitis.

The Lancet, 1, 672.

**- APLEY J., CLARKE S.K.R., ROOME A.P.C.R., SANDRY S.A., SAYGI G., SILK B., WARURST D., 1970.**

Primary amoebic meningo-encephalitis in Britain.

Brit. Med. J., 1. 569-599.

**- BROWN T.J., 1980.**

Cytopathogenic and non-pathogenic *Naegleria* ssp. in mammalian cell cultures.

Proc. 2nd. Int. Conf. on Biol. and Pathogenicity of small free-living *Amoebae*  
Gainesville, Florida, 88.

- BUTT C. 1966.  
Primary amoebic meningo-encephalitis.  
New England J. Med., 274, 1473-1476.
  
- CAPRON A., BIGUET J., VERNES A., AFCHAIN D., 1968.  
Structure antigénique des helminthes. Aspects immunologiques des relations hôtes-parasites.  
Patho. Biol., 16, 121-138.
  
- CARTER R.F., 1970.  
Description of a *Naegleria* sp. isolated from two cases of primary amoebic meningo-encephalitis, and of the experimental pathological changes induced by it.  
J. Pathol., 100, 217-244.
  
- CARTER R.F., 1972.  
Primary amoebic meningo-encephalitis. An appraisal of present knowledge.  
Trans. R. Trop. Med. Hyg., 66, 193- 213.
  
- CAROSI G., 1974.  
Etude comparative de l'ultrastructure d'*Entamoeba moshkovskii*, des amibes parasites du genre *Entamoeba* et des amibes "Free-living" du genre *Hartmannella- Naegleria*.  
Ann. Soc. belge Med. Trop., 54, 265-277.
  
- CAROSI G., SCAGLIA M., FILICE G., WILLAERT E., 1976.  
An electron microscope study of *Naegleria jadini* nov. sp. (Willaert- Le Ray, 1973) in axenic medium. The ameboid stage.  
Protistologica, XII, 15, 31-36.
  
- CAROSI G., SCAGLIA M., FILICE G., WILLAERT E., 1977.  
A comparative electron microscope study of axenically cultivated trophozoite of free-living amoeba of the genus *Acanthamoeba* and *Naegleria* with special reference to the species *N. gruberi* (Schardinger, 1899), *N. fowleri* (Carter, 1970) and *N.jadini* (Willaert and Le Ray, 1973).  
Arch. Protistenk, 119, 264-273.

- **CHANG S.L., 1971.**  
 Small free-living amoeba: cultivation, quantification, classification, pathogenesis and resistance.  
 Curr. Trop. Comp. Pathobiol., 1, 201-254.
  
- **CHANG S.L., 1979.**  
 Pathogenesis of pathogenic *Naegleria* amoeba.  
 Folia Parasitol., (Prague), 26, (3), 195-200.
  
- **CERVÀ L., NOVAK K., 1968.**  
 Amoebic meningo-encephalitis: Sixteen fatalities.  
 Science, 160, 92.
  
- **CERVÀ L., 1971.**  
 Studies of limax amoeba in a swimming pool.  
 Hydrobiologia, 38, 141-161.
  
- **CHANG S.L., 1971.**  
 Small, free-living amoebas, cultivation, quantification, identification, classification, pathogenesis and resistance.  
 Curr. Trop. comp. Pathobiol., 1, 201-254.
  
- **COX CH. R. , 1967.**  
 Technique et contrôle du traitement des eaux.  
 Organisation mondiale de la santé, Genève.
  
- **CULBERTSON C.G., 1971.**  
 The pathogenicity of soil amoebas.  
 Ann. Rév. Microbiol. 25, 231-254.
  
- **DAS S.R., SINGH B.V., 1970.**  
 Disease potential of free living *amoeba*: virulence and chemotherapy of free-living *amoebae*.  
 J. Parasitology, 56, 67.

- **DAS S.R., WILLAERT E., JADIN., 1974.**  
 Studies on mitotic division in *Naegleria jadini*.  
 Ann. Soc. belge Med. Trop., 54, 141-146.
  
- **DE JONCKEERE J.F., VAN DE VOORDE H.,1976.**  
 Difference in destruction of cyst of pathogenic and non pathogenic *Naegleria*  
 and *Acanthmaeba* by chlorine.  
 Appl. Environ. Microbiol., 31,294-297.
  
- **DE JONCKHEERE J.F., 1977.**  
 Use of an xenic medium for differnciation between pathogenic and  
 non pathogenic *Naegleria fowleri* isolates.  
 Appl. Environ. Microbiol., 33, (4), 751-757.
  
- **DE JONCKHEERE J.F., 1981.**  
*Naegleria australiensis* sp. nov., another pathogenic *Naegleria* from water.  
 Protistologica, 17, 423-429.
  
- **DE JONCKHEERE J.F., 1981.**  
 L'écologie des amibes amphizoïques.  
 Ann. Stat. Biol. Besse-en-Chandesse, 15, 15-20.
  
- **DE JONCKHEERE J.F., DIVE D.G., PUSSARD M., VICKERMAN K., 1984**  
*Willaertia magna* gen nov., sp., nov., ( Valkampffiidae), a thermophilic  
 amoeba found in different habitats.  
 Protistologica ,20, 5-13.
  
- DESCHIENS R., 1965.**  
 L'amibiase et l'Amibe dysentérique.  
 Ed. MASSON, Paris, 1-697.
  
- DEVAQUET A., 1988.**  
 Université de Recherche: l'Etat d'Urgence.  
 Ed. Odile Jacobs, Paris, 1-330.
  
- **DIAMOND L.S., MATTERN C.F.T., BARTGIS I.L., 1972.**  
 Viruses of *Entamaeba histolitica*.  
 I. Identification of transmissible virus-like agents.  
 Jl. Virology, 9,326-341.

- **DINGLE A.D., FULTON C., 1966.**  
 Developpment of the flagellar apparatus of *Naegleria*.  
 J. Cell. Bio., 31, 43-54.
  
- **DUJARDIN. F., 1841.**  
 Histoire naturelle des zoophytes infusoires.  
 Librairie encyclopédique de Roret, Paris.
  
- **DUMA R.J., ROSEMBLUM W.J., Mc. GEHEE X.F., JONES M., NELSON E.C., 1971.**  
 Primary amoebic meningo-encephalitis caused by *Naegleria*. Two new cases, response to amphotericine B, and a review.  
 Ann. Intern. Med., 74. 923-931.
  
- **DUNNEBACKE T.H., SCHUSTER F.L., 1971.**  
 Infectious agent from a living soil amoeba, *Naegleria gruberi*.  
 Science, 174, 516-518.
  
- **DUNNEBACKE T.H., SCHUSTER F.L., 1972.**  
 Infectious materiel from the small free-living soil amoeba.  
 J. Cell. Bio., 55, 64 A.
  
- **FRANK W., BOSCH I., 1972.**  
 Isolierung von Amoeben des types "*Hartmannella-Acanthamoeba*" und "*Naegleria*" aus Kaltblüter.  
 Parasitenk., 40, 139-150.
  
- **FULTON C., 1970.**  
 Amebo-flagellate as research parteners. The laboratory biology of *Naegleria* and *Tetramitus*.  
 Meth. Cell. Physiol., 4, 341-376.
  
- **FULTON C., DINGLE A.D., 1971.**  
 Basal bodies, but not centrioles in *Naegleria*.  
 J. Cell. Biol., 51, 826-836.

- **FULTON C., WALSH ., 1980.**  
Cell differentiation and flagellar elongation in *Naegleria gruberi*.  
Dependence and translation.  
J. Cell. Biol., 85, 346-360.
  
- **GRASSE P.P., 1963.**  
Encyclopedie la pléiade. N. R. F. Paris.  
Zoologie I, 191.
  
- **GRIFFIN J.L., 1972.**  
Temperature tolerance of pathogenic and non pathogenic free-living *amaeba*.  
Science, 178, 869-870.
  
- **HERMANNE J., 1974.**  
Meningo-encephalite amibienne primitive. Aspect clinique.  
Ann. Soc. belge Med. Trop., 54, 227-450.
  
- **JADIN J.B., 1971.**  
De la méningo-encéphalite amibienne primitive et du pouvoir pathogène des  
amibes limax.  
Ann. Biol. XII, Fasc 7-8.
  
- **JADIN J.B., HERMANNE J., ROBIJNN G., WILLAERT E., 1971.**  
Trois cas de méningo-encephalite amibienne primitive en Europe  
Occidentale à Anvers.  
Bull. Acad. nat. Med. (Paris), 155, 232-238.
  
- **JADIN J.B., WILLAERT E., COMPERE F., 1972.**  
De la nécessité du contrôle biologique des eaux potables.  
Bull. Acad. Nat. Med. (Paris), 156, 995-999.
  
- **JADIN J.B., 1973.**  
Hypothèse au sujet de l'adaptation des amibes du groupe limax à l'homme et  
aux animaux.  
Ann. Parasit. (Paris), T 48, N° 2 , 199-204.

- **JADIN J.B., 1973.**  
De la méningo-encéphalite amibienne primitive et du pouvoir pathogène des amibes "Limax".  
Ann. Biol. TXII, Fasc 7-8, 305-341.
  
- **JADIN J.B., WILLAERT E., HERMANNE J., 1973.**  
Présence d'amibe limax dans l'intestin de l'homme et des animaux.  
Bull. Séance 3 Acad. Roy. Sc. Outre-Mer, 520-526.
  
- **JADIN J.B., 1974.**  
Les amibes dans les eaux.  
Path. Biol., 22, N°1, 81-87.
  
- **JADIN J.B., WILLAERT E., MORET R., DERREUMAUX A.L., 1974.**  
Action du chlore sur les amibes de l'eau.  
Ann. Soc. belge Med. Trop, 54, 227-450.
  
- **JADIN J.B., WILLAERT E., 1975.**  
Amibe "*limax*" vecteurs possibles de mycobactéries et Mycobacterium leprae.  
Acta leprologica, 59-60, 57-66.
  
- **JADIN J.B., WILLAERT E., 1977.**  
Mastigamoeba et amibes libres à partir du mucus nasale de lépreux.  
Acta Leprol. (Nouv. Série), 66-67.
  
- **JADIN J.B., 1980.**  
Les aspects épidémiologiques et cliniques des amibes libres.  
Extrait des annales de la station biologique de Besse-en-Chandesse, N°15,  
1-14.
  
- **JADIN J.B., GIROUD P., JADIN J.M., 1986.**  
Conception nouvelles concernant les relations entre protozoaires, virus et bactéries.  
Bull. S. Acad. Sci. O-M., 30, 183-201.



- u
- **JADIN J.M., ESCHBACH H.L., VERHEYEN F., WILLAERT E., 1974.**  
Etudes comparatives des kystes de *Naegleria* et d'*Acanthamoeba*.  
Ann. Soc. bele Med. Trop., 54, 259-264.
  
  - **JOHN D.T., 1982.**  
Primary amoebic meningoencephalitis and the biology of *Naegleria fowleri*.  
Annu. Rev. Microbiol., 36, 101-123.
  
  - **JOHN D.T., COLE T.B., BRUNER R.A., 1985.**  
Amebostome of *Naegleria fowleri*.  
J. Protozool., 32, 12-19.
  
  - **KINGSTONE D., WARHURST D.C., 1969.**  
Isolation of amoeba from the air.  
J. Med. Microbiol., 2, 27-36.
  
  - **LASMAN M., 1982.**  
The fine structure of *Acanthamoeba astronyxis* with special emphasis on encystment.  
J. Protozool. 29, 458-464.
  
  - **LASTOVICA A.J., 1974.**  
Scanning electron microscopy of pathogenic and non pathogenic *Naegleria* cysts.  
Int. J. Parasit., 4, 139-142.
  
  - **LASTOVICA A.J., 1975.**  
Ultrastructure of pathogenic and non pathogenic *Naegleria* amoeba.  
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 69, 286-287.
  
  - **LAWANDE R.V., ABRAHAM S.N., JOHN I., EGLER L.J., 1979.**  
Recovery of soil amoebas from the nasal passages of children during the dusty harmattan in Zaria.  
Am. J. Clin. Pathol., 44, 269-278.

- MARTINEZ A.J., NELSON E.L., JONES M.M., DUMA R.J., ROSENBLUM W.Z., 1971.  
Experimental *Naegleria* meningo-encephalitis in mice. An electron microscope study.  
Lab. Invest., 25, 465-475.
  
- MARTINEZ A.J., DUMA R.J., NELSON E.C., MORETTA F.L., 1973.  
Experimental *Naegleria* meningo-encephalitis in mice.  
Penetration of the olfactory mucosal epitheliumm by *Naegleria* and pathologicis changes produced: a lighth and electron microscope study.  
Lab. Invest., 29, 121-134.
  
- MARTINEZ A.J., 1981.  
Free-living amoebas in human infections.  
w. Bell and U. Iralu Eds., 57.
  
- MILLONIG G., 1961.  
A modified procedure for lead staining of thin sections.  
J. Biophys. Biochem. Cytol. II,736-739.
  
- NELSON E.C., 1972.  
Procedure for the isolation of pathogenic *Naegleria*.  
Virg. J. Science, 23, 145.
  
- PAGE F.C., 1967.  
Taxonomic criteria for limax amoeba, with descripton of 3 new species of *Hartmannella* and 3 of *Valkampfia*.  
J. Protozool. 14, 499-521.
  
- PAGE F.C., 1976.  
An illustrated key to freshwater and soil *amoebae*.  
Fershwater. Biol. Ass. Sci. Publ., 34, 1-153.
  
- PARDUZ B., 1964.  
Ciliary movement coordination in ciliates.  
Int. Rev. Cytol. 21, 91.

- **PRESTON T.M., O'DELL D.S., 1973.**  
Deuterium oxide-induced reversion of *Naegleria gruberi* flagellates.  
J. Gen. Microbiol., 75, 351-361.
  
- **RAFALKO J., 1947.**  
Cytological observations on the amoeba-flagellate, *Naegleria gruberi*.  
J. Morphol., 81, 1-34.
  
- **REYNOLDS E.S., 1963.**  
The use of lead citrate at high pH as an electron opaque staining microscopy.  
J. Cell. Biol., 17, 208-212.
  
- **ROBERTSON J.D., 1964.**  
Unit membranes. A review with new studies of experimental alternations and a new subunit in synaptic membranes. M. Locke, Ed. : Cellular membranes in development 22nd Symposium for the study of development and growth. New York, Academic Press I.
  
- **RONDANELLI E.G., CAROSI G., SCAGLIAM., DEI CAS A., LOTZICKER., 1976.**  
Modelli di organizzazione ultrastrutturale del trophozoite ameboide di *Naegleria fowleri* e di *Acanthamoeba astronyscis*, agenti etiologici di meningo-encephalitis amoebic primaric (M. E. A. P.) nell'uomo.  
Studio microelettronico comparativo.  
Giorn. Mal. Inf. Parass., 28, 450-456.
  
- **RONDANELLI E.G., SCAGLIA M., 1987.**  
Amphizoic amoeba: human pathology.  
Ed. Piccin, 49-86.
  
- **SAYGI G., 1971.**  
Studies on free-living amoeba.  
Ph. D. Thesis. Liverpool., 1971.

- **SCHARDINGER F., 1899.**

Entwicklungskreis einer *Amoeba lobosa* (*Gymnamoeba*): *Amoeba gruberi*.  
Sitzb. Kaiserrl. Akad. Wiss. Wien. Abt. 1, 108, 713-734.

- **SCHUSTER F.L., 1963.**

An electron microscope study of the amoebo-flagellate, *Naegleria gruberi*  
(Schardinger).

I. The ameboid and flagellate stages.

J. Protozool. 10, 297-313.

- **SCHUSTER F.L., 1963.**

An electron microscope study of the amoebo-flagellate *Naegleria gruberi*  
(Scardinger).

II. The cyst stage.

J. Protozool. 10, 313-320.

- **SCHUSTER F.L., SVILHA G., 1969.**

Ribonucleoproteine-containing vesicles in cysts of *Naegleria gruberi*.

J. Protozool., 15, 752-758.

- **SCHUSTER F.L., 1969.**

Intranuclear virus like bodies in the amoebo-flagellate *Naegleria gruberi*.

J. Protozool., 16, 724-727.

- **SCHUSTER F.L., DUNNEBACKE T.H., 1971.**

Formation of bodies associated with virus like particles in the  
amoeboflagellate *Naegleria gruberi*.

J. Ultrastructures Res., 36, 659-668.

- **SCHUSTER F.L., DUNNEBACKE T.H., 1974.**

Growth at 37°C of the EG<sub>s</sub> strain of the amoebo-flagellate *Naegleria gruberi*  
containing virus like particles.

I. Nuclear changes.

J. Invertebr. Pathol. 23, 172-181.

- **SCHUSTER F.L., DUNNEBACKE T.H., 1974.**  
 Growth at 37°C of the EG<sub>5</sub> strain of the amoeboflagellate *Naegleria gruberi* containing virus like particles.  
 II. Cytoplasmic changes.  
 J. Invertebr. Pathol. 23, 182-189.
  
- **SHUSTER F.L., 1975.**  
 Ultrastructure of mitosis in amoeboflagellate *Naegleria gruberi*.  
 Tissue and Cell., 7 (1), 1-12.
  
- **SCHUSTER F.L., 1975.**  
 Ultrastructure of cyst of *Naegleria* spp: A comparative study.  
 J. Protozool., 22 (3), 352-359.
  
- **SCHUSTER F.L., DUNNEBACKE T.H., 1980.**  
 Lysates of *Naegleria* amebas: Ultrastructural and autoradiographic studies of induced cytopathology in tissue culture systems.  
 2nd Int. Conf. on Biology and Pathogenicity of small free-living amoebae,  
 Gainesville, Florida, 58-88.
  
- **SINGH B.N., 1952.**  
 Nuclear division in nine species of small free-living amoeba and its bearing on the classification of the order Amoebida.  
 Phil. Trans. Roy. Soc. London. Ser. B., 236, 405-461
  
- **SINGH B.N., DAS S.R., 1970.**  
 Studies on pathogenic and non pathogenic small free-living amoeba and the bearing of nuclear division on the classification of the order *amoebida*.  
 Phil. Tans. Roy. Soc. Dond., 250, 435-476.
  
- **SINGH B.N., DAS S.R., 1972.**  
 Intranasal infection of mice with flagellate stage of *Naegleria aerobia* and its bearing on the epidemiology of human meningo-encephalitis.  
 Current Science, 41, 625-628.

- **STEVENS A.R., GALLUP E., WILLAERT E., 1978.**  
 Evaluation of membrane bound black bodies in trophozoite and cysts of *Naegleria* spp.  
 J. Inv. Path., 31, 63-76.
  
- **STEVENS A.R., DE JONCKHEERE J., WILLAERT E., 1980.**  
*Naegleria lovaniensis* new species: isolation and identification of six thermophilic strains of a new species found in association with *Naegleria fowleri*.  
 Int. J. Parasit. 4, 139-142.
  
- **VAHLKAMPF E., 1905.**  
 Beitrage zur Biologie und Entwicklungsgeschichte von *Amoeba limax* einschliesslickdes Züchtung auf Künstlichen Nahrbaden.  
 Arch. Protisenk.,5,167-220.
  
- **VICKERMAN K., 1962.**  
 Pattern of cellular organisation in limax *amoebae*. An electron microscope study.  
 Exptl. Cell Res., 26, 497-519.
  
- **VOLKONSKY M., 1931**  
*Hartmannella castellanii* Douglas et classification des *Hartmanelles*.  
 Arch. Zool. Exp. Gén. 72, 317-329.
  
- **WARHURST D.C., ROMME A.P., SAYGI G., 1970.**  
*Naegleria* sp. from human cerebrospinal fluid.  
 Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 64,19-20.
  
- **WARHURST D.C., MANN D., 1980.**  
 Primary amoebic meningo-encephalitis in bath spa.  
 England. II. Int. Conf on the biol. a pathogenicity of small free-living *Amoeba*.  
 Gainesville. Florida March ,1980.

- WELLINGS F.M., AMUSO P.T., CHANG S.L., LEWIS A.L., 1977.  
Isolation and identification of pathogenic *Naegleria* from Florida lakes.  
Appl. Environ. Microbiol., 34, 661-667.
  
- WILLAERT E., LE RAY D., 1973.  
Caractères morphologiques, biologiques et immunologiques de *Naegleria jadini* sp.nov.(*Amoebida*, *Vahlkampfiidae* ).  
Protistologica, 9, 417-426.
  
- WILLAERT E., 1976.  
Etude immuno-taxonomique des genres *Naegleria* et *Acanthamoeba*.  
(Protozoa: Amoebida).  
Acta zoologica et Pathologica, 1-239.  
Bulletin de la Société Royale de Zoologie d'Anvers. N° 65.