

50376

1975

N° Ordre: 88

212

50376

1975

212

# THESE

Présentée

A la Faculté des Sciences de l'Université de Lille

pour l'obtention du titre de Docteur de l'Université de Lille

(Mention: Biologie Cellulaire)

ETUDE IMMUNO-TAXONOMIQUE DES GENRES

*NAEGLERIA* ET *ACANTHAMOEBA*

(PROTOZOA: AMOEBIDA)



par

Eddy WILLAERT

Soutenue le **21 MARS** 1975 devant la Commission d'Examen

Président : M.E. Vivier

Examineurs : MM. A. Bart, A. Cepron, J.B. Jadin, M. Pussard.

50376

1975

212

N° Ordre: 88

50376

1975

212

# THESE

Présentée

A la Faculté des Sciences de l'Université de Lille

pour l'obtention du titre de Docteur de l'Université de Lille

(Mention: Biologie Cellulaire)

ETUDE IMMUNO-TAXONOMIQUE DES GENRES

*NAEGLERIA ET ACANTHAMOEBA*

(PROTOZOA: AMOEBIDA)

par

Eddy WILLAERT



Soutenue le **21 MARS** 1975 devant la Commission d'Examen

Président : M.E. Vivier

Examineurs : MM. A. Bart, A. Capron, J.B. Jadin, M. Pussard.

UNIVERSITE DES SCIENCES  
ET TECHNIQUES DE LILLE

DOYENS HONORAIRES DE L'Ancienne Faculté des Sciences

MM. R. DEFRETIN, H. LEFEBVRE, M. PARREAU.

PROFESSEURS HONORAIRES Des Anciennes Facultés de Droit  
Et Sciences Economiques, des Sciences et des Lettres

M. ARNOULT, Mme BEAUJEU, MM. BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON,  
CORDONNIER, DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN,  
HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERIET, KOUGANOFF, LAMOTTE,  
LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, MM. LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-  
LAGARDE, MAZET, MICHEL, NORMANT, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUBINE,  
ROUELLE, SAVART, WATERLOT, WIEMAN, ZAMANSKI.

PRESIDENT HONORAIRE DE L'UNIVERSITE DES  
SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

R. DEFRETIN

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DES  
SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

M. PARREAU.

PROFESSEURS TITULAIRES

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean-Pierre	Chimie Physique
M. BECART Maurice	Physique Atomique et Moléculaire
M. BLAYS Pierre	Géographie
M. BONNEMAN Pierre	Chimie Appliquée
M. BONTE Antoine	Géologie Appliquée
M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOUISSET Simon	Physiologie Animale
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. CELET Paul	Géologie Générale
M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. CORSIN Pierce	Paléontologie
M. DECUYPER Marcel	Géométrie

Mme LEHMANN Josiane	Analyse
M. LOUCHEUX Claude	Chimie Physique
M. MAES Serge	Physique Atomique et Moléculaire
Melle MARQUET Simone	Probabilités
M. MIGEON Michel	Chimie Physique
M. MONTEL Marc	Physique du Solide
M. PANET Marius	Electrotechnique
M. RACZY Ladislas	Electronique
M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
M. SALMER Georges	Electronique
M. SEGUIER Guy	Electrotechnique

MAITRES DE CONFERENCES (et chargés d'Enseignement)

M. ADAM Michel	Sciences Economiques
M. ANDRE Charles	Sciences Economiques
M. ANGRAND Jean-Pierre	Géographie
M. ANTOINE Philippe	Analyse
M. BART André	Biologie Animale
M. BEGUIN Paul	Mécanique
M. BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M. BOILLY Bénoni	Biologie Animale
M. BONNEMAIN Jean-Louis	Biologie Végétale
M. BOSCOQ Denis	Probabilités
M. BREZINSKI Claude	Analyse Numérique
M. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CARREZ Christian	Informatique
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. CORTOIS Jean	Physique Nucléaire et Corpusculaire
M. COQUERY Jean-Marie	Psycho-Physiologie
M. COULON Jean	Electrotechnique
Mlle DACCHARI Monique	Géographie
M. DEBOURSE Jean-Pierre	Gestion des Entreprises
M. DEBRABANT Pierre	Géologie Appliquée
M. DHAINAUT André	Biologie Animale
M. DELAUNAY Jean-Claude	Sciences Economiques
M. DERIEUX Jean-Claude	Microbiologie
M. DOUKHAN Jean-Claude	Physique du Solide
M. DRIEUX Baudouin	Informatique
M. DUEE Gérard	Géologie Appliquée
M. DYMENT Arthur	Mécanique
M. ESCAIG Bertrand	Physique du Solide
Mme EVRARD Micheline	Chimie Appliquée
M. FONTAINE Jacques-Marie	Electronique
M. FOURNET Bernard	Biochimie
M. FROELICH Daniel	Chimie Physique
M. GAMBLIN André	Géographie
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GRANELLE Jean-Jacques	Sciences Economiques

M. GUIGOU Jean-Louis	Sciences Economiques
M. GUILLAUME Henri	Sciences Economiques
H. HECTOR Joseph	Géométrie
M. HERMAN Maurice	Physique Spatiale
M. JOURNAL Gérard	Physique Atomique et Moléculaire
Mlle KOSMANN Yvette	Géométrie
M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LANGRAND Claude	Probabilités
M. LAURENT François	Automatique
Mlle LEGRAND Denise	Algèbre
Mlle LEGRAND Solange	Algèbre
M. LENTACKER Firmin	Géographie
M. LEROY Jean-Marie	Chimie Appliquée
M. LEROY Yves	Electronique
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique Théorique
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MAHIEU Jean-Marie	Physique Atomique et Moléculaire
Mme N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. MAIZIERES Christian	Automatique
M. MALAUSSENA Jean-Louis	Sciences Economiques
M. MESSELYN Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. MONTUELLE Bernard	Biologie Appliquée
M. NICOLE Jacques	Chimie Appliquée
M. PAQUET Jacques	Géologie Générale
M. PARSY Fernand	Mécanique
M. PECQUE Marcel	Chimie Physique
M. PERROT Pierre	Chimie Appliquée
M. PERTUZON Emile	Physiologie Animale
M. PONSOLLE Louis	Chimie Physique
M. POVY Lucien	Automatique
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROY Jean-Claude	Psycho-Physiologie
M. SIMON Michel	Sociologie
M. SLIWA Henri	Chimie Organique
M. SOMME Jean	Géographie
Mlle SPIK Geneviève	Biochimie
M. STANKIEWICZ François	Sciences Economiques
M. THERY Pierre	Electronique
M. TOULOTTE Jean-Marc	Automatique
M. TREANTON Jean-René	Sociologie

M. VANDORPE Bernard  
M. VILLETTE Michel  
M. WERNIER Georges  
M. WATERLOT Michel  
M. YVON Jean-Pierre  
Mme ZINN JUSTIN Nicole

Chimie Minérale  
Mécanique  
Informatique  
Géologie Générale  
Analyse Numérique  
Algèbre.

Avant-propos

Avant tout, nous tenons à remercier tous ceux qui nous ont aidé à mener à terme nos travaux.

Nous exprimons notre reconnaissance à Monsieur le Professeur E. Vivier, qui nous a fait l'honneur de présider cette thèse et de nous avoir apporté des conseils précieux.

Nous remercions Monsieur le Professeur A. Baet, qui a eu la bienveillance de s'intéresser à notre étude. Son accueil nous a été particulièrement agréable.

Nous exprimons notre profonde reconnaissance à Monsieur le Professeur A. Capron qui nous a réservé un accueil agréable dans son département d'Immunologie et de Biologie Parasitaire de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lille. Ses conseils efficaces et ses encouragements nous ont permis à mener à bien cette étude.

Nous exprimons notre sincère reconnaissance à notre Maître, Monsieur le Professeur J.B. Jadin, pour nous avoir initié à la Protistologie. Son enthousiasme habituel, son désir inépuisable de l'inconnu nous ont permis de sortir du cadre d'une spécialisation. Les moyens et la liberté que notre Maître J.B. Jadin a bien voulu nous accorder, nous ont permis de réaliser notre étude.

Notre reconnaissance à Monsieur M. Pussard qui nous a encouragé et conseillé en ami et nous a soutenu pendant la réalisation de notre travail.

Nombreux sont ceux, qui nous ont apporté leur soutien, leur aide en matériel et en souches, leur conseils: les Professeurs P.G. Janssens (Institut de Médecine Tropicale, Anvers), L. Farnerée (Institut National de Recherches Vétérinaires, Uccle), K.G.M. Adam (Université d'Edimbourg), G. Carosi (Institut des Maladies Infectieuses, Pavie), J. Martinez (Medical College Virginia, Richmond) I. de Carneri (Carlo Erba, Milan), A.R. Stevens (University of Florida, Gainesville), F.L. Schuster (University of Brooklyn,

New York) et E. Dyner (Institut de Biostructure, Varsovie), les Docteurs P. Kageruka et P. Van Wetteere (Institut de Médecine Tropicale, Anvers), J.M. Jadin (Centre d'énergie nucléaire, Mol), F.C. Page (Culture Collection of Algar and Protozoa, Cambridge), R. Carter (Childrens Hospital, Adelaïde), S.R. Das (Central Durg Research Institute, Lucknow), S.L. Chang (National environmental Research Center, Cincinnati) et O. Geisel (Faculté Vétérinaire de l'Université, Munich), Messieurs A. Graré, N. Van Meirvenne, T. Moors, E. Magnus et E. Xavier (Institut de Médecine Tropicale, Anvers), D. Bout et J. Fruit (Service d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Lille), S. Biefnot et J. Rigazzi. Nous les remercions.

Nos remerciements vont particulièrement à nos compagnons de recherches, Daniel Afchain, Dominique Le Ray et Adèle Jamieson.

Nous a été bénéfique l'aide de R. Moret, S. Vandembemt et M-X. Piron.

L'esprit coopératif de G. Roelants, Bibliothécaire, de L. Vermeulen et L. Van Tiggel, Service Central de Cryoconservation et de lyophilisation de J. Verboom, Photographe, de M.M. Gillis, Département de Protozoologie et de M. Beliën, Mme S'Jonckers, Ch. Vingerhoets, Unité de Recherche et d'Enseignement en Santé Publique. Nous remercions en particulier tout le membre du Département de Protozoologie et les amis qui nous ont apporté leur soutien .

A tous, Merci.

TABLE DES MATIERES.

Université des Sciences et Techniques de Lille .....	I
Avant-propos .....	VI
Table des matières .....	VIII
	<u>Page</u>
Chapitre 1. Introduction .....	1
1.1. Historique .....	1
1.2. Considérations taxonomiques .....	3
1.3. Pouvoir pathogène .....	10
1.4. L'analyse immunoélectrophorétique .....	14
Chapitre 2. Matériel et Méthodes	
2.1. Souches étudiées .....	21
2.2. Culture <u>in vitro</u> .....	27
2.3. Cryoconservation .....	40
2.4. Préparation des extraits antigéniques .....	42
2.5. Analyse immunoélectrophorétique .....	52
2.6. Epreuve sérologique par l'immunofluorescence .....	58
2.7. Morphologie et Biologie .....	62
Chapitre 3. Analyse immunoélectrophorétique du genre <u>Naegleria</u> .....	67
3.1. Etude préliminaire .....	68
3.2. Structure antigénique de <u>N. fowleri</u> .....	71
3.3. Structure antigénique de <u>N. gruberi</u> .....	82
3.4. Structure antigénique de <u>N. jadini</u> sp. nov. ....	85
3.5. Etude immunoélectrophorétique comparative entre <u>N. fowleri</u> , <u>N. gruberi</u> et <u>N. jadini</u> .....	86
3.6. Structure antigénique d'autres espèces appartenant au genre <u>Naegleria</u> .....	87
3.7. Parentés antigéniques du genre <u>Naegleria</u> .....	90
3.8. Conclusions .....	92

Chapitre 4. Structure antigénique du genre <u>Acanthamoeba</u> . .....	93
4.1. Etude antigénique du milieu de culture .....	95
4.2. Structure antigénique d' <u>A. culbertsoni</u> .....	95
4.3. Structure antigénique d' <u>Acanthamoeba</u> sp. Neff .....	96
4.4. Structures antigéniques comparées d' <u>A. culbertsoni</u> et d' <u>A. castellanii</u> .....	97
4.5. Structures antigéniques comparées d' <u>A. culbertsoni</u> avec d'autres espèces appartenant au même genre ....	99
4.6. Parentés antigéniques comparées d' <u>A. castellanii</u> avec <u>A. terricola</u> , <u>A. polyphaga</u> et <u>A. rhyodes</u> .....	100
4.7. Parentés antigéniques du genre <u>Acanthamoeba</u> .....	102
4.8. Essai d'identification immunoelectrophorétique de quelques espèces d' <u>Acanthamoeba</u> isolées au laboratoire .....	105
Chapitre 5. Parentés antigéniques des genres <u>Naegleria</u> et <u>Acanthamoeba</u> .....	109
5.1. Parentés antigéniques entre les genres <u>Naegleria</u> et <u>Acanthamoeba</u> .....	110
5.2. Ordre des Amoebida .....	114
5.3. Classe des Phytomastigophorea .....	119
5.4. Famille des Trypanosomatidae .....	120
5.5. Classe Ciliata .....	122
5.6. Organismes non apparentés .....	122
5.7. Substance C .....	129
5.8. Synthèse .....	129
Chapitre 6. Immunofluorescence indirecte .....	132
6.1. Genre <u>Naegleria</u> .....	134
6.2. Genre <u>Acanthamoeba</u> .....	143
6.3. Essai d'identification par l'immunofluorescence indirecte de quelques souches isolées en laboratoire. ....	150

6.4. Identification de l'agent étiologique de la méningo- encéphalite amibienne primitive dans les coupes histologiques .....	155
6.5. Identification par l'immunofluorescence indirecte d' <u>E. histolytica</u> dans des coupes histologiques .....	163
6.6. Conclusions .....	164
Chapitre 7. Morphologie et Biologie de <u>N. jadini</u> .....	166
7.1. Etude morphologique .....	168
7.1.1. Observations en microscopie photonique .....	168
7.1.2. Observations en microscopie électronique .....	173
7.2. Caractères biologiques .....	176
7.2.1. Culture .....	176
7.2.2. Pouvoir pathogène .....	177
7.3. Etude comparative de kystes de <u>Naegleria</u> et d' <u>Acanthamoeba</u> en microscopie électronique à balayage .....	179
7.3.1. Genre <u>Naegleria</u> .....	180
7.3.2. Genre <u>Acanthamoeba</u> .....	181
7.3.3. Synthèse .....	181
7.4. Etude comparative du pouvoir pathogène de quelques souches de <u>Naegleria</u> et d' <u>Acanthamoeba</u> .....	182
Chapitre 8. Discussion et conclusions .....	191
8.1. Antigènes hétérospécifiques .....	193
8.2. Antigènes amibiens .....	196
8.2.1. Taxonomie .....	197
8.2.1.1. Groupe-espèce .....	197
8.2.1.2. Groupe-genre .....	201
8.2.1.3. Parentés suprafamiliales .....	207
8.2.2. Phylogénèse .....	211
8.3. Immunofluorescence indirecte .....	212
8.4. Morphologie et Biologie de <u>N. jadini</u> .....	214
Résumé .....	219
Références bibliographiques .....	223

CHAPITRE I

INTRODUCTION

La chance favorise seulement  
les esprits préparés.

Pasteur.

## 1.1. Historique.

Une quantité considérable de publications a été consacrée aux amibes libres depuis leur première observation faite au microscope par Rösel von Rosenhof en 1755.

Il a fallu cependant attendre Dujardin (1841) qui, le premier décrivit une amibe libre sous le nom d'Amoeba limax, lequel fut repris par la suite par plusieurs auteurs, pour désigner diverses amibes. Les premières descriptions excellentes d'amibes libres furent réalisées par Leidy (1879) et ensuite par Penard (1890) dans leurs monographies. Mais, durant cette seconde partie du 19e siècle, les connaissances en ce domaine ne progressèrent que fort peu. C'est seulement au 20e siècle que des études expérimentales débutèrent.

"Rien n'est plus difficile, en effet, que de déterminer une amibe" écrivait Dangeard en 1900. Cette expression sera répétée très souvent et à juste titre, par de nombreux chercheurs. L'identification spécifique d'amibes libres, appartenant à l'ordre des Amoebida, demeure toujours un des problèmes les plus épineux en zoologie. En effet, on peut constater chez ces amibes une homogénéité apparente de leurs structures cellulaires qui rend difficile leur identification.

L'historique des amibes libres, qui nous intéresse particulièrement, remonte à Schardinger (1899) qui décrivit l'Amoeba gruberi, maintenant connue sous le nom de Naegleria gruberi. Ces genres d'amibes seront appelées par la suite des "Amoebo-flagellates" par Awerinzew (1910) et Rafalko (1947). Ce terme désigne diverses amibes qui peuvent se transformer en flagellates sans appartenance taxonomique précise, comme il en est de même pour l'appellation "Limax". Hollande (1942) dans son étude sur les flagellés libres pense que les "amoebo-flagellates" représentent en réalité des formes évolutives de flagellés, et non pas un état passager d'une amibe. A ce sujet,

il est généralement accepté que les "amoébo-flagellates" représentent les ancêtres des amibes. Ils sont considérés par Schaeffer (1926) comme les plus primitifs parmi les vrais amibes lesquelles peuvent se transformer temporairement en flagellés. Le genre Vahlkampfia ne semble pas différer beaucoup des amoébo-flagellates, excepté qu'un stade flagellé est absent et que de ce fait ces amibes peuvent être considérées comme descendantes des amoébo-flagellates.

Ensuite, Chatton (1912) décrit le genre Vahlkampfia, et avec Lalung-Bonnaire (1912) le définit comme suit : "Amibes de petite taille, ne dépassant pas 30 microns à noyau formé d'un caryosome central compact, entouré de peu de chromatine périphérique, figurée ou diffuse (type protokaryon) à caryodierèse promitotique (Nägler), à kystes monoénergides". Le groupe des Hartmannelles, créé par Alexeieff (1912), réunit les petites amibes libres dont le caryosome disparaît totalement au début de la caryodierèse.

A cette époque de nombreux auteurs décrivent des amibes libres mais laissent de grandes lacunes dans leurs descriptions morphologiques. Plusieurs tentatives de classification furent établies dans l'ordre des Amoebida (Alexeieff, 1912; Volkonsky, 1931; Weynon, 1926, Schaeffer, 1926).

Il faut alors attendre les importants travaux de Singh (1952) sur la taxonomie et la phylogénie des amibes; néanmoins ce travail aura peu d'influence sur les autres auteurs et fut encore repris et complété par Singh et Das en 1970.

Les importants travaux ont débuté avec la découverte que certaines parmi ces amibes contaminaient les cultures de tissus (Jahnes et Fulmer, 1957; Chi et Vogel, 1959) et étaient capables de provoquer une méningo-encéphalite chez la souris et le singe (Culbertson et al., 1959).

Depuis lors, ces amibes ont été retrouvées chez l'homme provoquant une méningo-encéphalite foudroyante décrite pour la première fois par Fowler et Carter en 1965.

En 1972, lorsque Carter présenta son travail à la "Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene" à Londres, le Professeur P.C.C. Garnham prononça : "Breaking a barrier is always a thrill; whether it is the "sound barrier" or the "barrier of host parasite specificity", for instance, making human malaria parasites grow in owl monkeys. Dr. Carter's work on the amoeba-flagellates provides an example of overcoming an even more formidable obstacle. He has shown in one of the most interesting papers presented to the Society, how the gulf between free-living and parasitic protozoa can be traversed to give rise to a fulminating infection in the human host".

L'ubiquité et la multiplicité de ces amibes libres, rencontrées dans tout notre environnement, méritent largement des études approfondies de leurs aspects morphologiques, biologiques, écologiques, parasitologiques, biochimiques et immunologiques.

#### 1.2. Considérations taxonomiques.

L'ensemble des amibes libres est constitué de nombreuses espèces réparties entre différents genres et familles. Leur classification actuelle est essentiellement basée sur leurs caractères morphologiques, leur mode de division nucléaire et la formation de pseudopodes. Pour ces raisons l'interprétation de leur position taxonomique diffère considérablement selon les auteurs, ce qui entraîne des problèmes de systématique des plus urgents à résoudre. Il s'agit d'éliminer la confusion actuelle due au double emploi de plusieurs noms génériques ou spécifiques. Seulement alors des affectations exactes pourront être envisagées permettant éventuellement d'aborder les spéculations phylogéniques.

La mitose a certainement été le mécanisme le plus exploité par les chercheurs pour trouver des caractères susceptibles de différencier les amibes, si semblables entre elles. En effet, si une homogénéité apparente de leurs structures cellulaires est constaté, une certaine hétérogénéité mitotique en fait contraste. Néanmoins, ce caractère se montre souvent insuffisant au niveau générique ou spécifique. A la fin du siècle dernier et au début de celui-ci, beaucoup de travaux ont porté sur les caractères de la mitose, mais seulement les travaux de Singh (1952, 1972) et de Pussard (1966, 1972, 1973) donnent un aperçu réaliste de cet aspect au niveau de différents groupes d'amibes. Seul Pussard (1973) réalise les difficultés existantes à l'utilisation de la mitose dans un but taxonomique.

La méthode de classification la moins laborieuse, mais aussi la moins fiable consiste à distinguer les amibes d'après leur physionomie générale et d'après la forme de pseudopodes. Cette méthode fut employée par beaucoup de chercheurs, mais peu de leurs résultats sont encore en mesure de satisfaire les taxonomistes d'aujourd'hui. Citons quand même les descriptions remarquables de Dujardin (1841), Leidy (1879), Penard (1890, 1902), Frenzel (1892), Schaeffer (1926) et Fovee (1953, 1966, 1970).

Seul Page (1967, 1974) saisit la nécessité d'employer tous les caractères disponibles qu'ils soient cytoplasmiques, nucléaires, kystiques ou cytochimiques. C'est pourquoi, ses travaux sont le plus près de la réalité et actuellement la plupart des chercheurs préfèrent la classification selon les travaux de Page.

Encore peu de tentatives ont été faites pour essayer de reconstituer une taxonomie basée sur les caractères exprimés par les protéines, les enzymes, l'ADN et l'ARN ainsi que par des caractères immunologiques ou sérologiques.

Schaeffer en 1931 déjà suggère que les différences morphologiques entre amibes refléteraient leur composition moléculaire protéinique. Band et Morard (1956) considèrent l'organisation submicroscopique des protéines comme taxonomiquement utile. Finalement, Crick (1958) a suggéré qu'une taxonomie des protéines serait l'expression la plus fidèle possible du phénotype.

Adam (1969, 1974) considère que le dosage de l'ADN et de l'ARN devrait avoir un emploi taxonomique dans la distinction et l'apparement entre amibes.

Sellards (1911) trouve des différences immunologiques entre des espèces de petites amibes morphologiquement semblables. Les méthodes immunologiques et sérologiques ont surtout été employées pour l'identification d'amibes parasites (Goldman, 1959; Talis et al., 1962, 1963, 1967, 1971; Alikhan et Meero-vitch, 1968, 1970; Lunde et Diamond, 1969; Capron et al., 1972).

Néanmoins, quelques tentatives d'études sérologiques sur les amibes libres ont été effectuées (Siddiqui et Balamuth, 1965; Balamuth et Kawakami, 1967; Cervà, 1967, 1973; Singh et Das, 1970; Saygi, 1971).

Le progrès dans la taxonomie et la phylogénie des amibes est très lent d'autant plus que les méthodes modernes sont peu utilisées. Corliss (1962) accusa les Protistologues d'être toujours au stade alpha de la taxonomie, 100 ans en retard. Les méthodes modernes, entre autres les analyses biochimiques commencent seulement à être employées et les parentés sérologiques et immunologiques ont été à peine abordées. Une étude intensive sur les amibes est nécessaire pour être capable de les distinguer aisément et convenablement.

Nous croyons que pour constituer une taxonomie valable des amibes, il faut tenir compte de tous les caractères accessibles, tant morphologiques, biologiques et écologiques que biochimiques, sérologiques et immunochimiques, puisque notre but est, de classifier des "Amibes" et non pas leur "pseudopodes" ou leurs "fuseaux mitotiques".

Plusieurs classifications s'opposent actuellement, dont nous retenons seulement les deux plus importantes, voir les plus employées par les chercheurs. Il s'agit des classifications issues des travaux d'Alexeieff (1912) et de Volkonski (1931), revue par Page (1967) et celle de Singh (1952) et Singh et Das (1970). Les premiers auteurs se basent essentiellement sur les caractères morphologiques et cytochimiques des amibes libres, tandis que les derniers considèrent le mode de la division nucléaire comme le seul critère stable et reproductible. Sans prendre en considération les techniques et la reproductibilité de ces critères, nous résumons ci-dessous les classifications des genres considérées dans ce travail.

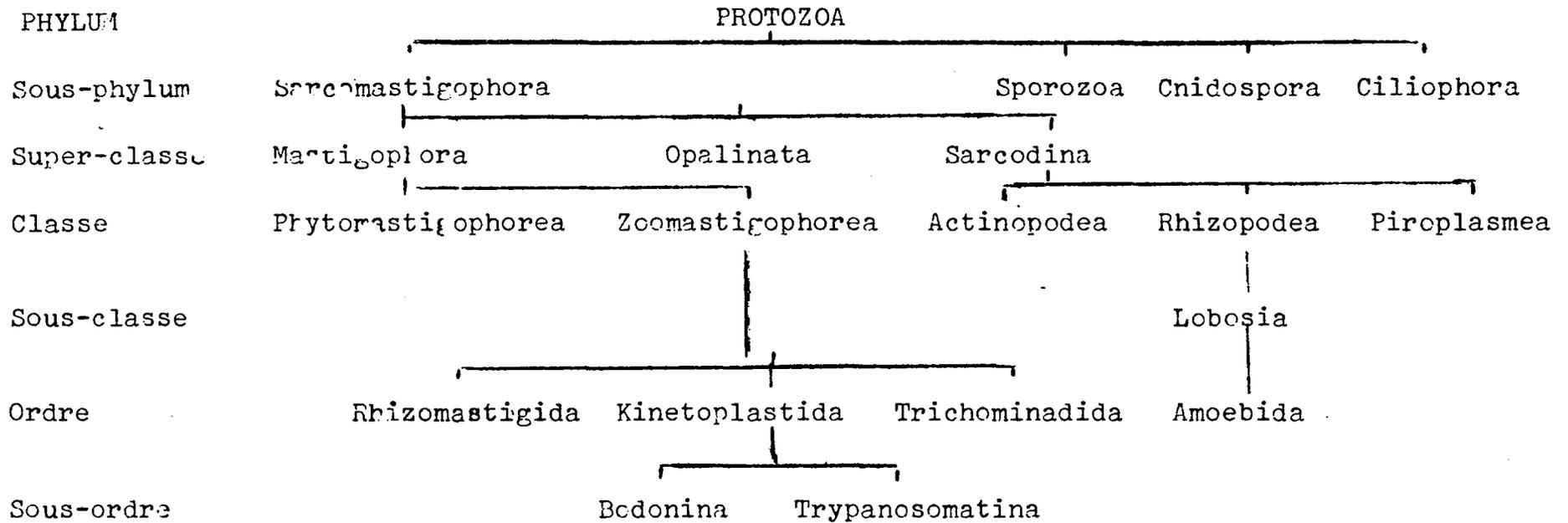


Tableau 1 : Situation de l'ordre des Amoebida dans le Phylum PROTOZOA.  
 Committee on Taxonomy and Taxonomic problems of the Society of Protozoologists.  
 (J. Protozool., 11 (1) : 7-20 (1964))

1.2.2. Classification selon Page (1967).

Ordre : Amoebida, Kent 1880

Famille : Vahlkampfiidae Jollos, 1917; Zulueta, 1917

Genres : Vahlkampfia Chatton et Lalung-Bonnaire, 1912

Espèces : Vahlkamphia vahlkampfi Chatton, 1910

Vahlkampfia avara Page, 1967

Vahlkampfia inorata Page, 1967

Vahlkampfia jugosa Page, 1967

Naegleria Alexeieff, 1912

Espèces : Naegleria gruberi Schardinger, 1899

Naegleria fowleri Carter, 1970

Tetramitus Perty

Espèce : Tetramitus rostratus Perty , 1852

Famille : Hartmannellidae Volkonski, 1931

Genre : Hartmannella Alexeieff, 1912

Espèces : Hartmannella hyalina Dangeard, 1900

Hartmannella vermiformis Page, 1967

Hartmannella exudans Page, 1967

Hartmannella limacoïdes Page, 1967

Acanthamoeba Volkonski, 1930

Espèces : Acanthamoeba castellanii Douglas, 1930

Acanthamoeba astronyxis Ray et Hayes, 1954

Acanthamoeba polyphaga Puschkarew, 1913

Acanthamoeba palestinensis Reich, 1933

Famille : Endamoebidae Calkins, 1913

Genre : Entamoeba Casarrandi et Barbarallo, 1895

Espèces : Entamoeba histolytica Schaudinn, 1903  
Entamoeba invadens Rodhain, 1934

1.2.3. Classification de Singh (1952) et de Singh et Das (1970)

Ordre : Amoebida, Kent 1880

Famille : Schizopyrenidae Singh, 1952

Genres : Schizopyrenus Singh, 1952

Espèces : Schizopyrenus russelli Singh, 1952  
Schizopyrenus atopus Singh, 1952

Naegleria Alexeieff, 1912

Espèces : Naegleria gruberi Schardinger, 1899  
Naegleria aerobia Singh et Das, 1970

Didascalus Singh, 1952

Espèce : Didascalus thorntoni Singh, 1952

Tetramitus Pertry

Espèce : Tetramitus rostratus Pertry, 1852

Famille : Hartmannellidae Volkonski, 1931

Genre : Hartmannella Alexeieff, 1912

Espèces : Hartmannella glebae Dobell, 1914  
Hartmannella culbertsoni Singh et Das, 1970  
Hartmannella rhyodes Singh, 1952  
Hartmannella castellanii Douglas, 1930

Hartmannella astronoxis Ray et Hayes, 1954

Hartmannella palestinensis Reich, 1933

Famille : Erdamoebidae Calkins, 1913

Genre : Entamoeba Casagrandi et Barbagallo, 1895

Espèces : Entamoeba histolytica Schaudinn, 1903

Entamoeba invadens Rodhain, 1934

Bien que ces deux classifications soient fondées sur des critères différents la distinction entre les familles des Vahlkampfiidae (Schizopyrenidae) et Hartmannellidae est essentiellement caractérisée par la différence dans leur mode de division nucléaire. En effet, les Vahlkampfiidae ou Schizopyrenidae montrent une division nucléaire appelée la "promitose" de Nägler (1909), tandis que les Hartmannellidae ont recours à la "mitose", qui a été différenciée tout récemment, en "mésomitose" et "métamitose" par Pussard (1973). Dans ce même article, Pussard accuse l'état de désordre et de confusion dans la taxonomie des amibes. Il conclut que la création d'une véritable classification suppose l'adoption préalable d'une hiérarchie judicieuse de tous les caractères disponibles.

### 1.3. Pouvoir pathogène

Un groupe parmi les amibes libres, appelées souvent amibes "Limax", attire de plus en plus l'attention des chercheurs depuis ces dernières années. En effet, depuis la mise en évidence du pouvoir pathogène de certaines de ces amibes, nos connaissances relatives à ce groupe d'amibes ont été considérablement bouleversées.

Mais cependant au début de ce siècle, plusieurs auteurs ont pu constater la présence de ces amibes libres chez des malades. Rappelons encore que Naegleria gruberi fut isolée par Schardinger (1899) à partir de selles diarrhéiques. Simultanément en Indochine et aux Philippines, Lesage (1905), Musgrave et Cleff (1906), Walker (1908) et Noc (1909) vont mettre en évidence la présence d'amibes "limax" dans des selles diarrhéiques et dans du pus d'abcès du foie. Chatton et Lalung-Bonnaire (1912) décrivent une Vahlkampfia sp. isolée à partir des selles d'un malade atteint de dysenterie. Ils ont observés directement les amibes végétatives dans les selles et ont pu isoler et entretenir la souche en culture in vitro.

Wells (1911) fait observer qu'il est aisé d'isoler ces amibes libres à partir des poussières de l'air et déclare que celles-ci sont dénuées de pouvoir pathogène.

Mais ensuite, Whitmore (1911), Hartman (1910), Hogue (1915) et Pinto (1922) affirment dans leurs travaux avoir isolé des amibes "limax" à partir d'abcès du foie. Ces amibes étaient généralement considérées comme étant des Vahlkampfia.

Finalement, ce sont les observations successives de Jahnes et Fullmer (1957) et de Culbertson et collaborateurs (1958, 1959) qui aboutissent à la découverte du caractère pathogène de certaines de ces amibes libres. En effet, après avoir observé des amibes contaminant des cultures de cellules de rein de singe, ces auteurs inoculent ces amibes par voie intracérébrale et intranasale chez des singes et des souris et provoquent ensuite la mort de ces animaux qui contractent une méningo-encéphalite. Cette amibe est décrite par Singh et Das (1970) comme Hartmannella (Acanthamoeba) culbertsoni. Depuis cette mise en évidence, plusieurs auteurs vont confirmer ces premières observations et retrouvent ces amibes dans des coupes histologiques du cerveau de patients morts d'une méningo-encéphalite.

L'intérêt que présente cette amibe est accru encore par la découverte de Wang et Feldman (1961, 1967) qui retrouvent ces amibes dans des cultures de tissus ensemencées avec des prélèvements du nasopharynx. Cette observation est confirmée par la suite par Armstrong et Fereira (1967), Chang et al., (1966) et Little et Chang (1968).

Mais la pathogénicité pour l'homme des amibes du genre Acanthamoeba est révélée, pour la première fois, par Patras et Andujar (1966) qui isolent d'un cas de méningo-encéphalite à évolution chronique, une Acanthamoeba. Ensuite Callicot et al., (1968) isolent A. astronyxis chez un malade atteint de méningo-encéphalite. D'autres cas se suivent : Kenney (1971) identifie Acanthamoeba après autopsie d'un patient, ainsi que Rorke (1971) et Jager et Stamm (1972). Tout récemment un nouveau cas a été identifié au Texas (Sotelo-Avila et al., 1974, 1975).

Mais Carter (1968) va isoler pour la première fois une amibe d'un liquide céphalo-rachidien chez un malade souffrant d'une méningo-encéphalite. Il constate qu'il s'agit d'une autre amibe du groupe "limax" ressemblant à Naegleria gruberi et l'appelle N. fowleri (Carter 1970). Ensuite, cette amibe sera encore décrite sous le nom de Naegleria aerobia (Singh et Das, 1970) et de Naegleria invades (Chang, 1971).

A ce jour, 84 cas de méningo-encéphalite amibienne primitive confirmés ou suspects sont décrits dans la littérature (Willaert, 1974). Naegleria fowleri est considéré le plus souvent comme l'agent étiologique, quelquefois seulement Acanthamoeba. Ces cas ont été cités dans tous les continents de notre monde répartis comme suit : l'Afrique 1 cas, l'Amérique 31 cas, l'Asie 7 cas; l'Europe 27 cas et l'Océanie, 18 cas.

Nos connaissances du mécanisme de la virulence de ces amibes, rencontrées le plus souvent dans l'eau, sont encore mal connues. Ces amibes acquièrent-elles un pouvoir pathogène ou sont-elles pathogènes d'emblée ? Suivant Jirovec (1967), la pathogénicité de ces amibes semble lié à plusieurs facteurs :

l'adaptation parfaite des amibes aux températures élevées rencontrées chez les mammifères homéothermes, leur faculté de pouvoir pénétrer activement dans le corps de l'hôte et la formation de kystes, ce qui permet leur dissémination dans le milieu aérien. Jadin (1973) attire l'attention sur le fait que les amibes limax peuvent suivre un cycle qui va de l'eau et de la terre à l'homme et aux animaux. Ainsi, en contact avec des protéines humaines ou animales, s'établirait une relation hôte-parasite.

Nous savons néanmoins que ces amibes, tout en possédant le caractère pathogène ne sont pas obligatoirement parasites, et qu'on peut les rencontrer dans notre environnement. A ce sujet, ces amibes ont été isolées à plusieurs reprises, en Australie, à partir de l'eau et du sol (Anderson et Jamieson, 1972, 1973). Singh et Das (1972) mentionnent l'isolement de N. fowleri et A. culbertsoni à partir du sédiment des eaux d'égouts en Inde. Gordeeva (1973) isole deux souches de Naegleria pathogènes des boues d'égouts. D'autres auteurs viennent de confirmer récemment ces observations.

L'homogénéité morphologique marquée, chez les amibes libres du genre Naegleria et Acanthamoeba, nous a conduit à prendre en considération leurs caractères antigéniques mis en évidence par l'analyse immunoélectrophorétique. Notre but est d'évaluer à l'aide de cette analyse l'importance des parentés et des spécificités immunoélectrophorétiques, de ces amibes libres, dans leurs diverses catégories taxonomiques.

#### 1.4. L'analyse immunoélectrophorétique.

Les protéines sont les constituants les plus significatifs d'un organisme vivant car elles sont l'expression relativement directe du génôme. L'analyse immunoélectrophorétique se présente comme une méthode privilégiée permettant la caractérisation immunochimique des protéines. Elle est le moyen par excellence de saisir objectivement les parentés et les spécificités de l'organisme. Elle seule permet la caractérisation des constituants cellulaires solubles et immunogènes.

Les principes et les modalités de l'analyse immunoélectrophorétique en gel ont été décrites par Grabar et Williams (1953) se basant sur les travaux fondamentaux d'Oudin (1947, 1948) qui a démontré que deux antigènes différents donnent lieu à des lignes de précipitation distinctes. La méthode a ensuite été simplifiée par Scheidegger (1955), qui a mis au point la microméthode ce qui permettait une réalisation plus rapide et une économie d'immunsérum.

L'application de l'analyse immunoélectrophorétique à des organismes entiers a été essentiellement réalisée par l'école lilloise de Biguet et Capron. L'analyse immunoélectrophorétique des Helminthes et de leurs hôtes invertébrés et vertébrés leur a permis d'apporter une contribution fondamentale à la standardisation des extraits antigéniques (Biguet et al., 1965) et à la taxonomie et à la phylogénie immunochimique (Rose et al., 1966; Capron et al., 1968, 1970, 1972). De plus, à l'aide de cette technique ils ont pu établir les relations hôte-parasite (Capron et al., 1968, 1970, 1969) ainsi que démontrer l'intérêt diagnostique (Biguet et al., 1962; Capron et al., 1969, 1970) et en général contribuer à la connaissance de la structure et de la fonction de l'antigène parasitaire (Capron, 1970).

#### 1.4.1. Principes, définitions, valeur, limites.

L'analyse immunoélectrophorétique est une méthode d'investigation moléculaire. Elle permet la visualisation de substances solubles immunogènes dans un extrait cellulaire.

Deux techniques sont impliquées dans l'analyse immuno-chimique : l'immunoélectrophorèse permet la caractérisation des composants du mélange et l'immunoabsorption, qui permet la définition des parentés et des spécificités de ces composants.

L'immunoélectrophorèse consiste en une combinaison d'électrophorèse et d'immunodiffusion radiale dans un substrat généralement en gel d'agar. Dans un premier temps, le mélange antigénique est séparé par électrophorèse en diverses zones. Dans un second temps, une double diffusion se produit; l'anti-sérum entre et diffuse dans le gel pendant que les antigènes diffusent radialement dans toutes les directions à partir des zones électrophorétiques. Les antigènes rencontrent les anticorps et des précipités se forment dans les zones d'équivalence d'antigène-anticorps. Le nombre de précipités formés correspond au nombre de composants antigéniques objectivés. Du fait de la séparation électrophorétique préliminaire les précipités sont rassemblés dans un système caractéristique appelé "ligne de précipitation" en forme d'arcs, lesquels sont localisés le long des zones électrophorétiques. L'ensemble des arcs de précipitation constitue "la structure immunoélectrophorétique" ou "la mosaïque antigénique" du mélange analysé. Chaque ligne de précipitation représente une famille de protéines dont les sites antigéniques sont communs et d'autres distincts. Ces composants antigéniques sont définis par la vitesse de migration électrophorétique, le coefficient de diffusion quand à la spécificité immunologique, elle est déterminée par les sites antigéniques.

L'immunoabsorption est la seconde étape de l'analyse immunochimique. Cette étape est capitale dans la comparaison de deux organismes. Elle consiste à épuiser des anticorps non spécifiques qui, dans un immunsérum obtenu vis-à-vis d'un organisme donné, correspondent à des antigènes partagés par cet organisme et par un organisme hétérologue.

L'absorption est réalisée en épuisant les anticorps spécifiques par l'organisme hétérologue, seul les anticorps dirigés contre les composants spécifiques restent présents. L'organisme homologue est alors examiné avec l'immunsérum absorbé et les composants antigéniques qui sont révélés peuvent être considérés comme spécifiques de l'organisme homologue envers l'organisme hétérologue employé pour l'absorption.

Le rapport du nombre de composants antigéniques spécifiques avec le nombre total des composants révélés en réaction homologue fournit un indice qui mesure l'isologie immunochimique des deux organismes considérés.

L'absorption est le seul moyen de démontrer la spécificité de la mosaïque antigénique d'un organisme. L'analyse directe d'un organisme hétérologue par un immunsérum non absorbé n'a qu'une valeur indicative.

L'analyse immunoélectrophorétique caractérise essentiellement des protéines. La structure des protéines est l'une des expressions les plus directes du génôme. En conséquence, l'analyse immunoélectrophorétique permet la définition de caractères stables et significatifs. Ainsi, elle se présente comme une méthode d'investigation moléculaire de valeur génétique, tout comme l'analyse des acides nucléiques et des isoenzymes. Contrairement aux méthodes sérologiques, l'analyse immunoélectrophorétique permet d'objectiver directement les substances antigéniques.

L'analyse immunoélectrophorétique est en outre une méthode, permettant de refléter les structures moléculaires d'un organisme. Elle est la méthode de choix pour analyser la composition d'un organisme, en révéler les contaminations éventuelles et en déterminer les parentés et les spécificités vis-à-vis d'un organisme hétérologue. Elle fournit ainsi des arguments objectifs aux études taxonomiques et'aux hypothèses phylogénétiques.

L'analyse immunoélectrophorétique de réalisation technique relativement aisée est d'une grande efficacité; mais cette efficacité dépend de la préparation des extraits antigéniques de qualité et d'antisérum hyperimmun, ce qui justifie notre attention dans la partie méthodologique de notre travail.

L'analyse immunoélectrophorétique a deux limites théoriques Elle ne donne accès qu'aux antigènes solubles qui représentent néanmoins une partie significative d'un organisme, et elle est essentiellement qualitative, ne permettant d'établir que des différences absolues de spécificité antigénique. L'immuno-électrophorèse bidimensionnelle permet de pallier cet inconvénient.

#### 1.4.2. Application aux Protistes.

L'analyse des structures antigéniques des Protistes a généralement été abordée de manière occasionnelle et fragmentaire.

Les études consacrées aux Amibes sont peu nombreuses. Sen, Mukerjee et Ray, (1961) objectivent trois arcs de précipitation en immunodiffusion vis-à-vis d'antigène homologue, n'observent aucune réaction croisée vis-à-vis de N.gruberi, de Schizopyrenus russelli et de E. moshkovski. Siddiqui et Balamuth (1966) et Balamuth et Kawamaki (1967) constatent qu'aucune parenté antigénique n'existe entre les amibes parasites (E. histolytica, E.invadens et E.moshkovski) et les amoeboflagellates (Naegleria et Tetramitus) et les Hartmannella.

Une étude immunoélectrophorétique comparative des Entamoeba a mis en évidence des différences structurelles marquées entre E.histolytica, les souches eurythermes Laredo et Huff, E. invadens et E.moshkovski. (Ali Khan et Meerovitch, 1968<sup>o</sup>; Lunde et Diamond, 1969).

Les amibes libres de type limax ont fait récemment l'objet d'une série de travaux (Willaert et al., 1972, Willaert et Le Ray, 1973; Willaert 1974 a et b, 1975), utilisant l'analyse immunoélectrophorétique. Nos travaux ont permis successivement d'établir l'homogénéité de Naegleria fowleri, organisme libre présentant spontanément une pathogénicité aiguë pour l'homme, de démontrer son autonomie vis-à-vis de N.gruberi, d'observer une hétérogénéité subgénérique importante dans les genres Naegleria et Acanthamoeba dont les représentants témoignent d'une similité morphologique étonnante et de définir l'importance des affinités entre les principaux genres de l'ordre des Amoebida. Ces travaux sont repris par Visvesvara et Healy (1973, 1974<sup>o</sup>) qui confirment nos observations concernant le genre Naegleria.

Les Trypanosomatidae paraissent être les premiers et les plus étudiés par les réactions de précipitation, mais la plupart de ces travaux sont fait dans un but diagnostique. La première analyse compréhensive d'un Trypanosomidé est réalisée en 1964 par Williamson et Brown et caractérise plusieurs composants spécifiques du type antigénique variable de T.brucei. Depuis lors, une liste impressionnante de travaux s'est accumulée. Nous citons les plus importants concernant :

- a) la structure antigénique des Trypanosomatidae (Seed 1963; Seneca, 1964; Ranque et al., 1969; Le Ray, 1969; Le Ray et al., 1973; Afchain et Capron, 1969, 1971 et Dwyer, 1973);

---

<sup>o</sup> Travaux ayant recours à l'immunoélectrophorèse.

- b) les réactions entre souches (Le Ray et al., 1971; Nussenzweig et al., 1963; Zuckerman et al., 1973);
- e) les affinités entre taxa du genre Trypanosoma (Bigalke, 1966 Oelerich et Mannweiler, 1970; Bice et Zeledon, 1971; Le Ray et al. 1971; Le Ray, 1972; Capron et al., 1973; Ranque et al., 1969; Afchain et al., 1973 et Oelerich, 1973);
- d) la présence d'antigène du milieu de culture et de l'hôte dans la structure antigénique (Le Ray, 1969; Afchain et Capron, 1969);
- e) les remaniements antigéniques survenant au cours du cycle évolutif (Le Ray et al., 1973; Simpson, 1966 et Dwyer, 1971);
- f) les caractères des antigènes spécifiques du sérotype des trypanosomes Salivaria (Njogu et Humphryes, 1972; Oelerich et Manweiler, 1970, 1972; Le Ray et al., 1973; Van Meirvenne et al., 1973 et Afchain et al., 1973);
- g) la présence d'exoantigènes libérés in vitro par les trypanosomes Salivaria (Dodin et Fromentin, 1962, Seed, 1963);
- h) la localisation cellulaire des antigènes (Brown et Williamson, 1964; Taksyanagi, 1973).

L'hypothèse d'une relation phylétique entre Flagellés et Rhizopodes vient d'être illustrée par Dwyer (1974). L'auteur met en évidence des parentés antigéniques relativement importantes entre Histomonas, Dientamoeba, les Trichomonadidae et les Entamoebidae.

Parmi les Sporozoaires, quelques Plasmodium ont été abordés à l'aide des méthodes de précipitation en gel (Wilson et al., 1969; Stutz et Ferris, 1971).

L'analyse des structures antigéniques des Ciliés reste pratiquement inexistante. Des antigènes liés à des composants cellulaires de Paramécium ont pu être révélés par double diffusion (Preer et Preer, 1959). La caractérisation récente d'un antigène d'immobilisation de Tetrahymena (Grass, 1972) est particulièrement intéressante. Elle offre une voie d'approche

nouvelle à l'étude des antigènes de surface et des modalités de la variation antigénique.

Un travail a été consacré aux agents unicellulaires du genre Chlamydomonas (Brown et Walne, 1967). L'immunoélectrophorèse précédé par l'immunoabsorption met en évidence des différences antigéniques importantes entre espèces et entre variétés, ainsi que des différences réduites entre mutants.

Le nombre de travaux recensé n'est pas négligeable; ceci montre la diversité des domaines abordés et l'intérêt offert par l'immunoprécipitation. Mais des lacunes fondamentales s'opposent la plupart du temps à la prise en considération des résultats. La structure antigénique globale des organismes est rarement analysée. Lorsque c'est le cas, l'absence d'hyperimmunisation efficace entraîne généralement un nombre réduit de composants. Finalement, l'absence quasi totale d'immunoabsorption empêche une appréciation définitive de la spécificité ou de l'isologie supportées par les composants révélés.

=====

CHAPITRE 2

MATERIEL ET METHODES

"Tout, chercheur, je crois, se souvient  
- comme de son premier amour - de son  
premier contact avec une vérité neuve,  
si humble qu'ait peu être celle-ci".

Jean Rostand.

1. Souches étudiées.

Les souches faisant l'objet de la présente étude sont originaires principalement des collections suivantes : Amcebic Research Unit, Institute of Medical and Veterinary Sciences, (I.M.V.S.), Adelaide, South Australia; Culture Centre of Algae and Protozoa (C.C.A.P.), Cambridge, England; Department of Zoology, University of Edingburgh, Scotland et Département de Protozoologie, Institut de Médecine Tropicale "Prince Léopold" I.T.M.A.P., Anvers, Belgique.

1.1. Sarcodina - Amoebida, Kent 1880.

1.1.1. Famille Vahlkampfiidae

Genre Vahlkampfia Chatton et Lalung-Bonnaire, 1912.

V. avara CCAP 1588/1A : souche isolée et décrite par F.C. Page (1967) comme espèce type (F.C.P. n°33). Elle a été isolée à partir de l'eau d'une rivière des U.S.A. Maintenu en culture monoxénique depuis son isolement et reçue à l'ITMA en mars 1973.

Genre Naegleria Alexeiff, 1912.

N. gruberi CCAP 1518 : Souche isolée par Pringsheim et reçue à l'ITMA en octobre 1971 en culture monoxénique. Maintenu en culture axénique depuis juin 1973.

Naegleria sp. I.M.V.S. BG-6 : souche isolée par K.Anderson en Adelaide (Australie du Sud) à partir de l'eau de la rivière du jardin botanique d'Adelaide. Reçue à l'ITMA en culture axénique en Avril 1972.

N. fowleri ITMAP 359 : souche isolée le 4 novembre 1970 à Anvers, Belgique, à partir du liquide céphalo-rachidien d'un enfant atteint de méningo-encéphalite amibienne primitive (Jadin et al., 1971).

N. fowleri ITMAP 360 : souche isolée le 9 novembre 1970 à Anvers, Belgique, à partir du liquide céphalo-rachidien d'un enfant atteint de méningo-encéphalite amibienne primitive (Jadin et al., 1971).

N. fowleri HB-1 : souche isolée en juillet 1966 à Orlando, Florida à partir du liquide céphalo-rachidien d'un jeune homme atteint de méningo-encéphalite amibienne primitive (Butt, 1966). Souche reçue à l'ITMA en novembre 1970 de L. Cervà, Prague, Tchécoslovaquie. Cette souche a servi pour définir N.aerobia (Singh et Das, 1970) et N. Invades (Chang, 1971).

N. fowleri VITEK : souche isolée en juin 1968 à Prague par L. Cervà à partir du liquide céphalo-rachidien d'un garçon âgé de 11 ans atteint de méningo-encéphalite amibienne primitive (Cervà et al., 1969). Cette souche nous a été communiquée par L. Cervà en novembre 1970.

N. fowleri C-66 : souche isolée en janvier 1966 en Australie du Sud par R. Carter à partir du L.C.R. d'un enfant atteint de méningo-encéphalite amibienne primitive (Carter, 1970). Souche originale décrite pour la première fois sous le nom de N.fowleri, reçue à l'ITMA en décembre 1973 de F.L. Schuster.

N. fowleri IMVS Morgan : souche isolée en février 1972 à Adelaide, Australie du Sud, à partir du liquide céphalo-rachidien d'un enfant atteint de méningo-encéphalite amibienne primitive (Anderson et Jamieson, 1972).

N. fowleri NH-1 : isolée en mai 1972 en Nouvelle-Zélande (Nicoll, 1973) à partir du L.C.R. d'un homme atteint de méningo-encéphalite amibienne primitive. Souche reçue à l'ITMA en juin 1973 de K. Anderson.

N.fowleri IMVS PA 90 : isolée le 24 février 1972 à Adélaïde (Australie du Sud) à partir de l'eau du réseau. Cette souche s'est montrée pathogène pour la souris après instillation intra-nasale et la sérologie (test d'agglutination) s'est montrée positive en faveur de N.fowleri. Souche reçue à l'ITMA en avril 1972.

N.fowleri IMVS PA 117 : isolée le 23 mars 1972 à Port Augusta (Australie du Sud) à partir de l'eau du réseau. Elle s'est montrée pathogène pour la souris après instillation intra-nasale et s'est avérée positive en agglutination avec un antisérum anti-N.fowleri. Reçue à l'ITMA en juin 1972.

N. fowleri IMVS PA a : isolée le 20 juin 1972 à partir de terre sèche récoltée entre Port Pirie et Port Augusta (Australie du Sud). Elle s'est montrée pathogène pour la souris après instillation intra-nasale et s'est avérée positive en agglutination avec un antisérum anti-N.fowleri. Reçue à l'ITMA en janvier 1973.

N.fowleri N. a.1 : isolée à partir de la boue d'égout à Lucknow (Inde) et s'est montrée pathogène pour la souris après instillation intra-nasale (Singh et Das, 1972). Reçue à l'ITMA en juillet 1973.

N. jadini ITMAP 400 : souche isolée à partir d'une piscine privée à Anvers (Belgique en juillet, 1972). A été décrite comme espèce nouvelle (Willaert et Le Ray, 1973).

Naegleria sp. IMVS A : cinq souches de ce type ont été isolées à partir de l'eau du réseau en Adélaïde (Australie du Sud) en janvier 1972 par Anderson et Jamieson. Ces souches ne se sont pas montrées pathogènes pour la souris, mais elles ont été agglutinées au même taux qu'en réaction homologue par un anti-N.fowleri (Jamieson, 1973). Nous avons examiné les souches IMVS A-2 et IMVS A-9. Reçues à l'ITMA en décembre 1972.

Naegleria sp. IMVS PPMFB : six souches ont été isolées à partir d'un aquarium dans une maison de Port-Pirie (Australie du Sud). Un cas confirmé de MEAP et plusieurs cas suspects s'étaient déclarés à cet endroit (Jamieson, 1973). Ces souches sont également agglutinées par un antisérum anti-N.fowleri, mais l'inoculation aux animaux est restée négative. Nous avons examiné la souche IMVS-PPMFB-6.

Genre Tetramitus Pertry, 1852

Tetramitus rostratus C.C.A.P. 1581/1 : souche originaire du département de Santé Publique, Austin, Texas, USA.

Souche reçue à l'ITMA en octobre 1971.

1.1.2. Famille Hartmannellidae.

Genre Hartmannella

H. vermiformis C.C.A.P. 1534/7 : souche isolée et décrite par F.C. Page (1967) (FCP N°25 : Type). Elle est isolée de l'eau du Pigeon Lake Wisconsin, USA. Maintenu depuis son isolement en culture monoxénique et reçue à l'ITMA en mars 1973.

Genre Acanthamoeba

A. castellanii : souche originaire de S.H. Hutner, Haskins Lab., New-York, USA. Reçue à l'ITMA de K.G.M. Adam (Edinburgh) en février 1974.

A. castellanii : souche isolée en 1930 par A. Castellani à partir d'une culture de levures. Elle a été envoyée par de Carneri. Cette souche a été entretenue en présence de Cryptococcus pararoseus d'une part et d'autre part par la présence de bactéries vivantes. Elle a été axénisée dans notre département lors de sa réception en juin 1974.

Acanthamoeba sp. Neff : souche isolée en 1957 à partir du sol du Pacific Grove en Californie (Neff et al., 1957) et reçue en octobre 1971 de K.G. M. Adam, Edinburgh.

A. culbertsoni A-1 : souche isolée par C. Culbertson en 1958 à partir d'une culture de cellules de rein de singe. Cette souche s'est montrée pathogène pour la souris et le singe après instillation intra-nasale. Entretien en culture axénique et reçue à l'ITMA DE K.G.M. Adam en octobre 1971.

A. polyphaga P.-23 : souche isolée par F.C. Page aux U.S.A. Entretien en culture axénique et reçue à l'ITMA de K.G.M.-Adam en janvier 1973.

A. rhysodes : souche reçue de K.G.M. Adam, Edingburgh en octobre 1971. Probablement une souche originale de Singh.

A. rhysodes C.C.A.P. 1534/3 : souche originale de B.N. Singh et isolée à partir de la terre de Rothamsted, Angleterre. Cette souche a été axénisée dans notre département dès son arrivée en mars 1973.

A. terricola 425 : souche originale de M. Pussard (1964) et isolée à partir d'échantillons de terre arable, provenant du domaine de la minière, Seine et Oise. Elle a été clonée et axénisée dans notre laboratoire à partir d'une culture monoaxénique reçue de M. Pussard.

A. Palestinensis : souche originale de K.Reich, isolée d'un sol en Israel en 1933 et décrite sous le nom de Mayorella palestinensis (Reich, 1933). Souche reçue en février 1974 de K.G.M. Adam.

A. astronoxis : souche isolée par D.L. Ray en 1954 à partir d'une eau en Seattle, USA. Reçue de K.G.M. Adam en février 1974.

Acanthamoeba sp. ITMAP 1024 : cette souche a été isolée à partir de selles diarrhéiques provenant d'un enfant hospitalisé à la Clinique Good-Engels à Anvers (Jadin et al., 1973). Cette souche s'est montrée pathogène pour la souris.

Acanthamoeba sp. ITMAP 361 : souche isolée à partir d'une eau de piscine à Anvers. Se cultive axéniquement et a pu être transmise à la souris à plusieurs reprises par passages intracérébrales.

Acanthamoeba sp. IMVS RUS 22 : souche isolée par A. Jamieson en 1973 à partir de la terre entourant une source d'eau chaude à Rotuora, Nouvelle Zélande. Cette souche s'est montrée pathogène pour la souris. Reçue à l'ITMA en février 1974.

1.1.3. Famille Entamoebidae.

Genre : Entamoeba

E. histolytica HK 9 : souche originaire de Corée (Diamond, 1961). Les extraits antigéniques (ICN Pharmaceuticals, Cleveland, Ohio) sont obtenus à partir de cultures axéniques (Diamond, 1968).

1.2. Phytomastigophorea.

1.2.1. Euglena gracilis : souche pigmentée provenant de la collection E.G. Pringsheim Prague, Tchécoslovaquie, et reçue en 1961 de J. Colas-Belcour, culture à température ambiante en milieu peptoné (peptone, 5 g; acetate de sodium, 2 g. eau distillée, 1l.).

1.2.2. Monas sp. ITMAP 422 : souche isolée le 6 janvier 1972 dans notre laboratoire à partir d'eau du réseau urbain d'Anvers (Belgique) et déterminée par le Professeur A. Hollande. Culture axénique à 28°C en milieu C.G.V. (Willaert, 1971).

1.3. Trypanosomatidae.

1.3.1. Trypanosoma (Trypanozoon) brucei brucei EATRO 1125 : Isolée le 5 octobre 1966 à partir d'une antilope Tragelaphus scriptus (Céphalophe) trouvée infectée naturellement à Mavubwe, South Busoga, Uganda; pas de parasitémie consécutive à l'injection à un volontaire humain. Formes de culture en milieu G.L.S.H. (Jadin et Pierreux, 1960).

- 1.3.2. T. (T.)b. gambiense ELIANE : souche isolée en 1952 à Paris par M. Vaucel à partir d'une patiente contaminée en Côte d'Ivoire (Fromentin, 1971). La culture in vitro, a été obtenue en 1953 par J. Colas-Belcour et nous a été communiquée par H.Fromentin, Institut Pasteur, Paris.
- 1.3.3. T.(Schizotrypanum) cruzi Tehuentepec : souche isolée en 1938 par E. Brumpt à partir de Triatoma sp.infectés naturellement dans la région de Tehuentepec, Mexique (Darman, 1941). Maintenu in vitro depuis 1959 au Service de Parasitologie, Institut Pasteur, Paris et reçue à l'ITMA en 1960.
- 1.3.4. Leishmania donovani ITMAP 263 : souche isolée le 22 février 1967 à Bruxelles par ensemencement sur gélose au sang du produit de ponction sternale d'un enfant marocain âgé de deux ans.

#### 1.4. Ciliata

- 1.4.1. Tetrahymena pyriformis souche isolée par E.Dyner à Varsovie à partir d'un sédiment d'urines d'un homme souffrant de glomérulo-néphrite. Souche reçue à l'ITMAP en octobre 1974. Se cultive axéniquement en milieu C.G.V. à la température de 28°C.

## 2. Culture in vitro

L'analyse immunochimique de Protistes requiert leur obtention en quantité importante et leur séparation des éléments antigéniques du milieu d'origine. L'accès à la culture axénique a été handicapé longtemps par l'absence d'un milieu monophasique adéquat.

Les descriptions morphologiques d'amibes, au début de ce siècle, ont été essentiellement effectuées à partir des échantillons d'origine sans que l'on n'ait essayé de cultiver et de

conserver ces amibes en vue de constituer une collection d'amibes types. La culture des petites amibes libres est restée pendant très longtemps dans une phase stationnaire. Il s'agissait de cultures d'amibes, très souvent hétérogènes, associées à la flore bactérienne qui s'y trouvait lors de l'isolement. Les cultures primitives étaient généralement réalisées dans des infusions de foin, de terre et même parfois de selles.

Schardinger, en 1899, fut le premier à isoler, sur un milieu d'infusion de foin solidifié par de l'agar, à partir de selles diarrhéiques d'origine humaine, une amibe qu'il appella Naegleria gruberi. En 1904 et 1906, Musgrave et Clegg emploient de l'agar alcalinisé pour isoler des amibes du même type de selles dysentériques, de l'eau et du sol. Wells, en 1911, emploie cette même gélose additionnée d'extrait de boeuf pour isoler des amibes de l'air.

Un grand nombre de chercheurs utilisent par la suite l'agar à 1,5 pour cent recouverte d'une couche de bactéries vivantes ou tuées. Seules quelques modifications ont été apportées par l'incorporation de produits nutritifs comme la protéase-peptone, l'extrait de boeuf et l'extrait de levure. C'est sur ces milieux que furent généralement isolées les premières souches de Naegleria provenant de cas de méningo-encéphalite amibienne primitive.

Seul Mandal (1968), isola en milieu axénique liquide (milieu de Schüffner) une souche de Naegleria provenant d'un cas de méningo-encéphalite amibienne primitive. Les subcultures sur ce milieu, dépourvu de matériel cellulaire ou bactérien, maintenaient les amibes en vie, mais ne permettaient pas une multiplication mesurable, si ce n'est par addition à ce même milieu gélosé de germes Aerobacter.

Des cultures axéniques de Naegleria ont été rapportées par Chang (1960) exécutées sur milieu solide pourvu de débris cellulaires ou de bactéries tuées par la chaleur, cependant en

il en résulta seulement une croissance limitée. Schuster (1960), Pittam (1963) décrivent par la suite des conditions de culture axénique de Naegleria en présence de bactéries tuées ou d'extraits bactériens.

Enfin, nous devons à Cervà (1969) les premières cultures axéniques de Naegleria dans un milieu liquide semi-défini, mais dépourvu d'éléments figurés.

D'autres milieux favorables à la culture axéniques ont été décrits par la suite par Fulton (1970), Nelson et Jones (1970) et des modifications ont été envisagées par Willaert (1971) et O'Dell et Stevens (1973) en vue de l'obtention d'une production massive de ces amibes.

En ce qui concerne les amibes du genre Acanthamoeba, il a fallu attendre Neff (1957) et Adam (1959) pour que les premières cultures bactériologiquement pures soient réalisées.

A l'heure actuelle les méthodes de culture se sont perfectionnées et les cultures axéniques sont de réalisation relativement plus aisée, mais restent entachées de nombreuses difficultés techniques et il subsiste des problèmes non encore résolus en ce qui concerne les amibes du genre Hartmannella et Vahlkampfia.

## 2.1. Verrerie.

La verrerie servant aux cultures doit être chimiquement neutre, être nettoyée et stérilisée facilement et permettre l'observation des amibes in situ à l'aide d'un microscope inversé. Les récipients servant aux cultures sont lavés avec des solutions détergentes douces ou avec un mélange sulfochromique de Kuss (Bichromate de potassium en poudre, 800 g; eau distillée 5 l., acide sulfurique pur 66°, 2.750 l.), rincés abondamment à l'eau du robinet puis à l'eau distillée ou mieux encore, à l'eau bidistillée. La verrerie servant à la culture en masse est traitée avec une solution de Silicone hydrosoluble (Siliolad, Clay-Adams) pour éviter une trop grande adhérence des amibes au verre.

Les ouvertures seront bouchées au coton cardé, de préférence enrobé de gaz. La verrerie est ensuite stérilisée, d'abord à l'autoclave pendant 30 minutes à 120°C, puis au four Pasteur pendant 3 heures à la température de 180°C.

La verrerie employée, en matériaux borosilicaté comprend :

- a) des tubes à fond plat de 100 mm x 15 mm ("Veinules", Le Veinc-tube, Sainte-Savine, France) pour l'entretien des souches;
- b) des flacons carrés de 180 ml pour le départ des cultures massives;
- c) des boîtes de Roux de 1000 ml pour les cultures en masse.

Les boîtes de Pétri sont en matière plastique stérilisées par rayonnement et jetées après chaque usage.

## 2.2. Milieux.

L'isolement de souches d'amibes et leur conservation en culture reste toujours la base de tout travail valable quel qu'il soit.

Les divers types de milieux de culture se répartissent en 3 catégories :

- a) les milieux non définis, solides ou biphasiques de type agar recouvert d'une couche de bactéries vivantes ou tuées.
- b) les milieux semi-définis ou semi-synthétiques, monophasiques et dépourvus d'éléments figurés comme le milieu de Cervà (1969), le milieu C.F.A. (Fulton, 1970) et le milieu C.G.V.S. (Willaert 1971).
- c) les milieux entièrement définis ou synthétiques tel que le milieu de Adam (1959) et de Band (1961).

La choix du type de milieu dépend du but poursuivi, à savoir l'isolement d'une souche, l'entretien en culture continue, ou encore l'étude de caractères biochimiques ou antigéniques des organismes.

En ce qui concerne l'isolement d'amibes libres les milieux non définis se montrent les plus favorables, néanmoins l'installation in vitro d'une population varie selon les espèces et selon les souches. Il y a donc intérêt à diversifier les types de milieux utilisés. Puisque les amibes libres envisagées dans notre étude, se nourrissent essentiellement de bactéries, à l'isolement il suffira d'employer un support pourvu d'une couche de bactéries vivantes ou tuées. Le support le plus souvent employé est l'agar à 1,5 %. Suivant les auteurs les bactéries employées varient mais le plus souvent Escherichia coli ou Aerobacter aerogenes sont recommandées (Singh 1952; Culbertson, 1958).

Nous employons l'agar à 3 % pour des raisons pratiques, à savoir la solidité du support, la déshydratation plus lente (pour les milieux incubés à 43°C) et la manipulation plus facile.

L'agar (Difco) est dissout dans l'eau bidistillée par chauffage, puis stérilisé par autoclavage. Cette préparation est ensuite distribuée dans les boîtes de pétri à raison d'environ 10 ml par boîte. Après solidification, quelques gouttes d'une suspension laiteuse d'Aerobacter aerogenes, tués par chauffage à 60°C pendant 1 heure (souche 6068, Institut Pasteur, Paris) est étalée à la surface. Ces boîtes de pétri, prêtes à l'emploi, peuvent être conservées ainsi emballées dans un sac en plastique, bien fermé à la température de +4°C. Pour éviter une éventuelle surinfection par levures ou champignons, il peut être incorporé à l'agar de la Nystatine (500 U par ml.) ou mieux encore la 5-Fluorocytosine à raison de 50 mcg par ml.

Après l'isolement sur le milieu précité, il peut être procédé à l'adaptation en culture axénique en vue de l'entretien en culture continue, de la conservation en azote liquide et de l'obtention d'une production massive des organismes, en vue de la préparation d'extraits antigéniques solubles.

Nous avons choisi comme point de départ le milieu de Cervà (1969), lequel a été modifié par la suite (Willaert, 1971).

Composition du milieu de Cervà :

Bacto-casitone (Difco)	20 g
Sérum de veau (ou de poulain)	100 ml
Pénicilline	500.000 U
Streptomycine	50.000 mcg
Eau bidistillée	900 ml

Nous avons observé que différents lots de sérums peuvent influencer la multiplication des amibes Naegleria. En décomplant le sérum à 56°C pendant 30 minutes, certains lots se montrent plus favorables, mais d'autres restent inutilisables.

Néanmoins, l'emploi de sérum de veau foetal présente un avantage considérable tant pour l'adaptation de certaines souches que pour l'obtention de cultures plus riches. Nous avons aussi observé une plus grande stabilité parmi ces lots de sérums.

Tout comme Stevens et O'Dell (1973) et O'Dell et Stevens (1973) nous avons pu constater qu'une concentration de 5 pour cent de sérum de veau foetal donne les mêmes résultats que 10 pour cent de sérum de veau normal ou foetal.

De plus, certaines souches d'amibes du genre Naegleria cultivant mal ou incapables de se multiplier axéniquement ont pu être adaptée au milieu de Cervà modifié.

Composition du milieu de Cervà modifié :

Bacto-casitone (Difco)	20 g
Glucose	1 g
Acide folique	2 mg
Biotin	20 mcg
Sérum de veau foetal (Flow)	50 ml
Pénicilline	500.000 U
Streptomycine	50.000 mcg
Eau bidistillée	950 ml
p <sup>H</sup>	7.0

Ce milieu appelé C.G.V.S. est essentiellement employé pour la culture axénique d'amibes du genre Naegleria.

Nous avons comparé ensuite ces deux milieux à l'aide de quatre souches de Naegleria fowleri durant quinze repiquages. Outre deux souches anversoises (ITMA 359 et ITMA 360) nous avons étudié les souches VITEK et HB-1. La température de croissance était 37°C.

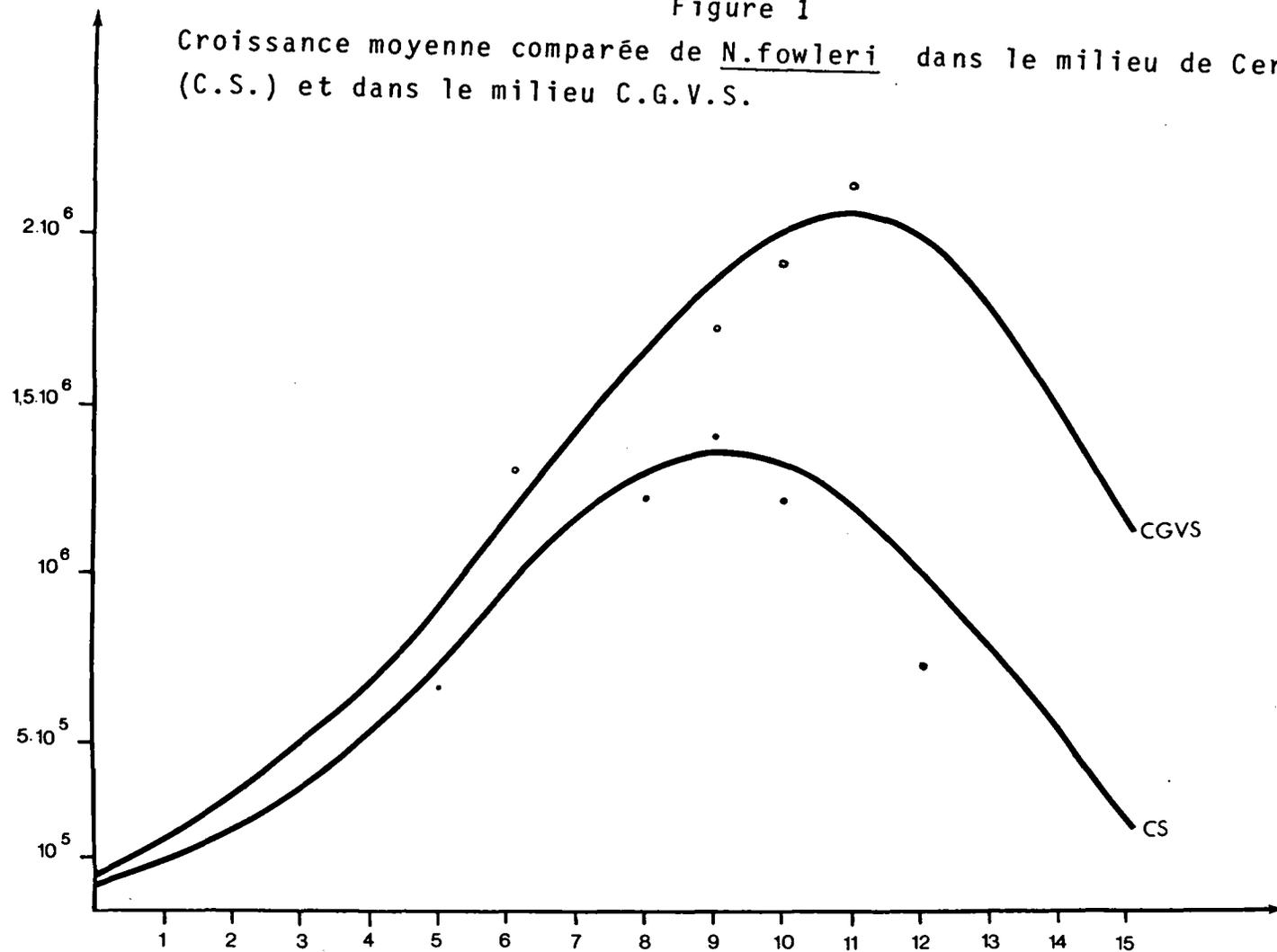
Dans ce but, des cultures âgées de six jours ont été ensemencées à raison de 100.000 à 150.000 amibes par ml de milieu neuf. Des numérations quotidiennes ont été effectuées en cellule de Thomas après agitation mécanique de la culture pendant cinq minutes. Les chiffres obtenus sur les diagrammes représentent la moyenne de quatre cultures distinctes (fig. 1).

Nous avons pu observer :

- a) en milieu de Cervà : les 4 souches se comportent de la même façon. nous observons des formes amiboïdes mobiles, des formes arrondies et des formes flagellées peu nombreuses. La multiplication est active durant les huit premiers jours et la population atteint une moyenne de 1.400.000 amibes par ml. Un début de lyse s'observe à partir du 10e jour. Vingt jours après l'ensemencement il ne subsiste que peu de formes viables..
- b) en milieu C.G.V.S. : les formes flagellées sont nombreuses. Les amibes ont tendance à se multiplier en grumeaux et parfois une multiplication à la surface du milieu est observé. Les mêmes phénomènes ont été observés chez les trypanosomatidae (Jadin et Wéry, 1963 et Jadin et Le Ray, 1969).

Une croissance abondante s'observe durant les huit premiers jours, suivie d'une phase de multiplication modérée. La population atteint une moyenne de 2 millions parfois de 2,5 millions d'amibes par ml. Aucune lyse ne s'observe durant les 10 premiers jours de culture. Après 24 jours de culture des formes viables subsistent encore.

Figure 1  
Croissance moyenne comparée de N.fowleri dans le milieu de Cervà (C.S.) et dans le milieu C.G.V.S.



Les courbes de croissance comparatives sont représentées dans la fig.1

Notre but était également de comparer les structures antigéniques d'espèces du genre Naegleria à celle d'espèces du genre Acanthamoeba, nous avons essayé de cultiver Acanthamoeba dans les mêmes conditions. Nous avons pu observer que ces amibes se multiplient abondamment dans le milieu C.G.V.S., mais également dans ce même milieu dépourvu de sérum.

Composition du milieu C.G.V. (Willaert 1975).

Bacto-carsitone (Difco)	20 g
NaCl	5 g
Glucose	1 g
Acide folique	2 mg
Biotin	20 mcg
Penicilline	500.000 U
Streptomycine	50.000 mcg
Eau bidistillée	1000 ml
p <sup>H</sup>	7.0

La stérilisation des milieux est effectuée par filtration sur membranes de 0,22  $\mu$  (Sartorius) et la stérilité est contrôlée par incubation du milieu à 37°C pendant 24 heures. Le milieu est ensuite conservé à +4°C.

### 2.3. Isolement.

L'isolement d'amibes libres à partir d'échantillons d'eau, du liquide céphalo-rachidien, de selles, d'organes et d'autres origines est toujours effectué sur Agar-bactéries tuées, rarement en milieu liquide monophasique.

Les échantillons d'eau sont filtrés sur des membranes d'acétate de cellulose (Millipore ou Sartorius) avec une porosité de 1,2 microns. Après filtration de l'échantillon la membrane est ensuite incubée avec la face filtrante sur le surface d'agar.

Les échantillons de selles, d'organes ou de terre sont déposés ou étalés sur une moitié de la surface d'agar. Sur l'autre moitié quelques pastilles d'antibiotique à large spectre sont disposés de façon à obtenir une zone relativement exempte de contaminants microbiens, ce qui facilite la mise en culture axénique des amibes prélevées à ces endroits. Les boîtes de Pétri sont ensuite scellées au parafilm, afin de conserver l'humidité.

Trois boîtes de Pétri d'un même échantillon sont successivement incubées aux températures de 28°, 37° et de 43°C, ce qui permet de sélectionner les amibes pathogènes. En effet, Naegleria fowleri se multiplie à la température de 43°C tandis que les amibes non pathogènes ne se multiplient pas à cette température élevée (Griffin, 1972).

Après observation d'une multiplication amibienne à l'aide d'un microscope inversé, on peut procéder à l'isolement d'une colonie d'amibes végétatives apparemment homogène, ou attendre la formation de kystes pour procéder au clonage. La présence de kystes permet d'orienter le diagnostic du genre de l'amibe. La forme caractéristique des kystes d'Acanthamoeba (fig. 2,3) et de Naegleria (fig. 4,5,6) facilitent notre choix.

#### 2.4. Clônage.

Pour travailler dans des conditions optimales avec une population homogène, nous clônons les souches utilisées à partir de kystes. La méthode employée a été récemment décrite par Das (1972). Les kystes sont récoltés sur la surface d'agar avec de l'eau distillée, puis lavés à plusieurs reprises par centrifugation s'il y a une trop grande contamination bactérienne. Le clônage est effectué sur des plaques à cupules (Agglutination slides Clay-Adams), sous le microscope à faible grossissement (obj. x10, oc. x 10).

Figure 2

Kystes d'Acanthamoeba sp.

Figure 3

Kyste d'A.castellanii Neff.

Figure 4

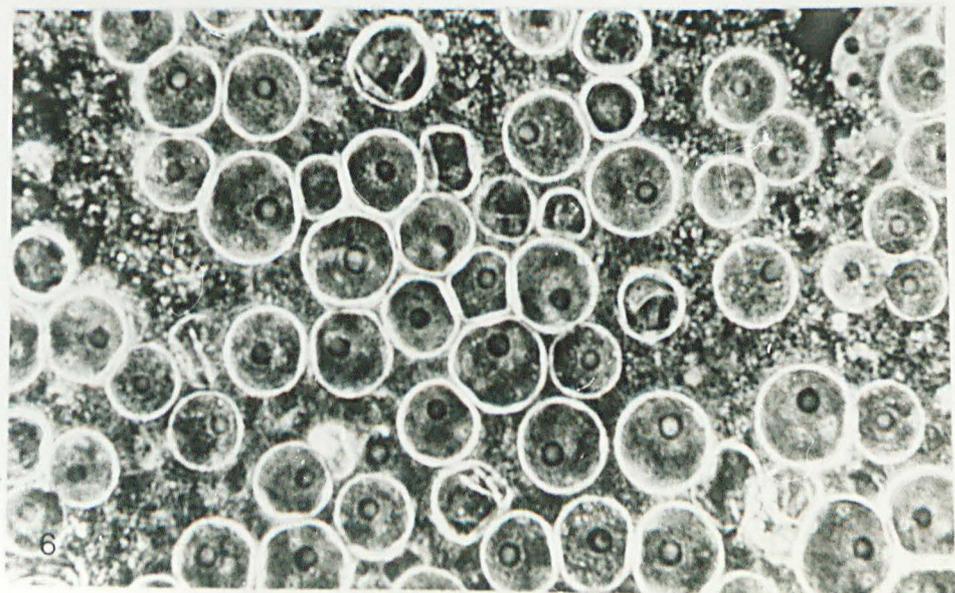
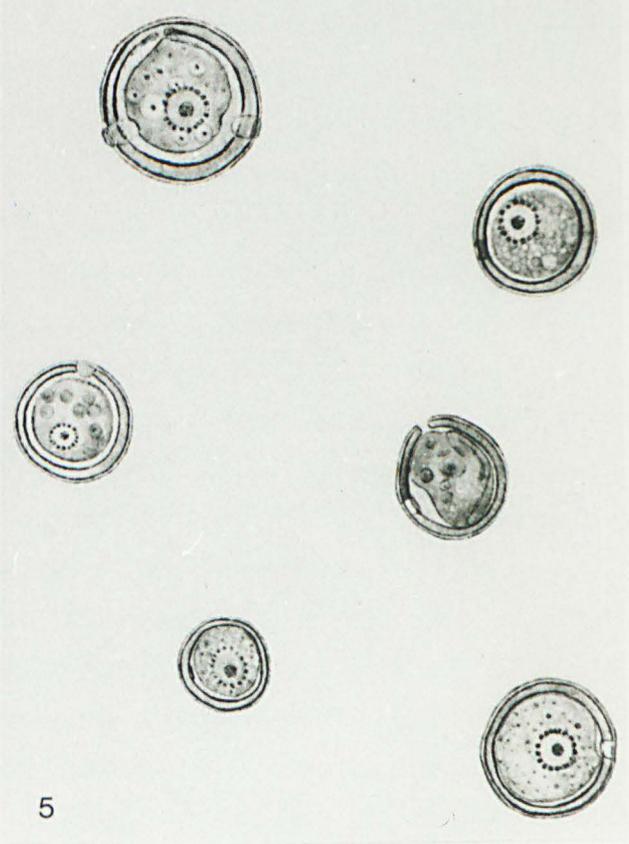
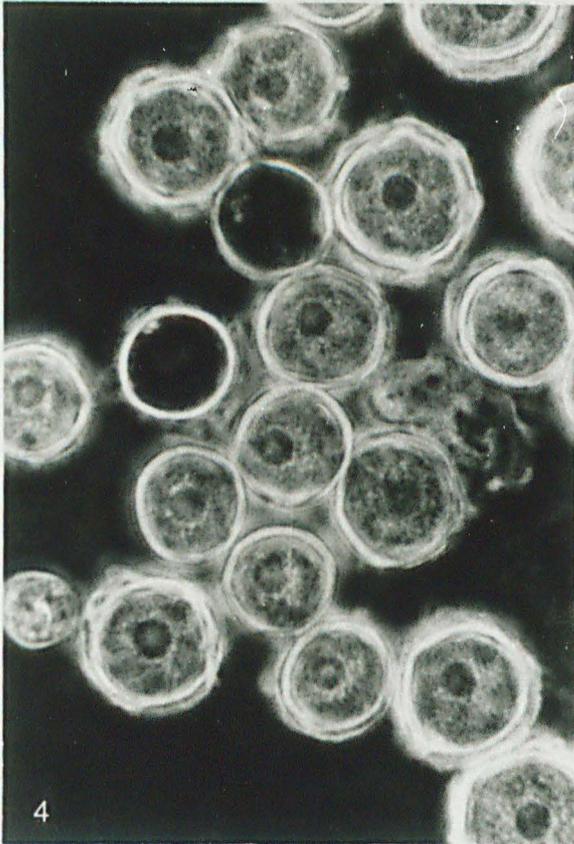
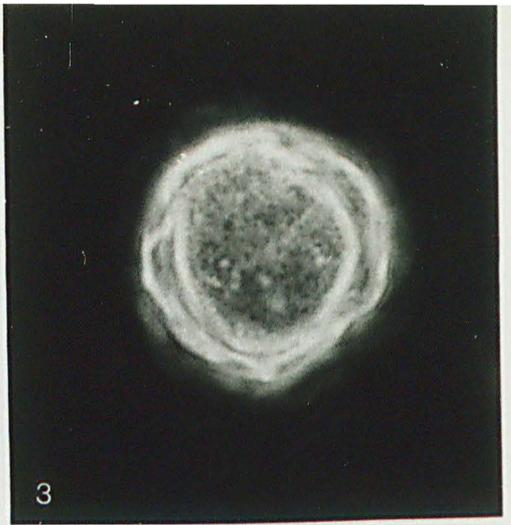
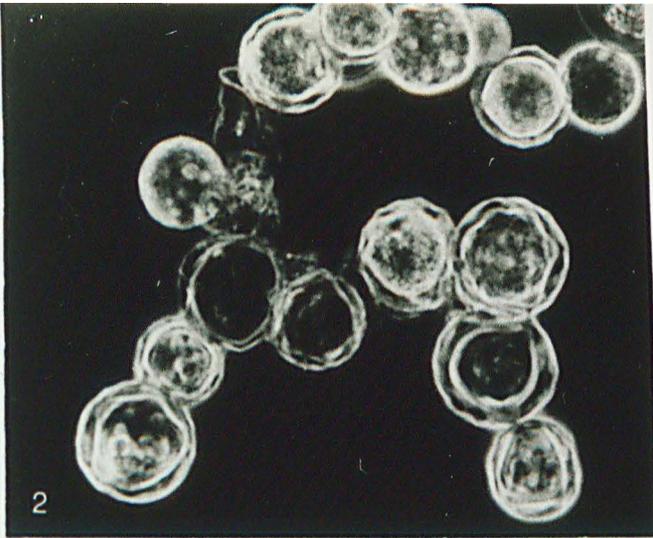
Kystes de N.gruberi CCAP 1518. Les ostioles sont nettement visibles.

Figure 5

Kystes de Naegleria sp.

Figure 6

Kystes de N.fowleri.



Des microgouttes d'eau distillée sont placées dans chaque concavité de la plaque, de façon à ce qu'une goutte recouvre un champ microscopique. Avec une micropipette une gouttelette contenant quelques kystes est ajoutée à la première goutte. Sous observation microscopique; il est possible à l'aide d'un capillaire de prélever 2, 3 ou 4 kystes et de les transférer dans la goutte suivante. On poursuit ce transfert jusqu'à obtention d'un seul kyste dans une gouttelette. Ce kyste peut être transféré plusieurs fois afin de s'assurer de la présence d'un seul kyste. Ce kyste est ensuite inoculé sur une surface d'agar recouverte de bactéries tuées. Ainsi à d'une culture hétérogène on a pu sélectionner la forme typique et obtenir des populations pures appropriées pour la mise en culture axénique et tout étude morphologique ou immuno-chimique.

Un autre moyen de clonage, mais moins précis, consiste à enfoncer une pipette Pasteur finement effilée dans la surface d'agar à l'endroit où se trouve un seul kyste ou trophozoïte. Ensuite on dépose en soufflant légèrement dans la pipette, le morceau d'agar avec le kyste sur un milieu neuf. Cette manipulation est aisément effectuée à l'aide d'un microscope inversé. Cette méthode est très rapide mais la réussite n'est pas toujours assurée. De plus, il faut que les kystes d'amibes soient bien dispersés sur la surface d'agar et non agglomérés comme c'est généralement le cas. Cette méthode est valable en cas de contamination fongique, pour prélever une colonie d'amibes apparemment homogène. Cette manipulation permet souvent d'éliminer les contaminations.

Le clonage d'une population constitue une étape importante dans tout étude envisagée. Il faut, avant de poursuivre toute analyse, vérifier l'homogénéité parfaite de la population d'organismes étudiée.

## 2.5. Adaptation.

A partir d'une culture de formes végétatives d'une population clônée, on ensemence les milieux liquides monophasiques pour obtenir des cultures axéniques.

Cependant, la mise en culture continue pose souvent certaines difficultés, variables selon les souches et les espèces, plus marquées, en milieu monophasique que sur milieu solide. Nous l'avons constaté avec Le Ray (Le Ray et al., 1970) pour les Trypanosomatidae. Notre expérience a montré que :

- 1/ le fait d'avoir isolé une souche ne signifie pas nécessairement que cette souche pourra être régulièrement subcultivée : une crise d'adaptation s'observe au cours des premiers repiquages, causée vraisemblablement par la disparition de certains constituants de leur environnement;
- 2/ le transfert de la culture d'un milieu donné à un autre requiert également une période d'adaptation. Cette période d'adaptation peut être longue et difficile à surmonter.

La population à axéniser est lavée de la surface d'agar avec du milieu liquide neuf, ensuite cette suspension est ensemencée en veinotube et incubée à 28° et 37°C. L'incubation à différentes températures permet de trouver la température optimale, donnant le meilleur développement de la souche.

Les cultures sont examinées au microscope inversé; dès l'observation d'une multiplication favorable, la population est repiquée .

L'augmentation de la fréquence des subcultures aide à surmonter la phase lytique qui se produit dès les premières subcultures pendant l'adaptation des souches.

Parfois, il est nécessaire d'avoir recours à des antibiotiques pour éliminer les contaminants bactériens provenant de l'isolement. Nous employons de préférence la Neomycine (10 mcg par ml) ou la Rifadine (50 mcg par ml).

On effectue le repiquage à l'aide d'une pipette Pasteur stérile en prélevant une partie du culot et en le transférant dans du milieu neuf, préalablement chauffé à une température égale à celle du laboratoire.

Quand les contaminants bactériens ne sont pas éliminés par l'addition d'antibiotiques, il peut être procédé par chauffage. Pour cette technique on récoltera sur la surface d'agar une population d'amibes enkystées. Cette suspension de kystes (avec des bactéries contaminantes) est ensuite incubée au bain-marie à 56°C pendant 30 minutes. Puis on ensemence les milieux neufs. Ainsi nous avons obtenu des cultures axéniques d'Acanthamoeba dont les kystes sont très résistants à la chaleur. Il faut procéder à plusieurs repiquages successifs permettant de stabiliser l'entretien régulier d'une souche axénique. On estime qu'une souche est stabilisée en culture quand aucune modification des conditions de culture n'est nécessaire pendant dix repiquages. Une fois bien établie sur un milieu donné une souche peut se cultiver indéfiniment sans difficulté particulière .

Certains échecs ont été rencontrés durant nos isolements et adaptations, car toutes les espèces ou souches ne se multiplient pas en culture axénique dans nos conditions d'expériences. Il s'agit, une fois de plus, d'espèces appartenant aux genres Vahlkampfia et Hartmannella.

Nous avons pu adapter en culture axénique continue 23 souches du genre Naegleria et 2 souches du genre Acanthamoeba.

## 2.6. Entretien.

En routine, les cultures sont ensemencées sur des milieux neufs en veinotule contenant 3 ml. de milieu. Le milieu neuf est préalablement porté à la température du laboratoire.

L'inoculum, 0,5 ml environ, est prélevé au fond du tube avec une pipette Pasteur et transféré dans un milieu neuf. Une goutte de l'inoculum est contrôlée au microscope à contraste de phase afin de s'assurer de la pureté de la culture.

Les repiquages à 28°C se font tous les 8 à 10 jours et ceux à 37°C tous les 5 à 6 jours pour les souches de Naegleria. Les souches d'Acanthamoeba qui se lysent moins vite, sont repiquées tous les 8 jours à 37°C et tous les 14 jours à 28°C.

## 2.7. Culture en masse.

Le développement d'une culture peut être décomposé schématiquement en quatre phases (fig. 7).

- 1) phase de latence
- 2) phase de multiplication active (ou logarithmique)
- 3) phase stationnaire
- 4) phase de lyse.

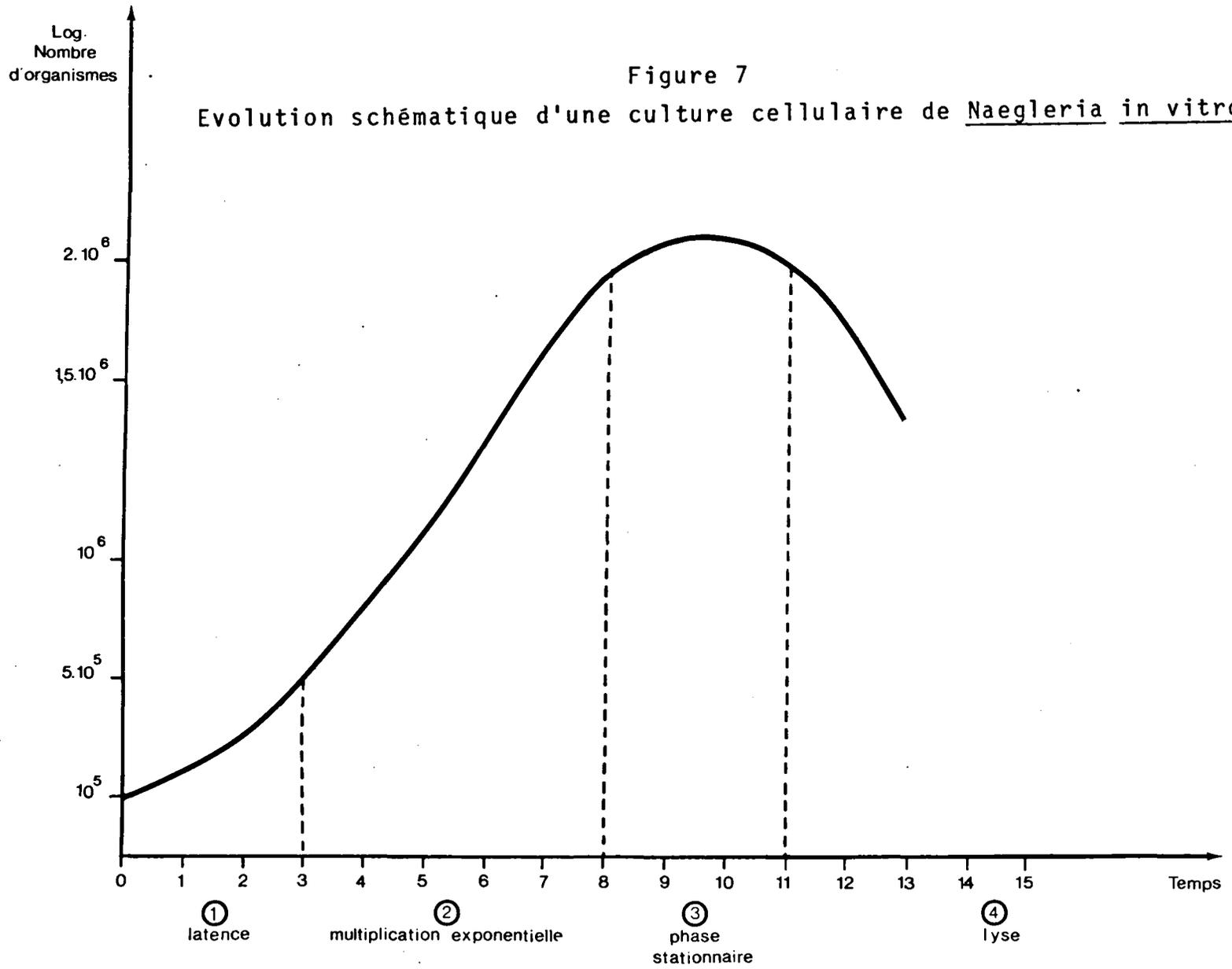
Pour avoir un bon rendement en corps cellulaires lors de la récolte, la culture doit être maintenue en phase logarithmique de multiplication. Les organismes sont à prélever en fin de phase 2 et le volume de l'inoculum doit être évalué de manière à ramener la population au début de phase 2.

La production des antigènes en grande quantité, nécessite la culture massive des amibes dans des récipients à grand volume.

Ces cultures massives sont réalisées en flacons de Roux de 1000 ml préalablement siliconés, contenant 200 ml de milieu de culture. Dans ces flacons le milieu est étalé en une couche mince, assurant une bonne oxygénation. L'ensemencement est réalisé par l'inoculation de 50 ml d'une culture de 7 jours environ.

Quand il s'agit d'amibes du genre Naegleria, de 10 à 12 jours environ pour les amibes du genre Acanthamoeba.

En pratique, les cultures en masse, en flacons de 1000 ml demandent d'abord l'exaltation et l'entretien des souches par repiquages en veinotubes tous les 5 jours, puis par transferts successifs en volumes de 25 ml et de 50 ml tous les 8 jours et finalement par ensemencement dans 200 ml de milieu frais en flacon de Roux permettant la culture en couche mince. Dans le cas, des amibes, le volume minimal de l'inoculum a été égal au quart de volume à ensemer.



Les organismes sont récoltés au début de la phase stationnaire après 8 à 9 jours de culture pour Naegleria et après 10 à 12 jours de culture pour Acanthamoeba.

### 3. Cryoconservation

#### 3.1. Principes.

La conservation de souches de Protozoaires à basse température est devenue indispensable car l'entretien d'une collection pose toujours un problème aux laboratoires. Cet entretien nécessite un temps et un matériel considérable, de plus les souches sont constamment à la merci d'une surinfection et surtout de modifications de leurs caractères morphologiques et biologiques qui surviennent inévitablement au cours des passages.

Les basses températures arrêtant le métabolisme cellulaire, constituent en théorie le moyen de choix pour conserver des corps cellulaires dans l'état d'origine.

Depuis le début de ce siècle la congélation à basse température a permis à Laveran et Mesnil (1904) de retrouver virulent Trypanosoma lewisi après un séjour de 15 minutes à  $-196^{\circ}\text{C}$ , température de l'azote liquide. Depuis, bien de recherches ont été menées pour la mise au point des méthodes appropriées à chaque micro-organisme.

Les travaux de Meryman (1960), Mazur (1960, 1962) et Ressler et al. (1965) sur des micro-organismes et des protozoaires, ainsi que les travaux de Lovelock (1953) sur des globules rouges émettent une théorie générale : si on considère un système biologique quelconque, constitué d'eau et de cellules, soumis à un abaissement progressif de température, deux phénomènes physiques interviennent; d'abord un ralentissement de la vitesse des réactions chimiques, ensuite un changement de phase par cristallisation de l'eau sous forme de glace.

Lors de la cryopréservation deux passages critiques sont à prendre en considération; tout d'abord la congélation progressive, ensuite la décongélation qui doit être brutale.

### 3.2. Technique.

A l'Institut de Médecine Tropicale à Anvers, Resseler et al. (1965) ont mis au point une technique, laquelle a permis de stabiliser avec succès un grand nombre de souches de Trypanosomatidae en particulier. La viabilité de ces organismes congelés s'est maintenue pendant plus de 9 ans. Cette technique s'est également montrée valable pour de nombreux autres organismes. Néanmoins, pour les amibes du genre Entamoeba, la technique s'est montrée inefficace. Pour cette raison, nous préconisons une méthode dérivée de celle de Neal (1974). Cette technique procède par congélation lente en présence des diméthylsulfoxyde (DMSO) comme agent cryoprotecteur, par conservation à  $-196^{\circ}\text{C}$  dans l'azote liquide et par décongélation rapide.

Deux volumes de plusieurs culots de cultures riches en amibes (concentration éventuelle par centrifugation afin d'obtenir environ  $1.10^6$  amibes par ml) sont mélangés aseptiquement à un volume d'une solution à 22,5 % de diméthylsulfoxyde (Merck, Darmstadt) en ringer glucosé à 1 %, préalablement stérilisée par filtration, afin d'obtenir une concentration finale de 7,5 %. Ce mélange est réparti dans des ampoules de 1ml en verre borosilicaté recuit (Vel, Leuven) scellées à l'aide d'un chalumeau. Le nom de la souche et la date de congélation sont mentionnés sur une étiquette autocollante protégée par du papier adhésif transparent.

La congélation est effectuée à l'aide d'un dispositif de refroidissement contrôlé (Linde, Biological Freezer, modèle BF-3-1, Union Carbide) permettant des taux de refroidissement de  $0,5^{\circ}\text{C}$  à  $19^{\circ}\text{C}$  par minute. Ce dispositif comprend une enceinte de congélation d'une unité de contrôle thermique. L'enceinte de congélation d'une capacité de 40 ampoules est refroidie par vapeur d'azote liquide.

A l'aide de ce dispositif, la congélation lente est assurée par équilibrage de la suspension en ampoules pendant 10 minutes à + 5°C ensuite par refroidissement de 1°C par minute jusqu'à -70°C, puis de 5°C par minute jusqu'à -100°C.

La congélation lente s'effectue sous le contrôle d'un intégrateur de température dont la courbe de congélation est mécaniquement enregistrée (type G-11 A, Varian Associates, Palo Alto, California).

Les ampoules sont ensuite émergées à -196°C dans l'azote liquide. Les récipients utilisés pour la conservation de nos souches sont des conteneurs isothermes de 28,5 litres de capacité de type Linde LNR-25-B, comprenant six canisters munis de cinq pots en aluminium pouvant contenir chacun vingt ampoules, soit au total environ 500 ampoules par par conteneur. Le niveau d'azote liquide est réajusté chaque semaine.

Pour la décongélation, l'ampoule prélevée est immédiatement plongée dans un bain-marie à 40°C. Après environ 90 secondes d'agitation mécanique, le contenu de l'ampoule est revenu à l'état liquide.

Pour chaque souche congelée, une fiche de référence est établie, portant le nom et les caractéristiques de la souche ainsi que ses conditions de congélation et son numéro d'ordre (conteneur, canister, pot) dans la cryothèque.

Nous préservons de cette façon des souches d'amibes depuis 4 ans, tout en conservant leurs caractères morphologiques et biologiques. Notre collection d'amibes conservées en azote liquide s'élève à plus de 150 souches.

#### 4. Préparation des extraits antigéniques.

La pureté et l'intégrité des antigènes cellulaires dépendent essentiellement des procédés de lavage, d'extraction et de conservation qui leurs sont appliqués. Des conditions normalisées ont été définies sous contrôle immunoélectrophorétique systématique des étapes préparatives. Les organismes récoltés sont lavés puis broyés mécaniquement à l'état congelé, les extraits ont été ultracentrifugés, dialysés, lyophilisés et conservés sous gaz inerte.

Toutes les manipulations sont menées le plus aseptiquement possible. Dès l'extraction des constituants cellulaires la température a été maintenue entre 0 et 4°C.

#### 4.1 Récolte.

Les amibes sont récoltées en fin de la phase de multiplication active, c'est-à-dire pour les Naegleria se cultivant à 37°C au 8e jour et pour les Acanthamoeba se cultivant à 28°C entre le 10e et 12e jour de leur multiplication.

Avant la récolte tous les flacons de cultures sont examinés macroscopiquement et microscopiquement afin de s'assurer de la pureté des cultures. L'absence de bactéries est contrôlée par ensemencement des cultures sur gélose et bouillon nutritif (B.H.I., Difco) et de champignons par ensemencement sur milieu Sabouraud. Périodiquement, l'absence de germes anaérobies est contrôlée en milieu thioglycolate et l'absence de Mycoplasma par ensemencement direct sur gélose PPLO. Ces examens ont donnés des résultats négatifs.

Ensuite, les amibes sont concentrées par centrifugation à température ambiante en pots de 250 ml dans un appareil Martin Christ (Osterode am Harz) modèle universal junior III, muni d'une toupie à quatre godets (rotor n° 5010). La vitesse de centrifugation est de 885 g pour Naegleria et de 1500 g pour Acanthamoeba pendant 19 minutes. Le surnageant est aspiré au moyen d'une pipette reliée à une trompe à eau et un récipient intermédiaire. Les culots sont rassemblés dans des pots piriformes (tubes à essai des huiles n° 3114, capacité 125 ml) avant de procéder aux lavages.

#### 4.2. Lavage.

Le lavage a pour but d'éliminer les contaminants antigéniques du milieu de culture. Les organismes récoltés sont lavés dans une solution de casitone glucosée (casttone, 10 g; glucose 1 g et eau bidistillée, 1 litre) afin d'éviter une trop grande lyse : l'efficacité du lavage ainsi que la lyse cellulaire ont été visualisées par l'analyse immunoélectrophorétique des eaux de lavage à l'aide d'immunsérum anti-milieu de culture et antiorganismes

(cfr. 3.1.2.). Les lavages ont été effectués , à quatre reprises par centrifugation à 4°C à 885 g pendant 10 minutes en ce qui concerne Naegleria et à deux reprises à 1500 g pendant 10 minutes pour Acanthamoeba.

#### 4.3. Extraction

Pour obtenir une bonne appréciation du rendement des cultures, le culot de centrifugation est pesé après les lavages et mis en suspension dans une solution réfrigérée stérile de NaCl 0,017 M à raison de 4 à 8 ml de solution par gramme en poids humide d'organismes. La salinité de la suspension évite la précipitation d'éventuelles englobulines cellulaires.

La concentration des organismes constitue un facteur important dans la qualité antigénique. Toute dilution entraîne un abaissement de la température de décongélation du système lors de la lyophilisation des extraits cellulaires et défavorise les conditions de lyophilisation.

Deux modes d'extraction ont été employés.

Nous avons eu recours, pendant la première partie du travail, à la technique du "mortier-glace" préconisée par Biguet et Capron (1965). La suspension des amibes en NaCl 0,017 M est versée dans un mortier en porcelaine (Haldenwanger), modèle 54, capacité 2.500 ml). Le mortier est placé au congélateur à -30°C.

Lorsque la suspension est complètement congelée on effectue un broyage à l'aide d'un pilon, réduisant ainsi progressivement en poudre le produit congelé. La poudre est ensuite triturée jusqu'à fusion presque complète. Ce traitement est répété au moins 5 fois. Le nombre de broyage, nécessaire pour obtenir une extraction optimale a été mis au point pour les Trypanosomatidae (Le Ray, 1957).

Ensuite, nous avons eu recours à la méthode d'extraction préconisée par Ebedo (1960) à l'aide d'une presse hydraulique.

La "X-Press" (Biotec, Bromma, Suède; distribué en Belgique par L.K.B.) existe en deux modèles, une de capacité de 5 ml et une de capacité de 25 ml. (fig. 89).

Cet appareil est composé de deux cylindres identiques, placés dans un manteau et séparés par un disque perforé. Le produit à désintégrer est introduit dans un des cylindres et congelé à  $-30^{\circ}\text{C}$  en même temps que deux pistons courts logés dans les cylindres et un long piston sur lequel la pression est appliquée. Après avoir refroidi l'ensemble, on applique à l'aide d'une presse hydraulique, une pression d'environ 13 Tonnes/cm<sup>2</sup>.

Le contenu congelé du cylindre, sous l'action de la pression, traverse le pertuis (2 mm de diamètre), ce qui provoque la désintégration des amibes. En fait c'est le passage de la phase "glace I" en "glace II" qui se produit entraînant un brusque changement dans la structure des cristaux. Ceci combiné à la contraction rapide suivi de l'expansion du matériel congelé désintègre des amibes, après la chute brutale de la pression.

La passage de la totalité de l'antigène par l'orifice est répété à 4 reprises. Entre chaque passage l'X-Press est de nouveau porté au congélateur à  $-30^{\circ}\text{C}$ . Après le dernier passage, l'antigène toujours congelé, est récupéré puis décongelé.

Nous préférons la méthode à l'X-Press, car les manipulations sont moins longues, moins fastidieuses et le produit obtenu est de qualité égale à celui obtenu par le broyage manuel.

La qualité de l'éclatement cellulaire, par les deux méthodes a été contrôlée par les examens pratiqués en microscopie optique et en microscopie électronique et ne montrent plus de cellules ni d'organelles intactes (fig. 9).

#### 4.4. Ultracentrifugation préparative.

Après décongélation de l'antigène, celui-ci est conditionné dans des tubes à centrifuge en polycarbonate fabriqués pour le rotor 40.000. L'ultracentrifugation est menée à 40.000 g à  $+ 4^{\circ}\text{C}$  pendant 60 minutes dans une ultracentrifugeuse Martin-Christ, modèle Omega II 700.

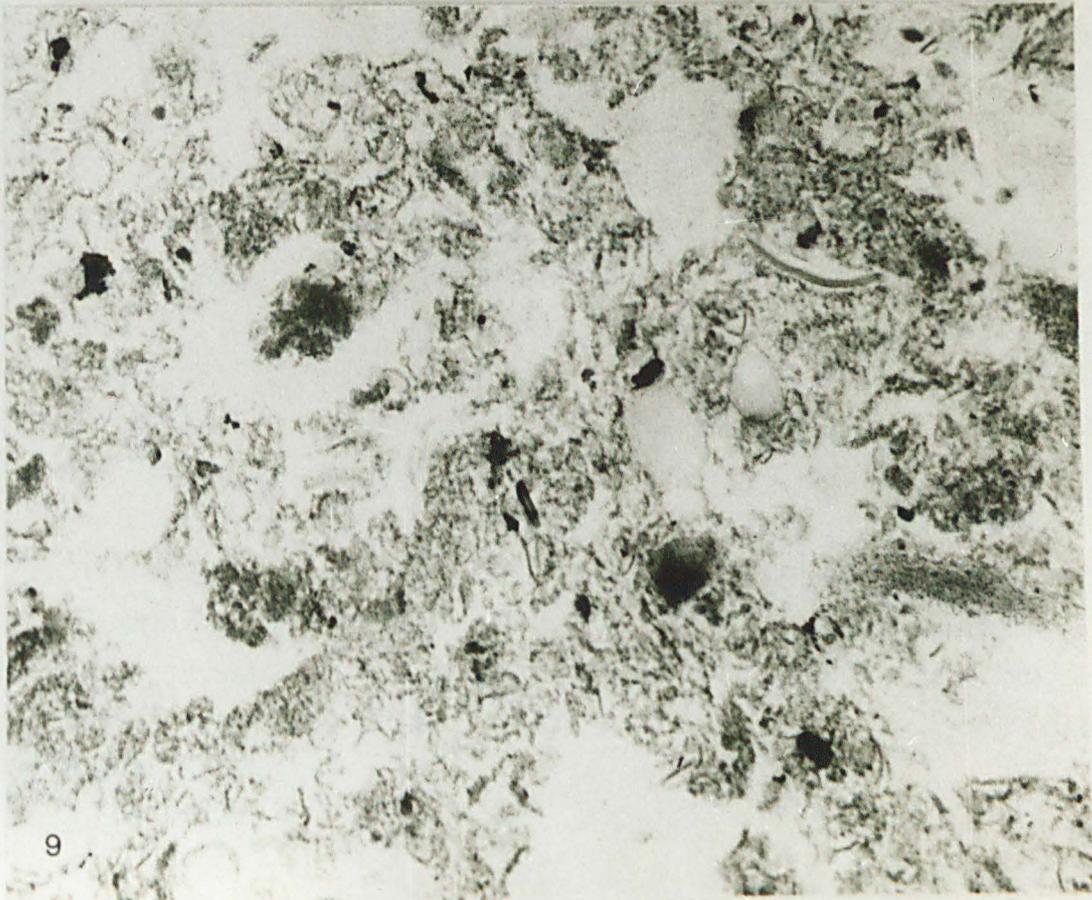
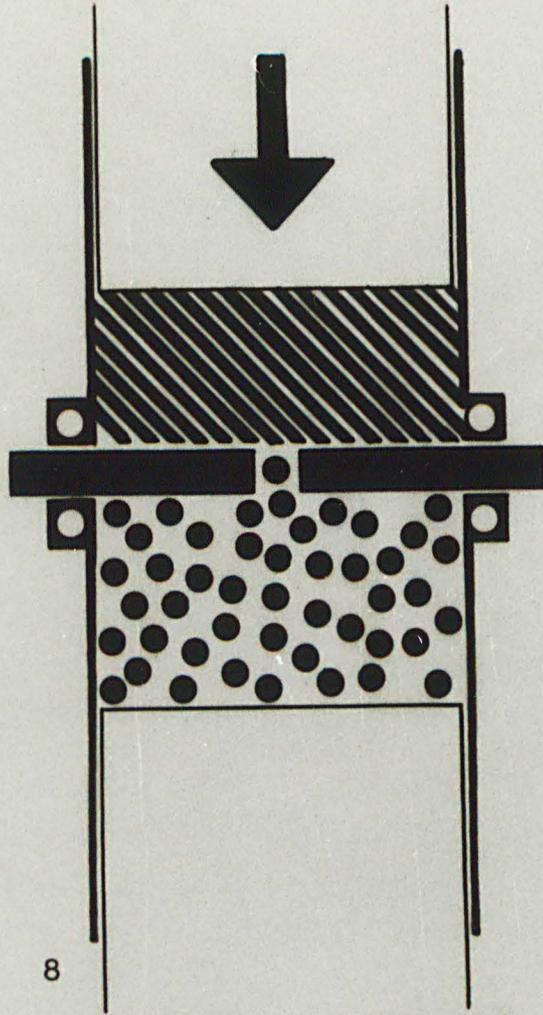
Figure 8

Représentation schématique du principe de l'X-Press : Les organismes congelés traversent le pertuis sous l'action de la pression, ce qui entraîne la désintégration effective des corps cellulaires.

Figure 9

Contrôle en microscopie électronique de la qualité de la désintégration cellulaire.

X-PRESS



Une centrifugation insuffisante se traduit en immunoelectrophorèse soit par un éclatement de puits de dépôt de l'antigène, soit par une trainée obscurcissant le parcours électrophorétique.

#### 4.5. Dialyse.

Après centrifugation, le surnageant est dialysé. Celui-ci introduit en tubes à dialyse Nojax (Sophyc, Levallois) calibre 16 ou 21. La membrane contenant l'antigène est ensuite immergée dans l'eau distillée à + 4°C pendant environ 24 heures. Un rapport minimal de 1 : 100 entre les volumes du liquide à dialyser et de l'eau distillée est respecté.

#### 4.6. Lyophilisation

La lyophilisation constitue également une étape importante dans la préparation des extraits antigéniques.

Nous avons eu recours à un équipement Usifroid (Boulogne, France) comprenant un congélateur à rouleaux, un microsублиmateur de type MSP 32-4 et un galvanomètre relié à une série de sondes thermiques ce qui fournit la possibilité d'un contrôle permanent des divers paramètres au cours de la lyophilisation.

Le dialysat est réparti par volumes de 50 ml dans les flacons plasma (capacité 500 ml) et une sonde thermique y est introduite également. Le flacon est ensuite déposé horizontalement sur le congélateur à rouleau dans un bain d'alcool et de carboglace et le produit est congelé rapidement en coquille à une température la plus basse possible. Le flacon est ensuite rapidement introduit dans une alvéole du sublimateur, relié à l'enceinte sous vide et entouré d'un bain thermostaté ce qui permet une accélération de la sublimation par apport de calories. Le produit est ainsi lyophilisé en une seule étape.

Le produit obtenu est une poudre floconneuse, très légère et bien soluble dans l'eau distillée.

#### 4.7. Conservation.

L'antigène est pesé et conditionné dans des flacons à pénicilline à raison de 20 à 30 mg, à fin de connaître le rendement final de la culture en poids sec.

L'extrait antigénique est conservé à l'abri de toute réhydratation et réoxygénation pour ne pas altérer la qualité. Une meilleure conservation est assurée par le maintien sous gaz inerte ou l'air est remplacé par l'azote stérile (Azote A 28, Air liquide). Les antigènes ainsi traités peuvent être conservés à l'obscurité et à la température ambiante du laboratoire, ou mieux encore en congélateur à  $-30^{\circ}\text{C}$ .

Nous n'avons observé aucune altération importante des extraits conservés après 36 mois et plus.

#### 4.8. Rendement.

Le rendement de la récolte dépend de la qualité du sérum de veau incorporé au milieu de culture (facteur à négliger après emploi du sérum de veau foetal) de la qualité de l'inoculum et de la durée de multiplication.

Nous avons eu recours, pour ce travail, à 172 litres de milieux C.G.V.S. et à 86 litres de milieu de culture C.G.V. 210 grammes d'organismes ont fourni 9 g d'extrait lyophilisé. Généralement les récoltes ont été de l'ordre de 1 g d'organismes par litre de milieu de culture et le lyophilisat a représenté environ 4 pour cent du poids humide (Tableau 2).

La qualité antigénique des extraits obtenus a été constante durant toute la période du présent travail.

#### 4.9. Analyse physico-chimique

Des lyophilisats de six espèces différentes ont été analysés par examen spectrophotométrique dans l'ultra-violet et dans le visible et par dosage de l'azote.

##### 4.9.1. Spectrophotométrie.

Les spectres d'absorption lumineuse ont été établis à l'aide d'un spectrophotomètre enregistreur Beckman, modèle DB (double faisceau) en cuves de 1 cm (chemin optique); spectrophotomètre : DO de 0 à 2; enregistreur : 100 mV, vitesse 2 et 5, étalonnage avec témoins eau bidistillée et sulfate de dextrane (donnant un maximum d'absorption à 260 nm); dilution effectuée: 1 mg/3 ml.

##### a) ultra-violet :

Quatre lots de N.fowleri (souches ITMAP 359, HB-1 et IMVS Morgan), un lot de N.jadini (ITMAP 400) et un lot de N.gruberi (c.c.A.P. 1518) ont été examinés à la concentration de 1 mg/ 3 ml eau bidistillée. Les spectres U.V. de N.fowleri (fig. 10) et de N.jadini sont qualitativement et quantitativement à peu près identiques. La pente ascendante de la courbe est faible et croît lentement dans la zone située autour de  $\lambda = 280$  nm. On observe un maximum d'absorption vers  $\lambda = 258$  nm et un minimum vers  $\lambda = 245 - 248$  nm. Le spectre d'absorption de N.gruberi est un peu différent et montre un maximum d'absorption vers  $\lambda = 266$  nm et un minimum vers  $\lambda = \frac{247}{5}$  nm.

Le matériel U.V. absorbant de N.fowleri et de N.jadini est constitué essentiellement d'acides déoxyribonucléiques et de ses dérivés tandis que chez N.gruberi le matériel U.V. absorbant consiste surtout en dérivés d'acide ribonucléique.

Un lot d'A.castellanii (souche Neff) et un lot d'A.rhysodes ont été examinés à la concentration de 1 mg/3 ml eau

bidistillée. Les spectres U.V. de ces deux souches sont sensiblement identiques (fig.11). On observe un maximum d'absorption vers  $\lambda = 258$  nm et un minimum vers  $\lambda = 240-243$  nm.

Ces spectres sont typiques des acides nucléiques et dérivés. La quantité importante d'acides nucléiques dans les lyophilisats reflète la multiplication exponentielle des organismes étudiés.

b) Visible :

Les mêmes lyophilisats ont été examinés à la même concentration qu'en ultra-violet.

Aucune absorption n'a été observée entre  $\lambda = 320$  nm et  $\lambda = 800$  nm. On peut conclure à l'absence de pigment en quantité décelable dans les conditions de l'examen.

La même observation a été faite pour T.b.brucei (Le Ray, 1974) et pour T.cruzi (Afchain, communication personnelle).

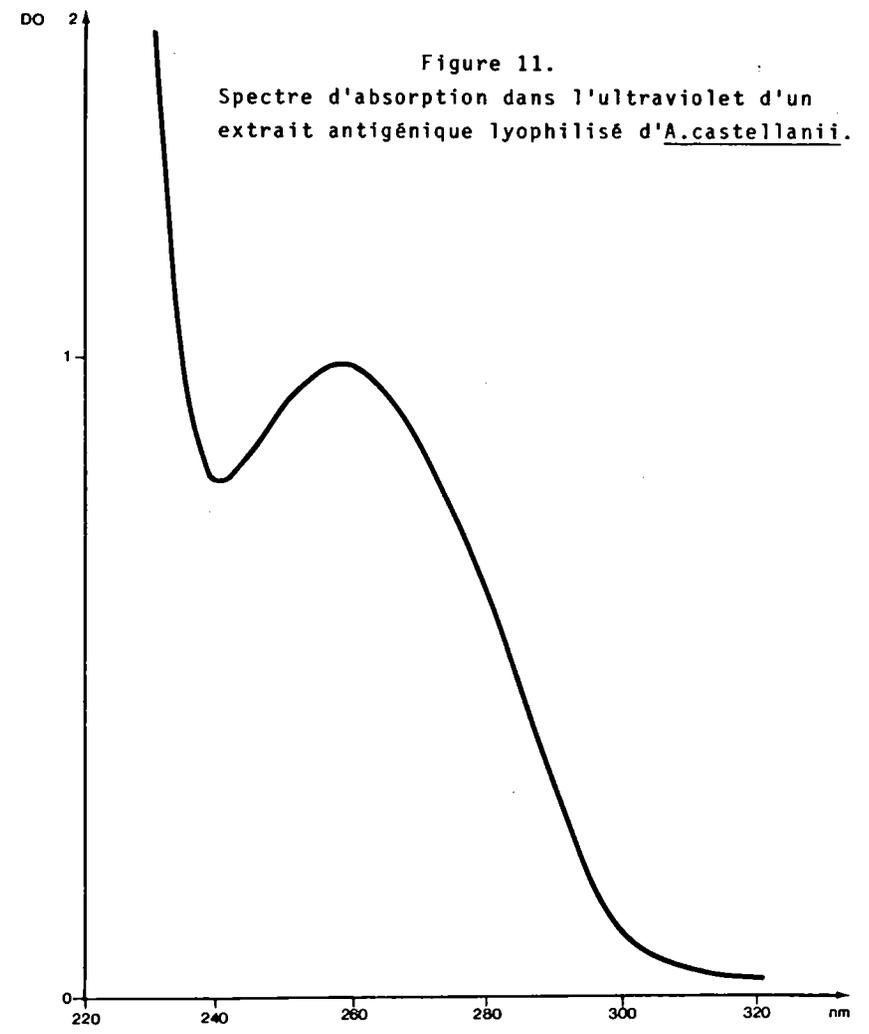
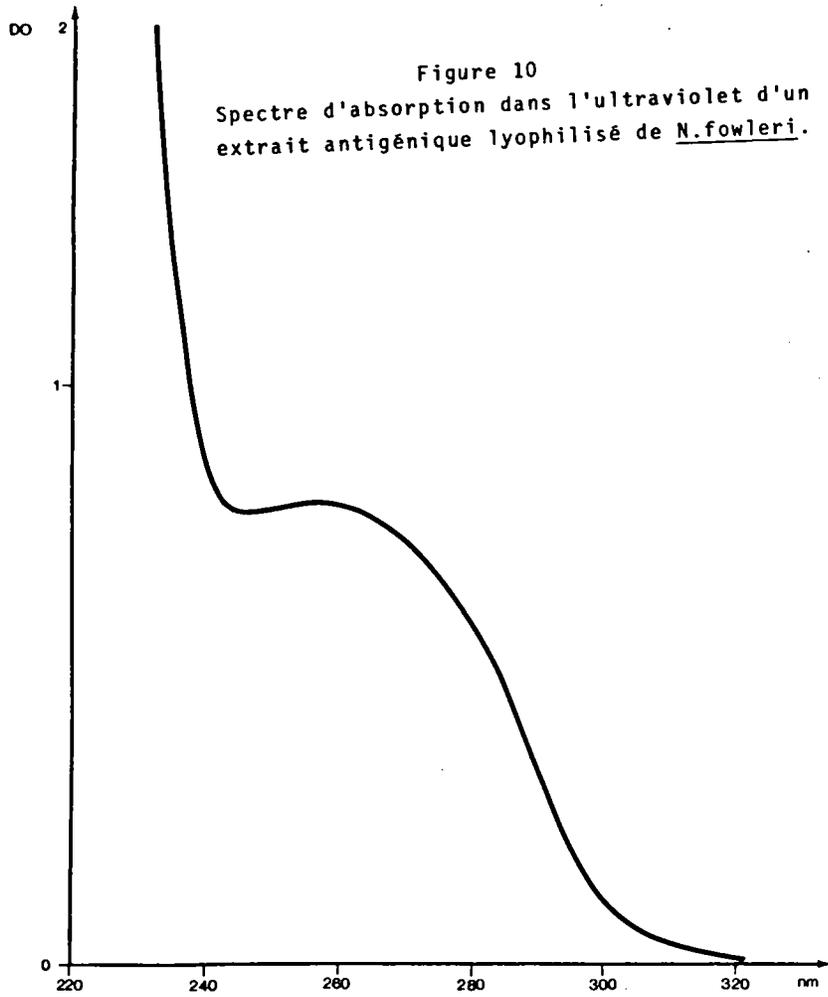


Tableau 2 : Rendement de la récolte (poids humide) et de l'extraction (poids sec) de diverses espèces de Naegleria et Acanthamoeba.

Espèce	Souche	Nombre Lots	Poids humide (mg/l milieu)	Poids sec (% poids humide)
<u>N. fowleri</u>	ITMAP 359	4	1.021	6,2
<u>N. fowleri</u>	ITMAP 360	2	690	6,2
<u>N. fowleri</u>	MEDVED Morgan	2	974	4,3
<u>N. fowleri</u>	HB-1	1	1.195	6,8
<u>N. fowleri</u>	VITEK	1	1.038	5,7
<u>N. fowleri</u>	MEDVED PAa	2	1.202	4,7
<u>N. fowleri</u>	N.a.1	1	729	5,7
<u>N. fowleri</u>	C-66	1	892	5,8
<u>N. jadini</u>	ITMAP 400	2	911	3,9
<u>N. gruberi</u>	C.C.A.P. 1518	3	529	5,4
<u>Naegleria sp.</u>	MEDVED A	4	735	3,2
<u>Naegleria sp.</u>	MEDVED PPMFB	2	814	4,3
<u>Naegleria sp.</u>	MEDVED BG 6	2	1.495	4
<u>Acanthamoeba sp.</u>	Neff	3	866	3,6
<u>A. rhyssodes</u>	C.C.A.P. 1534	2	784	4,7
<u>A. culbertsoni</u>	a-1	3	1.046	2,7
<u>A. polyphaga</u>		1	324	4,3
<u>Acanthamoeba sp.</u>	ITMAP 1042	1	756	4,7
<u>A. palestinensis</u>		1	404	4,2
<u>A. astronyxis</u>		2	837	3,3
<u>A. terricola</u>		1	453	5,5
<u>A. castellanii</u>		1	924	4,3
<u>A. castellanii</u> (d.c)		2	760	3,6
<u>Acanthamoeba sp.</u>	IMVS RUS 22	1	1.016	2,6

4.9.2. Dosage d'azote.

Le dosage d'azote a été effectué par la méthode de Dumas appliquée au Nitrogen Analyser, modèle 29 Colemena. Les examens ont porté sur des quantités de lyophilisats de 2 mg et 2,5 mg.

La teneur en azote chez une même souche est stable d'un lot à l'autre de lyophilisat (tableau 3), mais par contre variable d'une souche à l'autre d'une même espèce. Pour N.fowleri nous avons trouvé une moyenne de 18,5 (en mg d'azote pour 100 mg de lyophilisat) et une variation de 15,2 à 25,2 suivant les souches. Des lyophilisats de N.gruberi obtenu après culture monoxénique et axénique, montrent une teneur en azote variable, allant de 11,7 à 14,5 pour cent. Des lyophilisats de trois espèces différentes d'Acanthamoeba ont montré peu de variation en teneur d'azote allant de 16,6 à 18,2%.

Tableau 3 : Teneur en azote d'extraits lyophilisés de Naegleria et d'Acanthamoeba.

Espèce	souche	Lyophilisat	mg % azote
<u>Naegleria</u>			
<u>N.fowleri</u>	ITMAP 359	2	16,2
	"	3	16,1
	"	5	16,6
<u>N. fowleri</u>	MEDVED Morgan	1	20,8
<u>N. fowleri</u>	VITEK	2	20
<u>N. fowleri</u>	HB-1	1	25,2
<u>N. fowleri</u>	MEDVED PAa	3	15,2
<u>N. gruberi</u>	C.C.A.P. 1518 †	5	11,1
<u>N. gruberi</u>	C.C.A.P. 1518 °	9	14,5
<u>N. jadini</u>	ITMAP 400	1	16,7
<u>Naegleria</u> sp.	MEDVED BG-6	2	17,6
<u>Acanthamoeba</u>			
<u>Acanthamoeba</u> sp.	Neff	1	16,6
<u>Acanthamoeba</u> sp.	ITMAP 1042	1	17
<u>A. rhyssodes</u>		1	18,2

\* en culture monoxénique

° en culture axénique

## 5. Analyse immunoélectrophorétique.

Les principes de l'analyse immunoélectrophorétique ont été développées par l'Ecole lilloise de Biguet et Capron (Biguet et al., 1965; Capron, 1970). Le protocole proposé pour les antigènes vermineux et fongiques procède par hyperimmunisation du lapin à l'aide d'extraits lyophilisés en présence d'adjuvants, par absorption assurant la spécificité des hyperimmunsérums et par immunoélectrophorèse. Il nous restait à en adapter les modalités à un matériel protozoologique.

### 5.1. Immunsérum.

Les immunsérums sont obtenus par immunisation expérimentale de lapins suivant la méthode préconisée par Biguet et al., (1965).

#### 5.1.1. Immunisation.

Des lapins de ferme de 3 kg sont immunisés par injection hebdomadaire, dans l'espace sous-claviculaire, de 2 mg d'antigène hydrosoluble dissout dans 0,5 ml d'eau physiologique, émulsionné dans un volume égal d'adjuvant de Freund complet (Difco). Avant la première injection de l'antigène, on prélève du sang pour contrôler l'absence d'anticorps naturels vis-à-vis l'antigène d'immunisation. L'immunisation, par injection hebdomadaire est menée aussi longtemps que s'observe une augmentation du nombre d'arcs de précipitation lors du contrôle bimensuel de sérums en immunoélectrophorèse. Ce procédé d'immunisation permet d'obtenir des sérums hyperimmuns (hyperimmunisation).

Une immunisation révélant la cinétique de l'apparition des anticorps est menée avec un antigène figuré. Cet antigène constitue le culot de l'ultracentrifugation préparative, lequel est injecté de la même façon que pour l'hyperimmunisation sans adjonction d'adjuvant de Freund. Cette immunisation est menée durant six semaines et les lapins sont saignés deux fois par semaines.

Nous avons au total immunisé 39 lapins.

### 5.1.2. Saignée.

Les saignées s'effectuent à la veine marginale de l'oreille à l'aide d'un dispositif de saignée sous vide. Après la sixième semaine d'hyperimmunisation la première saignée s'effectue, puis sont pratiquées tous les quinze jours, pendant que l'immunisation continue. Une saignée de contrôle est effectuée avant toute injection. Des volumes de 20 à 150 ml de sang sont obtenus. Le sérum est séparé après rétraction du caillot le jour de la saignée. L'immunsérum recueilli à chaque saignée est caractérisé par le numéro du lapin et par le numéro d'ordre de la saignée.

### 5.1.3. Contrôle, caractéristiques et conservation.

Dès l'obtention des immunsérums leur qualité et leur spécificité ont été examinées en double diffusion et en immunoelectrophorèse. Les anticorps précipitants dirigés contre les composants antigéniques originaires du milieu de culture ont été épuisés par absorption. Des saignées distinctes n'ont jamais été mélangées. Les immunsérums ont été conservés par congélation à  $-30^{\circ}\text{C}$  pendant les contrôles de qualité ensuite par lyophilisation en volume de 0,3 ml et maintien sous vide en ampoules scellées.

### 5.2. Absorption

Les anticorps non spécifiques présents dans un immunsérum ont été absorbés par des extraits antigéniques hétérologues, afin de déterminer les composants antigéniques spécifiques de l'organisme étudié. L'épuisement de ces anticorps est contrôlé par double diffusion en gel. Nous avons rencontrée une difficulté au cours de notre étude due à la présence d'antigènes apparentés présents chez l'organisme hétérologue en quantité beaucoup plus faibles que chez l'organisme homologue. L'absorption ne provoque alors qu'un épuisement apparent. Pour pouvoir affirmer la spécificité des résultats, il est nécessaire de poursuivre

l'absorption au delà de la dose nécessaire à l'épuisement, sans qu'une modification des arcs de précipitation en réaction homologue se révèle.

L'épuisement des immunsérums a été pratiqué :

- a) avant toute étude, par des extraits lyophilisés des milieux C.G.V. et sérum de veau, afin d'éliminer les réactions croisées dues aux antigènes du milieu de culture.
- b) lors de la comparaison des mosaïques antigéniques d'organismes distincts à l'aide de lyophilisats d'extraits hétérologues, afin d'établir la spécificité antigénique de l'organisme homologue.

L'absorption est menée par solubilisation des extraits antigéniques directement dans l'immunsérum. Préalablement, la dose d'absorption a été définie en micro-méthode par addition de quantités croissantes d'antigènes hétérologues (solution d'antigène à 1 mg dans 20 microlitres d'eau distillée), par incubation à 37°C pendant 2 heures puis à 4°C pendant la nuit et par centrifugation à 2.800 g pendant 10 minutes.

L'ensemble de l'épreuve d'absorption consiste dans :

- a) le contrôle en macro-immunodiffusion de l'existence de réactions croisées (fig. 12);
- b) l'épuisement progressif de l'immunsérum par addition de quantités croissantes d'antigène hétérologue et contrôle en micro-immunodiffusion vis-à-vis des antigènes hétérologues et homogènes (fig. 13). Ceci permet de déterminer la quantité d'antigène hétérologue nécessaire et suffisante pour assurer la disparition totale des réactions croisées.
- c) l'absorption de l'immunsérum répété une seconde fois à l'aide de la dose d'épuisement apparent et contrôle en micro-immunodiffusion ;
- d) contrôle d'épuisement complet en macro-immunodiffusion (fig. 14).
- e) l'analyse immunoélectrophorétique en caractérisant les composants antigéniques spécifiques (fig. 15).

Étapes de l'épreuve d'absorption croisée

Figure 12

Réactions croisées entre N.fowleri et N.gruberi, révélées à l'aide d'un hyperimmunsérum anti-N.fowleri.

Figure 13

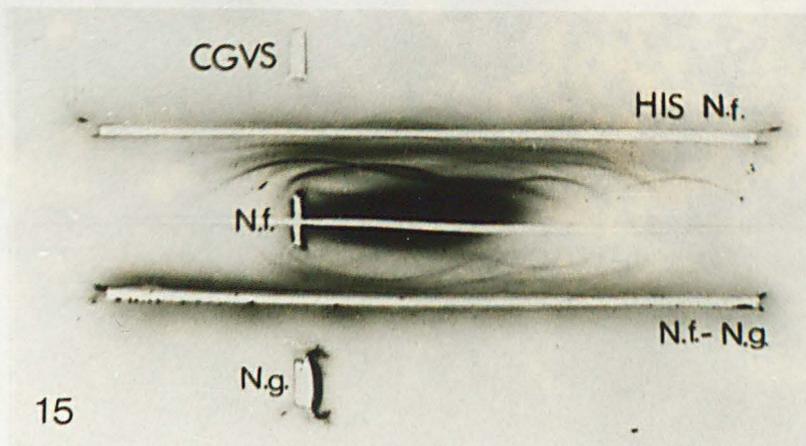
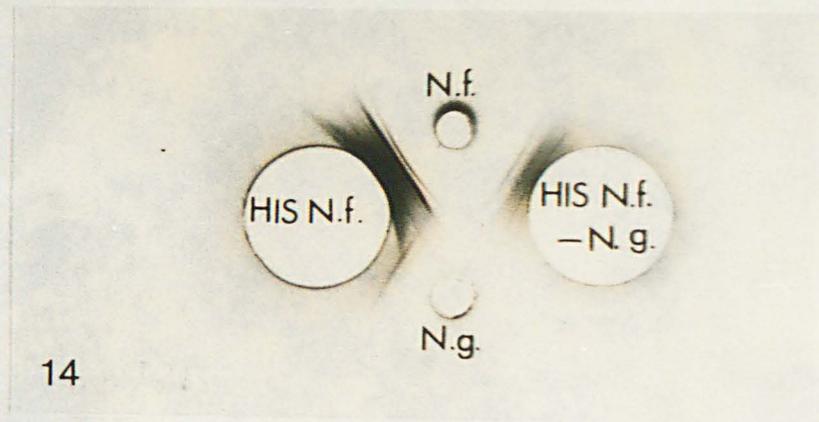
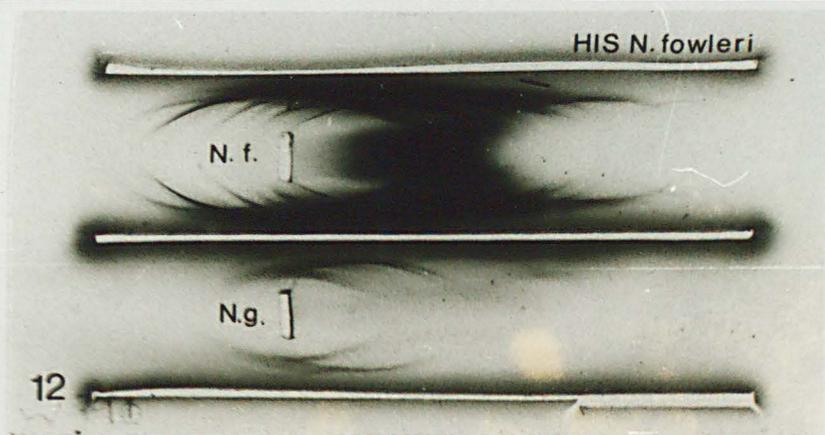
Absorption progressive de l'hyperimmunsérum anti-N.fowleri par un extrait de N.gruberi.

Figure 14

Contrôle d'épuisement en double diffusion des réactions croisées.

Figure 15

Caractérisation immunoélectrophorétique des spécificités antigéniques de N.fowleri.



### 5.3. Précipitation en gel.

Les réactions d'immunoprécipitation sont pratiquées selon les méthodes de Biguet et al. (1965).

#### 5.3.1. Substrat

Nous employons l'agarose (indubiose type A 37; Industrie Biologique Française, Gennevilliers) à 1 % en tampon barbital à pH 8.2. (16 g de diéthylbarbiturate de sodium, Merck; 22 ml HCl 1N, eau distillée à 1.000 ml; pH 8.2 : I 0,1). L'agarose est dissout dans le tampon barbital au bain-marie sans dépasser 90°C.

Les lames de verre destinées à supporter le gel sont de deux types principaux; microlames de 80 mm x 25 mm x 2 mm et macrolames de 120 mm x 50 mm x 2 mm. Elles ont été nettoyées dans un bain d'acide sulfochromique, rincées à l'eau distillée et conservées dans du méthanol-éther éthylique (volume 1 : 1).

Les lames sont recouvertes rapidement avec l'agarose à raison de 4 ml par microlame et de 12 ml par macrolame (environ 1 ml d'agarose par 5 cm<sup>2</sup> épaisseur couche est d'environ 3 mm). Laisser refroidir à température ambiante.

#### 5.3.2. Double diffusion.

La double diffusion suivant Ouchterlony (1948), modifiée par Abelev (1960) a comme principe, la diffusion de l'antigène et de l'antisérum, l'un vers l'autre à travers le gel d'agarose.

a) Macrométhode : 0,25 ml de sérum est déposé dans un puits de 12mm de diamètre et opposé à 2 mg d'antigène solubilisé dans 20 microlitres d'eau distillée et déposé dans un puits de 4 mm de diamètre distant de 7 mm à bord (fig. 16 b). La réaction se fait durant la nuit à température ambiante, puis pendant incubation à 4°C durant 48 heures.

b) Microméthode 25-30 microlitres d'immunsérum dans un puits de 4 mm de diamètre sont opposés à 3 microlitres d'une solution antigénique (1 mg antigène solubilisé dans 10 microlitres d'eau distillée), déposés dans un puits de 1 mm de diamètre distant du puits d'immunsérum de 2 mm bord à bord. La disposition des puits est représenté à l'échelle millimétrique (fig.16 a). Ce procédé a été utilisé pour la recherche des conditions d'épuisement par absorption progressive.

### 5.3.3. Immunoélectrophorèse.

Dans l'étape immunoélectrophorétique nous distinguons également une micro- et macrométhode. La microméthode est employée en raison d'économie d'antigène et sert principalement aux contrôles des saignées des lapins et des lots d'antigène. La macrométhode est employée en raison de commodité de lecture.

Les puits et gouttières sont découpés dans le gel; les puits sont évidés; les gouttières ne le seront qu'après la séparation électrophorétique. Les lames sont déposées dans une cuve en perspex (Pleuger, Wijnegem) munie d'électrodes linéaires en platine. Un couvercle à parois inclinées assure l'écoulement latéral de l'eau de condensation en cours d'électrophorèse. L'antigène lyophilisé est solubilisé à raison de 10 microlitres d'eau distillée par mg de lyophilisat. Les puits des microlames reçoivent 1 mg ceux du macrolames 5 mg. Le contact entre le gel et le tampon des compartiments à électrode est assuré par des ponts de papier Whatman n°1. L'électrophorèse est menée à température ambiante à 20 V pendant 2h30 sur microlames, à 24 V pendant 5 h sur macrolames. La différence de potentiel est mesurée aux extrémités de chaque lame.

La séparation électrophorétique terminée, les gouttières sont évidées et remplies d'immunsérum concentré préalablement 3x par lyophilisation et resolubilisé en eau distillé; dans le tiers du volume initial, à raison de 0,1 ml par gouttières de microlame et de 0,3 ml par gouttière de macrolame (fig.17).

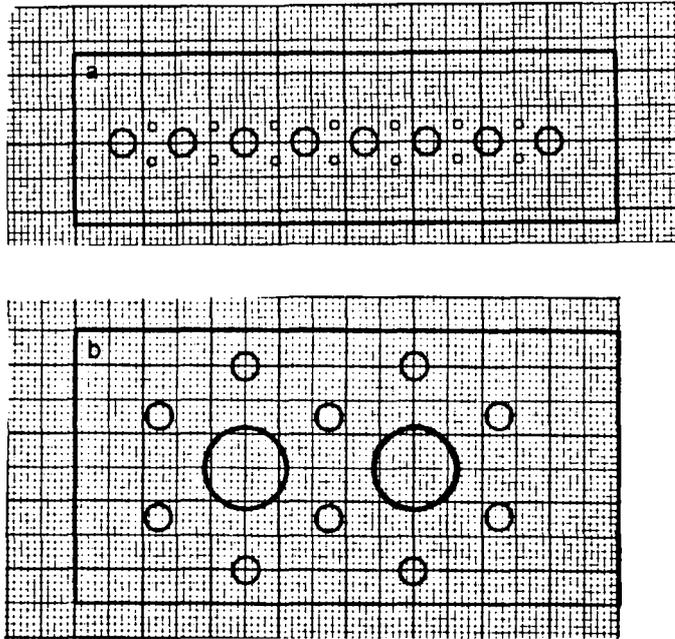


Figure 16.  
 Matrices millimétriques des réactions de précipitation en double diffusion : (a) microméthode; (b) macrométhode.

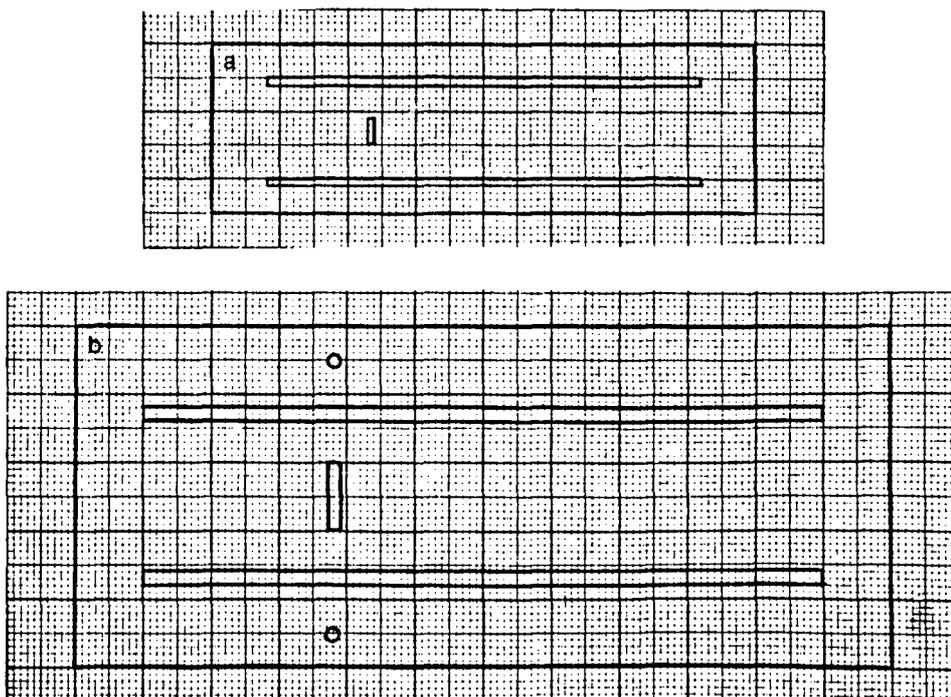


Figure 17.  
 Matrices millimétriques des réactions de précipitation en immunoelectrophorèse : (a) microméthode; (b) macrométhode.

Après incubation en chambre humide, avec de l'azide de sodium, pendant une nuit à température ambiante, les microlames sont laissées 24 heures à 4°C et les macrolames 48 heures. Cette incubation peut être prolongée si nécessaire mais ne doit pas dépasser 3 jours à 4°C.

#### 5.3.4. Lecture des lames.

Une lecture préliminaire des immunoélectrophorégrammes est effectuée en lumière indirecte après l'incubation des lames à température ambiante ainsi qu'avant lavage. Après coloration, la lecture définitive a lieu par examen à la coupe en lumière transmise à travers un verre dépoli et par décalque de l'image projetée au moyen d'un agrandisseur photographique.

Les arcs de précipitation sont numérotés, par convention, de l'extrémité cathodique vers l'extrémité anodique et de la gouttière vers le centre de la lame.

#### 5.3.5. Lavage, déminéralisation et coloration.

Après incubation des réactions d'immunoprécipitation, les lames sont placées pendant au moins trois heures, dans une solution de citrate trisodique à 5 % dans l'eau distillée afin de dissoudre d'éventuels complexes du type substance C-protéine C-réactive. Les substances de type C se rencontrent fréquemment dans les extraits cellulaires et déterminent de fausses réactions de précipitation (Biguet et al., 1965) avec la protéine C-réactive de certains sérums.

Ensuite les lames sont lavées en solution isotonique tamponnée (9 g de  $\text{CaCl}_2$ , 1 g de  $\text{NaN}_3$ , 900 ml d'eau distillée, 100 ml de tampon barbital pH 8,2 ; pH final ajusté à 7.5 - 8.0 à l'aide d'une solution de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  à 8,08 g/l) à température ambiante durant 24 à 48 heures dans un dispositif à courant continu, outillé d'un filtre à charbon activé.

Après lavage les lames sont nettoyées au pinceau avec soin puis recouvertes de papier Whatman n°1 pour la déminéralisation et le séchage à température ambiante.

Ensuite les lames sont colorées au Noir Amido B (425 ml d'une solution d'acide acétique pur à 60 ml/l, 425 ml d'une solution d'acétate de sodium à 13,61 g/l; 2 g de noir Amido 10 B Merck, eau distillée jusqu'à 1000 ml) durant 5 minutes pour les microlames et 10 minutes pour les macrolames. La différenciation est assurée dans l'acide acétique pur à 2 % dans l'eau pendant 10 minutes dans 3 bains successifs, puis les lames sont séchées sous ventilateur.

#### 6. Epreuve sérologique par l'immunofluorescence.

Le but de toute réaction sérologique est de mettre en évidence la fixation d'un anticorps sur l'antigène correspondant. En immunofluorescence ce résultat est obtenu en marquant les anticorps avec des substances fluorescentes appelées fluorochromes.

Le principe de la réaction d'immunofluorescence consiste donc à mettre en contact des anticorps marqués et un antigène figuré. Après incubation, lavage qui élimine le conjugué en excès, la préparation est examinée en lumière ultra-violette.

Si les anticorps sont spécifiques de l'antigène considéré, ils se fixent sur l'antigène en formant un complexe fluorescent grâce aux molécules du fluorochrome auxquelles ils sont couplés.

Au contraire, s'il n'y a pas de correspondance entre l'antigène et les anticorps marqués, ces derniers ne peuvent se fixer et sont éliminés lors du lavage.

Depuis le travail princeps de Coons (1941), diverses modifications importantes sont intervenues. Elles concernent en particulier les fluorochromes employés. Actuellement l'isothiocyanate de fluorescéine est le plus souvent employé en raison de la facilité de conjugaison aux anticorps, la stabilité du conjugué et l'intensité de sa fluorescence.

Parmi les techniques d'immunofluorescence les plus employées sont la méthode directe et la méthode indirecte.

#### 6.1. Préparation des antigènes.

##### 6.1.1. Antigènes de culture.

Ces antigènes sont préparés selon la méthode préconisée par Wéry-Paskoff (1971) pour E. histolytica.

Des cultures axéniques, âgées de cinq jours environ sont centrifugées pendant 5 minutes à 885 g. Pour les cultures d'amibes sur agar bactériens, les amibes sont prélevées au moment où la population présente principalement des formes végétatives. Le sédiment d'amibes est ensuite lavé 3 fois en eau casitone. Après les lavages les amibes sont fixées pendant 30 minutes dans une solution de tampon à pH 7.2. (NaCl 8,5 g; Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3,5 g; eau bidistillée 100 ml; ajuster le pH à 7.2. avec Na Cl 1N) contenant 2 % de formol de commerce. Après fixation, la suspension d'amibes est de nouveau lavée trois fois dans le tampon à pH 7.2. Le culot est ensuite dilué de façon à obtenir environ 25 amibes par champs microscopique (obj. 40x oc.10x). Les gouttes d'antigène sont ensuite déposées sur des lames pour immunofluorescence (B.G. Mérieux) à 10 réactions par lame. Les antigènes sont ensuite séchés à la température ambiante, puis emballés en papier doux (Kleenex) et conservés en présence de silicagel bleu (Merck) dans des boîtes hermétiquement fermées au congélateur à -30°C. Au moment de l'emploi, les lames sont reportées à température ambiante dans un dessiccateur contenant du silicagel.

##### 6.1.2. Antigènes de biopsies.

Les biopsies doivent être nécessairement fixées au formol pour assurer les meilleurs résultats. La préparation des coupes histologiques est assurée par les techniques classiques. Il est souhaitable d'employer des coupes très minces (2 à 3 microns) lesquelles doivent être déparaffinées avant la réaction d'immunofluorescence.

## 6.2. Antisérums.

Deux méthodes d'obtention d'antisérums sont employées :

- a) une méthode préconisée par Vaitukaitis et al. (1971) modifiée par Capron. Cette méthode consiste en une seule série d'injections intradermiques à l'aide d'1 mg d'antigène solubilisé dans 1 ml d'eau physiologique et émulsionné à 3 ml d'adjuvants de Freund incomplet, préalablement ajoutée de M. butyricum (25 mg pour 10 ml de Freund incomplet). Avec ce mélange on procède à 40 injections intradermiques sur les flancs du lapins préalablement rasé. Simultanément, une injection intramusculaire avec 1 ml de vaccin anticoquelucheux est effectuée. Les lapins sont saignés après 8, 15, 21 et 28 jours.

Les différents saignées sont contrôlées en réaction homologue, ensuite en réaction hétérologue vis-à-vis d'organismes communs et les antisérums seront sélectionnés suivant leur spécificité.

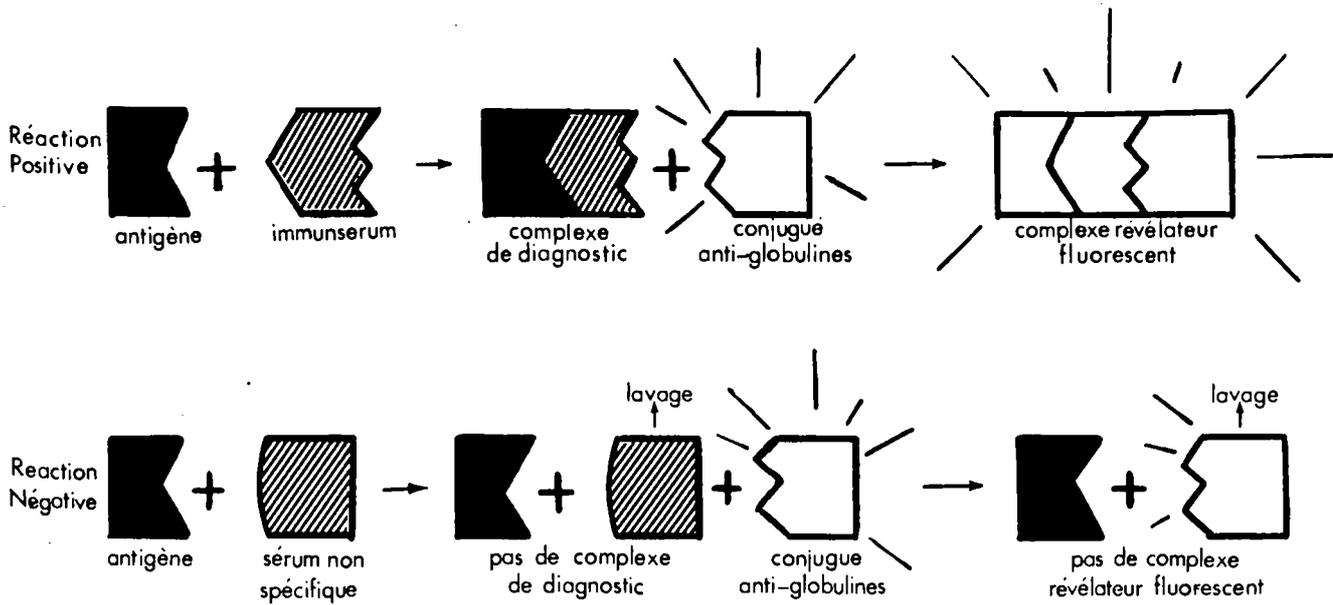
- b) une méthode préconisée par Van Meirvenne et al (1974), laquelle consiste en une seule injection intraveineuse d'amibes vivantes. Une culture d'amibes est lavée à plusieurs reprises et concentrée de façon d'obtenir  $1.10^6$  amibes dans 0,5 ml d'eau casitone glucosée. Cette suspension est injectée dans la veine marginale de l'oreille du lapin. Les saignées sont effectuées au 7, 14 et 21 jours après l'immunisation. Ces saignées sont ensuite contrôlées par la réaction d'immunofluorescence et sélectionnées suivant leur spécificités.

## 6.3. Immunofluorescence indirecte.

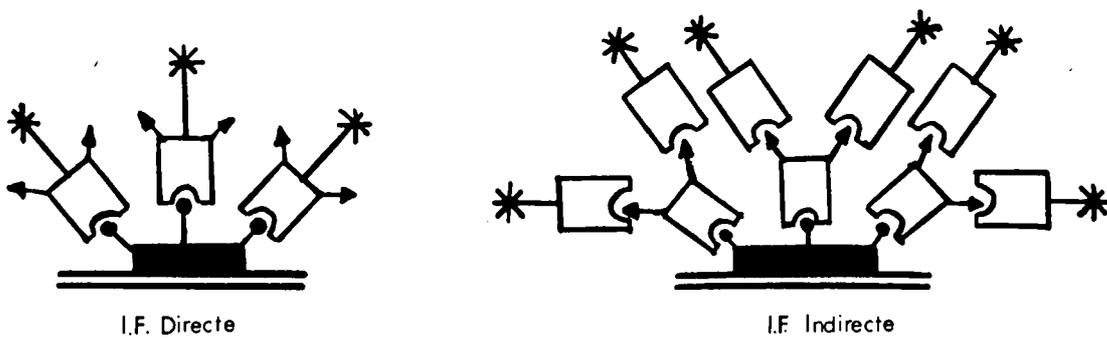
Dans la méthode d'immunofluorescence indirecte (Weller et Coons, 1954), on met en contact l'antigène avec les dilutions du sérum à étudier. Si ce dernier contient des anticorps spécifiques, ceux-ci se fixent sur les sites antigéniques. Dans le deuxième temps de la réaction, ces anticorps sont mis en évidence grâce à un conjugué fluorescent anti-immunoglobulines (fig. 18). Cette technique bénéficie d'une plus grande sensibilité que la méthode directe.

Figure 18.

Principe de la méthode indirecte d'Immuno-Fluorescence  
(d'après P. Ambroise-Thomas).



Gain de sensibilité en Immuno-Fluorescence indirecte  
(d'après P. Dupouey)



Nous avons employé la méthode préconisée par Ambroise-Thomas (1969) pour l'étude de l'amibiase à E. histolytica et la technique de Stamm (1974) pour les coupes histologiques.

### 6.3.1. Méthode pour antigènes de culture.

Les porte-objets contenant les antigènes sont sortis du congélateur et portés à la température du laboratoire dans un dessiccateur contenant du silicagel. Les sérums à étudier dont dilués <sup>suyvant une</sup> progression arithmétique dans le tampon à pH 7.2. à partir de la dilution de 1/2. Sur chaque empreinte d'antigène une goutte de chaque dilution du sérum est placée et incubée pendant 30 minutes à température ambiante dans une chambre humide. Les lames sont ensuite lavées dans le tampon à pH 7.2. à trois reprises. On recouvre ensuite chaque empreinte d'une goutte de conjugué fluorescent dilué à raison de 1 : 100 dans une solution de Bleu d'Evans à 1 : 200 (Bleu Evans 1 g; tampon pH 7.2 : 200 ml). Après 30 minutes de contact les lames sont de nouveau lavées à trois reprises dans le tampon, puis après avoir enlevé l'excès de tampon elles sont pourvues d'un couvre objet monté sur une goutte de glycérine tamponnée (9 parties glycérine, 1 partie tampon pH 7.2; ajuster pH 7.2. à 7.4.).

### 6.3.2. Méthode pour coupes histologiques.

Cette méthode est la même <sup>telle</sup> que décrite antérieurement, seulement le conjugué fluorescent est dilué à 1/50 et mis à incuber pendant 30 minutes, tandis que la courte coloration par le bleu d'Evans est effectuée pendant 10 à 15 minutes à la dilution de 1 : 10.000.

### 6.3.3. Dispositif de lecture.

Nous avons réalisé nos examens à l'aide d'un microscope Leitz "Dialux" équipé pour la fluorescence d'un boîtier d'éclairage 250 pourvu d'une lampe à vapeur de mercure HBO-200 W. Nous utilisons un condensateur à fond clair, à sec et des objectifs achromatiques 20x, 40x et des oculaires 6x.

Nous avons choisi des filtres d'excitation dans le bleu conditionné par le spectre d'absorption du fluorochrome utilisé. Nous utilisons des filtres 4 mm BG 12 et un 4 mm BG 38. Le filtre d'arrêt est un "Blau Abs" (K 51I).

### 6.3.4. Interprétation des résultats.

Pour apprécier objectivement l'intensité de la fluorescence (diaphragme du condensateur fermé) on interprète la brillance de la manière suivante :

++++	= fluorescence brillante sur toute la surface des amibes
+++	= fluorescence brillante à la périphérie, pôle au milieu
++	= étroite bande de fluorescence à la périphérie
+	= peu de fluorescence à la périphérie
0	= absence de fluorescence

Les dilutions d'antisérums employées, au taux de spécificité en réaction homologue, vis-à-vis d'un antigène hétérologue sont interprétés comme étant significatifs à ++++ et +++.

## 7. Morphologie et biologie.

### 7.1. Observations en microscopie photonique.

Toutes les observations morphologiques ont été effectuées sur le vivant, à l'aide d'un microscope "Leitz" Ortholux II, équipé d'un contraste de phase.

Les mensurations de kystes portant sur une moyenne de 100 individus et de formes végétatives portant sur une moyenne de 25 individus ont été réalisées sur le vivant (objectif 100 X, micro mètre oculaire 6X).

Les tests de flagellation sont pratiqués par incubation en eau distillée à 28°C pendant au moins 2 heures.

La division nucléaire a été étudiée à l'aide de la technique de Singh et Das décrite par Das et al. (1974). Nous reprenons ici "in extenso" cette méthode.

#### A. souches

Des cultures homogènes d'amibes du genre Naegleria sont obtenus à partir d'un seul kyste. La lignée est ensuite subcultivée tous les 24 à 48 heures sur agar non nutritif recouvert de jeunes cultures d'Aerobacter aerogenes dans le but des études cytologiques.

#### B. méthode

- Un mince film d'agar non nutritif (Difco) à 1 % est appliqué, à l'aide d'un couvre objet, sur des porte-objets préalablement nettoyés et stérilisés.
- Une jeune culture d'Aerobacter aerogenes, cultivé sur B.H.I. (Brain Heart infusion, Difco) gélosé, est délicatement déposée à l'aide d'une oese sur le mince film d'agar.
- Les amibes sont ensuiteensemencées sur le film d'agar recouvert de bactéries et cultivées pendant 24 à 48 heures.
- Les amibes en phase active de multiplication sont fixées à l'aide du fixateur de Carnoy (60 parties d'alcool éthylique absolu; 30 parties de chloroforme et 10 parties d'acide acétique glacial), pendant 35 à 40 minutes.
- Après fixation, les préparations sont transférées dans l'éthanol à 90 % pendant 24 heures.
- Les préparations sont ensuite placées successivement dans l'éthanol à 70 %, 50 % et 30 %, puis dans l'eau distillée.
- Le film d'agar est enlevé des préparations en agitant doucement la lame porte-objet dans l'eau distillée. Un grand nombre de trophozoites collés à la lame, peut être observé à l'aide d'un microscope inversé.

- Les préparations sont ensuite placées dans l'alun ferrique pendant 3 à 4 heures, puis dans l'eau distillée.
- Ensuite les préparations ont été placées dans une solution aqueuse d'hématoxyline à 0,5 % pendant 24 heures ou plus.
- Elles sont différenciées dans l'alun ferrique à 1 % sous contrôle microscopique. Après différenciation les préparations sont lavées .
- La déshydratation est exécutée selon la méthode classique à l'éthanol et le xylol en exposant les préparations pendant 10 minutes a chaque degré.

## 7.2. Procédé d'observation en microscopie électronique.

### 7.2.1. Microscopie électronique conventionnelle.

Le matériel est fixé dans une solution de tétroxyde d'osmium à 1 % en milieu tamponné à pH 7,2. Nous avons utilisé différents types de milieu tamponné. Le milieu commercialisé par Mérieux sous le nom de tampon Acétate de Véronal-Magnésium-Calcium à pH 7,2 est le plus facile à utiliser de plus il nous permet d'obtenir d'excellents résultats. Ce tampon est utilisé additionné de 4 % de saccharose.

Après déshydratation à l'éthanol pur puis à l'oxyde de propylène le matériel est enfin enrobé dans l'Epon R 812, selon Luft, (1961).

Les coupes ont été faites à l'ultratome LKB III, puis contrastées à l'acétate d'uranyl et au citrate de plomb (Millonig, 1961; Reynolds, 1963), enfin examinées au microscope électronique Philips EM 300.

### 7.2.2. Microscopie électronique à balayage.

Le matériel à examiner est fixé selon Parducz (1964) dans une solution de tétroxyde d'osmium et de chlorure mercurique. Il est ensuite déshydraté par passage successifs dans des bains d'alcool, dans des bains d'acétate d'isoamyle puis dans du CO<sub>2</sub> liquide. Cette dernière opération se fait dans un appareil à point critique (Polaron). L'enceinte de cet appareil est brusquement

chauffée, le CO<sub>2</sub> liquide passe en phase gazeuse dans que les membranes cellulaires s'effondrent. Enfin, les cellules déshydratées sont recouvertes, par évaporation, d'une fine couche d'or. Le matériel est alors examiné à l'aide d'un microscope électronique JEOL SEM 50.

### 7.2.3. Cryodécapage et microscopie électronique.

Le matériel est préalablement passé dans un bain de glycérine ou de diméthylsulfoxyde, est fixé par immersion dans du fréon puis dans de l'azote liquide. Placé sur un support, ce matériel est ensuite introduit dans un Freezing Etching Apparatus F 301 de Balzers, toujours à la température de l'azote liquide.

Grâce à un dispositif spécial le fragment supérieur du matériel à examiner est classé, puis grâce à un autre dispositif l'eau du cytoplasme située au niveau de la tranche de section est sublimée de façon à produire une légère dénivellation, enfin le tout est recouvert d'or par évaporation.

La mince couche d'or de recouvrement est ensuite plongée dans un bain d'acide sulfurique, de cette façon toute trace de matériel organique disparaît. Cette mince couche est ensuite déposée sur une grille et examinée au microscope électronique Philips E M 300.

### 7.3. Etude biologique.

Les méthodes d'isolement, de clonage et de culture sont décrites précédemment dans ce chapitre (2.2.3; 2.2.4).

Des souris NMRI de 10 à 15 grammes ont été employées pour l'instillation par voie intranasale et l'inoculation par voie intracérébrale. Les techniques employées sont celles décrites par Lépine et al. (1964).

#### A. Instillation intranasale :

Anesthésie : l'anesthésie à l'éther doit être profonde pour éviter le réflexe d'éternuement chez la souris lors de l'instillation.

Nous préférons employer comme anaesthésique le Nozinan (Levomepromazine, Specia), à raison de 15 mg/Kg par injection intrapéritonéale.

De même qu'Anderson et Jamieson (communication personnelle) nous avons pu constater que les amibes du genre Naegleria sont sensibles aux vapeurs d'éther; cette sensibilité à l'éther donne des résultats inconstants et non reproductibles.

Instillation : Prendre la souris entre le pouce et l'index par la peau de la nuque et la tenir verticalement. On place l'aiguille à quelques millimètres au-dessus des narines de la souris et on laisse tomber la quantité de suspension à instiller. En tenant la souris à la verticale on évite un éventuel rejet de la suspension. Cette manipulation est d'ailleurs effectuée dans une enceinte en perspex.

B. Inoculation intra-cérébrale.

Pour effectuer cette manipulation nous employons une seringue de 1 ml graduée au 100<sup>ème</sup> avec une aiguille intradermique.

La souris est immobilisée sur un grillage servant d'appareil à contention.

Ensuite l'aiguille est enfoncée de 2 à 3 mm de profondeur à environ 5 mm au-dessus de l'oeil. Ne pas injecter plus de 0,03 ml; retirer l'aiguille d'un coup sec.

Le geste consistant à fixer le piston de la seringue avec l'index lors de la perforation du crâne et du retrait de l'aiguille est important car il évite toute erreur sur la quantité injectée.

CHAPITRE 3

ANALYSE IMMUNOELECTROPHORETIQUE DU GENRE NAEGLERIA

"Ce sont les espèces les plus florissantes ou dominantes de chaque genre qui présentent la plus forte moyenne de variétés, lesquelles (...) tendent à se convertir en espèces nouvelles et distinctes".

Charles Darwin.

La comparaison des structures antigéniques d'un groupe donné du règne animal permet de montrer l'apport indiscutable des méthodes immunoélectrophorétiques pour toute étude zoologique, taxonomique et biologique (Capron et al., 1972).

Il ne faut surtout pas perdre de vue, que les composants révélés par l'immunoélectrophorèse, proviennent de l'organisme entier et que chacun de ces composants représente une famille immunologiquement distincte de protéines. Donc, la différence immunostructurelle observée entre deux espèces peut être considérée comme l'expression d'une profonde différence génétique.

Le genre Naegleria représente une unité dont l'homogénéité morphologique est très marquée. Actuellement, trois espèces ont été décrites, N. gruberi (Schardinger, 1899), N. fowleri (Carter, 1970) et récemment nous avons décrit une nouvelle espèce N. jadini (Willaert et Le Ray, 1973). D'autres espèces décrites ont été mises en synonymie avec N. gruberi (Fulton, 1970) et N. fowleri (Griffin, 1972; Willaert et al., 1972; Lastovica, 1974). A ces trois espèces du genre Naegleria viendront sans doute se joindre d'autres espèces. L'apport de l'étude comparée des structures antigéniques par l'immunoélectrophorèse est appelée à y jouer un grand rôle.

Nos recherches à propos de ces amibes ont été entreprises à la suite de cas de méningo-encéphalite amibienne primitive survenus en Belgique (Jadin et al., 1971; Hermanne et al., 1974 et Vandepitte et al., 1973) et à la suite de leur dispersion considérable de ces amibes dans notre environnement (Jadin et Willaert, 1972).

Après l'isolement d'une série de souches de Naegleria chez l'homme et dans son environnement, nous avons entrepris leur caractérisation antigénique en vue d'établir leur position taxonomique, afin d'éliminer la confusion due à l'apparition de synonymes ainsi que pour vérifier l'éventualité d'une adaptation à la vie parasitaire de ces amibes, dites "libres".

## 1. Etude préliminaire.

### 1.1. Etude antigénique du milieu de culture.

Les structures antigéniques d'amibes du genre Naegleria ont été analysées au stade en culture axénique présentant en majorité des formes végétatives. Des formes flagellées sont occasionnellement présentes, mais un stade kystique n'a

pas été observé dans une jeune culture axénique.

Dans le but de contrôler l'analyse des antigènes amibiens, l'antigénicité du milieu de culture "C.G.V.S." est contrôlé à l'aide d'hyperimmunsérums anti-milieu de culture et antisérum de veau et antisérum de veau foetal. La réponse antigénique vis-à-vis du milieu de culture, des lapins immunisés avec un antigène amibien, est contrôlée à l'aide d'antigènes "milieu de culture" préparés par dialyse et lyophilisation. Par la même occasion, les conditions optimales de lavage des corps cellulaires lors de leur récolte ont pu être précisées.

L'analyse immunoélectrophorétique des différents constituants du milieu de culture C.G.V.S. a révélé que seul le sérum de veau foetal est responsable de la présence d'anticorps contaminants chez le lapin lors de l'hyperimmunisation avec les antigènes amibiens.

Un hyperimmunsérum préparé contre le sérum de veau et contre le sérum de veau foetal, permet d'observer en réaction homologe, par l'analyse immunoélectrophorétique, 23 composants antigéniques.

L'analyse immunoélectrophorétique des amibes cultivées en milieu C.G.V.S. menée à l'aide d'hyperimmunsérums anti-sérum de veau et anti-sérum de veau foetal, révèle 4 à 5 composants antigéniques (fig.25). Les hyperimmunsérums anti-amibes opposés au C.G.V.S. ou au sérum de veau révèlent de 1 à 3 arcs de précipitation, parmi lesquels les arcs localisés dans la zone des immunoglobulines et de l'albumine sérique se retrouvent constamment.

Etant donné que la structure antigénique du sérum de veau est identique à celle du milieu de culture, il est préférable d'utiliser l'antigène sérum de veau (ou sérum de veau foetal) pour les absorptions des hyperimmunsérums anti-amibiens afin de ne conserver que les composants amibiens.

Le milieu C.G.V., utilisé pour la culture des Acanthamoeba et de Monas, ainsi que le milieu de culture d'Euglena gracilis opposés aux hyperimmunsérums anti-amibiens ne déterminent aucun arc de précipitation.

Par contre, le milieu agar + Aerobacter aerogenes tués opposé aux hyperimmunsérums anti-amibiens révèle de 1 à 4 arcs de précipitation, lesquels correspondent aux anticorps dirigés contre l'A. aerogenes (fig.19). Ce milieu de culture est utilisé principalement pour l'obtention des extraits antigéniques de V. avara, H. vermiformis et T. rostratus.

Figure 19.

Anticorps précipitants spontanés révélés par des hyperimmunsérums anti-N.fowleri et anti-A.castellanii par un extrait antigénique d'Aerobacter aerogenes.

Figure 20

Contrôle des conditions de lavage. Constituants antigéniques du milieu de culture C:G.V.S. présents après récolte des organismes au cours des quatre lavages (L 1 à L 4).

Figure 21

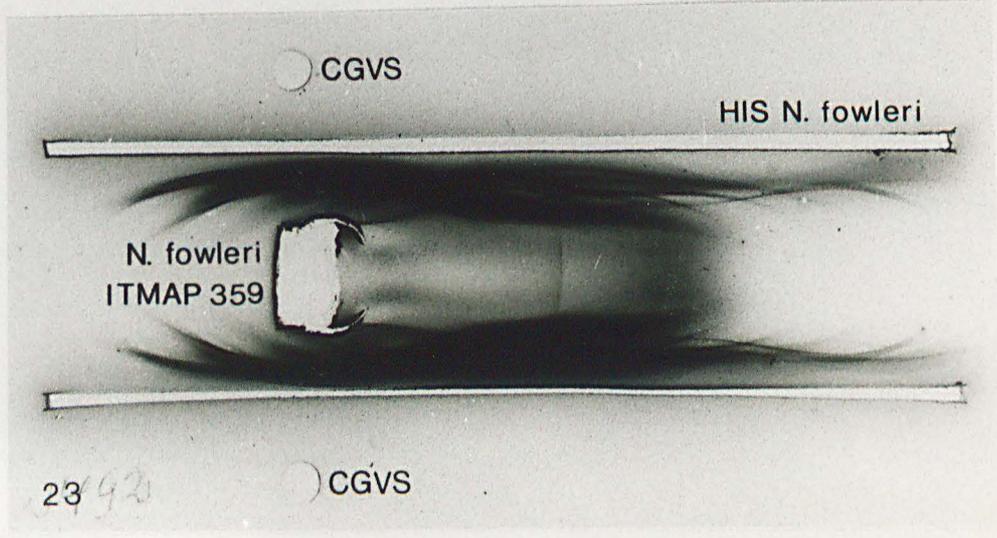
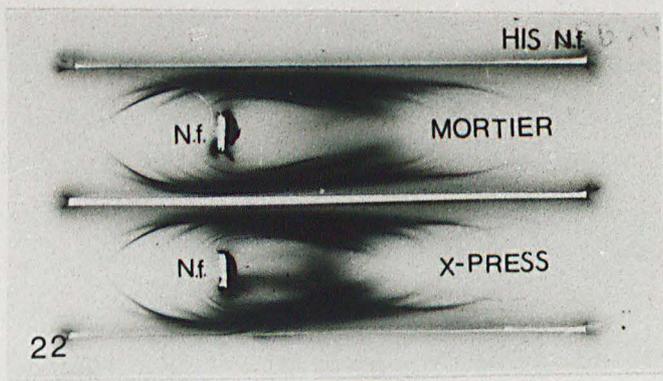
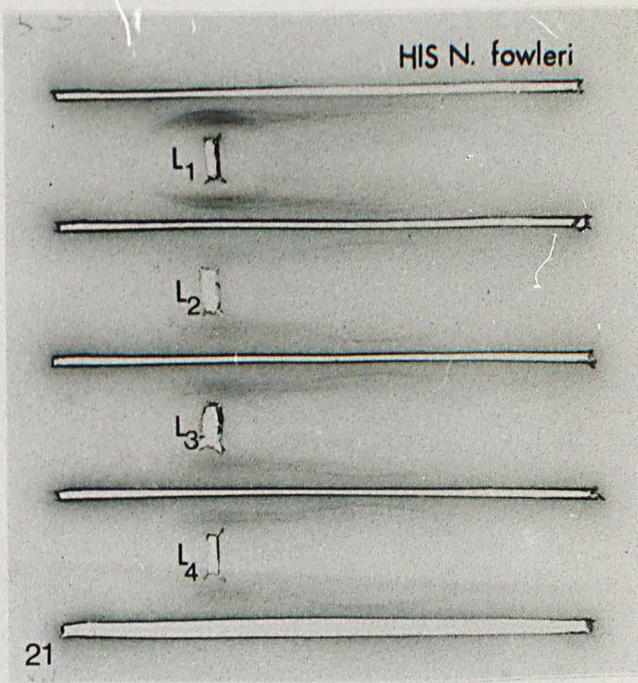
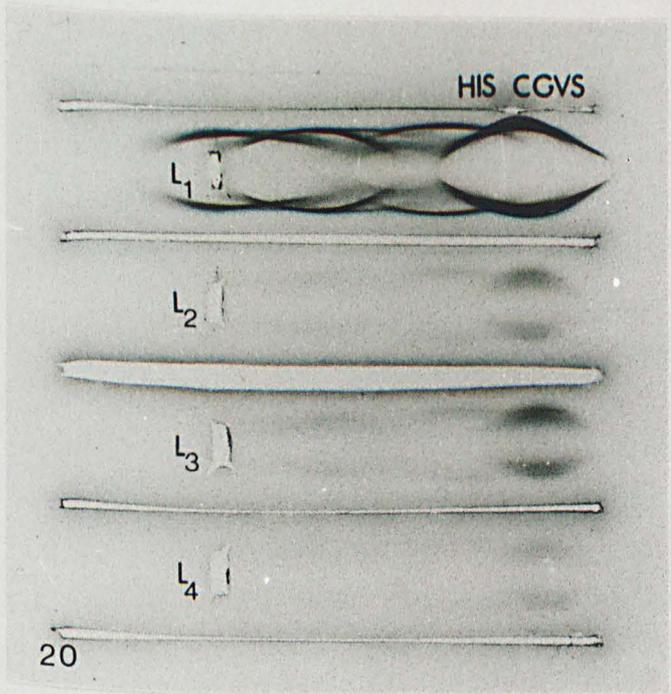
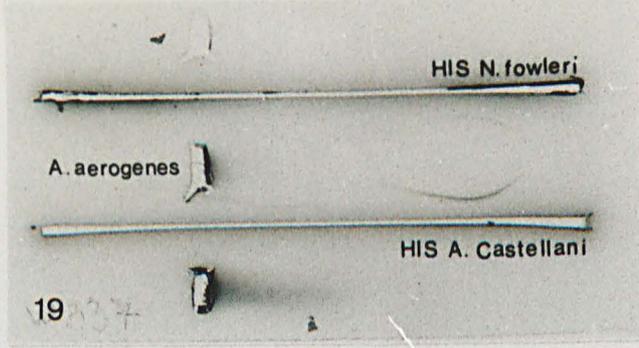
Constituants antigéniques de N.fowleri libérés au cours des lavages des organismes après la récolte.

Figure 22

Contrôle de l'extraction des constituants antigéniques cellulaires de N.fowleri. Comparaison immunoélectrophorétique des extractions obtenues par le mortier-glace et par "l'X-Press".

Figure 23

Mosaïque immunoélectrophorétique de N.fowleri ITMAP/359. Vingt - sept composants sont objectivés sur l'immunoélectrophorégramme.



Tous les hyperimmunsérums anti-amibiens ont été absorbés préalablement par un antigène A. aerogenes avant de déterminer les parentés entre les espèces d'amibes et les antigènes précités.

## 1.2. Contrôle de la pureté antigénique des antigènes amibiens.

La présence d'antigènes sériques dans les extraits antigéniques amibiens a été mise en évidence et dépend des conditions de lavage. En effet, l'hyperimmunsérum anti-sérum de veau a permis de contrôler immunologiquement les eaux de lavages successifs des organismes récoltés.

Les diverses eaux de lavage, obtenues au cours de la récolte des amibes, sont concentrées 100 fois par dialyse en tubes Nojax (Calibre 12, Sophic, Levallois) contre le P.V.P. (polyvinylpyrrolidone, SPECIA, Paris). Ces différentes eaux de lavage sont testées en immunoélectrophorèse contre un hyperimmunsérum anti-sérum de veau. Les immunoélectrophorégrammes des eaux de lavage n°1, 2 et 3 révèlent respectivement 13, 5 et 5 fractions antigéniques. L'eau de lavage n°4 révèle qu'une trace de fraction antigénique dans la zone des albumines (fig.20).

Cette analyse a permis de déterminer les conditions minimales assurant la disparition dans les eaux de lavage, des composants antigéniques du milieu de culture.

En conséquence, les immunsérums anti-amibiens ont été systématiquement absorbés par le sérum de veau (ou sérum de veau foetal) à raison de 5 à 15 mg de lyophilisat par ml d'immunsérum, suivant le protocole d'absorption croisée.

Les antigènes "eaux de lavage" opposés à un hyperimmunsérum anti-amibien homologue ont permis de contrôler la perte du matériel antigénique pendant les lavages. Ces immunoélectrophorégrammes des eaux de lavages n°s 1, 2, 3 et 4 révèlent respectivement 9,5, 4 et 4 fractions antigéniques d'origine amibienne (fig. 21).

L'analyse immunoélectrophorétique permet ainsi de réaliser la cinétique de la disparition des protéines du milieu de culture et le contrôle de la lyse des amibes au cours des lavages successifs pendant la récolte de l'antigène corps cellulaire. Elle semble être une méthode de choix pour le contrôle de la purification et la standardisation des antigènes.

### 1.3. Comparaison immunologique des méthodes d'extraction d'antigènes.

La mise au point du nombre de broyages au pilon, nécessaire et suffisante pour obtenir une extraction optimale a été effectué par Le Ray (1975) à propos des flagellés. Après trois pilonnages, peu de cellules à contour intact subsistent dans la suspension et l'analyse immunoélectrophorétique ne révèle pas d'augmentation de l'intensité des arcs de précipitation. Au cinquième broyage, le cassage cellulaire paraît terminé. Un second cycle de cinq broyages ne solubilise que peu de matériel antigénique. En conséquence, le nombre de cinq broyages a été retenu.

Nous avons ensuite comparé l'extraction par broyage au pilon à l'extraction à l'aide de l'"X-Press".

Quatre compressions ont donné les meilleurs résultats selon les critères morphologiques, ultrastructurels et immunologiques. Ce mode de broyage, d'exécution simple et rapide a fourni des résultats parfaitement reproductibles et comparables en immunoélectrophorèse mais non supérieurs (fig.22) aux résultats obtenus en mortier, à propos des amibes libres. Par contre le rendement du lyophilisat obtenu après broyage par X-Press s'est montré en général inférieur à celui obtenu par broyage au mortier (Tableau 4). Quatre compressions à l'X-Press procurent un rendement légèrement supérieur à trois compressions tandis que la comparaison immunoélectrophorétique ne révèle aucune différence significative.

### 2. Structure antigénique de N. fowleri

Au départ de nos recherches nous avons adopté l'appellation N.fowleri (Carter, 1970) en faveur de N. aerobia (Singh et Das, 1970) et N. invades (Chang, 1971), en raison de sa priorité en date de publication suivant les règles du code international de la nomenclature zoologique.

Les structures antigéniques de Naegleria fowleri ont été analysées à l'aide des formes végétatives en culture in vitro. Les structures antigéniques ont été établies pour référence aux souches ITMAP 359, IMVS Morgan et HB-1, pathogènes pour l'homme. Elles ont été comparées et l'identité de leurs composants a été déterminée par l'épreuve d'absorption croisée.

Tableau 4 : Rendement des lyophilisats suivant le mode et le nombre d'extractions.

Espèce	Nombre lots	Nombre broyages		Moyenne Poids sec (% poids humide)
		Mortier	X-Press	
<u>N. gruberi</u> 1518	2	-	3	2,3
"	2	-	4	4,05
<u>N. fowleri</u> IMVS Morgan	1	5	-	5,7
"	1	-	3	2,8
<u>N.fowleri</u> IMVS PA 90	1	5	-	4,1
"	1	-	3	3,6
<u>N.fowleri</u> IMVS PA a	1	5	-	4
"	1	-	3	3,95
"	1	-	4	5,3
<u>Naegleria</u> sp.IMVS A 2	2	-	3	2,3
"	2	-	4	4,05
<u>A.culbertsoni</u> A-1	2	7	-	3,2
"	1	-	3	1,7
<u>A. rhyodes</u>	1	5	-	5,4
"	1	-	3	4,1
<u>H. vermiformis</u>	1	-	3	0,94
"	1	-	4	1

L'analyse immunoélectrophorétique a permis de définir successivement :

- a) la structure immunoélectrophorétique de N.fowleri;
- b) la stabilité de cette structure au cours du maintien des souches in vitro;
- c) la constance de cette structure chez des souches isolées à partir de l'homme et de distribution géographique distincte;
- d) la constance de cette structure chez des souches isolées chez l'homme et celles isolées dans l'environnement;
- e) la stabilité de la structure immunoélectrophorétique en culture in vitro à différentes températures.

L'étude des structures antigéniques de N.fowleri a été réalisée en se basant sur les réponses antigéniques de 12 lapins et à l'aide de 23 lots d'extraits antigéniques.

#### 2.1. Structure antigénique de la souche ITMAP 359.

L'analyse immunoélectrophorétique a été menée à l'aide de huit immun-sérums homologues distincts et cinq lots d'extraits antigéniques.

##### 2.1.1. Hyperimmunisation.

Six lapins ont été immunisés de façon à obtenir des hyperimmunsérums, titrant un maximum en anticorps, permettant par la suite de révéler les parentés antigéniques existantes entre les diverses souches et les différentes espèces. Parmi ces hyperimmunsérums, deux ont été retenus, caractérisés par leur pouvoir de révélation élevé (fig.27). Celles-ci ont servi de référence pendant l'ensemble de cette étude.

L'analyse immunoélectrophorétique d'un extrait hydrosoluble de N.fowleri souche ITMAP 359 par les hyperimmunsérums homologues 41S<sub>7</sub>, 41S<sub>9</sub> et 65S<sub>9</sub> permet d'objectiver au moins 27 composants antigéniques d'origine ambiante (fig. 23). Ceux-ci sont schématisés sur la fig.24.

L'absorption préalable des hyperimmunsérums à l'aide du sérum de veau et l'incubation des immunoélectrophorégrammes dans une solution de citrate trisodique permettent d'affirmer la nature spécifiquement ambiante de la structure antigénique décrite.

Le nombre important de composants antigéniques observé dans les ex-

Figure 24

Diagramme des composants immunoélectrophorétiques de N.fowleri.

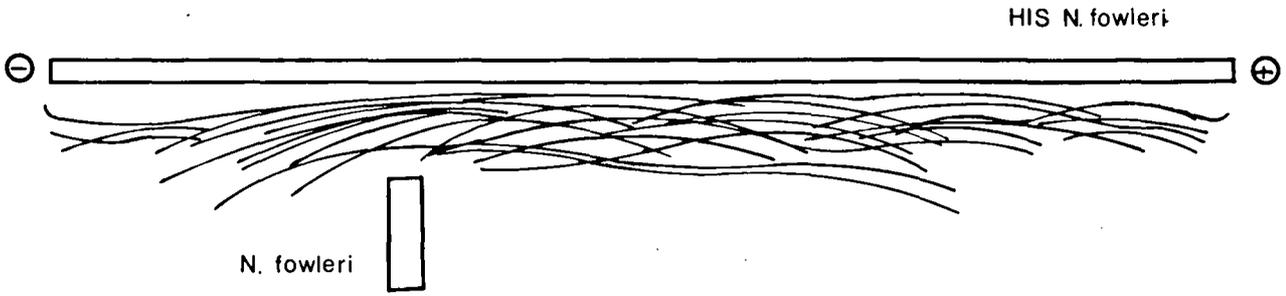


Figure 25.

Diagramme des composants partagés par N.fowleri et le milieu de culture.

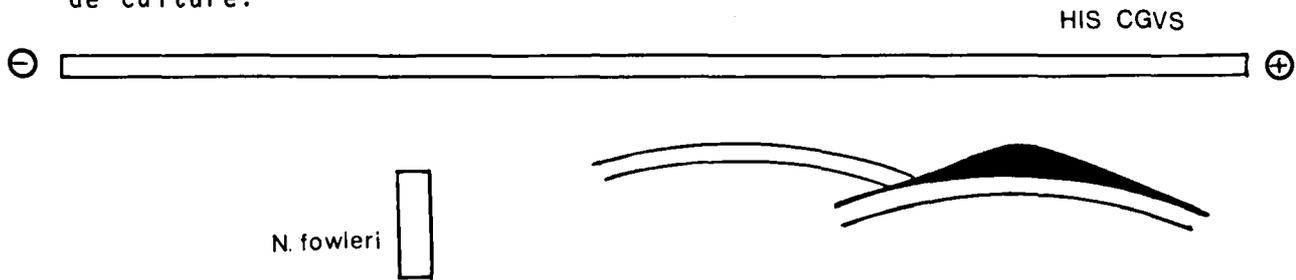


Figure 26.

Cinétique de l'apparition des anticorps précipitants induits par l'immunisation à l'aide de N.fowleri.

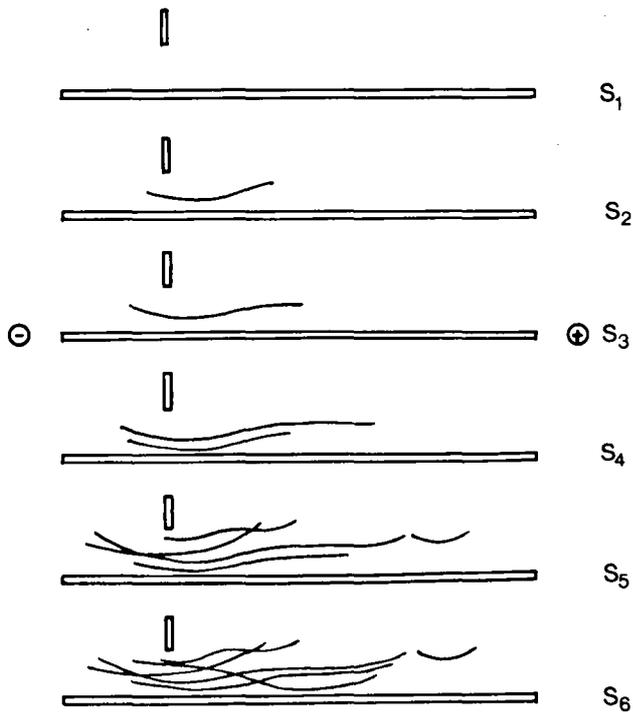
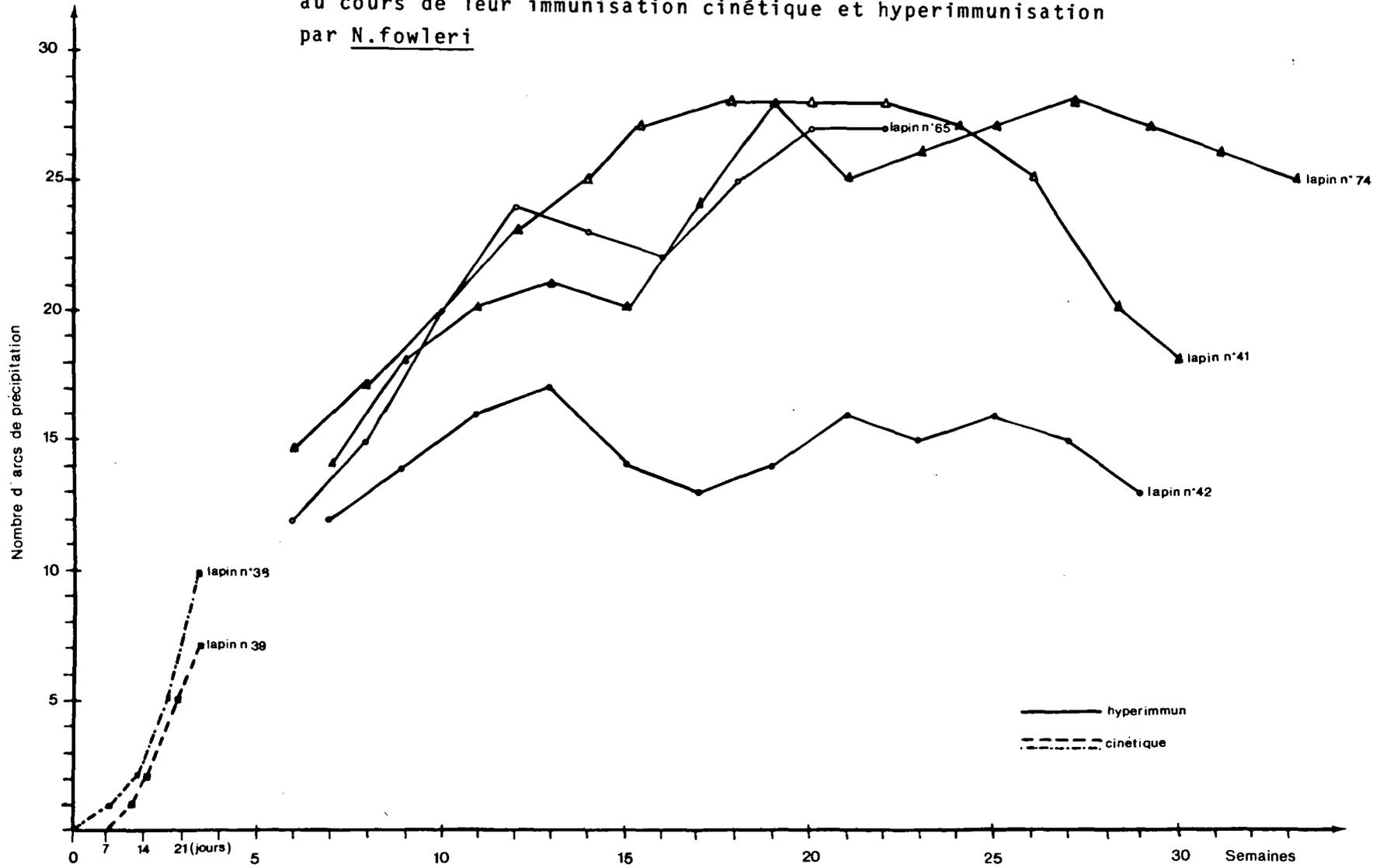


Figure 27.

Nombre d'arcs de précipitation révélés par différents lapins au cours de leur immunisation cinétique et hyperimmunisation par N.fowleri



traits antigéniques de N.fowleri témoigne de la complexité de ses structures immuno-chimiques reflétant sa constitution génétique.

### 2.1.2. Immunisation cinétique.

Deux lapins ont été immunisés à l'aide d'un antigène "brut" (culot d'ultracentrifugation préparative) sans addition d'adjuvant de Freund. Cette immunisation permet de suivre la cinétique de l'apparition des anticorps et de vérifier la spécificité de ceux-ci vis-à-vis d'autres espèces au sein du même genre et vis-à-vis d'autres genres.

L'immunsérum 38 ( $S_3$ ,  $S_4$  et  $S_5$ ) ainsi que l'immunsérum 39 ( $S_2$ ,  $S_3$ ,  $S_4$  et  $S_5$ ) permettent de suivre l'apparition progressive des arcs de précipitation en réaction homologue. (fig. 26, 27).

Le même nombre d'arcs de précipitation a été décelé à l'aide de ces immunsérums vis-à-vis d'extraits antigéniques d'autres souches de N.fowleri d'origine humaine et d'origine libre, ainsi que partiellement vis-à-vis des extraits antigéniques d'autres espèces du genre Naegleria.

### 2.1.3. Stabilité en culture.

Les hyperimmunsérums n° 41 et 65 ont été produits par l'immunisation à l'aide de deux lots distincts d'extraits antigéniques. Ces lots ont été préparés à un interval de 15 mois de culture continue. La comparaison immunoélectrophorétique des hyperimmunsérums 41 et 65 ne révèle apparemment pas de différences significatives compte tenu des variations quantitatives dues à la préparation des extraits antigéniques. L'épreuve d'absorption nous a permis de vérifier cette observation. L'absorption complète des anticorps précipitants confirme que la structure antigénique initiale est restée inchangée au cours de l'entretien prolongé in vitro.

Ces résultats nous ont permis d'affirmer que la mosaïque antigénique de N.fowleri ITMAP 359 s'est montrée stable et reproductible au cours de notre étude.

### 2.2. Structure antigénique de la souche IMVS Morgan.

L'analyse immunoélectrophorétique a été menée à l'aide de deux hyperimmunsérums homologues distincts et de 2 lots d'extraits antigéniques.

L'analyse immunoélectrophorétique de l'extrait hydrosoluble de N.fowleri IMVS Morgan par l'hyperimmunsérum homologue 74 (S<sub>15</sub>) a permis d'objectiver au moins 28 composants antigéniques d'origine ambiante. Cette mosaïque antigénique s'est montrée stable et reproductible par les deux extraits antigéniques préparés à un interval de 12 mois de culture continue.

### 2.3. Structure antigénique de la souche HB-1

La souche HB-1 a servi à définir N.aerobia et N. invades.

L'analyse immunoélectrophorétique de l'extrait hydrosoluble de N.fowleri HB-1 par l'hyperimmunsérum homologue 85 (S<sub>7</sub>, S<sub>8</sub>) permet d'objectiver au moins 28 composants antigéniques d'origine ambiante. Un seul lapin a été immunisé à l'aide d'un seul lot d'extrait antigénique. Nous n'avons pas estimé nécessaire de produire plusieurs hyperimmunsérums avec différents lots d'antigène, puisque nous envisageons seulement d'effectuer un contrôle supplémentaire pour établir l'identité de souches de N.fowleri comme on le verra par la suite.

### 2.4. Comparaison antigénique de souches N.fowleri d'origine humaine.

Une vingtaine de souches de N.fowleri d'origine humaine ont été isolées à partir de cas de méningo-encéphalite ambiante primitive sur tous les continents (Willaert, 1974). L'identité de ces souches est mise en doute par les dénominations successives différentes données par divers auteurs, ainsi que par des descriptions morphologiques incomplètes donnant lieu à un malentendu entre auteurs. Pour cette raison, Naegleria fowleri (Carter, 1970) a été successivement dénommée N. aerobia (Singh et Das, 1970) et N. invades (Chang, 1971).

Nous avons voulu démontrer, non seulement l'identité des souches de N.fowleri isolées chez l'homme, mais également l'homogénéité géographique de l'espèce, reconnue comme agent étiologique de la méningo-encéphalite ambiante primitive.

Pour effectuer cette comparaison nous avons choisi les souches ayant servi à la dénomination successive de N.fowleri (souche Carter, 1966), N. aerobia et N. invades (souche HB-1) ainsi que des souches isolées dans des régions géographiques différentes.

2.4.1. Les hyperimmunsérums anti-N.fowleri ITMAP n° 42 et 65 ont été opposés à des souches d'origine humaine et d'origine géographique variée.

- 1/ souche IMVS Morgan, isolée en Australie (Anderson et Jamieson, 1972);
- 2/ souche C-66, isolée en Australie (Carter, 1969);
- 3/ souche HB-1, isolée en Floride (Etats-Unis, Butt, 1966);
- 4/ souche Vitek, isolée en Tchécoslovaquie (Cervà, 1969);
- 5/ souche NH-1, isolée en Nouvelle Zélande (Nicoll, 1973);
- 6/ souche ITMAP 360, isolée en Belgique (Jadin et al., 1971).

Toutes ces souches sont entretenues en culture continue et se sont montrées toujours pathogènes pour la souris sans perte apparente de virulence. La pathogénicité a été testée après clonage de la souche et avant de procéder à la préparation des extraits antigéniques.

L'analyse immunoélectrophorétique comparative (fig.28) permet d'objectiver une structure antigénique de ces souches apparemment isologue avec la souche ITMAP 359. Quelques variations quantitatives observées sont comparables à celles observées entre différents lots antigéniques de la même souche. Cependant la complexité des immunoélectrophorégrammes ne permet pas d'affirmer leur identité.

L'épreuve d'absorption de l'hyperimmunsérum anti-N.fowleri ITMAP 359 par les six souches mentionnées ci-dessus établit que celles-ci renferment tous les composants immunoélectrophorétiques révélés chez la souche ITMAP 359. Cette épreuve d'absorption a été contrôlée en Ouchterlony (fig.29) et en immunoélectrophorèse (fig.30).

Les 7 souches étudiées partagent apparemment la même structure antigénique. Ces résultats suggèrent donc que les formes de culture de N.fowleri sont antigéniquement stables, constantes et homogènes.

2.4.2. A l'aide de l'hyperimmunsérum n° 74 anti-N.fowleri IMVS Morgan, objectivant en réaction homologue 28 composants antigéniques, l'analyse immunoélectrophorétique des extraits antigéniques des souches ITMAP 359, HB-1 et C-66 est effectuée comme contrôle supplémentaire pour prouver l'identité des souches isolées chez l'homme.

L'analyse immunoélectrophorétique comparative, suivie par l'épreuve d'absorption avec les extraits antigéniques hétérologues nous a permis de constater une

Figure 28

Constance antigénique des souches de N.fowleri d'origine humaine. L'analyse immunoelectrophoretique indique leur similitude antigénique

Figure 29

L'hyperimmunsérum anti-N.fowleri ITMAP 359 avant et après absorption par un extrait de N.fowleri souche HB-1. Après absorption aucun anticorps précipitant n'est révélé avec les extraits hétérologues.

Figure 30

L'épreuve d'absorption de l'hyperimmunsérum anti-N.fowleri ITMAP 359 menée en immunoelectrophorèse.

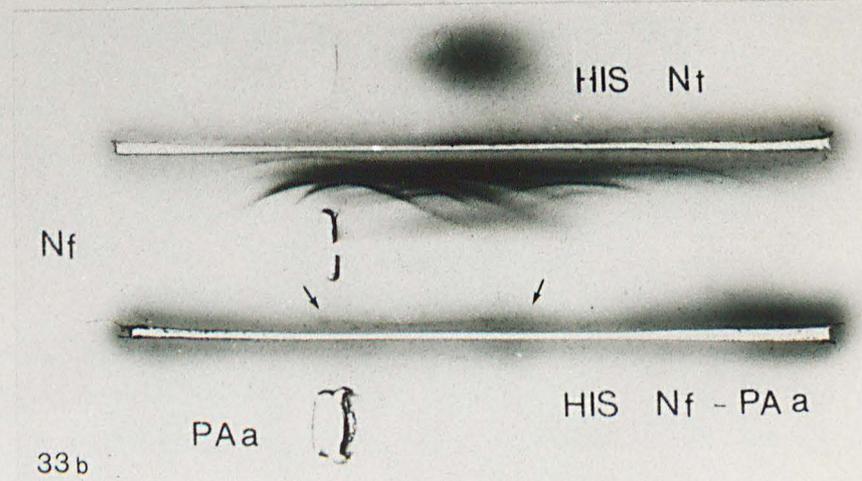
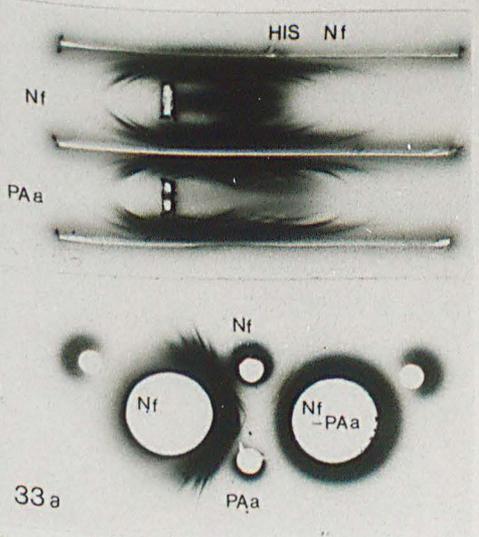
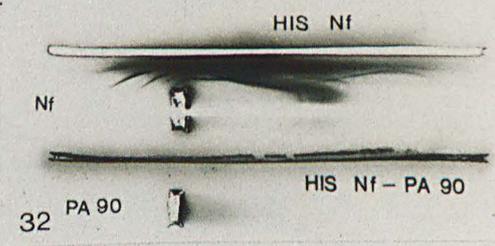
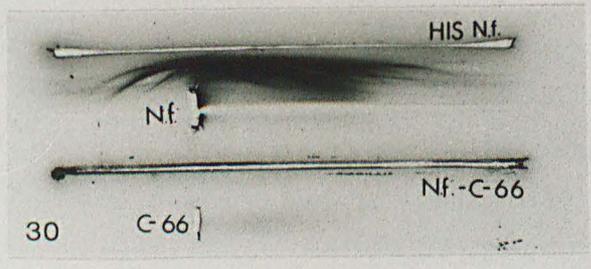
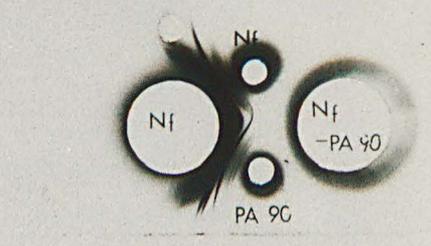
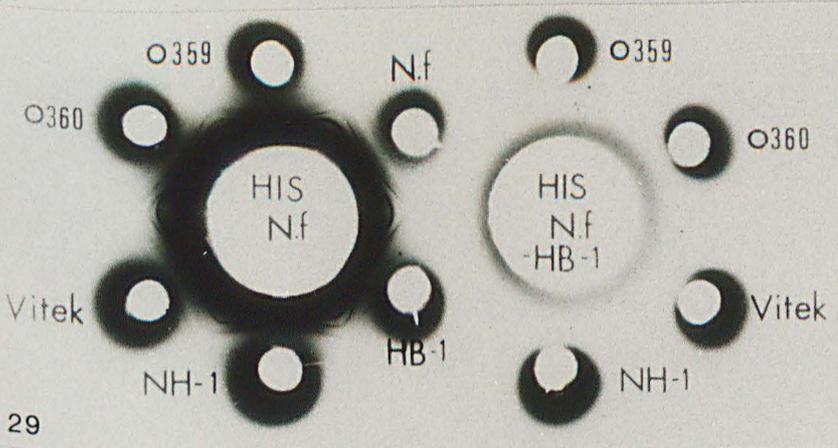
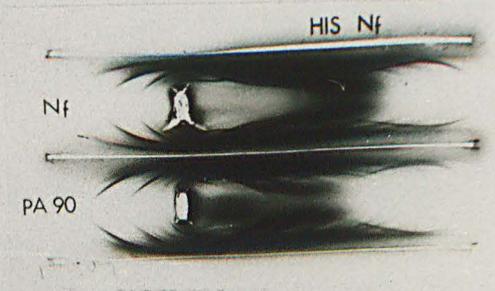
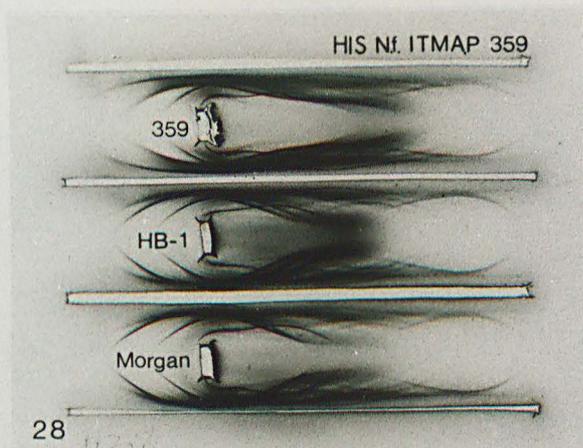
Figure 31

Comparaison immunoelectrophoretique de N.fowleri IMVS Morgan humaine et de N.fowleri IMVS PA 90 (libre) à l'aide de l'hyperimmunsérum anti-N.fowleri IMVS Morgan.

Figure 33

Spécificité antigénique de N.fowleri:

- a) Similitude immunoelectrophoretique de N.fowleri et de Naegleria sp PA a; le contrôle de l'épuisement des réactions croisées en double diffusion montre la spécificité antigénique de N.fowleri
- b) Caractérisation immunoelectrophoretique de la spécificité antigénique de N.fowleri.



une isologie complète entre les souches étudiées.

Les quatre souches étudiées partagent donc la même structure antigénique révélée chez sa souche IMVS Morgan.

2.4.3. Une dernière vérification d'identité entre souches de N.fowleri d'origine humaine est enfin effectuée à l'aide de l'hyperimmunsérum n° 85 anti-N.fowleri souche HB-1.

L'analyse immunoélectrophorétique comparative avec les extraits des souches IMVS Morgan et C-66, suivie par l'absorption avec les extraits hétérologues nous a permis de constater une isologie complète des souches étudiées. Ces trois souches étudiées partagent donc la même structure antigénique révélée chez la souche HB-1.

2.4.4. Ces résultats suggèrent dans les limites de la méthode que les différentes souches d'origine humaine de N.fowleri sont antigéniquement homogènes. Leur structure immunoélectrophorétique se montre indépendante de l'origine géographique de l'organisme lequel ne semble pas se modifier au cours de l'entretien en culture in vitro.

L'identité immunostructurale de N.fowleri ITMAP 359 et de N.fowleri IMVS Morgan avec N.aerobia et N. invades HB-1 soulignée par la ressemblance de leurs caractères morphologiques, biologiques et sérologiques, établit l'homogénéité antigénique géographique de l'espèce. Ainsi elle confirme la priorité de N.fowleri (Carter, 1970) dont N.aerobia et N.invades sont des synonymes juniors non valables.

2.5. Comparaison antigénique de N.fowleri d'origine humaine et d'origine libre.

N.fowleri se rencontre dans notre environnement. Généralement, les cas de méningo-encéphalite amibienne primitive ont été mis en rapport avec la natation, dans la plupart des régions du monde où des cas sont signalés. Néanmoins, jamais l'agent causal n'a été mis en évidence dans les piscines incriminées.

En Australie du Sud, par contre, un grand nombre de cas ont été signalés sans rapport direct avec la natation mais un contact avec l'eau était soupçonné (Anderson et Jamieson, 1972). Les villes où les cas se sont produits sont distantes d'environ 80 km, mais ont un facteur important en commun; elles n'ont pas de

SOUTH AUSTRALIA

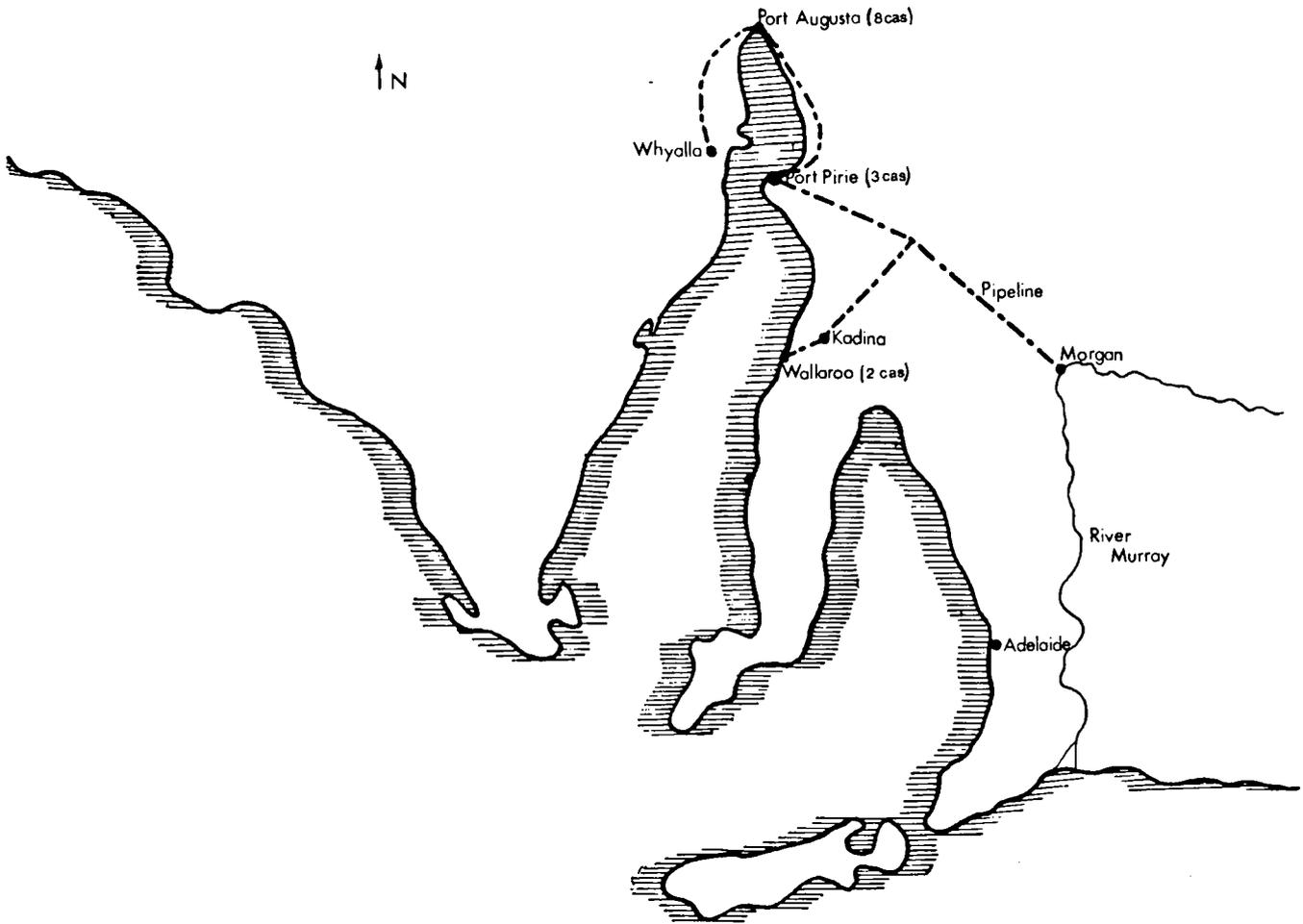


Figure 31.

Région de l'Australie du Sud montrant la distribution des cas de méningo-encéphalite ambiante primitive et le trajet du pipeline.

ressources naturelles d'eau mais sont approvisionnées par le même pipe-line, lequel s'étend le long d'un parcours de 250 km à partir de la rivière Murray (fig. 31). Ce pipe-line est installé au-dessus du niveau du sol et est exposé à des températures élevées durant l'été. Des échantillons d'eau prélevés à partir du pipe-line et des échantillons d'eau prélevés aux robinets approvisionnés par ce pipe-line ont révélé la présence d'amibes du genre Naegleria potentiellement pathogènes pour la souris. En plus des isolements à partir de l'eau, une souche de Naegleria a été isolée du sol en Australie du sud (Anderson et al., 1973).

La présence des souches de Naegleria pathogènes a été signalée également dans d'autres parties du monde. Singh et Das (1972) ont communiqué l'isolement de N.fowleri (N.aerobia) à partir du sédiment des eaux d'égouts à Lucknow : aux Indes. Gordeeva (1973) a isolé deux souches de Naegleria pathogènes à partir d'un échantillon provenant d'un concentré des sédiments d'égouts dans les régions de Moscou et de Gorky (URSS). Un isolement de N.fowleri a été fait à partir de sources d'eau chaude en Nouvelle-Zélande par Jamieson (communication personnelle, 1974). Chang (1974) rapporte l'isolement d'une souche de Naegleria d'un lac à Richmond, Virginie, dont l'effet cytopathogène, en culture sur tissu, permet de suspecter la pathogénicité.

Il nous a semblé important de confirmer l'identité de quelques-unes des souches isolées dans l'environnement avec les souches isolées chez l'homme.

Nous avons analysé successivement des extraits antigéniques de souches provenant de l'eau, de la boue d'égouts et du sol. Ces souches se sont montrées potentiellement pathogènes pour la souris, se cultivent axéniquement à 37°C et ont été clônées avant l'analyse immunoélectrophorétique.

#### 2.5.1. Souches isolées de l'eau.

Deux souches parmi un lot d'une dizaine de souches isolées à partir de l'eau en Australie du Sud ont été examinées par l'analyse immunoélectrophorétique. Il s'agit des souches IMVS PA 90 et IMVS PA 117 lesquelles ont été isolées à partir de l'eau de robinets dans des maisons à Port Augusta. Des cas confirmés de méningo-encéphalite amibienne primitive sont survenus dans cette ville.

L'analyse immunoélectrophorétique comparative des extraits antigéniques des souches IMVS PA 90 et IMVS PA 117 permet d'objectiver une structure antigénique de ces souches apparemment isologues avec les souches ITMAP 359 et IMVS Morgan.

L'épreuve d'absorption de l'hyperimmunsérum anti-N.fowleri IMVS Morgan par les deux souches mentionnées ci-dessus établit que celles-ci renferment tous les composants immunoélectrophorétiques révélés chez la souche IMVS Morgan. Cette épreuve d'absorption a été menée en double diffusion et en immunoélectrophorèse (fig. 32).

Les trois souches étudiées partagent donc la même structure antigénique, ce résultat suggère l'identité immunostructurale de ces souches.

De plus, l'analyse immunoélectrophorétique des extraits antigéniques de ces deux souches, à l'aide d'un immunsérum cinétique anti-N.fowleri ITMAP 359, a permis de révéler un même nombre d'arcs de précipitation, possédant la même mobilité électrophorétique qu'en réaction homologue.

#### 2.5.2. Souche isolée de la boue d'égout.

A notre connaissance, sept souches de Naegleria, pathogènes pour la souris, ont été isolées à partir de la boue d'égout (Singh et Das, 1972; Gordeeva 1973). Parmi les cinq souches isolées par Singh et Das, que nous avons reçues et adaptées en culture axénique à 37°C, une souche a été soumise à l'analyse immunoélectrophorétique comparative. Le contrôle de sa pathogénicité confirme les observations de Singh et Das.

L'analyse immunoélectrophorétique comparative de l'extrait antigénique de la souche N.a.1 permet d'objectiver une structure antigénique apparemment isologue avec celle de la souche N.fowleri IMVS Morgan.

L'épreuve d'absorption de l'hyperimmunsérum anti-N.fowleri IMVS Morgan par l'extrait hétérologue de la souche N.a.1 établit l'identité immunostructurale de ces deux souches au niveau des composants révélés.

#### 2.5.3. Souche isolée du sol.

Jusqu'à ce jour, une seule souche de Naegleria, pathogène pour la souris, a été isolée à partir du sol et a été rapportée par Anderson et al. (1973). Cette souche a été isolée en juin 1972 d'une terre sèche en Australie du Sud entre les villes de Port Pirie et Port Augusta. Dans cette région des cas de méningo-encéphalite amibienne primitive ont été signalés. Cette souche, non clônée à l'isolement, a provoqué une méningo-encéphalite amibienne primitive chez une seule souris sur six inoculées par voie intra-nasale avec 65.000 trophozoïtes. Par la suite

la virulence de cette souche s'est comportée d'une façon assez inhabituelle comparée à celle d'autres souches de N.fowleri (Tableau 5).

Tableau 5 : Virulence de la souche PAa pour la souris

DATE	Nombre d'amibes inoculées	Mortalités pour six souris inoculées
21.7.1972	65.000	1 après 9 jours
13.8.1972	120.000	4 après 5 jours
29.8.1972	117.500	1 après 15 jours 1 après 17 jours
4.9.1972	200.000	aucune
1.10.1972	59.000	aucune
27.10.1972	3.100	aucune
7.11.1972	16.000	aucune
10.11.1972	4.500	aucune
17.12.1972	100.000	aucune
29.12.1972	23.300	aucune
8.1.1973	200.000	1 après 4 jours 5 après 5 jours

L'invasion du cerveau par les amibes a été confirmée par la culture sur agar et par coupes histologiques. Des analyses sérologiques au moyen de l'agglutination (Anderson et Jamieson, 1972) n'étaient pas possibles entre le mois d'août et décembre, puisque la souche était incapable de se multiplier en culture axénique. Finalement en décembre 1972 elle a pu être axénisée et le test d'agglutination effectué avec un antisérum anti-N.fowleri s'est montré négatif. Cette souche se multipliant en culture axénique est ensuite inoculée à six souris et toutes meurent d'une méningo-encéphalite amibienne primitive. La souche isolée à partir du cerveau de ces souris s'est montrée, aussi bien avant qu'après clônage, positive pour N.fowleri par le test d'agglutination, tandis que le résultat restait négatif vis-à-vis de N.gruberi.

L'analyse immunoelectrophorétique de l'extrait antigénique de la souche

IMVS PAa, à l'aide des hyperimmunsérums anti-N.fowleri souches ITMAP 359, IMVS Morgan et HB-1, avant et après absorption, a révélé qu'au moins un arc de précipitation en réaction homologue subsistait (fig. 33 a, b).

Supposant qu'il s'agissait d'une mauvaise qualité antigénique, un second puis un troisième lot d'extrait antigénique ont été préparés. Les résultats obtenus avec ces nouveaux lots confirment néanmoins les constatations initiales.

Les hyperimmunsérums anti-N.fowleri ITMAP 359, IMVS Morgan et HB-1 absorbés par les extraits antigéniques (lots 1, 2 et 3) de la souche IMVS PAa, révèlent encore au moins un arc de précipitation en réaction homologue tandis qu'en réaction hétérologue aucun anticorps n'est décelé.

L'absorption des hyperimmunsérums anti-N.fowleri par des quantités plus importantes d'extraits antigéniques de la souche IMVS PAa ne permet pas de faire disparaître ce composant antigénique ni de l'atténuer.

Suite à cette distinction peu marquée nous avons préparé un hyperimmunsérum anti-Naegleria sp. IMVS PAa. L'hyperimmunsérum n° 93 anti-Naegleria sp. IMVS PAa, objectivant en réaction homologue au moins 25 composants antigéniques ne permet pas de révéler après absorption par les extraits antigéniques hétérologues de N.fowleri ITMAP 359, IMVS Morgan et HB-1, l'existence d'anticorps précipitants en réaction homologue, ni en réaction hétérologue.

Ces résultats montrent que N.fowleri d'origine humaine se distingue de Naegleria sp. IMVS PAa par un composant antigénique. Néanmoins, un hyperimmunsérum anti-Naegleria sp. IMVS PAa ne permet pas de confirmer une distinction nette entre deux espèces. A la vue de ces résultats on pourrait supposer que la souche IMVS PAa représente une variante de l'espèce N.fowleri.

#### 2.5.4. Conclusions.

Nous avons pu observer à l'aide de l'analyse immunoélectrophorétique une constance infraspécifique de sept souches de N.fowleri d'origine humaine et d'une distribution géographique différente. Cette analyse nous a également permis de constater une isologie complète entre les souches isolées de l'eau, de la boue d'égout et les souches d'origine humaine.

Une différence antigénique concernant au moins un composant antigénique est observée entre N.fowleri d'origine humaine et la souche IMVS PAa, isolée à partir du sol. Néanmoins, cette souche montre apparemment les mêmes caractéristi-

ques morphologiques, biologiques et sérologiques que les souches de N.fowleri d'origine humaine. Elle peut donc être retrouvée chez l'homme. Cette souche nous semble être une variante de l'espèce N.fowleri.

N.fowleri peut donc mener une existence libre dans notre environnement.

## 2.6. Comparaison antigénique de N.fowleri cultivée à 28°C et à 37°C.

En vue d'une comparaison immunoélectrophorétique entre N.fowleri et d'autres espèces appartenant au même genre ainsi qu'entre genres différents, nous avons voulu vérifier si la température de culture des différentes souches à étudier peut influencer le profil antigénique d'une espèce. N.fowleri se cultive ordinairement à la température de 37°C et la plupart des autres espèces étudiées se multiplient à 28°C. Il fallait donc vérifier la constance antigénique d'une souche à ces deux températures.

Dans ce but nous avons parallèlement cultivé notre souche de référence N.fowleri ITMAP 359, pendant 14 mois aux températures de 37°C et 28°C. Des extraits antigéniques ont été préparés à partir de ces cultures et analysés à l'aide de l'hyperimmunsérum n°41 (obtenu par immunisation avec un extrait antigénique d'organismes cultivés à 37°C).

L'analyse immunoélectrophorétique comparative d'extraits antigéniques de N.fowleri ITMAP 359 cultivés à 28°C et à 37°C permet d'objectiver une structure antigénique apparemment isologue de ces deux extraits.

L'épreuve d'absorption de l'hyperimmunsérum anti-N.fowleri ITMAP 359 (37°C) par l'extrait homologue obtenue après culture à 28°C, établit l'isologie complète de ces deux extraits de la même souche.

Cette observation nous permet de constater qu'aucun changement fondamental de la constitution génétique d'un même organisme, cultivé à des températures différentes, s'est produit pendant les 14 mois de culture in vitro. Nous ne voyons donc aucune objection majeure à comparer, à l'aide de l'analyse immunoélectrophorétique, deux espèces se cultivant à différentes températures.

## 3. Structure antigénique de N.gruberi.

N.gruberi (Schardinger, 1899) est l'espèce type du genre Naegleria. Au début de nos recherches, nous n'avions pas encore pu réaliser la culture axénique de la souche N.gruberi C.C.A.P. 1518 que nous avons employée pour la produc-

tion des extraits antigéniques.

Nous envisageons donc successivement l'étude de la structure antigénique de N.gruberi en culture monoxénique puis en culture axénique. Ensuite, nous avons comparé les deux extraits antigéniques à l'aide des hyperimmunsérums obtenus avec les antigènes extraits à partir de cultures différentes.

### 3.1. Structure antigénique de N.gruberi en culture monoxénique.

Les extraits antigéniques de la souche C.C.A.P. 1518 furent produits à partir de cultures sur agar recouvert d'Aerobacter aerogenes. Ces lots d'antigènes ainsi que les immunsérums produits avec ces extraits nécessitent un contrôle rigoureux sur les composants contaminants. Il a été nécessaire de produire un extrait antigénique d'Aerobacter aerogenes pour le contrôle et l'absorption des hyperimmunsérums anti-N.gruberi. Aussi, nous avons produit un hyperimmunsérum anti-A. aerogenes pour contrôler le degré de contamination des antigènes de N.gruberi. Tous les immunsérums seront donc par la suite absorbés par un antigène A.aerogenes avant de procéder à une analyse immunoélectrophorétique. Les immunsérums produits contre d'autres espèces ont été également contrôlés quant à la présence d'anticorps naturels vis-à-vis d'A. aerogenes.

En cas de présence d'anticorps anti-A.aerogenes dans les immunsérums servant aux réactions croisées, ceux-ci sont absorbés par un antigène A.aerogenes de façon à conserver seulement les composants spécifiques. Cinq lots d'extraits antigéniques ont été produits avec lesquels quatre lapins ont été immunisés.

L'analyse immunoélectrophorétique d'un extrait hydrosoluble de N.gruberi souche C.C.A.P. 1518 par l'hyperimmunsérum homologue 72 S<sub>10</sub> permet d'objectiver au moins 19 composants antigéniques d'origine ambiante. L'hyperimmunsérum a été préalablement absorbé par un antigène "milieu de culture" afin d'assurer la spécificité de la réaction. Cette mosaïque antigénique s'est montrée stable et reproductible à l'aide des différents extraits antigéniques préparés à un intervalle de 16 mois de culture continue.

### 3.2. Structure antigénique de N.gruberi en culture axénique.

Depuis l'emploi de sérum de veau foetal dans le milieu de culture, nous avons pu adapter la souche N.gruberi C.C.A.P. 1518 à la culture axénique dans le milieu C.G.V.S. Cette souche est cultivée axéniquement à la température de 28°C en culture continue depuis 15 mois. Elle ne s'est pas montrée pathogène

pour la souris.

L'étude de la structure antigénique a été réalisée en se basant sur la réponse antigénique de 2 lapins et à l'aide de 5 lots d'extraits antigéniques. Parmi les hyperimmunsérums obtenus (n°s 102 - 103), l'hyperimmunsérum 103 (S<sub>8</sub> et S<sub>9</sub>) a été retenu pour son pouvoir de révélation élevé. Cet hyperimmunsérum a servi de référence pendant l'ensemble de cette étude.

L'analyse immunoélectrophorétique d'un extrait hydrosoluble de N. gruberi souche C.C.A.P. 1518 par l'hyperimmunsérum homologue 103 S<sub>9</sub> permet d'objectiver au moins 25 composants antigéniques d'origine amibienne (fig. 34). L'hyperimmunsérum a été préalablement absorbé par un antigène "milieu de culture" afin d'assurer la spécificité de la réaction. Cette mosaïque antigénique s'est montrée reproductible à l'aide de 5 extraits antigéniques préparés à un intervalle de 12 mois de culture continue.

### 3.3. Comparaison des structures antigéniques de N. gruberi cultivé monoxéniquement et axéniquement.

Nous avons étudié à l'aide de l'analyse immunoélectrophorétique comparative les deux extraits antigéniques obtenus dans des milieux de culture différents.

#### 3.3.1. Hyperimmunsérum N. gruberi (culture monoxénique).

L'analyse immunoélectrophorétique comparative des extraits antigéniques homologues et hétérologues à l'aide de l'hyperimmunsérum 73, permet d'observer une structure antigénique apparemment isologue. Après épuisement de l'hyperimmunsérum par l'extrait hétérologue, aucun anticorps dirigé contre l'extrait homologue ni hétérologue n'est plus objectivé en Ouchterlony et en immunoélectrophorèse.

#### 3.3.2. Hyperimmunsérum N. gruberi (culture axénique).

L'analyse immunoélectrophorétique comparative des extraits antigéniques homologues et hétérologues à l'aide de l'hyperimmunsérum 103 permet d'observer une structure antigénique différente des deux extraits. Après absorption de l'hyperimmunsérum par l'extrait hétérologue des arcs de précipitation sont encore révélés en réaction homologue tandis qu'en réaction hétérologue aucune précipitation n'est observée.

Figure 34

Mosaïque immunoélectrophorétique de N.gruberi CCAP 1518.

Vingt-cinq composants sont objectivés sur l'immunoélectrophorégramme.

Figure 35

Mosaïque immunoélectrophorétique de N.jadini ITMAP 400.

Trente-cinq composants sont objectivés sur l'immunoélectrophorégramme.

Figure 36

Comparaison immunoélectrophorétique des extraits de N.fowleri, de N.jadini et de N.gruberi à l'aide d'un hyperimmunsérum anti-N.fowleri.

Vingt-sept, quatorze et douze composants sont respectivement objectivés.

Figure 37

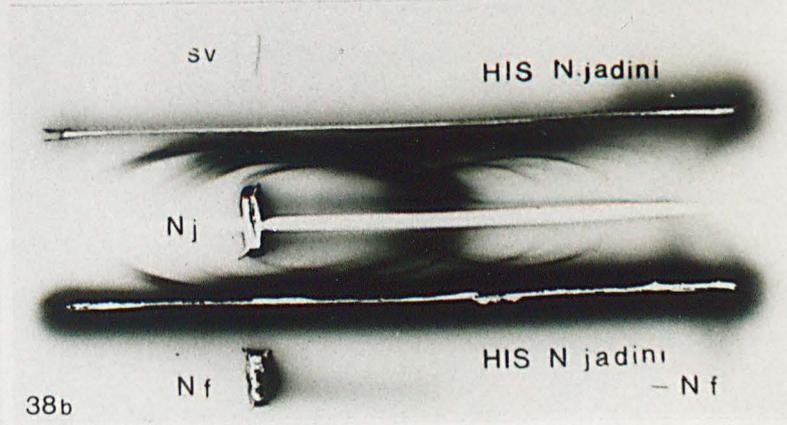
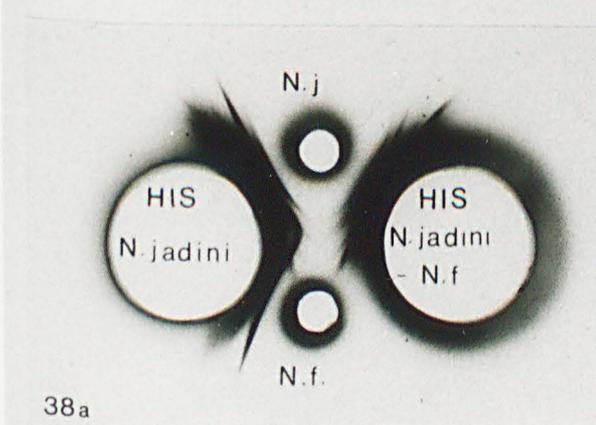
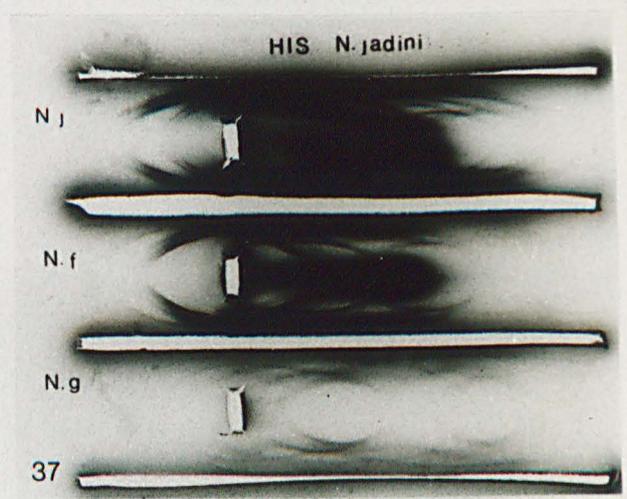
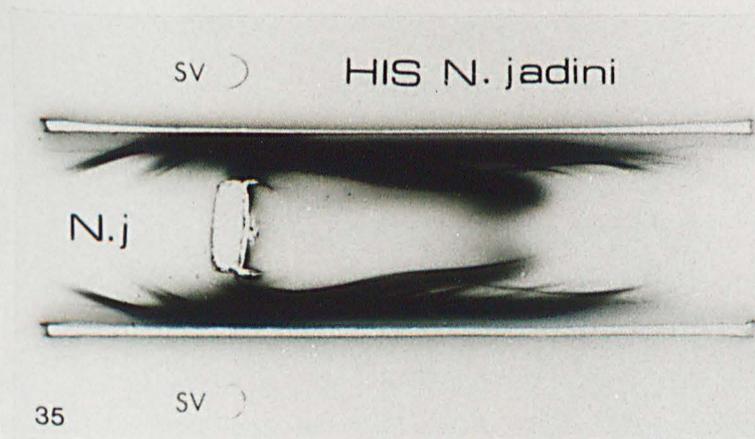
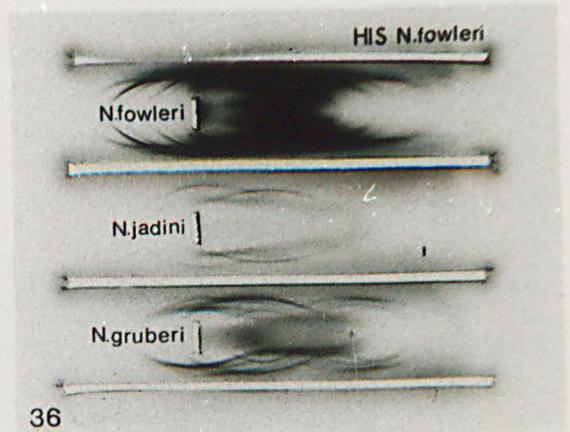
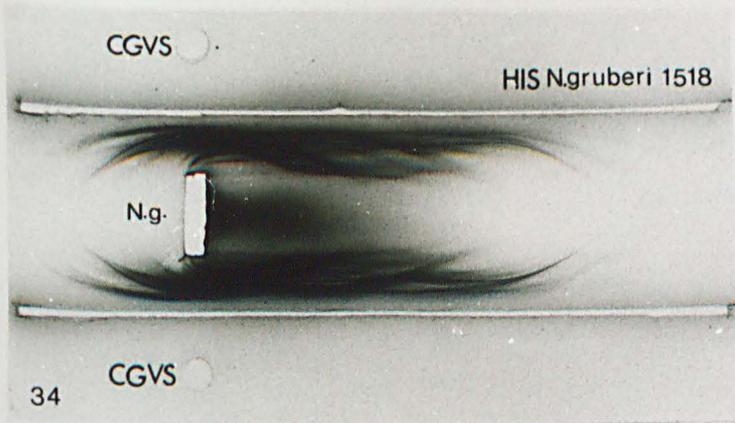
Comparaison immunoélectrophorétique des extraits de N.jadini, de N.fowleri et de N.gruberi à l'aide d'un hyperimmunsérum anti-N.jadini. Trente-cinq, quatorze et quatorze composants sont respectivement objectivés.

Figure 38

Spécificités antigéniques de N.jadini :

a) Le contrôle de l'épuisement des réactions croisées en double diffusion montre les spécificités antigéniques de N.jadini

b) Caractérisation immunoélectrophorétique des spécificités antigéniques de N.jadini. Après l'épreuve d'absorption croisée (gouttière à double inférieure).



Cette comparaison des structures antigéniques de N. gruberi cultivé monoxéniquement et axéniquement fait apparaître des nuances quantitatives. Elle suggère une différence qualitative des deux extraits due aux conditions différentes de culture de l'organisme. En effet, le rendement en poids sec des extraits antigéniques obtenus en culture axénique (5%) est environ 10 fois supérieur au rendement obtenu en culture monoxénique (0,60%). De plus, en culture monoxénique les amibes forment rapidement des kystes lesquels entraînent une extraction prolongée qui peut mener à une dénaturation de certains constituants protéiniques.

Les extraits antigéniques et les hyperimmunsérums obtenus à partir des formes de culture axénique seront employés par la suite pour toute étude comparative avec d'autres espèces.

#### 4. Structure antigénique de N. jadini sp. nov.

Au cours de nos recherches nous avons pu isoler, à partir de l'eau d'une piscine privée à Anvers, une souche de Naegleria ITMAP 400 (Jadin et Willaert, 1972) morphologiquement semblable à N. gruberi et N. fowleri. Cette souche se cultive axéniquement à la température de 28°C, mais non à 37°C. Cette souche s'est montrée peu pathogène pour la souris lors de l'isolement. Après sa mise en culture axénique aucune lésion n'a pu être produite chez la souris. N. jadini se distingue de N. gruberi par son kyste dont la paroi est lisse et contient en moyenne 1 pore, de N. fowleri par son incapacité à cultiver à 37°C et par l'absence de pouvoir pathogène spontané. C'est en définitive l'analyse immunoélectrophorétique des protéines hydrosolubles de cette souche qui nous a permis d'établir indiscutablement l'indépendance génétique de N. jadini.

Nous avons décrit cette souche et nous l'avons appelée N. jadini n. sp. (Willaert et Le Ray, 1973) en hommage au Professeur J.B. JADIN.

L'étude de la structure antigénique de N. jadini a été réalisée en se basant sur les réponses antigéniques de 2 lapins et à l'aide de trois lots d'antigènes différents. Parmi les hyperimmunsérums obtenus (n° 46 et 47) le n° 47 S<sub>9</sub> et S<sub>10</sub>) a été retenu par son pouvoir de révélation élevé. Cet hyperimmunsérum a servi de référence pendant l'ensemble de cette étude.

L'analyse immunoélectrophorétique d'un extrait hydrosoluble de N. jadini souche ITMAP 400 par l'hyperimmunsérum homologue 47 S<sub>10</sub> permet d'objectiver au moins 35 composants antigéniques d'origine amibienne (fig. 35). L'hyperimmunsérum a été préalablement absorbé par un antigène "milieu de cul-

ture" afin d'assurer la spécificité de la réaction. Cette mosaïque antigénique s'est montrée reproductible à l'aide de trois extraits antigéniques préparés à un intervalle de 24 mois de culture continue.

Etant donné que la souche ITMAP 400 est le seul représentant de l'espèce N. jadini, nous n'avons pas pu vérifier l'homogénéité de cette espèce.

#### 5. Etude immunoélectrophorétique comparative entre N. fowleri, N. gruberi et N. jadini.

Nous avons pu observer à l'aide de l'analyse immunoélectrophorétique la constance infra-spécifique de sept souches de N. fowleri d'origine humaine. Cette observation nous permet de confronter à l'aide de l'analyse immunoélectrophorétique comparée, les extraits antigéniques de plusieurs souches de Naegleria, morphologiquement similaires mais non pathogènes à des hyperimmunsérums anti-N. fowleri, anti-N. jadini et anti-N. gruberi.

Les parentés et les spécificités antigéniques de N. fowleri, de N. gruberi et de N. jadini sont analysées au moyen d'hyperimmunsérums préparés contre chaque espèce.

#### 5.1. Hyperimmunsérum anti-N. fowleri.

Des hyperimmunsérums anti-N. fowleri ITMAP 359 et IMVS Morgan objectivant en réaction homologue respectivement 27 et 28 composants antigéniques, opposés à l'extrait hydrosoluble de N. gruberi (C.C.A.P.) 1518 permet d'objectiver en immunoélectrophorèse 12 arcs de précipitation communs aux deux espèces (fig. 36). Il apparaît donc que N. fowleri se distingue de N. gruberi par un minimum de 15 composants antigéniques.

L'extrait antigénique de N. jadini ITMAP 400 opposé aux hyperimmunsérums anti-N. fowleri ITMAP 359 et IMVS Morgan permet d'objectiver en immunoélectrophorèse 14 arcs de précipitation partagés par les deux espèces (fig. 36). Il apparaît donc que N. fowleri se distingue de N. jadini par un minimum de 13 composants antigéniques.

Après épuisement au moyen des extraits hétérologues de N. gruberi et de N. jadini, l'hyperimmunsérum anti-N. fowleri détermine encore respectivement 15 et 13 composants antigéniques en réaction homologue, tandis que dans les réactions hétérologues aucun composant n'est révélé en parfaite confirmation des résultats précédents.

### 5.2. Hyperimmunsérum anti-N.jadini.

Un hyperimmunsérum anti-N.jadini opposé aux extraits hétérologues de N. fowleri et de N. gruberi permet d'objectiver en immunoélectrophorèse respectivement 14 et 14 composants antigéniques. Il apparaît donc que N.jadini se distingue de N.fowleri et de N. gruberi par un minimum de 21 composants antigéniques (fig.37).

Après épuisement de l'hyperimmunsérum anti-N.jadini, par saturation à l'aide des extraits antigéniques de N.fowleri et de N.gruberi, les résultats obtenus ont été confirmés par l'analyse immunoélectrophorétique (fig. 38 a, b).

N.jadini possède donc une structure antigénique se distinguant de la structure de chacune des deux espèces voisines par les 2/3 environ de ces composants.

### 5.3. Hyperimmunsérum anti-N.gruberi.

L'analyse immunoélectrophorétique comparative des extraits antigéniques de N.fowleri et de N. jadini au moyen de l'hyperimmunsérum n° 103 anti-N.gruberi, permet d'objectiver respectivement 12 et 14 composants antigéniques partagés par ces espèces (fig.39).

Il apparaît donc que N.gruberi se distingue de N.fowleri par un minimum de 14 composants antigéniques et de N. jadini par un minimum de 12 composants antigéniques.

Après épuisement de l'hyperimmunsérum anti-N.gruberi par saturation à l'aide des extraits antigéniques de N.fowleri et de N. jadini, les résultats obtenus ont été confirmés par l'analyse immunoélectrophorétique.

Ces résultats sont en parfaite concordance avec ceux obtenus à l'aide des hyperimmunsérums anti-N.jadini et anti-N.fowleri.

## 6. Structure antigénique d'autres espèces appartenant au genre Naegleria.

L'existence d'autres espèces appartenant au genre Naegleria est suggérée par la mise en évidence de deux types de souches distinctes en immunoélectrophorèse de N. gruberi, de N. fowleri et de N. jadini. C'est grâce à une collaboration fructueuse avec A. Jamieson d'Adelaide en Australie du Sud, que nous devons ces souches appartenant au genre Naegleria. Les résultats sérologiques obtenus par le test d'agglutination semble montrer un comporte-

ment inhabituel aux autres espèces connues.

L'étude immunoélectrophorétique de quelques unes de ces souches a mis en évidence l'existence de deux autres espèces au sein du genre Naegleria. Ces souches ne sont pas encore étudiées du point de vue morphologique et biologique mais des projets ont été mis au point dans ce sens. Il s'agit ici de souches que nous appelons du type "A" et du type "PPMFB".

### 6.1. Naegleria sp. A

Un premier type est le type "A" dont Anderson et Jamieson (1972) ont isolé cinq souches à partir de l'eau potable en Adelaide (Australie). En agglutination, ces souches se sont montrées différentes de N.gruberi, mais elles ont été agglutinées au même taux qu'en réaction homologue par un anti-sérum anti-N.fowleri (Jamieson, 1973). Par contre, les tests de pathogénicité ont été négatifs. L'aspect général de leur morphologie est semblable aux espèces déjà décrites. Nous avons étudié deux de ses souches à savoir Naegleria sp. IMVS A-2 et Naegleria sp. IMVS A-9.

#### 6.1.1. Structure antigénique de Naegleria sp. IMVS A-2

L'étude de la structure antigénique de Naegleria sp. IMVS A-2 a été menée à l'aide d'un seul hyperimmunsérum (n°88) homologue et de 4 lots d'extraits antigéniques.

L'analyse immunoélectrophorétique d'un extrait hydrosoluble de Naegleria sp. souche IMVS A-2 par l'hyperimmunsérum homologue 88 (S<sub>9</sub>) permet d'objectiver au moins 24 composants antigéniques d'origine amibienne (fig.40). L'hyperimmunsérum a été préalablement absorbé par un antigène "milieu de culture" afin d'assurer la spécificité de la réaction. Cette mosaïque antigénique s'est montrée stable et reproductible à l'aide des 4 extraits antigéniques préparés à un intervalle de 12 mois de culture axénique continue.

#### 6.1.2. Comparaison des deux souches de Naegleria sp. A

Un seul lot d'extrait antigénique de la souche IMVS A-9 a été préparé et comparé par la suite à la mosaïque antigénique de Naegleria sp. IMVS A-2.

L'hyperimmunsérum n°88 anti-Naegleria sp. IMVS A-2, opposé en immunoélectrophorèse à l'extrait antigénique de Naegleria sp. IMVS A-9 nous a per-

Figure 39

Comparaison immunoélectrophorétique de N.gruberi, de N.fowleri et de N.jadini à l'aide d'un hyperimmunsérum anti-N.gruberi CCAP 1518. Vingt-cinq, douze et quatorze composants sont respectivement objectivés.

Figure 40

Mosaïque immunoélectrophorétique de Naegleria sp. IMVS A-2. Vingt-quatre composants sont objectivés sur l'immunoélectrophorégramme.

Figure 41

Comparaison immunoélectrophorétique des extraits de Naegleria sp. IMVS A-2, de N.fowleri, de N.jadini et de N.gruberi à l'aide de l'hyperimmunsérum anti-Naegleria sp. IMVS A-2.

Figure 42

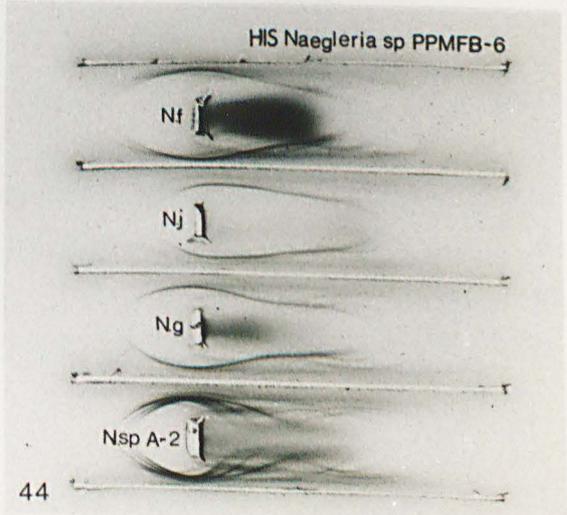
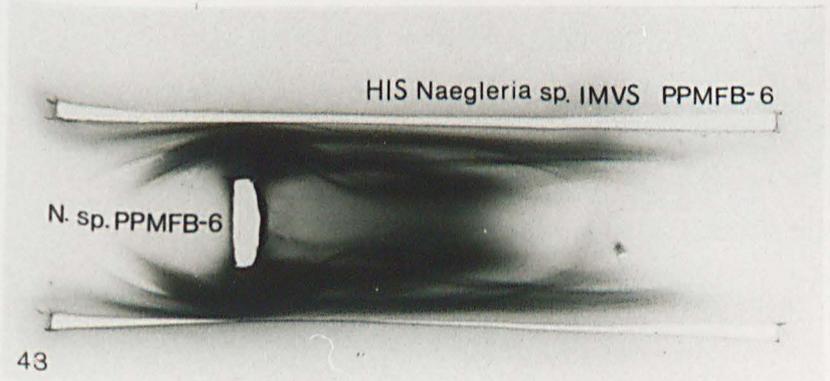
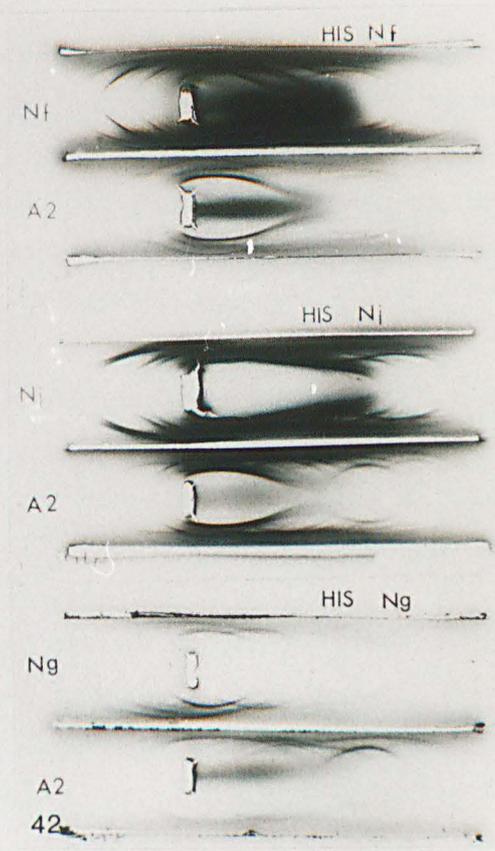
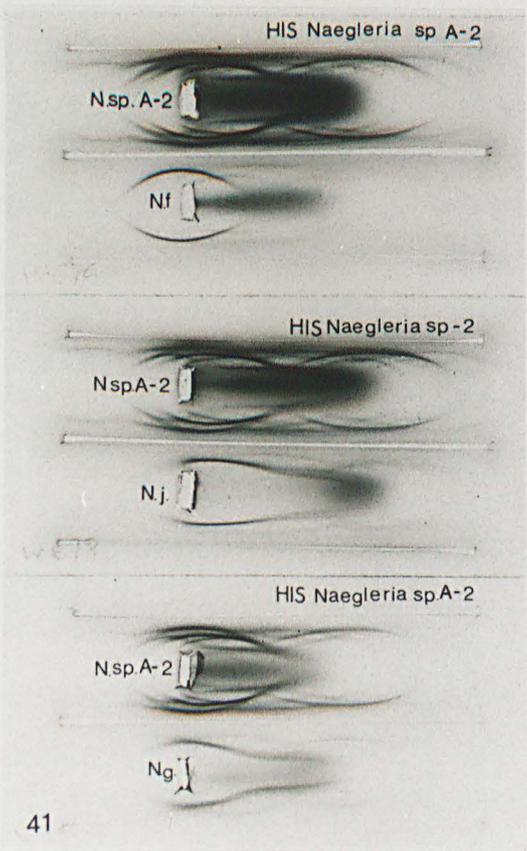
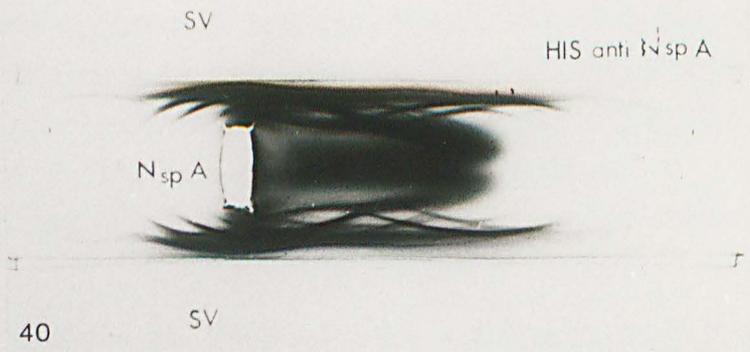
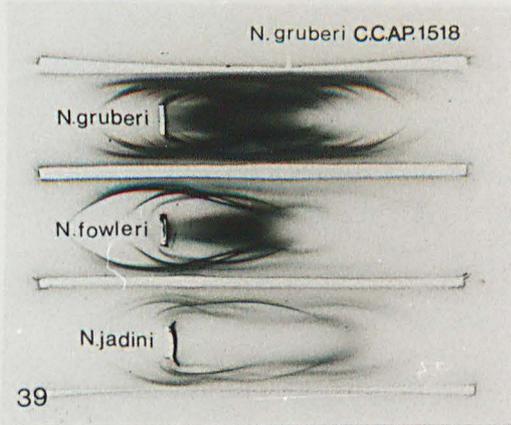
Analyse immunoélectrophorétique des réactions croisées minimales entre Naegleria sp. IMVS A-2 et N.fowleri, N.jadini et N.gruberi.

Figure 43

Mosaïque immunoélectrophorétique de Naegleria sp. IMVS PPMFB-6. Vingt-six composants sont objectivés sur l'immunoélectrophorégramme.

Figure 44

Comparaison immunoélectrophorétique des extraits de N.fowleri, N.jadini, N.gruberi et de Naegleria sp. A-2 à l'aide de l'hyperimmunsérum anti-Naegleria sp. IMVS PPMFB-6.



mis d'observer une structure antigénique apparemment isologue que celle observée en réaction homologue. Après épuisement de l'hyperimmunsérum anti-Naegleria sp. IMVS A-2 par l'extrait hétérologue de Naegleria sp. IMVS A-9 aucun anticorps dirigé contre l'extrait homologue et l'extrait hétérologue n'est plus objectivé en Ouchterlony, ni après l'analyse immunoélectrophorétique.

Ceci établit l'identité de ces deux souches au niveau des composants antigéniques révélés.

### 6.1.3. Etude comparative de Naegleria sp. IMVS A-2 avec N.fowleri, N. jadini et N. gruberi.

L'analyse immunoélectrophorétique des extraits hydrosolubles de N.fowleri ITMAP 359 et IMVS Morgan, N. jadini ITMAP 400 et N. gruberi C.C.A.P. 1518 par l'hyperimmunsérum anti-Naegleria sp. IMVS A-2, permet d'objectiver respectivement 10, 11 et 13 composants antigéniques partagés par ces espèces. Ces résultats sont confirmés après absorption de l'hyperimmunsérum anti-Naegleria sp. A-2 au moyen des extraits hétérologues de N.fowleri, N.jadini et N. gruberi (fig.41).

L'analyse immunoélectrophorétique de l'extrait hydrosoluble de Naegleria sp. A-2 par les hyperimmunsérums anti-N.fowleri, anti-N. jadini et anti-N.gruberi permet d'objectiver respectivement 10, 16 et 13 composants antigéniques partagés par Naegleria sp. A-2 avec les autres espèces du même genre (fig. 42).

L'ensemble de ces résultats permet d'établir l'indépendance immuno-structurelle de Naegleria sp. IMVS A-2 vis-à-vis de N.fowleri, de N. jadini et de N.gruberi. Les résultats montrent également qu'au moins deux souches de cette nouvelle espèce ont été identifiées par l'analyse immunoélectrophorétique.

### 6.2. Naegleria sp. IMVS PPMFB

Un second type est PPMFB. Six souches ont été isolées à partir de six échantillons d'eau d'un aquarium dans une maison de Port-Pirie(Australie). Un cas confirmé de méningo encéphalite ambiante primitive et plusieurs cas suspects s'étaient déclarés en cet endroit (Jamieson, 1973). Ces souches ressemblent morphologiquement aux autres espèces du genre Naegleria. Elles sont agglutinées par un antisérum anti-N.fowleri, mais l'inoculation aux animaux

est restée négative. Nous avons étudié à ce jour une de ces souches, à savoir Naegleria IMVS PPMB-6.

#### 6.2.1. Structure antigénique de Naegleria sp. IMVS PPMB-6

L'étude de la structure antigénique de Naegleria sp. IMVS PPMB-6 a été menée à l'aide d'un seul hyperimmunsérum (n° 97) homologue et de deux lots d'extraits antigéniques.

L'analyse immunoelectrophorétique d'un extrait hydrosoluble de Naegleria sp. IMVS PPMB-6 par l'hyperimmunsérum homologue 97 ( $S_{11}$ ,  $S_{12}$  et  $S_{13}$ ) permet d'objectiver au moins 26 composants antigéniques d'origine amibienne (fig. 43). Cette mosaïque antigénique s'est montrée reproductible à l'aide de deux extraits antigéniques préparés à un intervalle de 3 mois de culture axénique continue.

#### 6.2.2. Etude comparative de Naegleria sp. IMVS PPMB-6 avec N.fowleri, N.jadini et N.gruberi et Naegleria sp. A

L'analyse immunoelectrophorétique des extraits hydrosolubles de N.fowleri IMVS Morgan, N.jadini ITMAP 400, N.gruberi C.C.A.P. 1518 et Naegleria sp. IMVS A-2 par l'hyperimmunsérum anti-Naegleria sp. IMVS PPMB-6 permet d'objectiver respectivement 10, 11, 10 et 23 composants antigéniques partagés par ces espèces (fig. 44). Ces résultats sont confirmés après absorption de l'hyperimmunsérum anti-Naegleria sp. PPMB-6 au moyen des extraits hétérologues de N.fowleri, N.jadini, N.gruberi et Naegleria sp.A.

L'analyse immunoelectrophorétique de l'extrait hydrosoluble de Naegleria sp. IMVS PPMB-6 à l'aide des hyperimmunsérums anti-N.fowleri, anti-N.jadini, anti-N.gruberi et anti-Naegleria sp.A permet d'objectiver 11, 15, 13 et 22 composants antigéniques en commun.

L'analyse immunoelectrophorétique des extraits antigéniques de Naegleria sp. IMVS A et PPMB nous a permis d'objectiver une structure antigénique nettement apparentée, mais cependant distincte chez ces deux souches. Il faudrait une étude comparative plus approfondie de ces deux espèces avant de conclure définitivement à la distinction absolue.

### 7. Parentés antigéniques du genre Naegleria

Les affinités immuno-chimiques des espèces appartenant au genre Naegleria reflètent fidèlement leurs relations taxonomiques. L'ensemble des

parentés observées au sein du genre Naegleria sont rassemblées dans le tableau 6.

Tableau 6. Parentés antigéniques du genre Naegleria (réactions croisées minimales observées en immunoelectrophorèse.

Antigènes Hyperimmunsérums	<u>N.fowleri</u>	<u>N.jadini</u>	<u>N.gruberi</u>	<u>Naegleria</u> sp. A	<u>Naegleria</u> sp. PPMFB
<u>N. fowleri</u>	27	14	12	10	11
<u>N. jadini</u>	14	35	14	16	15
<u>N. gruberi</u>	12	14	25	13	13
<u>Naegleria</u> sp. A	10	11	13	24	22
<u>Naegleria</u> sp. PPMFB	10	11	10	23	26

Du point de vue qualitatif, le tableau montre que les parentés antigéniques observées en immunoelectrophorèse entre les différentes espèces du genre Naegleria sont remarquablement importantes.

Les parentés antigéniques entre N.fowleri et N. jadini concernent environ la moitié de leur structure antigénique alors que les parentés entre N. fowleri et N.gruberi concernent moins que la moitié de leurs structures antigéniques révélées.

Les parentés antigéniques entre N.jadini et N.gruberi concernent environ le tiers de leurs structures antigéniques.

Les parentés antigéniques entre Naegleria sp. A avec N. fowleri, N. jadini et N. gruberi concernent environ la moitié de leurs structures antigéniques alors que les parentés entre Naegleria sp. A et Naegleria sp. PPMFB concernent la presque totalité de leurs structures antigéniques.

Les trois espèces N. fowleri, N. jadini et N. gruberi ne partagent que cinq composants antigéniques. Ceux-ci représentent semble-t-il la structure immuno-chimique fondamentale du genre Naegleria. En effet, un hyperimmunsérum anti-N.jadini épuisé préalablement par un antigène N. fowleri et opposé en immunoelectrophorèse à N. gruberi révèle encore 7 composants antigéniques en commun. N. gruberi et N. jadini partagent un minimum de 12 composants antigéniques et 5 composants étant absorbés par N. fowleri, il s'ensuit qu'un minimum de 5 composants antigéniques est partagé par ces trois espèces.

De plus, N. jadini occupe réellement une position phylogénique intermédiaire entre N.fowleri et N. gruberi. Un hyperimmunsérum anti-N.fowleri épuisé par N. jadini et opposé à N.gruberi ne permet plus d'observer de composants antigéniques en immunoélectrophorèse.

#### 8. Conclusion.

La reproductibilité et la finesse de l'analyse immunoélectrophorétique permettent d'attribuer à cette méthode un rôle privilégié pour l'identification des espèces appartenant au genre Naegleria, étant donné l'homogénéité des caractères morphologiques.

Ainsi, au sein du genre Naegleria, nous avons pu mettre en évidence une distinction antigénique nette entre N. gruberi, N. fowleri et N. jadini. Nous pensons que le genre renferme d'autres espèces distinctes : l'analyse immunoélectrophorétique met en évidence chez les souches "A" et "PPMFB" une différence antigénique concernant le tiers des composants de N. fowleri et la moitié environ des composants de N.gruberi et de N. jadini.

Les parentés importantes observées au sein du genre Naegleria sont de l'ordre de 10 à 19 composants antigéniques et d'autre part la spécificité marquée s'exprime au niveau de la moitié environ des antigènes. Ces différences accusées entre espèces voisines des protozoaires libres témoignent d'un potentiel évolutif marqué de la part du genre. Cette diversification est d'autant plus frappante si l'on considère l'homogénéité morphologique du genre Naegleria. L'analyse immunoélectrophorétique permet ainsi de révéler l'existence de profonds remaniements moléculaires, sous-jacents au conservatisme des structures morphologiques.

-----

CHAPITRE 4

Sreucture antigénique du genre Acanthamoeba

---

It is a luxury to be understood.

Ralph Waldo Emerson.

Le genre Acanthamoeba comprend un nombre considérable d'espèces décrites sous des noms bien déterminés. Le nom générique d'Acanthamoeba souvent discuté, est mis en synonymie par plusieurs auteurs avec Hartmannella et Mayorella.

L'aspect morphologique des amibes appartenant à ce genre, est bien homogène. C'est pourquoi, plusieurs auteurs ont entrepris des études biologiques, biochimiques et sérologiques (Adam, 1964, 1969, 1973; Schmöller, 1964; Siddiqui et Balamuth, 1966). De ces travaux, il ressort que beaucoup d'espèces étudiées présentent les mêmes caractères que l'espèce A. castellanii.

Les travaux les plus importants de ces dernières années portant sur la définition du genre Acanthamoeba, sont ceux de Pussard (1966, 1972, 1974) et de Page (1967). Leur position est ferme et en faveur de la séparation des genres Acanthamoeba et Hartmannella. En ce qui concerne l'identification des espèces, ils se basent principalement sur les caractères morphologiques et les caractères mitotiques. Parmi les caractères morphologiques l'aspect du kyste peut être retenu comme un des plus importants des caractères morphologiques. Il faut néanmoins tenir compte d'une étonnante variabilité de la paroi kystique au sein d'une population clônée. Les caractères mitotiques, homogènes au sein du genre Acanthamoeba ne nous paraissent pas suffisants pour séparer les espèces. Il était donc souhaitable de comparer des structures représentant l'ensemble de l'organisme.

En nous basant sur les résultats obtenus par l'étude immunostructurale du genre Naegleria, il nous a semblé utile de comparer quelques espèces appartenant au genre Acanthamoeba afin d'essayer d'éliminer quelques problèmes de synonymie, et de déterminer les spécificités ainsi que les parentés des espèces appartenant à ce genre. Nous avons abordé cette étude au moyen d'hyperimmunsérums anti-A.culbertsoni et anti-Acanthamoeba sp. Neff. A l'aide de ces hyperimmunsérums nous avons pu comparer successivement les structures antigéniques de A.culbertsoni souche A.1., Acanthamoeba sp. Neff, A.castellanii souche 1930, A.castellanii souche Hutner, A. rhyodes souches Adam et C.C.A.P.

1534/3, A. polyphaga souche P.23, A. terricola souche 425, A. palestiniensis souche Reich et A. astronyxis souche Ray.

1. Etude antigénique du milieu de culture.

Les structures antigéniques d'amibes du genre Acanthamoeba ont été analysées à partir des formes végétatives obtenues en culture axénique.

Dans le but de contrôler l'analyse des antigènes amibiens, l'antigénicité du milieu culture "C.G.V." est contrôlée chez tous les hyperimmunsérums obtenus contre A. culbertsoni et Acanthamoeba sp. Neff. Un seul hyperimmunsérum révèle un arc de précipitation vis-à-vis de l'antigène "C.G.V.". Cet hyperimmunsérum a été écarté dans cette étude.

Nous avons déjà pu observer lors de l'étude antigénique du milieu de culture ajouté de sérum "C.G.V.S.", que l'analyse immunoélectrophorétique des différents constituants de ce milieu ne révèle que seulement le sérum de veau et le sérum de veau foetal sont responsables de la présence d'anticorps contaminants.

Pour cette raison nous n'avons pas trouvé nécessaire de préparer un hyperimmunsérum anti-"C.G.V.". Nous nous sommes contentés de contrôler systématiquement dans les hyperimmunsérums anti-Acanthamoeba la présence d'anticorps anti-"C.G.V."

2. Structure antigénique de A. culbertsoni

La découverte d'un pouvoir pathogène pour les animaux et pour l'homme a accru considérablement l'intérêt que présente cette amibe. Elle a été classifiée par Singh et Das (1970) comme espèce nouvelle et distincte et a été décrite par Culbertson (1959) comme un contaminant des cultures de rein de singe.

A. culbertsoni est capable de provoquer, tout comme N. fowleri une méningo-encéphalite chez les animaux et probablement aussi chez l'homme (Jager et Stamm, 1972).

La souche que nous avons étudiée (A-1) est une subculture de la souche isolée par Culbertson. Son pouvoir pathogène a été testé in vivo à plusieurs reprises.

L'étude de la structure antigénique de A.culbertsoni a été réalisée en se basant sur les réponses antigéniques de 2 lapins et à l'aide de 3 lots d'extraits antigéniques. Parmi les hyperimmunsérums obtenus (N°s 70 et 71) le N° 71 (S5, S7 et S10) a été retenu par son pouvoir de révélation élevé. Cet hyper-immunsérum a servi de référence pour l'ensemble de cette étude.

L'analyse immunoélectrophorétique d'un extrait hydrosoluble d'A.culbertsoni souche A-1 par l'hyperimmunsérum homologue 71<sub>S10</sub> permet d'objectiver au moins 25 composants antigéniques d'origine amibienne (fig.45). Cette "mosaïque" antigénique s'est montrée stable et reproductible à l'aide de trois extraits antigéniques préparés à un intervalle de 17 mois de culture continue.

### 3. Structure antigénique d'Acanthamoeba sp.Neff.

---

Acanthamoeba sp. Neff (Neff, 1957) est considérée comme étant A.castellanii, espèce type de genre Acanthamoeba, par Adam (1964) et Page (1967).

Nous avons choisi cette souche, au début de notre étude, en raison de la difficulté d'obtenir une subculture de la souche originelle isolée par Castellani en 1930. (Castellani, 1931). Depuis nous avons pu obtenir la souche d'origine grâce à l'obligeance de I.de Carneri.

L'étude immunostructurelle d'Acanthamoeba sp.Neff a été menée à l'aide de six hyperimmunsérums et de trois lots d'extraits antigéniques.

L'analyse immunoélectrophorétique d'un extrait hydrosoluble d'Acanthamoeba sp. Neff par les hyperimmunsérums homologues 62 et 71 (62<sub>S3</sub>, S5, S6 et 71<sub>S5</sub>, S7, et S10), permet d'objectiver au moins 26 composants antigéniques d'origine amibienne (fig. 46). Cette "mosaïque" antigénique s'est montrée stable et reproductible au cours de l'immunisation de plusieurs lapins avec les trois lots d'extraits antigéniques.

3.1. Comparaison d'Acanthamoeba sp.Neff avec deux souches de A. castellanii.

---

Nous avons voulu vérifier l'identité d'Acanthamoeba sp.Neff avec A.castellanii afin de confirmer les observations de Adam (1964), de Page (1967) et de Cerva (1967). Nous avons successivement étudié les souches A.castellanii provenant du laboratoire de S.H. Hutner et la souche originelle d'A. castellanii isolée en 1930 par Castellani.

L'analyse immunoélectrophorétique des extraits antigéniques d'A.castellanii souches Hutner et 1930 par l'hyperimmunsérum (62 et 73) anti-Acanthamoeba sp. Neff, permet d'observer la présence de structure apparemment isologue à celles observées en réaction homologue. Après absorption de l'hyperimmunsérum anti-Acanthamoeba sp.Neff par les extraits hétérologues des souches Hutner et 1930 aucun anticorps dirigé contre l'extrait homologue et l'extrait hétérologue n'est plus objectivé en Ouchterlony, ni après l'analyse immunoélectrophorétique (fig.47).

Cette observation établit l'identité de ces trois souches au niveau des composants antigéniques révélés. Acanthamoeba sp. Neff tombe en synonymie et devient A.castellanii souche Neff.

4. Structures antigéniques comparées d'A.culbertsoni et d'A.castellanii

---

Cette analyse comparative est successivement effectuée à l'aide des hyperimmunsérum anti-A.culbertsoni souche A-1 et et anti- A.castellanii souche Neff.

Figure 45

Mosaïque immunoélectrophorétique d'A.culbertsoni A-1.

Vingt-cinq composants sont objectivés sur l'immunoélectrophorégrammes.

Figure 46

Mosaïque immunoélectrophorétique d'A.castellanii Neff.

Vingt-six composants sont objectivés sur l'immunoélectrophorégramme.

Figure 47

Réactions croisées entre A.castellanii Neff et A.castellanii 1930.

L'analyse immunoélectrophorétique montre leur similitude antigénique.

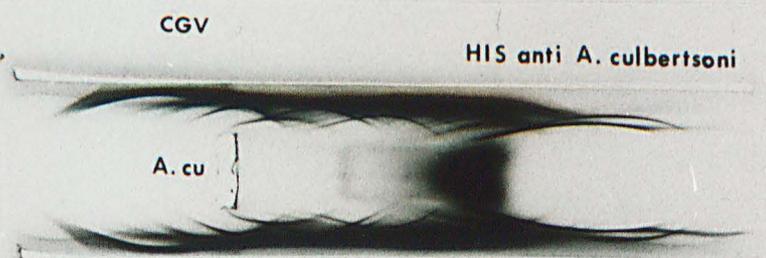
L'hyperimmunsérum anti-A.castellanii Neff absorbé par l'extrait hétérologue d'A.castellanii 1930 ne révèle aucune spécificité antigénique chez la souche homologue.

Figure 48

Comparaison immunoélectrophorétique des extraits d'A.culbertsoni et d'A.castellanii (A.sp.N.) à l'aide d'un hyperimmunsérum anti-A.culbertsoni (souche A-1). Vingt-cinq et quatorze composants sont respectivement objectivés.

Figure 49

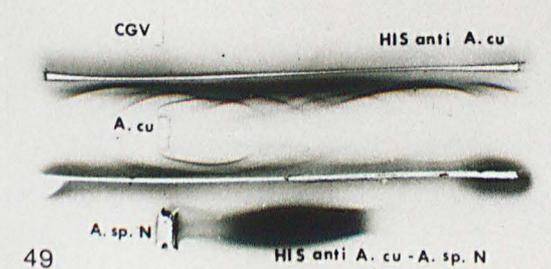
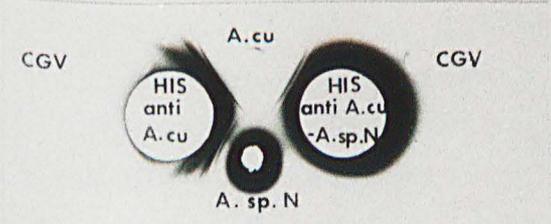
Spécificités antigéniques d'A.culbertsoni A-1. Le contrôle de l'épuisement en double diffusion et la caractérisation immunoélectrophorétique montre les spécificités antigéniques d'A.culbertsoni après l'épreuve d'absorption croisée.



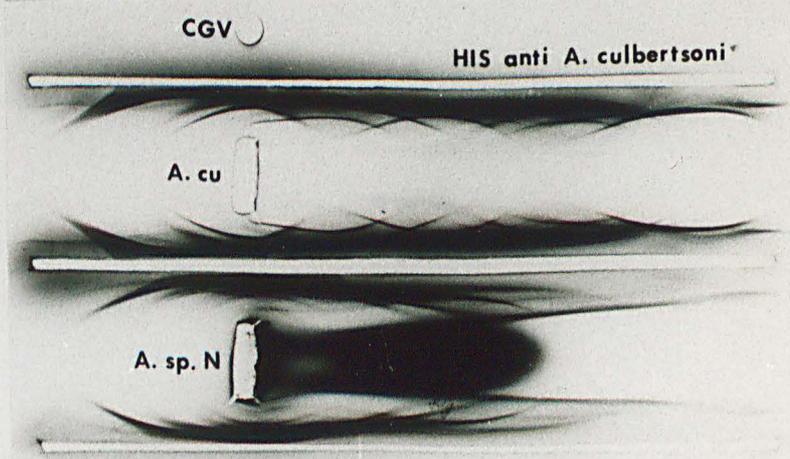
45 CGV



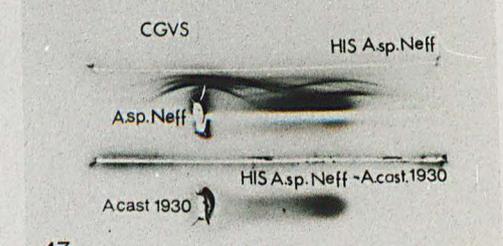
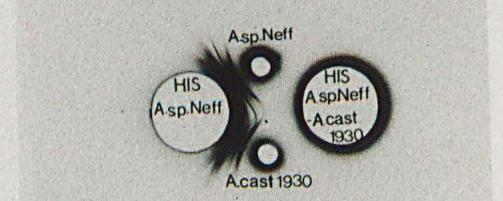
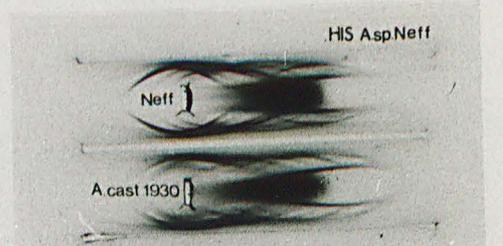
46 CGV



49



48 CGV



47

#### 4.1. Hyperimmunsérum anti-A.culbertsoni A-1

L'hyperimmunsérum anti-A. culbertsoni objectivant en réaction homologue 25 composants antigéniques, opposé à l'extrait hydrosoluble d'A.castellanii Neff, permet d'objectiver en immunoélectrophorèse 14 composants antigéniques partagés par les deux espèces (fig. 48).

Il apparaît donc que A. culbertsoni se distingue de A. castellanii par un minimum de 11 composants antigéniques. Après épuisement par l'extrait hétérologue de A. castellanii Neff, l'hyperimmunsérum anti-A.culbertsoni révèle encore 11 composants antigéniques en réaction homologue tandis qu'en réaction hétérologue aucun composant n'est révélé (fig. 49).

#### 4.2. Hyperimmunsérums anti-A. castellanii Neff.

Un hyperimmunsérum anti-A.castellanii Neff objectivant en réaction homologue 26 composants antigéniques, opposé à l'extrait hydrosoluble d'A.culbertsoni permet d'objectiver en immunoélectrophorèse 14 arcs de précipitation partagés par les deux espèces (fig. 50).

Il apparaît donc qu'A. castellanii se distingue de A. culbertsoni par un minimum de 12 composants antigéniques. Après épuisement par l'extrait hétérologue d'A.culbertsoni, l'hyperimmunsérum anti-A.castellanii Neff détermine encore 12 composants antigéniques en réaction homologue, tandis qu'en réaction hétérologue aucun composant n'est révélé (fig. 51). Ces résultats sont en parfaite confirmation avec ceux précédemment obtenus. Ces résultats permettent d'établir l'indépendance immunostructurelle d'A.culbertsoni et d'A.castellanii.

La spécificité marquée des espèces ainsi que l'importance des parentés antigéniques observées sont de l'ordre de la moitié environ de leurs structures antigéniques respectives.

5. Structures antigéniques comparées d'A.culbertsoni avec d'autres espèces appartenant au même genre

---

Dans cette étude nous avons comparé les structures antigéniques de A. polyphaga, A. rhyodes, A. terricola, A. palestinensis et A. astronyxis à l'aide d'un hyperimmunsérum anti-A. culbertsoni. Les parentés ont été établies à l'aide de deux lots d'extraits antigéniques de A. rhyodes et de A. astronyxis. Un seul lot a été préparé pour les autres espèces. En ce qui concerne A. rhyodes, deux lots d'antigène ont été obtenus à partir de deux souches d'origine différente. Ces souches sont probablement des subcultures de la même souche, originelle de Singh. Aucun hyperimmunsérum n'a été préparé vis-à-vis de ces espèces.

L'analyse immunoélectrophorétique des extraits antigéniques de A. polyphaga, A. rhyodes, A. terricola, A. palestinensis et A. astronyxis par l'hyperimmunsérum N°71 anti-A.culbertsoni objectivant en réaction homologue 25 composants antigéniques, permet d'objectiver respectivement 9, 11, 10, 15 et 16 composants antigéniques en commun (fig. 52).



Il apparait donc que A. culbertsoni se distingue d'A. polyphaga par 9 composants antigéniques, d'A. rhyodes par 11 composants, d'A. terricola par 9 composants antigéniques, d'A. palestinensis par 10 composants et d'A. astronyxis par 9 composants antigéniques. Ces résultats sont confirmés après l'absorption de l'hyperimmunsérum anti-culbertsoni par les extraits hétérologues.

A. culbertsoni se diversifie très nettement des autres espèces étudiées. Ses parentés antigéniques, de l'ordre de 9 à 16 composants, sont importantes mais d'autre part, sa spécificité marquée s'exprime au niveau de la moitié au tiers environ de ses antigènes.

6. Parentés antigéniques comparées d'A. castellanii avec A. terricola, A. polyphaga et A. rhyodes.

Ce groupe d'espèces appartenant au genre Acanthamoeba est morphologiquement très homogène. Plusieurs de ces espèces sont mises en synonymie par Singh et Das (1970) et par Page (1967). En raison de ce problème de systématique nous avons d'abord étudié les parentés antigéniques de ce groupe pour élucider la confusion actuelle due au double emploi de plusieurs noms spécifiques.

6.1. Structure antigénique comparée d'A. castellanii avec A. terricola.

A. terricola (Pussard, 1964) est une souche morphologiquement semblable à A. castellanii. La comparaison de sa structure antigénique par rapport à celle de A. castellanii a été effectuée à l'aide d'un seul extrait hydrosoluble de la souche 425 d'A. terricola.

L'hyperimmunsérum anti-A. castellanii souche Neff, opposé en immunoélectrophorèse à A. terricola permet d'observer une structure antigénique apparemment semblable à celle observée en réaction homologue. Après épuisement de l'hyperimmunsérum anti-A. castellanii par l'extrait <sup>hétérologue</sup> d'A. terricola aucun anticorps dirigé contre l'extrait homologue et l'extrait hétérologue n'est plus objectivé. Ceci établit l'identité de ces souches au niveau des systèmes précipitants objectivés. Une confirmation au moyen d'un hyperimmunsérum anti-A. terricola est souhaitable et permettra d'établir l'identité absolue.

6.2. Structure antigénique comparée d'A. castellanii avec A. polyphaga et A. rhyodes.

Cette comparaison a été effectuée à l'aide d'un extrait antigénique de la souche P.23 d'A. polyphaga et de 2 extraits d'A. rhyodes, provenant de deux souches d'origine différente.

Un hyperimmunsérum anti-A. castellanii objectivant en réaction homologue 26 composants antigéniques, opposé aux extraits hétérologues de A. polyphaga et A. rhyodes (deux souches) permet d'objectiver en immunoélectrophorèse respectivement 21 et

Figure 50

Comparaison immunoélectrophorétique des extraits d'A.castellanii Neff (A.sp.N.) et d'A.culbertsoni (A.cu) à l'aide d'un hyperimmunsérum anti-A.castellanii Neff. Vingt-six et quatorze composants sont respectivement objectivés.

Figure 51

Spécificités antigéniques d'A.castellanii Neff.

Le contrôle de l'épuisement des réactions croisées en double diffusion et la caractérisation immunoélectrophorétique permet d'objectiver les spécificités antigéniques d'A.castellanii Neff après l'épreuve d'absorption croisée.

Figure 52

Comparaison immunoélectrophorétique des extraits d'A.culbertsoni, d'A.palestinensis, d'A.terricola et d'A.astronyxis menée à l'aide d'un hyperimmunsérum anti-A.culbertsoni.

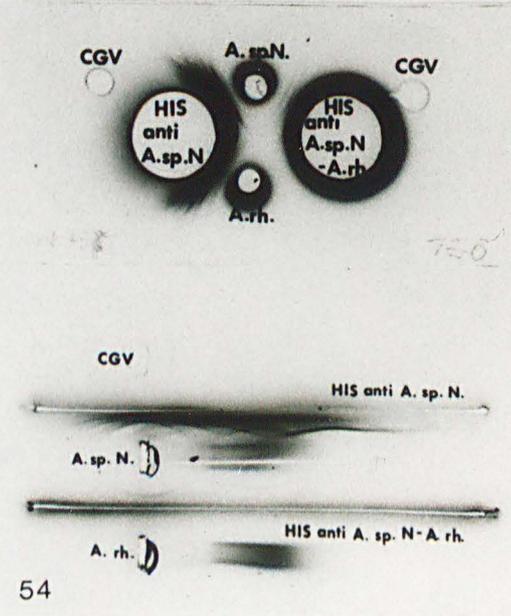
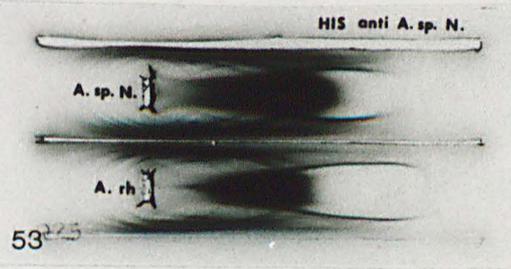
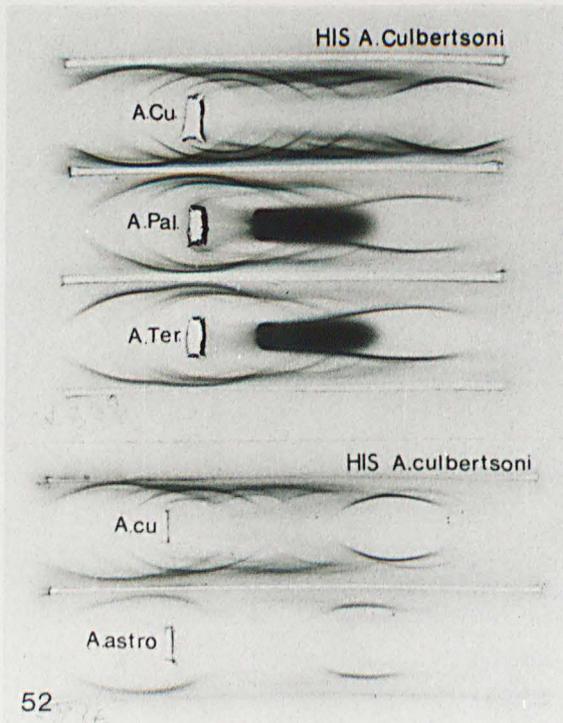
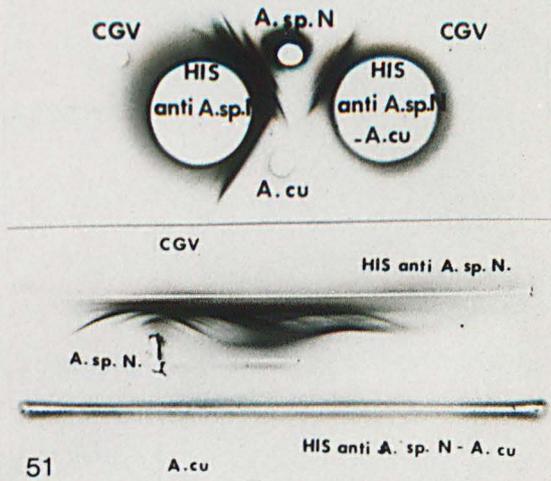
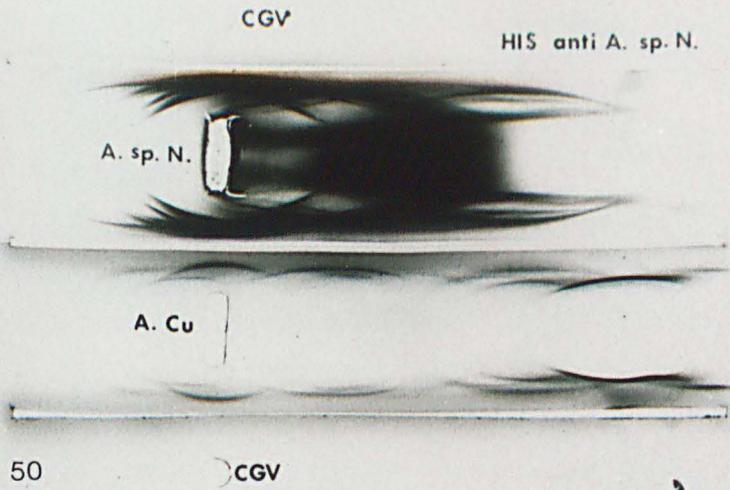
Figure 53

Comparaison immunoélectrophorétique des extraits d'A.castellanii Neff (A.sp.N.) et d'A.rhysodes (A.rh.) menée à l'aide d'un hyperimmunsérum anti-A.castellanii Neff.

Figure 54

Spécificités antigéniques d'A.castellanii Neff.

L'hyperimmunsérum anti-A.castellanii Neff absorbé par l'extrait de la souche hétérologue d'A.rhysodes permet de révéler les spécificités antigéniques chez la souche homologue.



23 composants antigéniques partagés par ces souches (fig. 53). Il apparaît donc qu'A. castellanii se distingue d'A. polyphaga par un minimum de 4 composants antigéniques et d'A. rhysodes par un minimum de 3 composants antigéniques (fig. 54).

Ces résultats sont confirmés après absorption de l'hyperimmunsérum anti-A. castellanii par les extraits hétérologues d'A. polyphaga et d'A. rhysodes.

Les parentés antigéniques entre A. castellanii et A. polyphaga et A. rhysodes sont très importantes et concernent un peu plus des 4/5 de leurs structures antigéniques respectives. Ces trois espèces différentes sont antigéniquement très apparentées et peuvent être considérées comme un groupe homogène, au sein du genre Acanthamoeba, comme le suggéraient d'ailleurs leurs caractères morphologiques.

### 6.3. Structure antigénique comparée d'A. castellanii avec A. palestinensis et A. astronyxis.

---

Cette étude a été effectuée à l'aide d'un lot d'extrait d'A. palestinensis et de 2 lots d'extraits antigéniques d'A. astronyxis. A. palestinensis a été originalement décrit comme étant Mayorella palestinensis par Reich (1936).

Les hyperimmunsérums n°62 et 73 anti-A. castellanii souche Neff utilisés pour cette comparaison révèlent respectivement 26 et 22 composants immunoélectrophorétiques en réaction homologue. Opposés aux extraits hydrosolubles d'A. palestinensis et d'A. astronyxis, ils montrent la présence respectivement de 17 et 14 composants immunoélectrophorétiques apparentés (fig. 55). Ces parentés correspondent à une isologie de l'ordre des 3/5 de la structure observée. Il est à remarquer que la proportion des antigènes apparentés reste la même lorsqu'elle est déterminée à l'aide d'hyperimmunsérums de force inégale.

Réciproquement la spécificité antigénique d'A. castellanii a été déterminée par l'épreuve d'absorption. Après épuisement de l'hyperimmunsérum n°62 à l'aide des extraits lyophilisés d'A.

palestinensis et d'A. astronyxis, 9 et 12 composants restent révélés en réaction homologue (fig 56). La spécificité antigénique d'A. castellanii vis-à-vis d'A. palestinensis et d'A. astronyxis intéresse donc environ les 2/5 de sa structure antigénique révélée en immunoélectrophorèse, en accord avec le degré d'apparement observé précédemment.

En conséquence, l'indice d'isologie antigénique entre ces trois espèces est d'environ trois cinquièmes. La parfaite complémentarité observée entre isologie et spécificité témoigne de la fidélité et de la reproductibilité de l'analyse immunoélectrophorétique, lorsque celle-ci est menée de façon normalisée à l'aide de sérums hyperimmuns et de l'épreuve d'absorption croisée.

#### 7. Parentés antigéniques du genre Acanthamoeba

---

Les affinités immunoélectrophorétiques des espèces appartenant au genre Acanthamoeba reflètent leurs relations taxonomiques. L'ensemble des parentés observées au sein du genre Acanthamoeba sont rassemblées dans le tableau 7.

Tableau 7 : Parentés antigéniques du genre Acanthamoeba  
(réactions croisées minimales observées en immunoélectrophorèse).

Hyperimmun sérum	<u>A.culbertsoni</u> A-1	<u>A.castellanii</u> Neff
<u>Antigènes</u>		
<u>A. culbertsoni</u> A-1	25	14
<u>A. castellanii</u> Neff	14	26
<u>A. castellanii</u> Hutner	14	26
<u>A. castellanii</u> 1930	14	26
<u>A. terricola</u>	14	26
<u>A. rhyodes</u>	11	23
<u>A. polyphaga</u>	9	22
<u>A. palestinensis</u>	15	17
<u>A. astronyxis</u>	16	14

Les parentés antigéniques sont remarquablement importantes entre les espèces étudiées appartenant au genre Acanthamoeba.

Nous avons pu mettre en évidence, parmi neuf souches étudiées, l'identité de quatre souches. Ces quatre souches, connues sous trois nomenclatures différentes doivent être ramenées à une seule espèce, à savoir Acanthamoeba castellanii (Volkonski, 1930). Les dénominations Acanthamoeba sp.Neff et A. terricola disparaissent et deviennent synonyme d'A. castellanii. Ce résultat témoigne ainsi de l'homogénéité antigénique de l'espèce A. castellanii.

Les parentés antigéniques entre A. culbertsoni et A. castellanii concernent un peu plus que la moitié de leurs structures antigéniques; ceci met également en évidence la spécificité marquée de ces deux espèces.

Les parentés antigéniques entre A.castellanii et A. polyphaga et A.rhysodes sont très importantes et concernent plus que les 4/5 de leurs structures antigéniques.

Les parentés antigéniques importantes, observées entre A. castellanii d'une part et A. polyphaga et A. rhysodes d'autre part, établissent une grande ressemblance de leurs structures antigéniques, supportée par leur identité morphologique. Ces trois espèces très apparentées antigéniquement et morphologiquement semblent constituer un groupe au sein du genre Acanthamoeba. Page (in litt., 1974 ) est de cet avis en ce qui concerne les caractères morphologiques.

Les spécificités d'A.castellanii vis-à-vis d'A.polyphaga et d'A.rhysodes sont peu marquées. Un hyperimmunsérum anti-A.castellanii absorbé préalablement par A. polyphaga et opposé en immunoélectrophorèse à A. rhysodes ne permet d'objectiver qu'un seul composant antigénique, tandis que ce même hyperimmunsérum absorbé préalablement par A.rhysodes ne permet plus d'objectiver de composants antigéniques vis-à-vis d'A. polyphaga.(fig. 57). Cette constatation permet d'envisager la possibilité, au sein de ce genre, la notion de celle d'"espèce" et "sous-espèce".

Les deux souches d'A. rhysodes étudiées sont probablement identiques. En effet, des hyperimmunsérums anti-A.culbertsoni et anti-A. castellanii épuisés préalablement par un extrait antigénique d'A.rhysodes (souche Adam) et opposés ensuite en immunoélectrophorèse à A. rhysodes (souche C.C.A.P.) ne permettent pas de révéler de composants antigéniques en réaction hétérologue. Cette constatation est à confirmer par un hyperimmunsérum anti-A. rhysodes.

Les espèces A. palestinensis et A. astronyxis se diversifient très nettement d'A.castellanii et leurs parentés antigéniques sont du même ordre que celles observées entre A. castellanii et A. culbertsoni et comprennent un peu moins que la moitié pour A. astronyxis et les 2/3 environ pour A. palestinensis.

Figure 55

Comparaison immunoélectrophorétique des extraits d'A.castellanii, d'A.palestinensis, d'A. terricola et d'A.astronyxis menée à l'aide d'un hyperimmunsérum anti-A.castellanii Neff.

Figure 56

Spécificités antigéniques d'A.castellanii Neff révélées par absorption croisée de l'hyperimmunsérum anti-A.castellanii par les extraits hétérologues d'A.palestinensis et d'A.astronyxis.

Figure 57

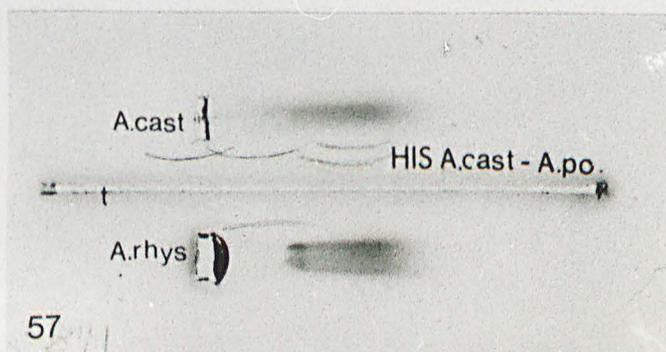
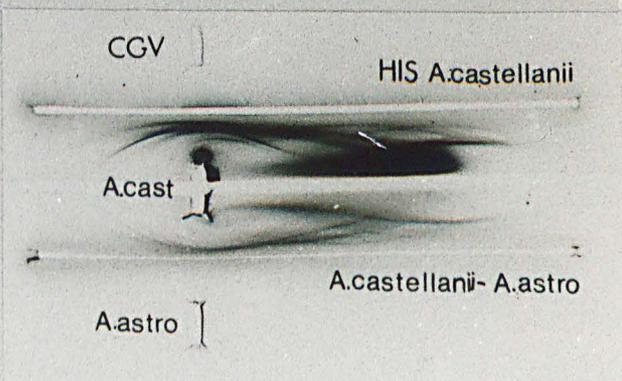
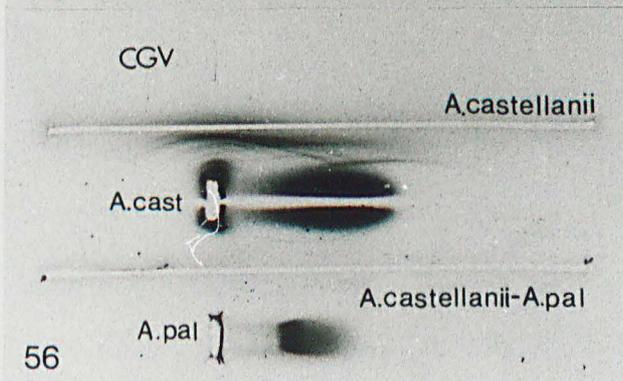
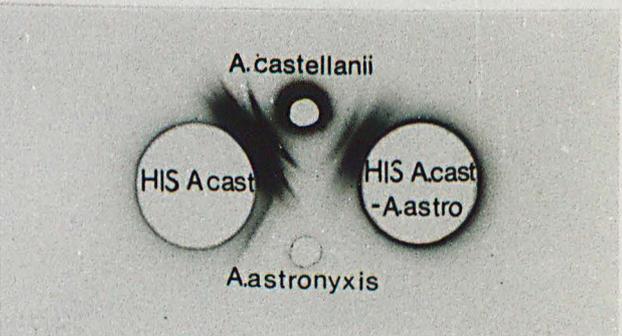
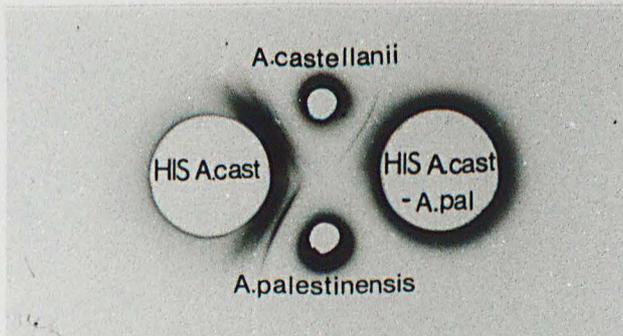
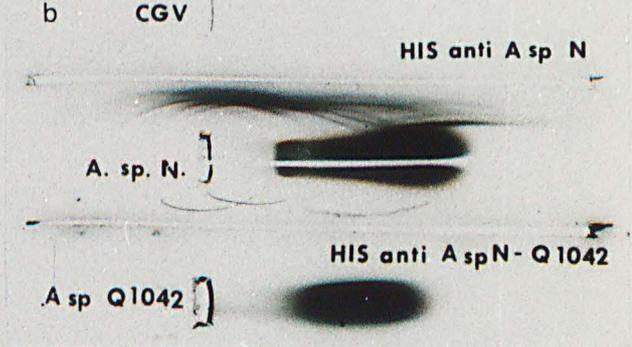
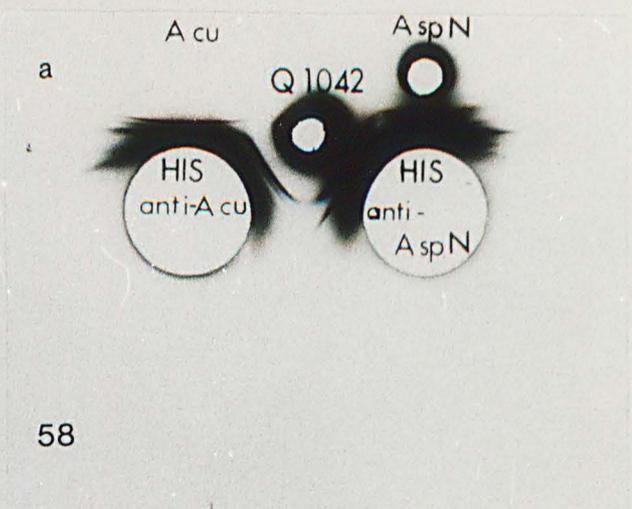
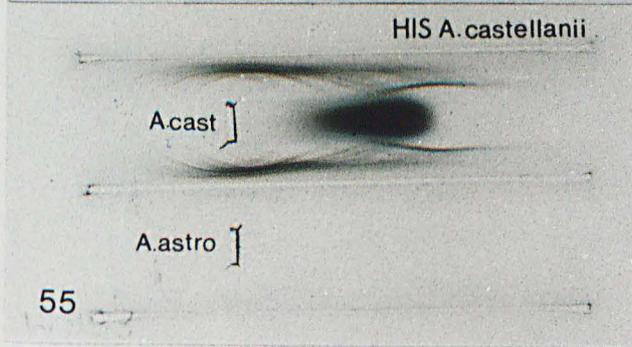
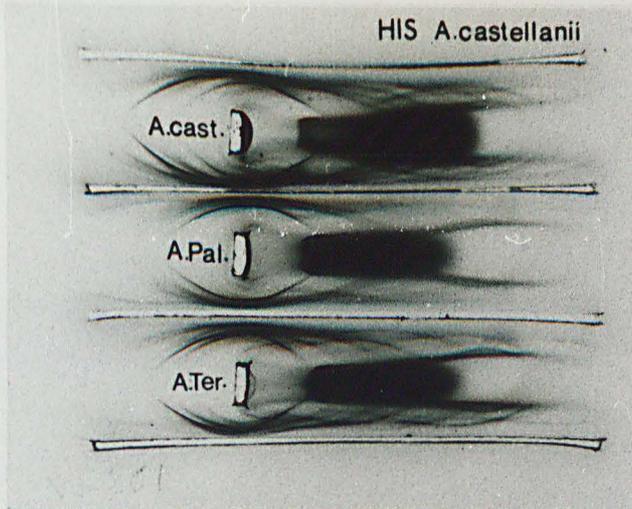
Spécificités antigéniques d'A.castellanii Neff et d'A.rhysodes révélées par un hyperimmunsérum anti-A.castellanii Neff préalablement absorbé par un extrait antigénique d'A.polyphaga. Quatre et un composants antigéniques sont respectivement objectivés.

Figure 58

a) Réactions croisées en double diffusion des extraits antigéniques d'A.culbertsoni (A.a), d'A.castellanii (A.sp.N.) et d'Acanthamoeba sp. ITMAP A042 objectivées à l'aide des hyperimmunsérum anti-A.culbertsoni et anti-A.castellanii.

b) Spécificités antigéniques d'A.castellanii Neff révélées par absorption croisée de l'hyperimmunsérum anti-A.castellanii Neff par l'extrait hétérologue d'Acanthamoeba sp. ITMAP 1042.

Trois composants antigéniques sont encore révélées en réaction homologue.



A. culbertsoni se diversifie très nettement des autres espèces étudiées. Ses parentés antigéniques, de l'ordre de 9 à 16 composants, sont importantes mais d'autre part sa spécificité marquée s'exprime au niveau de la moitié environ de ses antigènes. A. culbertsoni est indiscutablement l'espèce antigéniquement la plus indépendante au sein du genre Acanthamoeba. Remarquons encore que les quatre souches d'A. castellanii étudiées à l'aide de l'hyperimmunsérum anti-A. culbertsoni révèlent le même nombre de composants antigéniques en parfait accord avec les observations faites à l'aide de l'hyperimmunsérum anti-A. castellanii.

8. Essai d'identification immunoélectrophorétique de quelques espèces d'Acanthamoeba isolées au laboratoire.

---

Parmi les nombreuses souches d'Acanthamoeba isolées dans le Département de Protozoologie du Professeur J.B. Jadin, nous en avons choisi quelques unes pour tenter de les identifier à l'aide de l'analyse immunoélectrophorétique au moyen des seuls hyperimmunsérum dont nous disposons.

Nous avons successivement étudié les souches Acanthamoeba sp. ITMAP 361, Acanthamoeba sp. ITMAP 1042 et Acanthamoeba sp. IMVS RUS.22. Cette dernière souche a été isolée par A. Jamieson (Adelaïde, Australie).

8.1. Acanthamoeba sp. ITMAP 361

Cette souche, isolée à partir d'une eau de piscine à Anvers, se cultive axéniquement en milieu C.G.V. à 28° C mais supporte cependant la multiplication à 37°C. Morphologiquement elle ressemble à A. castellanii. Elle a pu être transmise à la souris à plusieurs reprises par passages effectués par voie intracérébrale.

L'extrait antigénique hydrosoluble de cette souche opposé aux hyperimmunsérum anti-A.culbertsoni et anti-A.castellanii en méthode d'Ouchterlony révèle un apparentement plus proche avec A. castellanii qu'avec A.culbertsoni. L'analyse immunoélectrophorétique de l'extrait hydrosoluble d'Acanthamoeba sp.ITMAP 361 par

un hyperimmunsérum anti-A. castellanii (N°62) permet d'objectiver au moins 21 composants antigéniques partagés par les deux souches.

L'hyperimmunsérum anti-A. castellanii épuisé préalablement par l'antigène d'Acanthamoeba sp. ITMAP 361 et opposé en immunoélectrophorèse à A. castellanii permet de révéler 4 à 5 composants antigéniques en réaction homologue tandis qu'en réaction hétérologue aucun composant antigénique n'est révélé.

Cette souche se montre antigéniquement très apparentée à A. castellanii mais n'est pas isologue à la structure antigénique de cette espèce. Nous pensons néanmoins que la souche ITMAP 361 appartient au groupe A. castellanii - A. rhyodes - A. polyphaga. Le manque d'hyperimmunsérums anti-A. rhyodes et anti-A. polyphaga ne nous permet pas de réaliser l'identification complète de cette souche.

#### 8.2. Acanthamoeba sp. ITMAP 1042

Cette souche a été isolée à partir de selles diarrhéiques provenant d'un enfant hospitalisé à la Clinique Good-Engels à Anvers (Jadin et al. 1973). Cette souche se multiplie axéniquement à 28°C et ressemble morphologiquement à A. castellanii. Inoculée par voie intracérébrale elle provoque la mort de la souris. Nous avons subinoculé cette souche chez la souris à cinq reprises.

Un extrait antigénique, préparé à partir de cette souche en culture axénique, a été opposé en Ouchterlony aux hyperimmunsérums anti-A. culbertsoni et anti-A. castellanii. Cette souche s'est montrée plus apparentée à A. castellanii qu'à A. culbertsoni (fig. 58 a).

L'analyse immunoélectrophorétique de l'extrait hydrosoluble d'Acanthamoeba sp. ITMAP 1042 par un hyperimmunsérum anti-A. castellanii (N°62), permet d'objectiver une structure apparemment identique à celle objectivée en réaction homologue.

L'hyperimmunsérum anti-A. castellanii épuisé préalablement par l'antigène d'Acanthamoeba sp. ITMAP 1042 et opposé en immunoélectrophorèse à A. castellanii permet d'objectiver en réaction homologe encore 3 composants antigéniques tandis qu'en réaction hétérologue aucun composant n'est révélé (fig. 58 b).

De plus, un hyperimmunsérum anti-A. castellanii, préalablement épuisé par l'extrait hétérologue d'Acanthamoeba sp. ITMAP 1042 et opposé ensuite en immunoélectrophorèse aux antigènes d'A. rhyodes et d'A. polyphaga révèle encore au moins un composant antigénique vis-à-vis de ces deux souches.

Cette souche se montre antigéniquement différente d'A. castellanii mais néanmoins très apparentée. Nous n'avons pas pu démontrer l'identité de cette souche avec les espèces A. rhyodes et A. polyphaga mais nous avons pu constater un apparentement très étroit avec ces espèces. Nous pensons donc que la souche Acanthamoeba sp. ITMAP 1042 appartient au groupe A. castellanii-A. rhyodes - A. polyphaga.

### 8.3. Acanthamoeba sp. IMVS RUS 22

Cette souche nous a été communiquée par Jamieson (Australie). Elle a été isolée à partir du sol entourant une source d'eau chaude dans le domaine de Rotura, Nouvelle Zélande. L'eau de cette source sert entre autres à l'alimentation d'une piscine où un cas de méningo-encéphalite amibienne primitive à N. fowleri s'est produit.

Cette souche se montre potentiellement pathogène pour la souris, tant par inoculation intra-cérébrale que par l'instillation intra-nasale. Par voie intra-cérébrale elle tue la souris, entre 4 et 6 jours et après instillation intra-nasale les souris meurent entre 5 à 8 jours.

Ces tests de pathogénicité ont été répétés à plusieurs reprises dans notre laboratoire et sont une confirmation des observations faites par Jamieson. Suite à cette pathogénicité aiguë, nous

avons cru qu'il s'agissait d'une souche d'A.culbertsoni . Néanmoins, les résultats obtenus en agglutination (Jamieson, in litt.) et en immunofluorescence ont montré qu'en vérité cette souche n'appartenait pas à A. culbertsoni ni à A. castellanii. Cette souche se cultive axéniquement en milieu C.G.V. à 37°C.

Un extrait antigénique préparé à partir de cette souche a été opposé en Ouchterlony aux hyperimmunsérums anti-A.culbertsoni et anti-A. castellanii. Elle s'est montrée plus apparentée à A. castellanii .

L'analyse immunoélectrophorétique de l'extrait hydrosoluble d'Acanthamoeba sp. IMVS RUS 22 par un hyperimmunsérum anti-A.castellanii permet d'objectiver une structure apparemment isolée à celle objectivée en réaction homologue. Après absorption de l'hyperimmunsérum anti-A.castellanii par l'extrait hétérologue, aucun anticorps précipitant n'est objectivé en Ouchterlony, ni en immunoélectrophorèse aussi bien en réaction homologue qu'en hétérologue.

Ces deux souches semblent donc être identiques mais le résultat demande une confirmation à l'aide d'un hyperimmunsérum anti-Acanthamoeba sp. IMVS RUS 22.

Cette observation confirme, qu'A.castellanii peut être potentiellement pathogène pour la souris.

### Conclusion

L'identification de ces souches ne nous est pas possible en l'absence d'hyperimmunsérums anti-A.polyphaga et anti-A.rhysodes. Acanthamoeba sp. RUS 22 est probablement A. castellanii mais une confirmation par un hyperimmunsérum anti-Acanthamoeba sp. RUS 22 est souhaitable. Ces observations permettent de conclure que les souches étudiées appartiennent au groupe A. castellanii - A. polyphaga - A. rhysodes.

CHAPITRE 5

Parentés antigéniques des genres Naegleria  
et Acanthamoeba

Le climat qui convient à l'homme n'est pas celui du bonheur. C'est celui de l'inquiétude, de l'insatisfaction et de l'aspiration vers ce qui le dépasse.

Albert Vaudel

"L'homme et l'évolution".

P. 197.

La définition des structures immunoélectrophorétiques des différentes espèces appartenant aux genres Naegleria et Acanthamoeba nous a permis d'aborder l'étude de leurs relations avec des organismes situés à divers niveaux taxonomiques. Cette étude comparative <sup>été</sup> à menée en collaboration avec D. Afchain et D. Le Ray en ce qui concerne les Trypanosomidae et les organismes non apparentés.

La comparaison a concerné principalement des organismes maintenus en culture axénique. La spécificité des résultats a été assurée par l'épreuve d'absorption croisée, après épuisement systématique des hyperimmunsérums d'analyse à l'aide du milieu de culture.

Le degré d'apparentement antigénique des espèces du genre Naegleria et Acanthamoeba a été apprécié successivement au niveau de l'ordre des Amoebida, dans le phylum des Protozoa et en dehors de celui-ci.

Au niveau de l'ordre des Amoebida nous avons comparé le genre Naegleria et Acanthamoeba avec quelques espèces représentant les familles des Vahlkampfiidae, Hartmannellidae. et Entamoebidae.

Dans le phylum des Protozoa, dans le groupe-classe, la comparaison a concerné, au niveau de la classe, les Phytomostigophorea Euglena et Monas, dans les Kinetoplastida plusieurs représentants de la famille des Trypanosomatidae, et au niveau de la classe des Ciliata Tetrahymena pyriformis.

Hors du phylum, nous avons recherché l'existence de réactions croisées entre les genres Naegleria et Acanthamoeba et des organismes parasites non apparentés : Champignons et Helminthes.

#### 1. Parentés antigéniques entre les genres Naegleria et Acanthamoeba.

Les parentés antigéniques entre ces deux genres ont été établies à l'aide de cinq hyperimmunsérums différents anti-Naegleria et de deux hyperimmunsérums différents anti-Acanthamoeba.

Les analyses sont d'abord menées en méthode d'Ouchterlony et les arcs de précipitation objectivés sont ensuite localisés en

immunoélectrophorèse. Le nombre d'arcs objectivés en Ouchterlony n'est pas toujours révélé en immunoélectrophorèse. Les résultats des parentés antigéniques minimales figurant dans les tableaux correspondent au nombre de composants antigéniques localisés en immunoélectrophorèse.

1.1. Hyperimmunsérums anti-Naegleria.

Les immunoélectrophorèses ont été menées à l'aide de 8 extraits antigéniques provenant de six espèces différentes du genre Acanthamoeba. Ces antigènes ont été opposés à cinq hyperimmunsérums anti-Naegleria représentant cinq espèces différentes. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 8.

Tableau 8 : Parentés antigéniques du genre Naegleria avec le genre Acanthamoeba (réactions minimales observées en immunoélectrophorèse).

Hyperimmun- sérum	<u>N.gruberi</u>	<u>N.jadini</u>	<u>N.fowleri</u>	<u>Naegleria</u> sp A.	<u>Naegleria</u> sp.PPMFB
Antigènes					
<u>Acanthamoeba</u> sp. Neff	1	3	3	3	-
<u>A.castellanii</u>	0	1	0	0	2
<u>A. terricola</u>	0	1	0	1	1
-----					
<u>A.rhysodes</u>	0	2	1	0	0
<u>A. polyphaga</u>	0	0	0	1	0
-----					
<u>A. culbertsoni</u>	0	2	2	0	0
<u>A. palestinensis</u>	0	1	0	0	1
<u>A. astronyxis</u>	0	1	0	0	0

Les renseignements rassemblés dans le tableau 8 mettent en évidence que les parentés concernant 1 à 3 composants antigéniques sont spécifiquement partagées par certaines espèces. Ces parentés exprimées entre deux genres de familles différentes sont réduites et leur reconnaissance par le lapin est irrégulière et nécessite une immunisation prolongée. On remarquera que l'hyper-immunsérum anti-N.jadini et anti-N.fowleri(fig. 59), révélant respectivement 35 et 28 arcs de précipitations en réaction homologue, ont mis en évidence les meilleurs résultats concernant les parentés observées entre les deux genres.

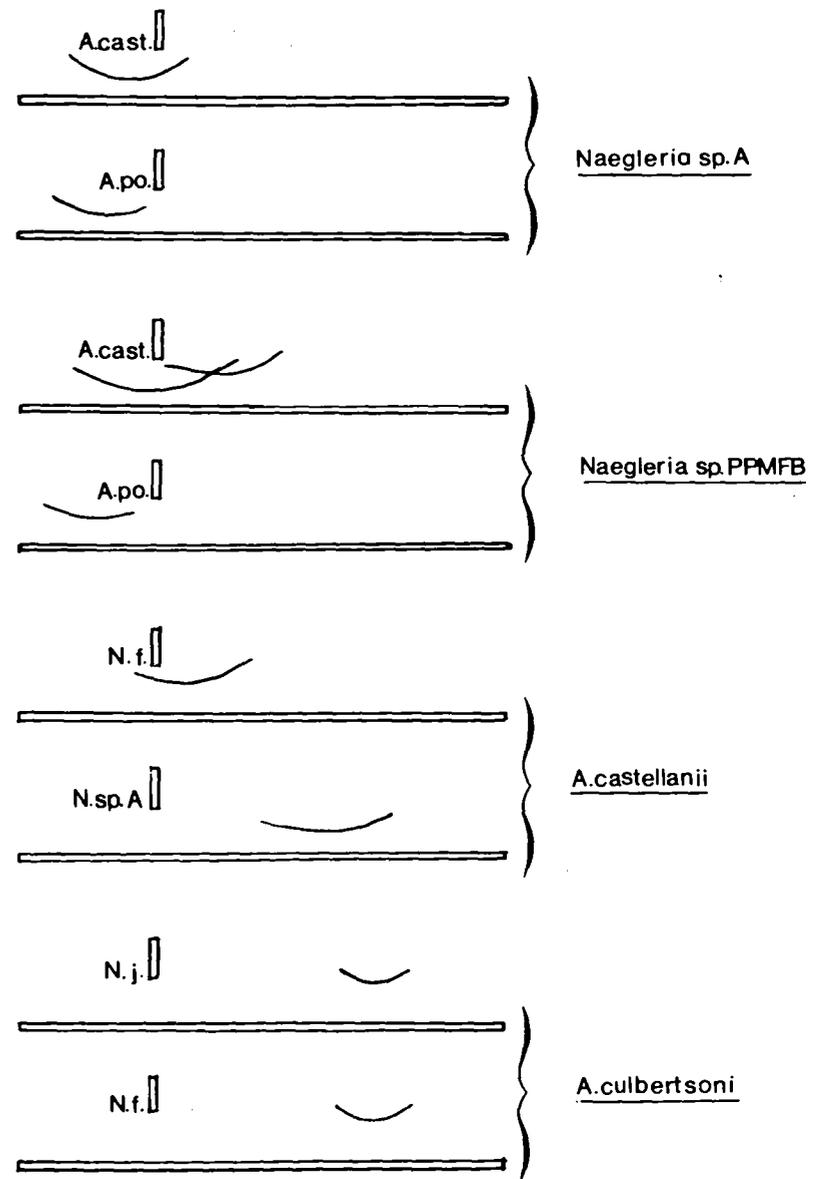
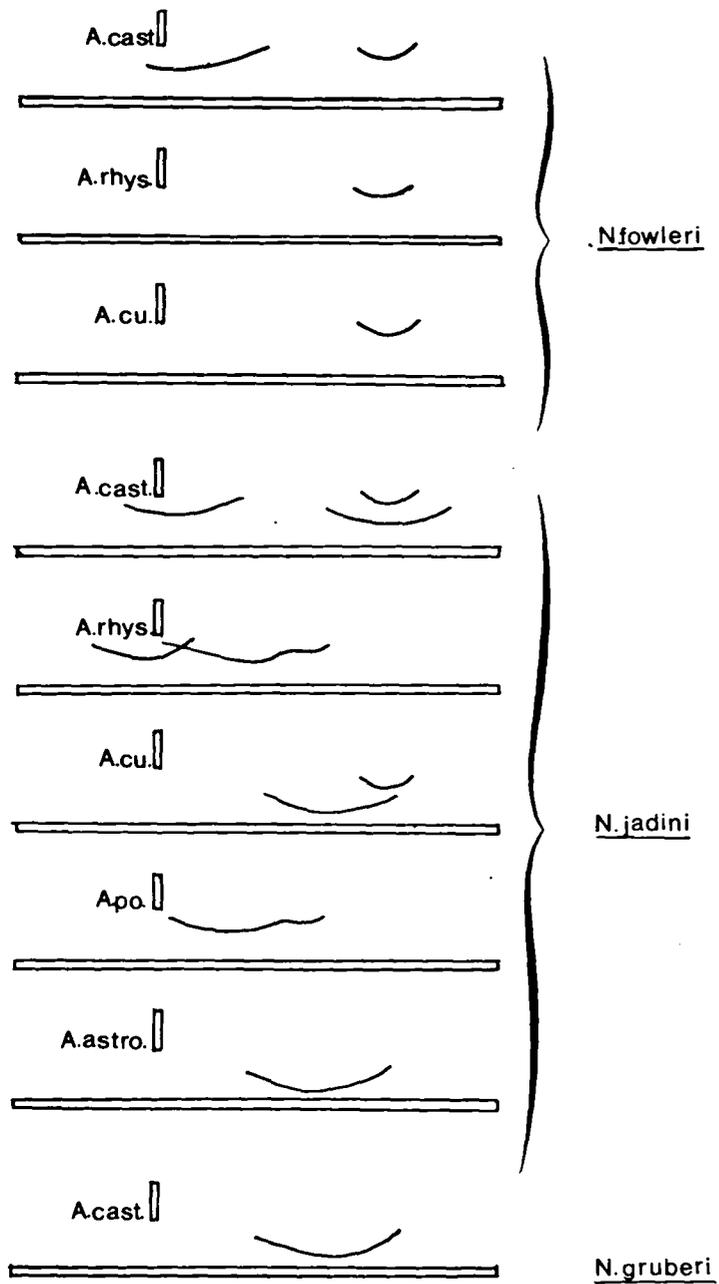


Figure 59.  
Parentés antigéniques entre les genres Naegleria et Acanthamoeba.

De plus, l'hyperimmunsérum anti-N.jadini épuisé préalablement par l'extrait antigénique d'A.castellanii souche Neff et opposé en Ouchterlony aux antigènes des autres espèces du genre Acanthamoeba ne permet de révéler aucun arc de précipitation; ceci montre que les parentés partagées par N.jadini et A. castellanii comprennent les mêmes composants partagés par N. jadini et les autres espèces du genre Acanthamoeba. Les composants partagés par ces deux genres apparaissent tardivement au cours de l'immunisation. Un antisérum de cinétique anti-N. fowleri objectivant en réaction homologue 6 composants antigéniques ne permet pas d'objectiver en double diffusion d'Ouchterlony la présence de composants antigéniques. Des hyperimmunsérums anti-Naegleria révélant moins de 20 composants antigéniques en réaction homologue n'ont pas permis de visualiser une parenté antigénique entre des espèces appartenant à ces deux genres.

#### 1.2. Hyperimmunsérums anti-Acanthamoeba.

Les immunoélectrophorèses ont été menées à l'aide de 5 extraits antigéniques provenant de cinq espèces différentes appartenant au genre Naegleria. Elles ont été opposés aux hyperimmunsérums d'A.castellanii souche Neff et d'A.culbertsoni souche A-1.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 9.

Tableau 9 : Parentés antigéniques du genre Acanthamoeba avec le genre Naegleria (réactions minimales observées en immunoélectrophorèse).

Hymmuésérums	<u>A.castellanii</u> Neff.	<u>A.culbertsoni</u> A-1
Antigens		
<u>N.gruberi</u>	0	0
<u>N.jadini</u>	0	2
<u>N.fowleri</u>	1	1
<u>Naegleria</u> sp.A.	1	0
<u>Naegleria</u> sp. PPMFB	0	0

Les résultats rassemblés dans ce tableau mettent en évidence des parentés antigéniques très réduites entre les genres Acanthamoeba et Naegleria. Ces parentés concernent 1 à 2 composants antigéniques (fig.59) spécifiquement partagés par certaines espèces, mais ceux-ci sont irrégulièrement reconnus par les lapins. Ces parentés concernent en moyenne moins d'un composant antigénique. Les parentés antigéniques les plus importantes sont révélées à l'aide des hyperimmunsérums anti-Acanthamoeba et les extraits antigéniques de N.jadini et N.fowleri comme c'était le cas dans le paragraphe précédent. Cette observation confirme la fidélité des réactions observées.

## 2. Ordre des Amoebida

Toujours par référence au genres Naegleria et Acanthamoeba, nous avons confronté leurs structures antigéniques à celles de diverses familles appartenant à l'ordre des Amoebida.

## 2.1. Vahlkampfiidae

Les Vahlkampfiidae font partie d'un groupe à position systématique controversée, généralement rangés parmi les Rhizopodes (Chatton, 1953; Kudo, 1956; Page, 1967; Singh et Das, 1970) celles-ci ont été placés "for convenience" parmi les Flagellés dans l'ordre des Rhizomastigida par le Committee de Taxonomie (1964). Cette famille comprend en effet les organismes amoeboïdes présentant au cours de leur cycle un stade flagellé illustrant ainsi les affinités fondamentales des Rhizopodes et des Flagellés.

Ces considérations nous ont conduit à examiner en détails les relations antigéniques du genre Naegleria et Acanthamoeba avec d'autres genres appartenant à la famille des Vahlkampfiidae.

Quatre hyperimmunsérums anti-Naegleria et deux hyperimmunsérums anti-Acanthamoeba ont été opposés à une souche appartenant au genre Tetramitus à savoir T. rostratus et une souche du genre Vahlkampfia, V. avara, T. rostratus représente ici un autre genre appartenant aux amoebo-flagellates tandis que chez V. avara, un stade flagellé n'as pas été mis en évidence au cours de son cycle.

Les résultats obtenus en immunoélectrophorèse sont rassemblés dans le tableau 10.

Tableau 10 : Parentés antigéniques du genre Naegleria et Acanthamoeba avec T.rostratus et V.avara.

Ag.	<u>T.rostratus</u>	<u>V. avara</u>
<u>N.gruberi</u>	4	4
<u>N. jadini</u>	2	1
<u>N.fowleri</u>	1	2
<u>Naegleria</u> sp A	0	1
<u>A.castellanii</u>	0	2
<u>A.culbertsoni</u>		1

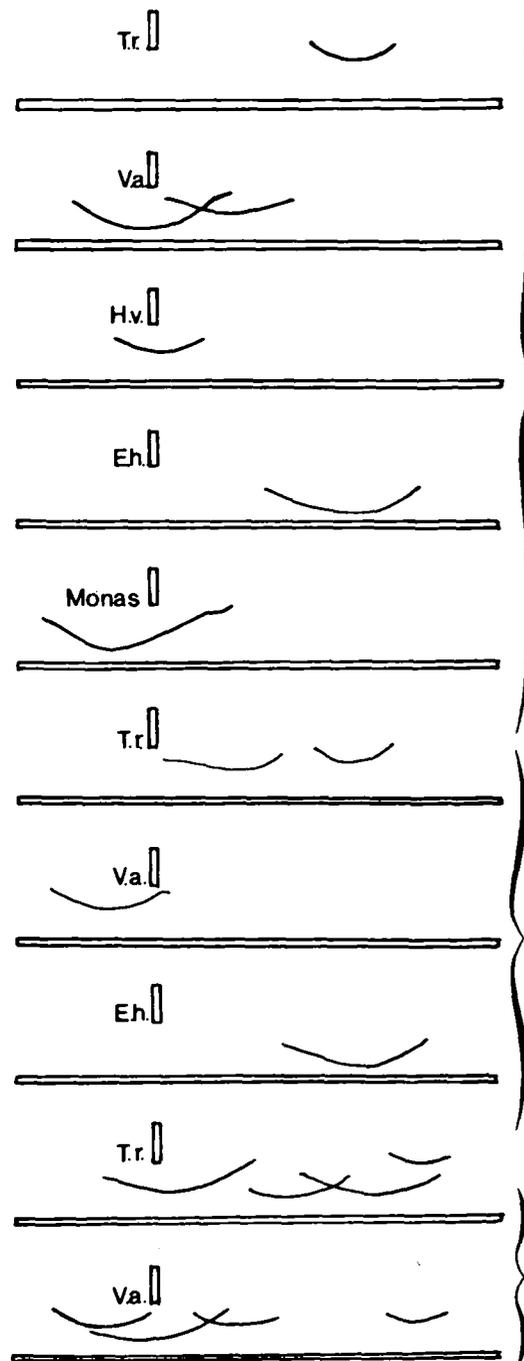
Les renseignements rassemblés dans ce tableau mettent en évidence que les parentés observées entre différents genres appartenant à la même famille sont plus importantes que les parentés observées entre genres appartenant à deux familles différentes (fig. 60).

Au sein de la famille des Vahlkampfiidae on constate que les parentés unissant deux genres différents d'amoébo-falgellates, sont aussi importantes que les parentés observées entre un genre d'amoébo-falgellate et le genre Vahlkampfia, ne produisant apparemment pas de stade flagellé temporaire.

## 2.2. Hartmannellidae

Une seule espèce appartenant au genre Hartmannella a été confrontée aux hyperimmunsérums anti-Naegleria et anti-Acanthamoeba. Le genre Acanthamoeba appartient également à la famille des Hartmannellidae, ainsi deux genres appartenant à la même famille seront confrontés.

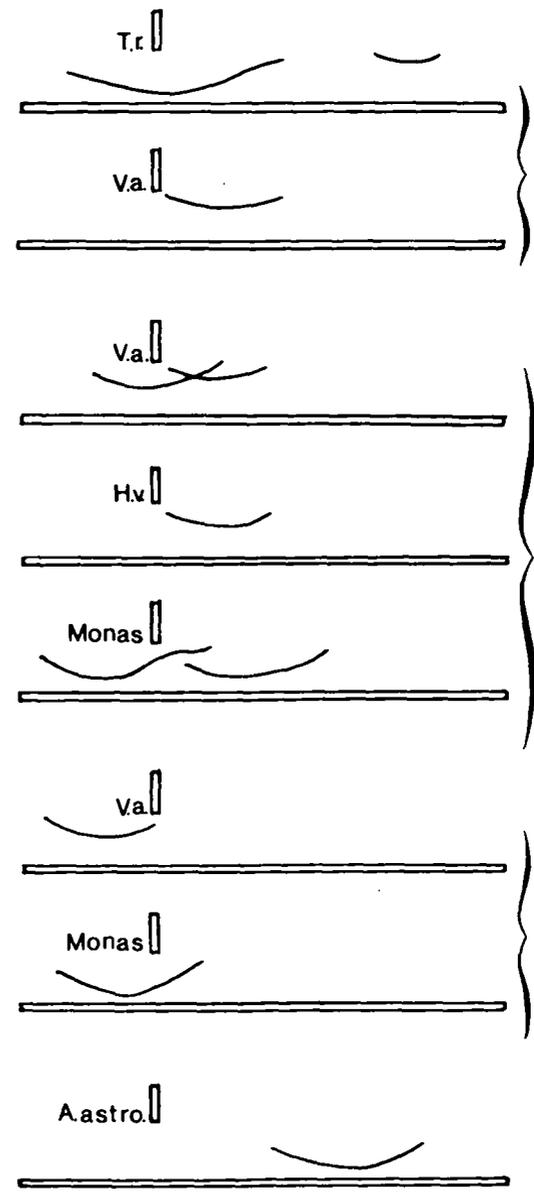
Les réactions croisées observées sont indiquées dans le tableau 11.



N.fowleri

N.jadini

N.gruberi



Naegleria sp.A

A.castellani

A.culbertsoni

E.histolytica

Figure 60.  
Parentés antigéniques des genres Naegleria  
et Acanthamoeba avec des Vahlkampfiidae, Hartmannellidae, Entamoebidae et des Phytotflagellés.

Tableau 11 : Parentés antigéniques du genre Naegleria et Acanthamoeba ave H. vermiformis. (Réactions minimales observées ou immunoélectrophorèse).

Antigène Hyperimmunsérums	<u>H. vermiformis</u>
<u>N. gruberi</u>	0
<u>N. jadini</u>	0
<u>N. fowleri</u>	1
<u>Naegleria</u> sp A	0
<u>A. castellanii</u>	1
<u>A. culbertsoni</u>	0

Les parentés observées entre genres appartenant à la même famille, ainsi que les parentés observées entre genres de familles différentes sont très minimes ou nulles. Elles peuvent être considérées comme négligeables. On remarquera qu'une disparité antigénique importante presque totale s'observe entre Acanthamoeba et Hartmannella, deux genres classifiés dans la famille des Hartmannellidae.

### 2.3. Entamoebidae.

Une seule espèce appartenant au genre Entamoeba a été confrontée aux hyperimmunsérums anti-Naegleria et anti-Acanthamoeba; il s'agit d'E. histolytica souche HK 9. Les réactions croisées ainsi que l'hyperimmunisation a été effectuée à l'aide d'un antigène de commerce (I.V.N.).

2.3.1. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 12.

Tableau 12 : Réactions croisées observées entre les genres Naegleria, Acanthamoeba et Entamoeba.

Antigène Hyperimmunsérums	<u>E. histolytica</u>
<u>N. gruberi</u>	0
<u>N. jadini</u>	1
<u>N. fowleri</u>	1
<u>Naegleria</u> sp.A	0
<u>A. castellanii</u>	0
<u>A. culbertsoni</u>	0

Ces résultats montrent que les parantés observées entre ces différents genres appartenant à différentes familles sont très réduites et négligeables.

2.3.2. Un hyperimmunsérum anti-E.histolytica objectivant en réaction homologue un minimum de 25 composants antigéniques a été opposé aux extraits antigéniques de plusieurs espèces du genre Naegleria et Acanthamoeba .

Tableau 13 : Réactions croisées observées d'E.histolytica avec Naegleria et Acanthamoeba.

Hyperimmunsérum Antigènes	<u>E. histolytica</u>
<u>N. gruberi</u>	0
<u>N. jadini</u>	0
<u>N. fowleri</u>	0
<u>Naegleria</u> sp.A	0
<u>Naegleria</u> sp PPMFB	0
<u>A.castellanii</u>	0
<u>A. culbertsoni</u>	0
<u>A. palestinensis</u>	0
<u>A. astronyxis</u>	1

Les renseignements rassemblés dans ce tableau mettent en évidence que les parentés observées entre les genres Acanthamoeba et Entamoeba sont nulles ou négligeables.

Aucune parenté n'a été observée entre Naegleria et Entamoeba.

Entre Entamoeba et Acanthamoeba seulement un composant antigénique est néés en évidence avec A. astronyxis.

En conclusion, les relations antigéniques entre Naegleria Acanthamoeba et Entamoeba sont nulles ou négligeables

### 3. Classe des Phytomastigophorea.

Les parentés antigéniques de Naegleria et Acanthamoeba avec quelques flagellés ont été appréciées en comparant l'amoéboflagellate N. fowleri et les amibes sans stade flagellé, A. castellanii, A. culbertsoni et E. histolytica à deux phytoflagellés appartenant à des ordres distincts. L'Euglénien Euglena et la Chrysomonadine Monas.

Les parentés antigéniques observées sont rassemblées dans le tableau 14.

Tableau 14 : Parentés antigéniques entre Amoebida et Phytomastigophorea.

Antigènes	<u>E. gracilis</u>	<u>Monas sp.</u>
Hyperimmunsérums		
<u>N. fowleri</u>	0	1
<u>N. jadini</u>	0	0
<u>A. castellanii</u>	0	2
<u>A. culbertsoni</u>	0	1
<u>E. histolytica.</u>	0	0

L'analyse immunoélectrophorétique d'Euglena gracilis (forme chlorophyllienne) par les hyperimmunsérums mentionnés dans le tableau 14 n'a pas permis de révéler la présence de composants antigéniques communs.

L'examen d'un organisme aplastidié, Monas sp., appartenant à un groupe distinct de Phytoflagellés, à l'aide des hyperimmunsérums anti-N.fowleri, anti-A.castellanii, anti-A.culbertsoni et anti-E. histolytica a révélé qu'un seul composant est partagé par ce protiste et par Naegleria, 1 à 2 composants sont partagés avec Acanthamoeba tandis qu'avec E. histolytica aucun composant n'est révélé.

Le composant à localisation anodique, observé par les hyperimmunsérums anti-Naegleria et anti-Acanthamoeba est identique. L'analyse immunoélectrophorétique par fente courte a permis d'effectuer l'épreuve d'identité. Ces parentés sont reconnues irrégulièrement par les animaux d'expérience. Un des trois hyperimmunsérums anti-Naegleria examinés ne réagit pas vis-à-vis de Monas. Cet antigène ne paraît pas représenter une parenté de hasard puisqu'on le retrouve chez Naegleria et Acanthamoeba d'une manière constante. L'arc de Précipitation observé correspond à une réaction antigène-anticorps; son allure n'étant pas modifiée après incultation prolongée dans le citrate trisodique.

L'absence de toute réaction croisée, entre les milieux de culture et les hyperimmunsérums d'étude, a été systématiquement contrôlée par double diffusion en gel.

#### 4. Famille des Trypanosomatidae

Toujours par référence aux genres Naegleria, Acanthamoeba et Entamoeba, nous avons confronté les structures antigéniques des Sarcodina à celles de divers Mastigophora.

##### 4.1. Section Salivaria : T.brucei brucei, T.brucei gambiense

Aucun hyperimmunsérum anti-Naegleria, anti-Acanthamoeba et anti-E. histolytica n'a entraîné de réaction de précipitation vis-à-vis de T.brucei brucei et de T.brucei gambiense.

L'absence de parentés antigéniques entre les Amoebida et les Salivaria a été confirmé à l'aide d'un hyperimmunsérum anti-T.brucei brucei déterminant en réaction homologue 35 arcs de

précipitation et opposés aux extraits hydrosolubles de N.fowleri, N.jadini, A.castellanii, A.culbertsoni et E.histolytica. (Le Ray, 1974).

#### 4.2. Section Stercoraria : T.cruzi

Aucun hyperimmunsérum anti-Naegleria, anti-Acanthamoeba et anti-E.histolytica n'a entraîné de réaction de précipitation vis-à-vis de T.cruzi.

Néanmoins un hyperimmunsérum anti-T.cruzi a permis de mettre en évidence la présence d'un arc de précipitation vis-à-vis de N.fowleri (Afchain, communication personnelle).

L'absence de parentés antigéniques entre Acanthamoeba et Entamoeba a été confirmé à l'aide d'un hyperimmunsérum anti-T.cruzi déterminant en réaction homologue 30 arcs de précipitation.

#### 4.3. Genre Leishmania : L.donovani

Les hyperimmunsérum anti-Naegleria et anti-Acanthamoeba ont été opposés à un extrait antigénique de L. donovani. Aucune réaction de précipitation n'a été observée. Réciproquement, un hyperimmunsérum anti-L.donovani révélant 28 arcs de précipitation en réaction homologue n'a mis en évidence aucune parenté entre ces protistes.

Un hyperimmunsérum anti-E.histolytica opposé à un extrait antigénique de L. donovani a permis d'objectiver la présence d'un arc de précipitation. Cette observation a été confirmée à l'aide d'un hyperimmunsérum anti-L.donovani, objectivant en réaction homologue 23 composants antigéniques.

#### Résumé

Les relations antigéniques d'Amoebida avec différents genres appartenant à la famille des Trypanosomatidae se sont montrées très réduites et presque nulles. Néanmoins une persistance de parentés antigéniques au niveau taxonomique le plus élevé s'observe mais elle ne concerne qu'un composant immunoélectrophorétique. On peut se demander si ces parentés observées ne concernent pas de composants ubiquistes.

## 5. Classe Ciliata

Une souche de Tetrahymena pyriformis (Ehrenberg) se cultivant axéniquement à 28°C en milieu C.G.V. a été analysée à l'aide des hyperimmunsérums anti-N.fowleri, anti-N.jadini, anti-N.gruberi, anti-Naegleria spp.A et PPMFB, anti-A.castellanii et anti-A.culbertsoni.

Aucune réaction de précipitation n'a été observée avec ce cilié isolé à partir d'urine humaine chez un malade souffrant d'une atteinte rénale.

## 6. Organismes non apparentés.

Ayant voulu estimer la fréquence et l'importance des parentés antigéniques de hasard nous avons étendu nos observations à différentes espèces de champignons et d'helminthes. Les extraits hydrosolubles de ces Champignons et Helminthes proviennent de la collection du Service d'immunologie et de Biologie parasitaire, Faculté de médecine, Lille, et du Laboratoire de Mycologie de l'U.E.F. de Pharmacie, Lille.

Cette étude a été menée à l'aide d'hyperimmunsérums anti-N.fowleri, anti-N.jadini, anti-Acanthamoeba sp. Neff et anti-A.culbertsoni.

La spécificité des réactions a été vérifiée à l'aide des sérums des lapins avant immunisation, afin de tenir compte d'éventuels anticorps précipitants résultant d'un contact naturel (voir tableau 19). Les réactions croisées des extraits antigéniques provenant des champignons et d'helminthes, vis-à-vis de ces quatre hyperimmunsérums ont été étudiées d'abord en double diffusion; les réactions positives ont été caractérisées ensuite, par l'analyse immunoélectrophorétique. Dans les deux cas, les précipités ont été soumis à une incubation prolongée en solution de citrate trisodique.

### 6.1. Champignons.

Vingt extraits antigéniques d'espèces fongiques différentes ont été examinés vis-à-vis des hyperimmunsérums anti-Naegleria et anti-Acanthamoeba.

Les résultats obtenus avec Naepleria sont rassemblés dans le tableau 15.

Tableau 15 : Réactions d'immunoprécipitation croisées entre Naepleria et 20 extraits fongiques.

Espèce fongique	Antiserums			
	<u>N.fowleri</u>		<u>N.jadini</u>	
	Ouchterlony	IEP	Ouchterlony	IEP
<u>Trichophyton rubrum</u>	1 arc	0	0	-
<u>T. soudanense</u>	1 arc	0	0	-
<u>Epidermophyton floccosum</u>	0	-	0	-
<u>Candida albicans</u>	0	-	1 arc	0
<u>C.robusta</u>	0	-	0	-
<u>Rhodotorula sp.</u>	0	-	0	-
<u>Histoplasma duboisii</u>	0	-	0	-
<u>Blastomyces dermatiditis</u>	0	-	0	-
<u>Mucor mucedo</u>	0	-	0	-
<u>Aspergillus fumigatus</u>	0	-	0	-
<u>A. nidulans</u>	0	-	0	-
<u>A. niger</u>	0	-	0	-
<u>A. terreus</u>	0	-	0	-
<u>A. flavus</u>	0	-	0	-
<u>Penicillium notatum</u>	0	-	0	-
<u>Sterptomyces somaliensis</u>	0	-	0	-
<u>Actinomyces vulgaris</u>	0	-	0	-
<u>Nocardia braziliensis</u>	1 arc	0	0	-
<u>Alternaria tenuis</u>	1 arc	0	0	-
<u>Micropolyspora faeni</u>	1 arc	0	0	-

Le tableau montre qu'une réaction de précipitation a été observée dans 5 cas vis-à-vis de N.fowleri et dans un cas vis-à-vis de N.jadini. A chaque fois un seul arc de précipitation a été objectivé en Ouchterlony, néanmoins aucun de ces arcs de précipitation n'a pu être mis en évidence par l'analyse immunoélectrophorétique.

Les résultats obtenus avec Acanthamoeba sont rassemblés dans le tableau 16.

Tableau 16 : Réactions d'immunoprécipitation croisées entre Acanthamoeba et 20 extraits fongiques.

Espèces fongique	Antisérums			
	<u>Acanthamoeba</u> sp.Neff		<u>A.culbertsoni</u>	
	Ouchterlony	IEP	Ouchterlony	IEP
<u>Trichophyton rubrum</u>	0	-	0	-
<u>T. soudanense</u>	0	-	1 arc	0
<u>Epidermophyton floccosum</u>	0	-	0	-
<u>Candida albicans</u>	0	-	0	-
<u>C. robusta</u>	0	-	0	-
<u>Rhodotorula</u> sp.	0	-	0	-
<u>Histoplasma duboisii</u>	0	-	0	-
<u>Blastomyces dermatiditis</u>	0	-	0	-
<u>Mucor mucedo</u>	0	-	0	-
<u>Aspergillus fumigatus</u>	0	-	0	-
<u>A. nidulans</u>	0	-	0	-
<u>A. niger</u>	0	-	0	-
<u>A. terreus</u>	1 arc	1 arc	0	-
<u>A flavus</u>	0	-	0	-
<u>Penicillium notatum</u>	0	-	0	-
<u>Sterptomyces somaliensis</u>	0	-	0	-
<u>Actinomyces vulgaris</u>	0	-	0	-
<u>Nocardia braziliensis</u>	0	-	0	-
<u>Alternaria tenuis</u>	1 arc	0	0	-
<u>Micropolyspora faeni</u>	0	-	-	-

Le tableau montre qu'une réaction de précipitation a été observée dans 2 cas vis-à-vis de Acanthamoeba sp. Neff et dans un cas vis-à-vis de A.culbertsoni. A chaque fois un seul arc de précipitation a été objectivé en Ouchterlony. Une seule fois, un arc de précipitation a été mis en évidence par l'analyse immunoélectrophorétique. Il s'agit d'une réaction croisée entre Acanthamoeba sp.Neff et Aspergillus terreus.

#### 6.2. Helminthes.

Treize espèces d'Helminthes représentant des Trématodes, des Cestodes et des Nématodes ont pu être examinées vis-à-vis les hyperimmunsérums anti-Naegleria et anti-Acanthamoeba.

Les résultats obtenus avec Naegleria sont rassemblés dans le tableau 17.

Tableau 17 : Réactions d'immunoprécipitation croisées entre Naefleria et 13 extraits solubles d'Helminthes.

Espèces d'Helminthes	Antisérums			
	<u>N.fowleri</u>		<u>N.jadini</u>	
	Ouchterlony	IEP	Ouchterlony	IEP
<u>Fasciola gigantica</u>	0	-	0	-
<u>F. hepatica</u>	0	-	2 arcs	2 arcs
<u>Schistosoma mansoni</u>	1 arc	-	1 arc	1 arc
<u>Clonorchis sinensis</u>	0	-	0	-
<u>Taenia solium</u>	0	-	0	-
<u>T. saginata</u>	0	-	0	-
<u>Echinococcus granulosus</u>	0	-	0	-
<u>Cysticercus fasciolaris</u>	0	-	0	-
<u>Ascaris suum</u>	0	-	0	-
<u>Toxocara canis</u>	0	-	0	-
<u>Onchocerca volvulus</u>	0	-	0	-
<u>Dipetalonema vitae</u>	0	-	1 arc	1 arc
<u>Panagrellus silusiae</u>	0	-	1 arc	0

Une réaction de précipitation a été observée dans un cas vis-à-vis de N.fowleri et dans quatre cas vis-à-vis de N.jadini . Généralement un seul arc de précipitation a été objectivé, une seule fois 2 arcs en Ouchterlony. L'analyse immunoélectrophorétique a révélée trois précipitations positives vis-à-vis N.jadini . Deux fois un arc de précipitation et une fois deux arcs de précipitation ont été objectivés, insolubles dans le citrate trisodique. Tous les arcs objectivés sont localisés dans la région du puits du dépôt de l'antigène.

Les résultats obtenus avec Acanthamoeba sont rassemblés dans le tableau 18.

Tableau 18 : Réactions d'immunoprécipitation croisées entre Acanthamoeba et 13 extraits solubles d'Helminthes

Espèces d'Helminthes	Antisérums			
	<u>Acanthamoeba sp.Neff</u>		<u>A.culbertsoni</u>	
	Ouchterlony	IEP	Ouchterlony	IEP
<u>Fasciola gigantica</u>	0	-	0	-
<u>F. hepatica</u>	0	-	0	-
<u>Schistosoma mansoni</u>	0	-	0	-
<u>Clonorchis sinensis</u>	0	-	0	-
<u>Taenia solium</u>	0	-	0	-
<u>T.saginata</u>	0	-	0	-
<u>Echinococcus granulosus</u>	0	-	0	-
<u>Cysticercus fasciolaris</u>	0	-	0	-
<u>Ascaris suum</u>	0	-	0	-
<u>Toxocara canis</u>	0	-	0	-
<u>Onchocerca volvulus</u>	0	-	0	-
<u>Dipetalonema vitae</u>	0	-	0	-
<u>Panagrellus silusiae</u>	0	-	1 arc	-

Le tableau montre qu'une seule réaction de précipitation a été observée vis-à-vis de A.culbertsoni à l'aide de la double diffusion avec l'antigène de P. silusiae. Aucun arc de précipitation n'a été mis en évidence par l'immunoélectrophorèse.

Ces résultats démontrent le caractère exceptionnel des réactions immunoélectrophorétiques croisées entre deux genres appartenant à l'ordre des Amoebida et les champignons et helminthes. En outre, les réactions positives n'expriment pas nécessairement des parentés antigéniques vraies.

D'une part, les réactions croisées sont représentées par un seul arc (une fois deux arcs), localisé dans la région du puits de dépôt de l'antigène. Cette région est celle où se situent

généralement les précipités de type substance C protéine C-réactive; de ce fait, la plupart des précipités sont partiellement solubilisés par le citrate trisodique.

D'autre part, un nombre très réduit d'anticorps précipitants peuvent résulter d'un contact immunogène autre que celui de l'immunisation. Selon notre propre expérience illustrée par le tableau 19, les lapins neufs présentent souvent des précipitines antibactériennes et parfois des précipitines anti-protocaires. Ces observations soulignent la nécessité d'une saignée de contrôle avant toute immunisation. Elles montrent que les contact naturels peuvent jouer un rôle dans les réactions croisées observées. Dans ce cas, ces réactions croisées ne correspondent pas à des parentés antigéniques authentiques.

De plus, la démonstration de parentés antigéniques authentiques, ne peut être prouvée que par absorption des anticorps correspondants par les extraits antigéniques intéressés.

Tableau 19 : Précipitines sériques en double diffusion chez 20 lapins non immunisés expérimentalement.

Extraits antigéniques	Nombre lapins positifs
<u>Aerobacter aerogenes</u>	12
<u>Mycobacteries chelonei</u>	3
<u>Acanthamoeba</u>	0
<u>Naegleria</u>	2
<u>Monas</u>	1
<u>Euglena</u>	0
<u>Trypanosoma brucei</u>	1

En conclusion, les relations antigéniques de hasard n'intéressent les Amoebida que de façon négligeable. Elles ne concernent pas les composants immunoélectrophorétiques de Naegleria, ni d'Acanthamoeba caractérisés dans cette étude.

## 7. Substance C

La substance C est un polyside initialement décrit au niveau de la capsule de Diplococcus pneumoniae (Tillet et Francis, 1930). Cette substance a la propriété de se combiner en présence d'ions  $Ca^{++}$  avec la globuline sérique dite protéine-C réactive élaborée au cours des états inflammatoires par la plupart des Vertébrés (Baldo et Fletcher, 1973). Le complexe substance C protéine C-réactive détermine une réaction de précipitation non-spécifique, car ne correspondant pas à une relation antigène-anticorps, et réversible : le précipité se redissout en l'absence des ions  $Ca^{++}$ .

Des substances analogues à la substance C sont d'occurrence fréquente dans les extraits cellulaires. Leur présence a été décrite chez les champignons et chez les helminthes (e.g. Biguet et al., 1965; Capron et al., 1965). Dans le cadre de cette étude, il était nécessaire de rechercher la présence de substances de type C dans les extraits antigéniques de Protozoaires.

Nous avons analysé une série d'extraits de souches de Naegleria et d'Acanthamoeba à l'aide de sérums humains riches en protéine C-réactive. L'observation de précipités redissous par incubation pendant 15 heures dans une solution de citrate trisodique démontre la présence de substances de type C chez plusieurs des espèces de Naegleria et d'Acanthamoeba.

Il s'avère donc indispensable de soumettre à l'épreuve du citrate trisodique, les réactions de précipitation concernant les Amœbida. Cette précaution permet d'éviter de fausses réactions positives lors des études comparatives.

## 8. Synthèse

En conclusion, l'étude immunoélectrophorétique des parentés antigéniques du genre Naegleria et Acanthamoeba met en évidence des caractères significatifs au point de vue taxonomique et phylogénique. Ces résultats permettent de dégager la valeur et de préciser les limites de la méthode d'analyse immunoélectrophorétique.

La structure immunoélectrophorétique de Naegleria et d'Acanthamoeba, telle qu'elle a été définie aux chapitres précédents, n'est pas concernée par des réactions croisées de hasard avec des organismes situés en dehors du phylum des Protistes, à condition d'éliminer les fausses réactions de précipitations dues à des substances de type C.

Le degré d'isologie antigénique exprimé par Naegleria au niveau de la famille des Vahlkampfiidae est en accord avec la diversification antigénique observée au sein de ce genre. Ce degré d'isologie semble être en accord avec la classification de Page (1967).

Les parentés antigéniques de Naegleria avec des genres représentant d'autres familles appartenant à l'ordre des Amoebida, sont moins significatives et parfois nulles s'accroissant au fur et à mesure que l'on descend les échelons taxonomiques de l'ordre des Amoebida.

En dehors de l'ordre des Amoebida, les parentés antigéniques de Naegleria avec les flagellés parasites, les Trypanosomatidae, et les ciliates sont nulles pendant que celles observées avec les phytoflagellés sont réduites mais existantes en particulier avec Monas.

Le degré d'isologie antigénique exprimé par Acanthamoeba au niveau de la Famille des Hartmannellidae ne correspond absolument pas avec sa situation taxonomique actuelle.

En effet, les parentés antigéniques observées outre le genre Acanthamoeba, sont plus importantes avec les genres appartenant à d'autres familles que celles observées au sein de sa propre famille.

En dehors de l'ordre des Amoebida les parentés antigéniques d'Acanthamoeba avec les Phytoflagellés, les flagellés parasites et les Ciliates sont inexistantes ou négligeables.

L'étude des parentés antigéniques de Naegleria et d'Acanthamoeba apporte des données nouvelles objectives pour une meilleure compréhension taxonomique et phylétique de la famille.

Les données acquises par notre étude sont représentées graphiquement sur la figure 61 et 62.

# PARENTES ANTIGENIQUES DE N.FOWLERI

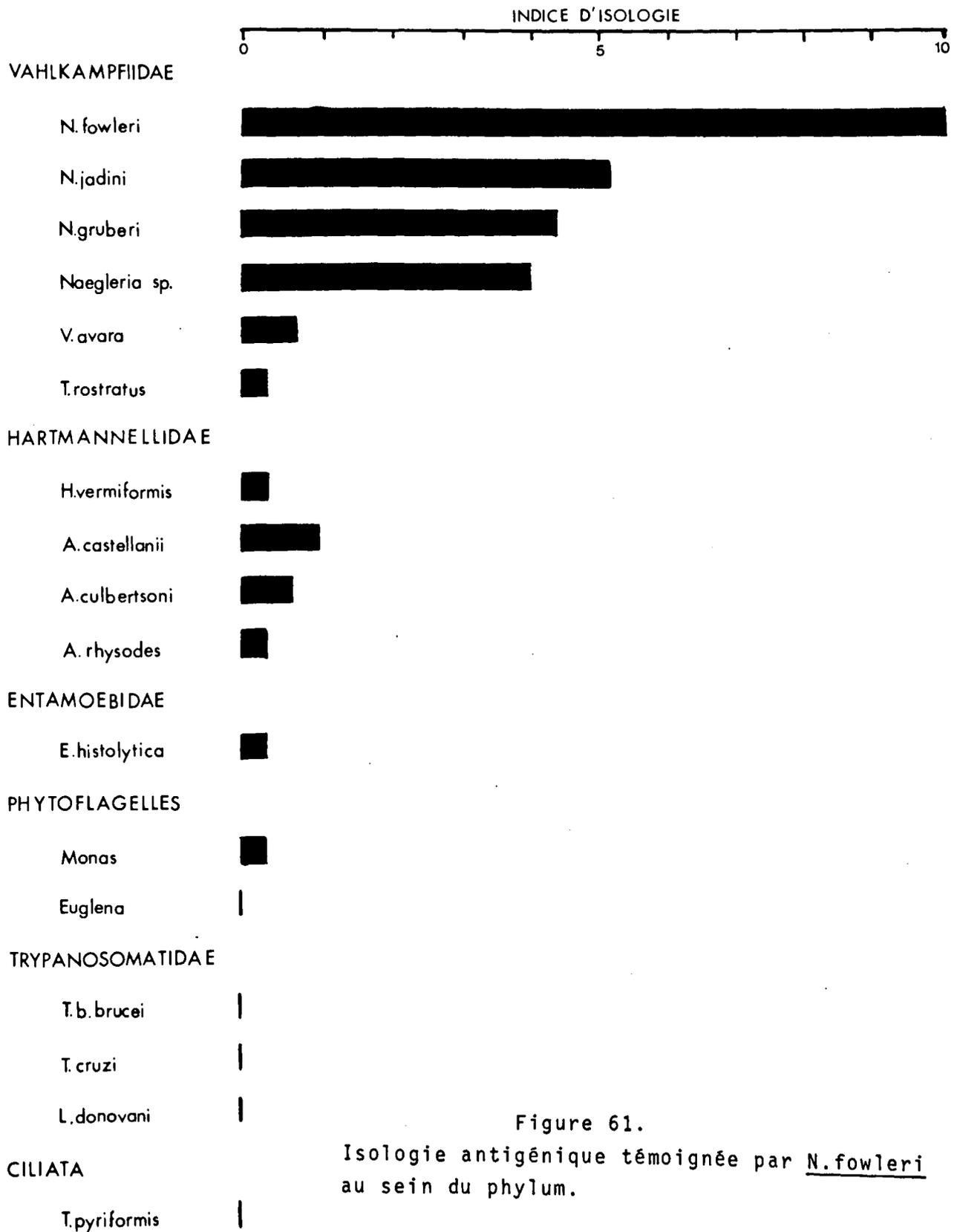


Figure 61.  
Isologie antigénique témoignée par N. fowleri  
au sein du phylum.

PARENTES ANTIGENIQUES DE A.CASTELLANII

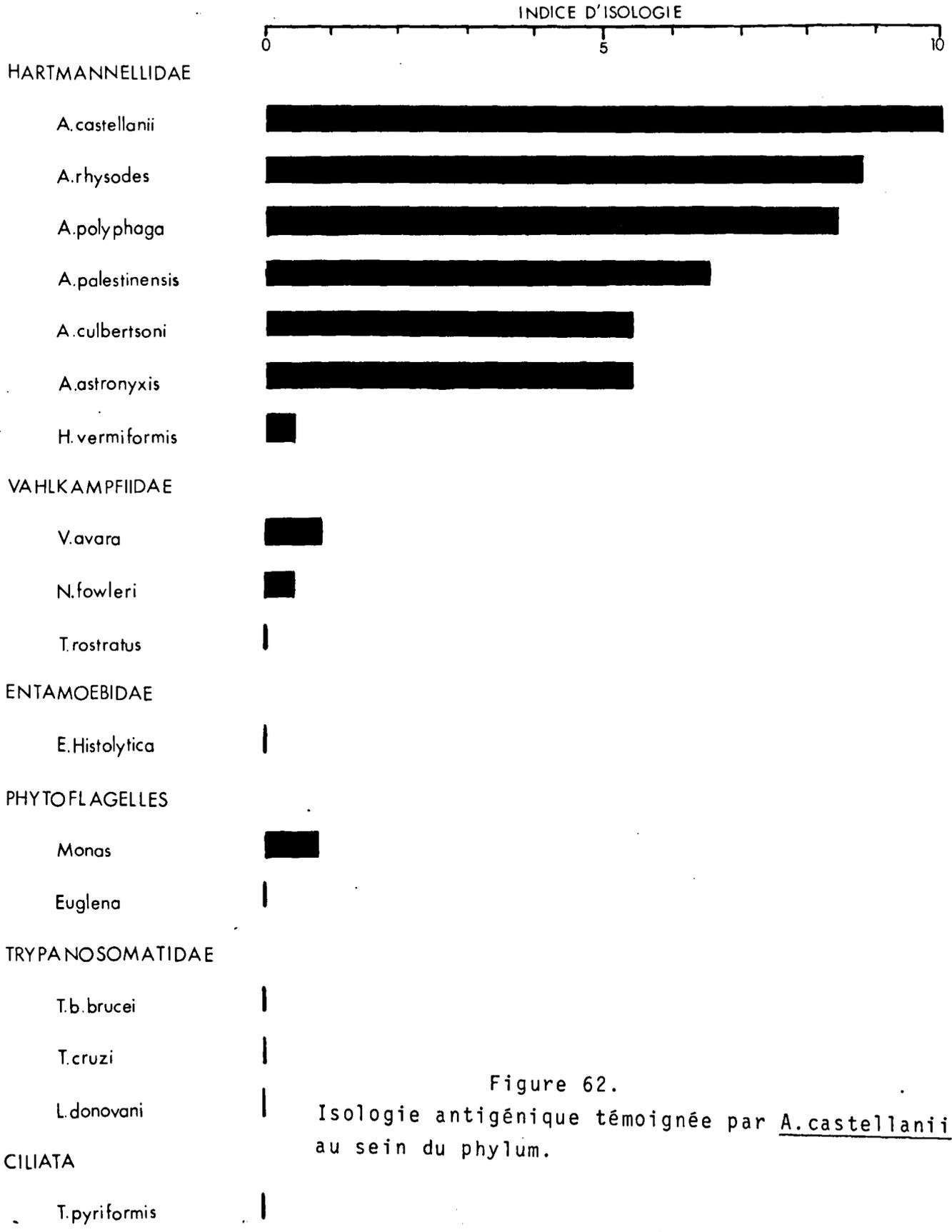


Figure 62.  
Isologie antigénique témoignée par A. castellanii  
au sein du phylum.

Il apparaît donc que la divergence évolutive au niveau moléculaire est très marquée chez les amibes libres. Ce groupe s'avèrera sans doute plus riche en espèces distinctes décrites actuellement. Il s'ensuit que sa phylogénie restera encore d'accès difficile.

Du point de vue taxonomique, les relations soulignées par la classification proposée en 1964 par le "Committee on Taxonomy of the Society of Protozoologists" sont à reconsidérer. Nous n'avons observé aucune parenté antigénique entre les amoebo-flagellates représentés par les Vahlkampfia et les Trypanosomatidae. Cette indépendance antigénique au niveau de l'ordre contraste avec les relations existantes entre flagellés au niveau de la classe (Le Ray, 1974) et les relations entre les amobo-flagellates et les Amibes. A la vue de nos résultats, il semble que les Rhizomastigida ne peuvent être considérés comme étant des flagellés.

CHAPITRE 6

IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE

"... one should never, never  
take life for granted."

A.R. STEVENS in litt

L'analyse immunoélectrophorétique des protéines hydrosolubles des amibes appartenant au genres Naegleria et Acanthamoeba, nous a permis d'identifier et de séparer les différentes espèces appartenant à ces genres. Cette analyse nous a permis d'établir aussi bien l'uniformité antigénique que l'homogénéité antigénique géographique de l'espèce N. fowleri (Willaert et al., 1974). Nous avons pu mettre en évidence au sein du genre Naegleria, une distinction antigénique nette entre N. gruberi, N. fowleri et N. jadini. De plus, nous pensons que le genre renferme d'autres espèces distinctes. Au sein du genre Acanthamoeba, nous avons également pu mettre en évidence, une distinction antigénique entre les différentes espèces ou groupe-espèces, ainsi que l'identité de certaines espèces décrites sous des noms différents.

Néanmoins, l'analyse immunoélectrophorétique de réalisation fastidieuse, exige des cultures axéniques massives pour obtenir les meilleurs résultats. Cette méthode ne peut être considérée comme technique de routine en laboratoire puisqu'elle n'est ni rapide, ni facile à exécuter. Les méthodes d'identification employées par les biologistes pour les amibes libres trouvent peu d'utilité pour le pathologiste, le clinicien ou l'épidémiologiste. Pour des études épidémiologiques, il est important de pouvoir identifier une amibe dans du matériel d'autopsie, spécialement quand il n'y a pas eu recours à une culture et même quand l'organisme a été cultivé, il faut pouvoir confirmer l'identité de celui-ci en culture et celui retrouvé dans les sections histologiques. Trop souvent des contaminations ont été prises pour l'agent causal de l'affection. C'est pourquoi, nous avons essayé d'établir une technique appropriée pour identifier rapidement au laboratoire, les amibes présentes dans un échantillon d'eau ou dans des coupes histologiques provenant de cas suspects de méningo-encéphalite amibienne primitive.

L'intérêt des réactions d'immunofluorescence n'est plus à démontrer. Elle a fait ses preuves en microbiologie, en histologie, en parasitologie et dans d'autres domaines encore depuis sa

naissance, il y a plus de vingt ans. L'aspect "artistique" de cette méthode peut retenir davantage l'attention par la beauté des images que l'on peut obtenir et faire ainsi oublier les problèmes de spécificité que la mise en oeuvre de cette réaction implique (Pillot, 1972). Nous n'avons pas l'intention de rappeler ici tous les progrès et modifications qui ont été réalisés pour donner à cette méthode une allure sophistiquée.

C'est à Goldman et al. (1960) que nous devons la mise au point d'une technique d'immunofluorescence indirecte pour le diagnostic de l'amibiase dysentérique. Siddiqui et Balamuth (1966) se sont servis de cette technique pour une étude comparative entre amibes parasitaires et amibes libres. Cervà (1966) et Cervà et Kramar (1973) ont eu recours à cette technique pour établir les relations entre les souches pathogènes du genre Naegleria et du genre Acanthamoeba.

Récemment Van Dijck et al. (1974), Willaert et al. (1974) et De Jonckheere et al. (1974) ont mis au point une méthode d'identification rapide pour des amibes libres présentes dans des échantillons d'eau. Jager et Stamm (1972) et Stamm (1974) identifient les amibes libres dans les sections histologiques à l'aide de l'immunofluorescence indirecte.

Nous avons envisagé dans cette étude l'identification des différentes espèces établies au sein des genres Naegleria et Acanthamoeba, ainsi que le diagnostic rétrospectif dans des cas suspects de méningo-encéphalite amibienne primitive.

#### 1. Genre Naegleria.

Les espèces connues du genre Naegleria différenciées par l'analyse immunoélectrophorétique, ont permis de préparer des antisérums à l'aide des deux méthodes précédemment décrites.

Tableau 20 : Liste des antisérums anti-Naegleria.

Antisérum n°	Espèce	Immunisation	Antigène
95	<u>N. fowleri</u> IMVS Morgan	Vaitukaitis <u>et al.</u>	Extrait soluble
96	<u>N. fowleri</u> IMVS Morgan	Vaitukaitis " "	Culot centrif.
98	<u>N. gruberi</u> CCAP 1518	Vaitukaitis " "	Culot centrif.
99	<u>N. jadini</u> ITMAP 400	Vaitukaitis " "	Culot centrif.
102	<u>N. gruberi</u> CCAP 1518	Vaitukaitis " "	Extrait soluble
104	<u>N. jadini</u> ITMAP 400	Vaitukaitis " "	Extrait soluble
105	<u>N. jadini</u> ITMAP 400	Vaitukaitis " "	(0)
106	<u>Naegleria</u> sp. IMVS A	Van Meirvenne <u>et al.</u>	Organismes

0 = Un hyperimmunsérum anti-N. fowleri (0,3ml) est préalablement épuisé par un extrait antigénique de N. jadini. Les complexes antigène-anticorps sont éliminés par centrifugation et l'antigène propre à N. jadini solubilisé dans le surnageant est employé pour l'immunisation.

### 1.1. Antiserum N. fowleri.

Les deux antisérums contre la souche N. fowleri IMVS Morgan ont été testés en réaction homologue et en réaction hétérologue. Le meilleur a été retenu pour effectuer les tentatives d'identification de souches inconnues. Les résultats obtenus avec l'antisérum 96 sont rassemblés dans le tableau 21. Cet antisérum montre encore une fluorescence appréciable en réaction homologue à la dilution de 1/128 (fig. 63).

Les résultats de la comparaison à l'aide de la méthode d'immunofluorescence indirecte de 16 souches différentes de N. fowleri montre une fois de plus l'homogénéité de l'espèce. Parmi ces 16 souches nous citons 10 souches d'origine humaine, une souche isolée à partir de l'eau de réseau, une souche à partir du sol et quatre souches à

Tableau 21 : Réactions homologues de N. fowleri en immunofluorescence indirecte.

Souches	Dilutions	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512
	antiserum						
<u>N. fowleri</u>							
ITMAP 359		++++	+++	+++	++	0	0
ITMAP 838		++++	+++	+++	++	++	++
ITMAP 1230		++++	++++	+++	++	++	0
IMVS Morgan		++++	+++	+++	++	++	0
Vitek		++++	+++	+++	++	++	0
HB-1		++++	++++	+++	++	0	0
C-69		++++	+++	+++	++	0	0
MCV LEE		++++	+++	++	++	0	0
MCV CJ		++++	++++	+++	+++	++	0
MCV WM		++++	+++	+++	+++	++	++
IMVS 291		+++	+++	++	++	0	0
IMVS PAa		++++	++++	+++	++	0	0
N.a.1		++++	++++	+++	++	0	0
N.a.2		++++	++++	+++	++	0	0
N.a.3		++++	++++	++	++	0	0
N.a.4		++++	+++	++	++	0	0

partir de la boue d'égout. Toutes ces souches se sont montrées pathogènes pour la souris et les amibes ont été retrouvées dans le cerveau des souris à l'autopsie.

Ces résultats montrent également une analyse comparative entre souches d'origine humaine et d'origine libre, permettent d'observer une antigénicité remarquable uniforme entre les Naegleria pathogènes d'origine géographique différente. Ces résultats sont conformes à nos résultats obtenus par l'analyse immunoélectrophorétique et plaident en faveur de l'indépendance antigénique de l'espèce N. fowleri.

1.2. Antiserum N. jadini.

Trois antisérums contre la souche ITMAP 400 ont été préparés et comparés en réaction homologue et hétérologue pour contrôler la spécificité. L'antisérum n° 105 a été retenu pour poursuivre ce travail. Les résultats obtenus avec les antisérums n° 99, 104 et 105 sont représentés dans le tableau 22.

Tableau 22 : Réaction homologues et hétérologues de N. jadini en immunofluorescence indirecte.

Souches	Dilutions antiserum <u>N. jadini</u>	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
<u>n° 99</u>						
<u>N. jadini</u> ITMAP 400		++	0	0	0	0
<u>N. fowleri</u> IMVS Morgan		+++	++	0	0	0
<u>N. gruberi</u> C.C.A.P. 1518		++	0	0	0	0
<u>n° 104</u>						
<u>N. jadini</u> ITMAP 400		+++	++	0	0	0
<u>N. fowleri</u> IMVS Morgan		+++	++	0	0	0
<u>N. gruberi</u> C.C.A.P. 1518		++	+	0	0	0
<u>n° 105</u>						
<u>N. Jadini</u> ITMAP 400		++++	++++	++++	+++	++
<u>N. fowleri</u> IMVS Morgan		+++	++	0	0	0
<u>N. gruberi</u> C.C.A.P. 1518		+++	0	0	0	0

Une réaction croisée importante révélée par les trois antisérums anti-N. jadini est observée en particulier vis-à-vis de N. fowleri. Etant donné que le titre en réaction homologue de l'antisérum n° 105 est significativement plus élevé qu'en réaction hétérologue, nous avons estimé valable d'employer les titres de 1/64 et 1/128 comme seuil de spécificité. Ne possédant qu'une seule souche de N. jadini, la constance infra-spécifique de l'espèce n'a pu être vérifiée.

1.3. Antisérums N. gruberi :

Deux antisérums contre la souche de N. gruberi C.C.A.P. 1518 ont été préparés (n°s 98 et 102). L'antisérum n° 98 a été retenu pour son titre plus élevé. Nous avons contrôlé cet antisérum en réaction homologue et vis-à-vis de la souche IMVS BG-6 (fig. 64). 6. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 23.

Tableau 23 : Réactions homologues de N. gruberi en immunofluorescence indirecte.

Souches	Dilutions antisérums	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
<u>N. gruberi</u>						
1518		++++	++++	++++	++	0
BG-6		++++	++++	+++	0	0

Un plus grand nombre de souches devraient être examinées avant de conclure à l'homogénéité de l'espèce, mais les résultats obtenus avec les deux souches montrent l'apparemment sérologique probable de ces souches à la même espèce.

1.4. Antisérums Naegleria sp. IMVS A

Un antisérum (n° 106) contre la souche Naegleria sp. IMVS A-2 a été préparé et contrôlé en réaction homologue et vis-à-vis de la souche Naegleria sp. IMVS A-9, dont nous avons déjà démontré l'isologie à l'aide de l'analyse immunoelectrophorétique. Les résultats obtenus en réaction d'immunofluorescence indirecte sont rassemblés dans le tableau 24.

Cet antisérum possède un titre peu élevé, mais il s'est montré très spécifique somme on le verra par la suite. Au sein de cette espèce, également un plus grand nombre de souches devraient être examinées pour conclure à l'homogénéité sérologique de l'espèce.

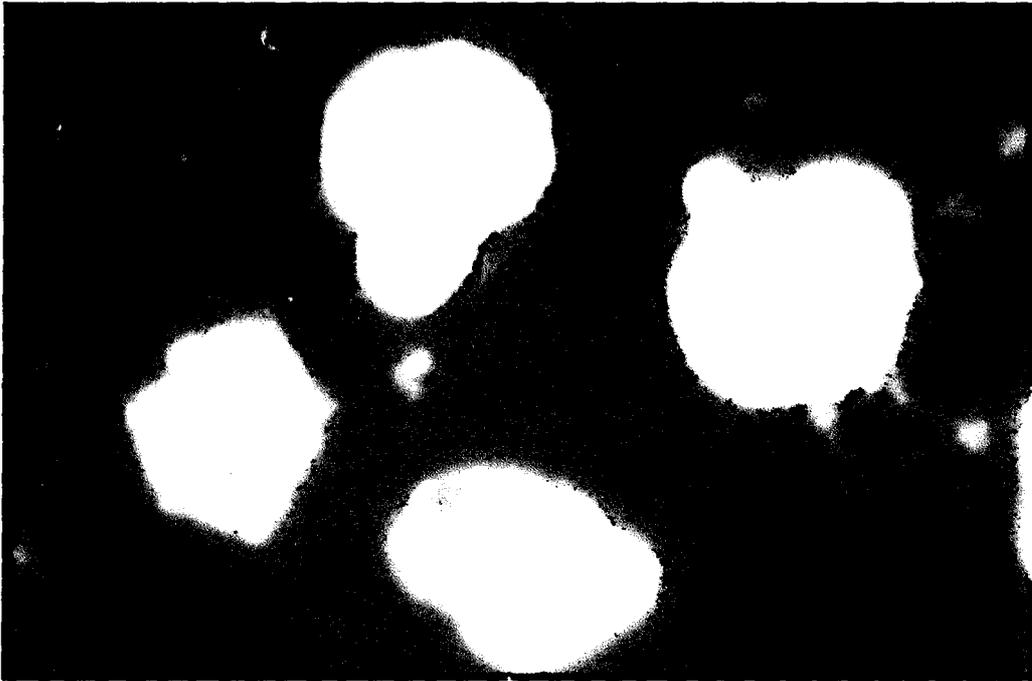


Fig. 63. Immunofluorescence indirecte positive en réaction homologue avec N. fowleri (interprétation : quatre croix).

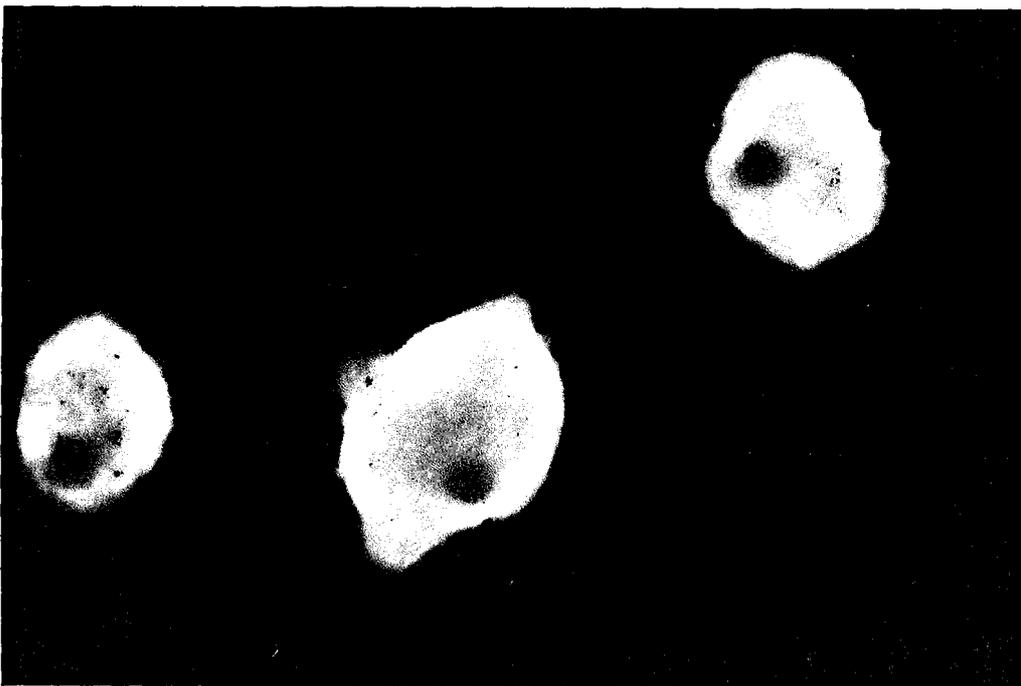


Fig. 64. Immunofluorescence indirecte positive en réaction homologue avec N. gruberi (interprétation : trois croix).

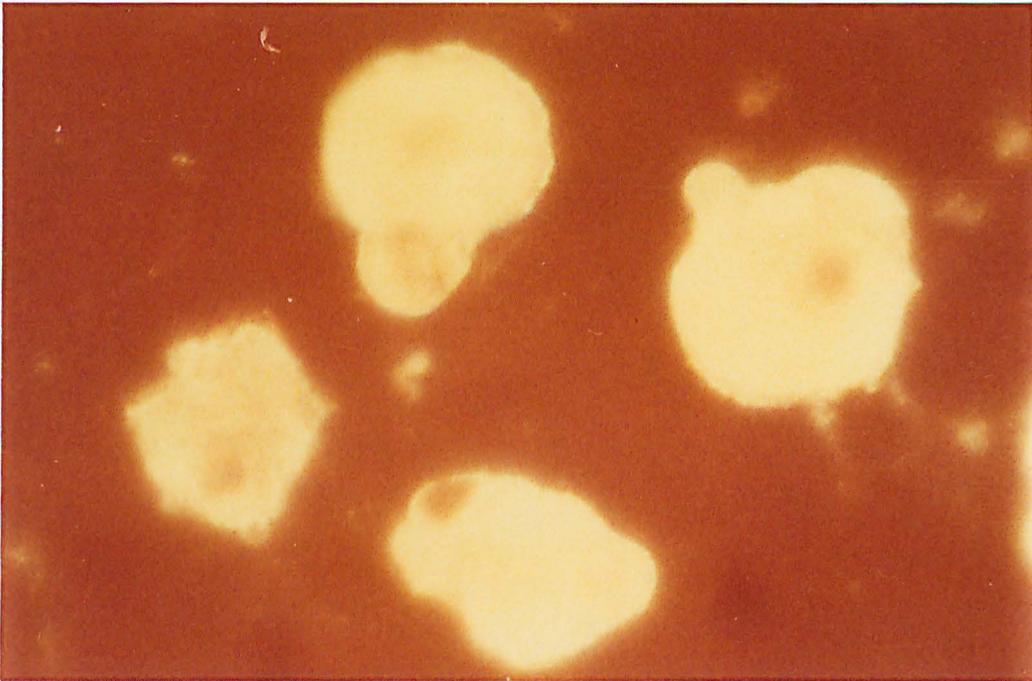


Fig. 63. Immunofluorescence indirecte positive en réaction homologue avec N. fowleri (interprétation : quatre croix).

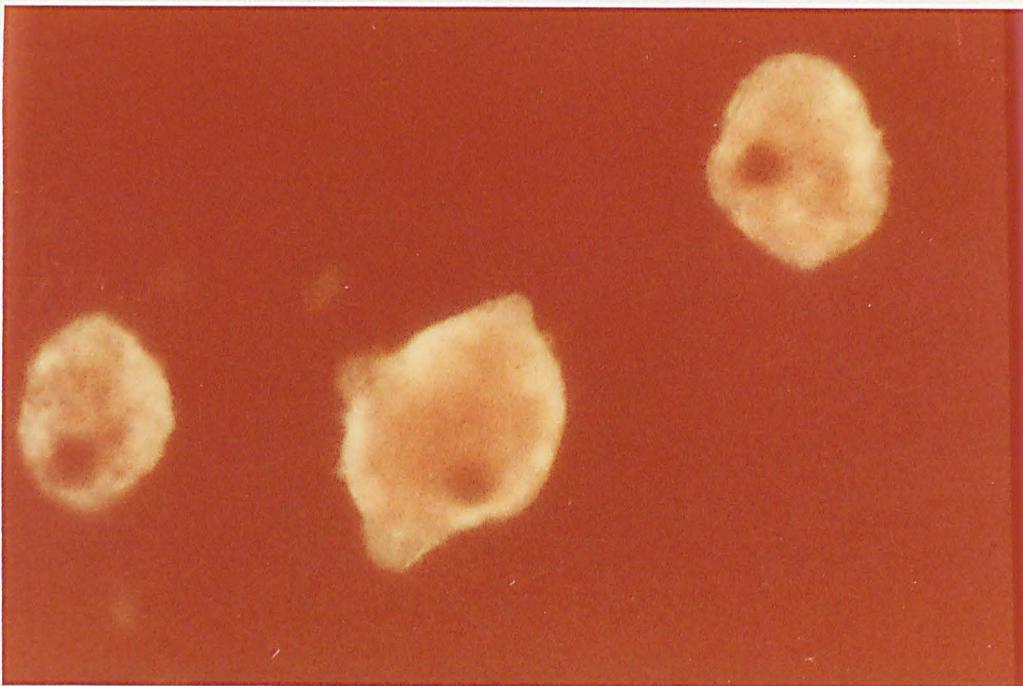


Fig. 64. Immunofluorescence indirecte positive en réaction homologue avec N. gruberi (interprétation : trois croix).

Tableau 24 : Réaction homologue de Naegleria sp. A en immunofluorescence indirecte.

Souches	Dilutions antisérum	1/8	1/16	1/32	1/64
<u>Naegleria</u> sp. A					
IMVS A-2		++++	++	0	0
IMVS A-9		++++	+++	0	0

1.5. Spécificité des réactions entre les différentes espèces du genre Naegleria.

Les quatre meilleurs antisérums, obtenus vis-à-vis des quatre espèces appartenant au genre Naegleria ont été testés en réaction homologue et en réaction hétérologue, vis-à-vis de plusieurs souches de chaque espèce. Les résultats obtenus de cette analyse comparée sont rassemblés dans le tableau 25.

Ces résultats permettent les constatations suivantes : Généralement peu de réactions croisées importantes sont observées entre les différentes espèces en considérant les antisérums à leur dilution optimale révélant une réaction spécifique, c'est-à-dire pour N. fowleri à un titre de 1/32, pour N. jadini un titre de 1/128, pour N. gruberi à 1/64 et pour Naegleria sp. A au 1/16.

- a) l'antisérum anti-N. fowleri dilué au 1/32, montrant encore une fluorescence brillante en réaction homologue, ne permet pas d'observer une réaction croisée vis-à-vis d'autres espèces étudiées. Cette dilution de l'antisérum sera donc employée par la suite pour l'identification de N. fowleri.
- b) Avec l'antisérum anti-N. jadini dilué à 1/64 une légère réaction croisée est encore observée avec N. fowleri et N. gruberi; néanmoins, cette réaction croisée est sensiblement moins importante que la réaction observée en : homologue. La dilution de l'antisérum à 1/128 sera retenue de préférence pour l'identification de l'espèce.

Tableau 25 : Réactions croisées en immunofluorescence indirecte entre espèces du genre Naegleria .

ANTIGENES		ANTISERUMS											
Espèces	Souches	<u>N. fowleri</u>			<u>N. jadini</u>			<u>N. gruberi</u>			<u>Naegleria sp.A</u>		
		1/16	1/32	1/64	1/32	1/64	1/128	1/16	1/32	1/64	1/8	1/16	1/32
<u>N. fowleri</u> -140-	IMVS Morgan	++++	+++	+++	+++	++	0	0	0	0	0	0	0
	HB-1	++++	++++	+++	++	0	0	++	++	0	0	0	0
	ITMAP 359	++++	+++	++	+++	++	0	0	0	0	0	0	0
	IMVS PAa	++++	++++	+++	0	0	0	0	0	0	++	0	0
	N.a.1.	++++	++++	+++	++	0	0	0	0	0	0	0	0
<u>N. jadini</u>	ITMAP 400	0	0	0	++++	++++	++++	++	0	0	0	0	0
<u>N. gruberi</u>	CCAP 1518	0	0	0	+++	++	0	++++	++++	++++	0	0	0
	IMVS BG-6	0	0	0	+++	++	0	++++	++++	+++	0	0	0
<u>Naegleria sp.</u>	IMVS A-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+++	+++	0
	IMVS A-9	0	0	0	++	0	0	++	0	0	++++	+++	0
	IMVS PPMFB-2	0	0	0	++	0	0	++	0	0	++	0	0

- c) L'antisérum anti-N. gruberi dilué à 1/64 peut être employé pour l'identification de l'espèce. A ce taux, aucune réaction croisée n'est observée vis-à-vis de N. fowleri, N. jadini et Naegleria sp. A et PPMFB.
- d) L'antisérum anti-Naegleria sp. A peut être employé à la dilution de 1/16 puisqu'aucune réaction croisée importante n'est observée avec les autres espèces appartenant au genre Naegleria.

Un plus grand nombre de souches devrait être examiné avant de conclure à une absence totale de réactions croisées entre les différentes espèces du genre Naegleria; néanmoins, nos constatations ont permis d'établir une différence sérologique entre les espèces étudiées appartenant au genre Naegleria. Nous pensons, que l'immuno-fluorescence indirecte permet ainsi d'identifier rapidement les différentes espèces, à l'aide d'antisérums employés aux taux spécifiques.

Nous avons voulu contrôler la spécificité de nos antisérums en faisant la réaction d'immunofluorescence indirecte sur un antigène mixte. Cet antigène mixte est constitué par un mélange en parties égales de N. fowleri, de N. jadini et de N. gruberi. Cet antigène opposé à l'antisérum anti-N. fowleri dilué à 1/32 permet de retrouver une fluorescence brillante sur les tiers environ des amibes. De plus, une particularité est observée chez l'espèce N. jadini opposée à cet antisérum : en effet, la couronne de lipoprotéines entourant la membrane nucléaire peut montrer une faible fluorescence chez N. jadini. Ainsi il est possible dans ce mélange d'identifier les trois espèces. Cette fluorescence de la couronne des lipoprotéines entourant la membrane nucléaire chez N. jadini a été contrôlée sur l'antigène N. jadini opposé à l'antisérum N. fowleri à différents titres et à l'antisérum N. gruberi. Dans aucun cas les anticorps anti-N. gruberi ont donné lieu à une fluorescence de la couronne périnucléaire de N. jadini.

Les antisérums anti-N. jadini et anti-N. gruberi nous ont permis respectivement d'observer une fluorescence brillante chez le tiers environ des amibes constituant cet antigène. Aucune particularité n'a été observée chez les amibes non fluorescentes.

1.6. Réactions croisées entre le genre Naegleria et d'autres genres.

Nous avons voulu vérifier s'il existait des parentés sérologiques entre le genre Naegleria et le genre Vahlkampfia appartenant à la même famille et aux genres Acanthamoeba et Hartmannella appartenant à la famille des Hartmannellidae et avec le genre Entamoeba appartenant à la famille des Entamoebidae.

Les résultats de ces réactions, effectuées avec les antisérums anti-N. fowleri, anti-N. jadini et anti-N. gruberi sont rassemblés dans le tableau 26.

Tableau 26 : Réactions croisées en immunofluorescence indirecte entre Naegleria et d'autres genres de l'ordre des Amoebida.

Espèce	ANTIGENES Souche	ANTISERUMS					
		<u>N. fowleri</u>		<u>N. jadini</u>		<u>N. gruberi</u>	
		1/32	1/64	1/64	1/128	1/32	1/64
<u>V. avara</u>	CCAP 1588	0	0	0	0	0	0
<u>A. castellanii</u>	1930	0	0	0	0	0	0
<u>A. culbertsoni</u>	A-1	0	0	0	0	0	0
	H.C.-1	0	0	0	0	0	0
	H.C.-2	0	0	0	0	0	0
<u>Acanthamoeba</u> sp.	Neff	0	0	0	0	0	0
<u>A. rhyodes</u>	CCAP 1534	0	0	0	0	0	0
<u>A. polyphaga</u>	P. 23	0	0	0	0	0	0
<u>A. astronyxis</u>	RAY	0	0	0	0	0	0
<u>H. vermiformis</u>	CCAP	0	0	0	0	0	0
<u>E. invadens</u>	Rodhain	0	0	0	0	0	0
<u>E. histolytica</u>	M.K.	0	0	0	0	0	0

Les résultats obtenus permettent de constater que les antisérums anti-Naegleria employés aux taux spécifiques ne montrent aucune réaction croisée avec les genres Vahlkampfia, Acanthamoeba, Hartmannella et Entamoeba.

En conclusion, nos résultats établissent bien sûr une parenté sérologique indiscutable entre les différentes espèces du genre Naegleria, mais ces parentés n'empêchent nullement le diagnostic spécifique de l'espèce au sein de ce genre. De plus, aucune parenté sérologique entre le genre Naegleria et d'autres genres de la même famille est observée, ni avec d'autres genres appartenant à des familles différentes.

## 2. Genre Acanthamoeba

Des antisérums contre quelques espèces du genre Acanthamoeba, dont la caractérisation immunoélectrophorétique a été établie précédemment ont été préparés selon la méthode Van Meirvenne et al. (1974), sauf l'antisérum anti-A. culbertsoni par la méthode Vaitukaitis et al. (1971).

Tableau 27 : Liste des antisérums anti-Acanthamoeba

Antisérum	Espèce	Souche
100	<u>A. culbertsoni</u>	A-1
108	<u>A. astronyxis</u>	RAY
109	<u>A. castellanii</u>	1930
110	<u>A. polyphaga</u>	p. 23

### 2.1. Antisérum A. culbertsoni

Un seul antisérum, n° 100 a été préparé avec la souche A-1 de Culbertson. Le sérum a été récolté au huitième jour de l'immunisation. L'immunofluorescence indirecte montre en réaction homologue une forte brillance des amibes jusqu'à la dilution de 1/64, tandis qu'à la dilution de 1/128 peu de fluorescence périphérique n'est observée. Le titre optimal est 1/64, lequel sera par la suite employé pour l'identification d'autres souches.

Deux souches de A. culbertsoni isolées par Singh et Das (1972) à partir d'échantillons de boue d'égouts, nous ont été remis

par Das pour identification à l'aide de l'immunofluorescence. Les résultats de ces réactions homologues sont rassemblées dans le tableau 28.

Tableau 28 : Réactions homologues de A. culbertsoni en immunofluorescence indirecte.

Souches	Dilutions AS	1/16	1/32	1/64	1/128
A - 1		++++	+++	+++	0
H.C - 1		+++	++	0	0
H.C - 2		++++	+++	++	0

Ces résultats ne permettent pas de montrer des différences significatives entre ces souches et permettent d'établir une homogénéité sérologique au sein de l'espèce.

## 2.2. Antisérum A. astronyxis

Un seul antisérum (n°108) a été produit au moyen de la souche Ray (1964) et des sérums sont obtenus au 7<sup>e</sup> jour (S<sub>1</sub>) et au 14<sup>e</sup> jour (S<sub>2</sub>) de l'immunisation. Les résultats obtenus en réaction homologue sont rassemblés dans le tableau 29.

Tableau 29 : Réaction homologue de A. astronyxis en immunofluorescence indirecte.

Dilutions antiserum	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
108 S <sub>1</sub>	++++	++++	+++	++	++	0	0
108 S <sub>2</sub>	++++	++++	++++	+++	+++	+++	0

L'antisérum 108 S<sub>2</sub> montrant encore une brillante fluorescence à la dilution de 1/64 sera retenu pour l'étude des réactions croisées avec d'autres espèces.

### 2.3. Antisérum A. castellanii

Un seul antisérum (n° 109) a été produit au moyen de la souche isolée à l'origine en 1930 par Castellani et les sérums sont prélevés au 7<sup>e</sup> jour (S<sub>1</sub>) et au 14<sup>e</sup> jour (S<sub>2</sub>) de l'immunisation. Les résultats obtenus en réaction homologue sont rassemblés dans le tableau 30.

Tableau 30 : Réaction homologue d' A. castellanii en immunofluorescence indirecte.

Dilutions AS	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
109 S <sub>1</sub>	++++	+++	+++	++	0	0	0
109 S <sub>2</sub>	++++	++++	++++	++++	+++	+++	0

L'antisérum 109 S<sub>2</sub> montrant encore une brillante fluorescence à la dilution de 1/64 sera retenu pour l'étude des réactions croisées avec les autres espèces du genre Acanthamoeba.

### 2.4. Antisérum A. polyphaga

Un seul antisérum (n° 110) a été produit avec la souche P.23 (Page, 1967) et les sérums sont obtenus au 7<sup>e</sup> jour (S<sub>1</sub>) et au 14<sup>e</sup> jour (S<sub>2</sub>) de l'immunisation. Les résultats de la réaction homologue sont rassemblés dans le tableau 31.

Tableau 31 : Réaction homologuede A. polyphaga en immunofluorescence indirecte.

Dilution AS	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
110 S <sub>1</sub>	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++	0
110 S <sub>2</sub>	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++	0

Les deux antisérums montrant le même titre en réaction homologue peuvent être retenus pour les observations en réaction hétérologue.

2.5. Spécificité des réactions entre les différentes espèces du genre Acanthamoeba.

Les quatre antisérums que nous venons d'étudier en réaction homologue sont ensuite opposés en réaction hétérologue aux différentes espèces du genre Acanthamoeba. Nous avons choisi pour effectuer les réactions croisées pour chaque antisérum les deux derniers taux les plus élevés donnant une fluorescence brillante en réaction homologue. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 31.

Tableau 31 : Réactions croisées en immunofluorescence indirecte entre espèces du genre Acanthamoeba.

Espèce	Souche	ANTISERUMS							
		<u>A. astronyxis</u>				<u>A. polyphaga</u>			
		<u>A. culbertsoni</u>		<u>A. castellanii</u>		<u>A. castellanii</u>		<u>A. polyphaga</u>	
1/32	1/64	1/32	1/64	1/32	1/64	1/32	1/64		
<u>A. culbertsoni</u>	A-1	+++	+++	0	0	0	0	0	0
<u>A. astronyxis</u>	Ray	0	0	+++	+++	0	0	0	0
<u>A. castellanii</u>	1930	0	0	+++	+++	+++	+++	0	0
<u>A. polyphaga</u>	P 23	0	0	0	0	++	0	+++	+++
<u>A. rhyssodes</u>	1534	0	0	0	0	0	0	++	0
<u>A. castellanii</u>		0	0	0	0	+++	++	0	0
<u>A. palestinensis</u>	Reich	0	0	0	0	0	0	0	0
<u>A. terricola</u>	425	++	0	0	0	+++	0	++	0
<u>Acanthamoeba</u> sp.	Neff	0	0	++	0	+++	0	0	0

Ces résultats permettent de faire les constatations suivantes :

- A) l'antisérum anti-A. culbertsoni ne donne aucune réaction croisée au 1/64 avec les autres espèces du même genre examinées. Une réaction croisée négligeable au 1/32 est observée avec A. terricola.

- b) l'antisérum anti-A. astronyxis ne donne aucune réaction croisée avec A. culbertsoni et A. palestinensis tandis qu'avec Acanthamoeba sp. Neff une faible réaction croisée est observée.
- c) les antisérums du groupe A. castellanii - A. polyphaga ne donnent aucune réaction croisée avec A. culbertsoni, A. astronyxis et A. palestinensis, tandis qu'avec quelques autres espèces étudiées, dont toutes appartiennent au même groupe, une faible réaction croisée est observée.

## 2.6. Spécificité des réactions entre Acanthamoeba et d'autres genres appartenant à l'ordre d'Amoebida.

Nous avons successivement recherché les réactions croisées entre A. culbertsoni et différentes espèces du genre Naegleria, Hartmannella vermiformis, Vahlkampfia avara et Entamoeba invadens. Les mêmes réactions ont été effectuées avec le groupe A. castellanii - A. polyphaga et avec A. astronyxis vis-à-vis des mêmes antigènes.

### 2.6.1. Antisérum A. culbertsoni

Les résultats des réactions croisées observées par l'immunofluorescence indirecte sont rassemblés dans le tableau 32.

Ces résultats permettent d'établir la spécificité de l'antisérum anti-A. culbertsoni à la dilution de 1/32. On observe que les réactions croisées entre A. culbertsoni et d'autres espèces du genre Acanthamoeba (2.5.) ne sont pas plus importantes qu'avec les espèces appartenant aux familles des Vahlkampfiidae, Hartmannellidae et Entamoebidae. Les réactions croisées observées entre A. culbertsoni et le genre Naegleria sont plus importantes qu'entre A. culbertsoni et H. vermiformis lesquelles appartiennent à la même famille. Cette constatation confirme nos résultats acquis par l'analyse immunoelectrophorétique.

Tableau 32 : Réactions croisées observées en l'immunofluorescence indirecte avec l'antisérum anti-A.culbertsoni vis-à-vis d'espèces hétérologues.

ANTIGENES		ANTISERUMS		
Espèce	Souches	1/16	1/32	1/64
<u>A. culbertsoni</u>	A-1	++++	+++	+++
<u>N. gruberi</u>	CCAP 1518	++	0	0
<u>N. jadini</u>	ITMAP 0 400	0	0	0
<u>N. fowleri</u>	IMVS Morgan	++	0	0
	ITMAP 359	0	0	0
	HB-1	++	0	0
	Vitek	0	0	0
<u>Naegleria</u> sp.	IMVS A-2	++	0	0
	IMVS A-9	0	0	0
<u>V. avara</u>	CCAP	0	0	0
<u>H. vermiformis</u>	CCAP	0	0	0
<u>E. invadens</u>	ITMAP Rodhain	0	0	0

#### 2.6.2. Antiserums de groupe A. castellanii - A. polyphaga

Les résultats des réactions croisées observées en immunofluorescence indirecte sont rassemblés dans le tableau 33.

Ces résultats permettent d'établir la spécificité des antiséras anti-A. castellanii et anti-A. polyphaga observée vis-à-vis les genres Hartmannella, Vahlkampfia, Naegleria et Entamoeba. Même entre deux genres (Acanthamoeba et Hartmannella) appartenant à la même famille, aucune réaction croisée n'est observée. Une fois de plus, ces observations confirment nos résultats obtenus par l'analyse immunoelectrophorétique et soulèvent le problème de l'appartenance d'Acanthamoeba et Hartmannella au même genre, comme le préconisent Singh (1952) et Singh et Das (1970).

Tableau 33 : Réactions croisées observées en immunofluorescence indirecte avec les antisérums anti-A. castellanii et anti-A. polyphaga vis-à-vis d'espèces hétérologues.

Espèce	ANTIGENES		ANTISERUM					
	Souche		Anti- <u>A. castellanii</u>			Anti- <u>A. polyphaga</u>		
			1/16	1/32	1/64	1/16	1/32	1/64
<u>A. castellanii</u>	1930		++++	+++	+++	++	0	0
<u>A. polyphaga</u>	P.23		+++	++	0	++++	+++	+++
-----								
<u>N. gruberi</u>	CCAP 1518		0	0	0	0	0	0
<u>N. jadini</u>	ITMAP 400		0	0	0	0	0	0
<u>N. fowleri</u>	IMVS Morgan		0	0	0	0	0	0
	ITMAP 359		0	0	0	0	0	0
	HB-1		0	0	0	0	0	0
	Vitek		0	0	0	0	0	0
-----								
<u>V. avara</u>	CCAP		0	0	0	0	0	0
<u>H. vermiformis</u>	CCAP		0	0	0	0	0	0
<u>E. invadens</u>	ITMAP Rodhain		0	0	0	0	0	0

### 2.6.3. Antisérum A. astronyxis

Les résultats des réactions croisées observées en immunofluorescence indirecte sont rassemblés dans le tableau 34.

Ces résultats permettent d'établir la spécificité de l'antisérum anti- A. astronyxis à la dilution de 1/16 vis-à-vis les espèces du genre Naegleria et vis-à-vis de Vahlkampfia, Hartmannella et Entamoeba.

Tableau 34 : Réactions croisées observées par l'immunofluorescence indirecte avec l'antisérum A. astronyxis vis-à-vis d'espèces hétérologues.

ANTIGENES		ANTISERUM		
Espèce	Souche	1/16	1/32	1/64
<u>A. astronyxis</u>	RAY	+++	+++	+++
<u>N. gruberi</u>	C.C.A.P. 1518	0	0	0
<u>N. jadini</u>	ITMAP 400	0	0	0
<u>N. fowleri</u>	IMVS Morgan	0	0	0
	ITMAP 359	0	0	0
	HB-1	0	0	0
	Vitek	0	0	0
<u>V. avara</u>	C.C.A.P.	0	0	0
<u>H. vermiformis</u>	C.C.A.P.	0	0	0
<u>E. invadens</u>	ITMAP Rodhain	0	0	0

3. Essai d'identification par l'immunofluorescence indirecte de quelques souches isolées en laboratoire.

Au cours de nos recherches, nous avons isolés de multiples souches d'amibes libres dont l'identification morphologique s'arrêta au niveau du genre. Nous avons essayé d'identifier, un petit nombre parmi ces souches, à l'aide de l'immuno-fluorescence indirecte.

Nous avons opposé les antigènes figurés des souches morphologiquement attribuables au genre Naegleria, aux antisérums préparés contre les différentes espèces de ce genre et les antigènes figurés des souches morphologiquement comparables au genre Acanthamoeba aux antisérums préparés contre quelques espèces appartenant à ce dernier genre. Pour la différenciation morphologique nous avons tenu compte de l'aspect du kyste, de la formation du pseudopode et de l'absence ou la présence d'un stade flagellé temporaire.

Tableau 35 : Origine de quelques souches isolées en laboratoire.

Souches	Origine	Culture	Pathogenicité
1. <u>Naegleria</u> sp.			
ITMAP 1121	<u>Larus ridibundus</u>	axénique	négative
ITMAP 1164	<u>Lebistes reticulatus</u>	axénique	négative
ITMAP 1213	Eau piscine	axénique	négative
ITMAP 1220	Eau élevage moustiques	axénique	négative
ITMAP 1387	Eau ruisseau	monoxénique	négative
IMVS RU 30	Source eau chaude	axénique	négative
IMVS RU 42	Source eau chaude	axénique	négative
-----			
2. <u>Acanthamoeba</u> sp.			
ITMAP 1042	Selles homme	axénique	positive
ITMAP 1302	Eau piscine	monoxénique	négative
ITMAP 1395	Eau piscine	axénique	négative
IMVS RUS 19	Sol	axénique	positive
IMVS RUS 22	Sol	axénique	positive
IMVS RUS 32	Source eau chaude	axénique	négative
IMVS HOV 6-2	Contaminant aérien	axénique	positive

Les antigènes à partir de ces souches proviennent soit de cultures axéniques soit de cultures monoxéniques. Ils ont été préparés comme décrit précédemment. Les antisérums ont été employés au titre spécifique que nous venons de déterminer.

### 3.1. Identification de quelques souches d'amibes libres appartenant au genre Naegleria.

Les résultats obtenus en immunofluorescence indirecte vis-à-vis de ces souches sont repris dans le tableau 36.

D'après les résultats obtenus, nous pouvons envisager l'identification des souches ITMAP 1164 et ITMAP 1213 comme étant le plus proche de N. jadini, puisqu'elles montrent une affinité sérologique prononcée pour cette espèce. De plus la souche ITMAP 1164 pré-

sente des caractères morphologiques et biologiques plus apparentés à N. jadini qu'à N. fowleri ou N. gruberi.

Tableau 36 : Identification par l'immunofluorescence indirecte de quelques souches d'amibes libres appartenant au genre Naegleria.

ANTIGENES		ANTISERUMS					
Genre	Souche	<u>N. fowleri</u>		<u>N. Jadini</u>		<u>N. gruberi</u>	
		1/32	1/64	1/64	1/128	1/32	1/64
<u>Naegleria</u>	ITMAP 1121	0	0	0	0	+++	++
	ITMAP 1164	0	0	+++	++	0	0
	ITMAP 1213	0	0	+++	0	0	0
	ITMAP 1220	0	0	0	0	+++	++
	ITMAP 1387	+++	+++	++	0	++	++
	IMVS RU 30	0	0	0	0	+++	++
	IMVS RU 42	0	0	0	0	++	++

Les souches ITMAP 1121, ITMAP 1220, IMVS RU 30 et IMVS RU 42 se sont montrées sérologiquement les plus apparentées à N. gruberi : les souches ITMAP 1121 et ITMAP 1220 atteignent un titre de 1:128 vis-à-vis l'antisérum anti-N. gruberi, lequel est conforme avec le titre obtenu en réaction homologue. De plus, les souches IMVS RU 30 et IMVS RU 42 ont atteints respectivement un titre de 1/256 et 1/1024 en réaction d'agglutination avec un antisérum anti-A. gruberi (titre en réaction homologue = 1/1024). Les réactions d'agglutination avec les antisérums anti-N. fowleri et anti-N. jadini ont donné des résultats négatifs. Aucune étude morphologique n'a été effectuée pour confirmer ces constatations.

Quant à la souche ITMAP 1387 on observe des réactions croisées assez importantes avec les différentes espèces du genre Naegleria. Cette souche atteint un titre de 1/512 vis-à-vis de l'antisérum anti-N. fowleri ; 1/128 vis-à-vis de N. jadini et 1/64 vis-à-vis de

N. gruberi. Ces résultats ont été obtenus à plusieurs occasions. L'inoculation par voie intranasale d'une suspension de ces amibes ne nous a pas permis d'établir son pouvoir pathogène pour la souris. La mise en culture axénique de cette souche a été sans succès. Une étude approfondie de cette souche, aussi bien du point de vue morphologique, biologique qu'immunologique est à envisager.

### 3.2. Identification de quelques souches d'amibes libres appartenant au genre Acanthamoeba.

Les résultats obtenus en immunofluorescence indirecte vis-à-vis de ces souches sont rassemblés dans le tableau 37.

Parmi les sept souches d'Acanthamoeba isolées dans notre laboratoire d'une part et dans le laboratoire de Jamieson en Adelaide (Australie), aucune de ces souches ne semble s'identifier comme étant A. culbertsoni ou A. astronyxis. Pourtant plusieurs de ces souches se sont montrées pathogènes pour la souris après l'instillation intranasale. Parmi ces souches nous citons ITMAP 1042; RUS 19; RUS 22 et HOV 6-2. Les tests de pathogénicité ont été répétés à plusieurs reprises dans les deux laboratoires.

Toutes les souches, sauf la souche RUS 22, appartiennent apparemment au groupe A. castellanii. La souche RUS 22 n'a pu être identifiée à l'aide de ces antisérums. Le test d'agglutination n'a pas permis d'identifier la souche (Jamieson, 1974, in litt.).

### 3.3. Conclusion

L'identification de souches appartenant au genre Naegleria et Acanthamoeba peut être faite à l'aide de l'analyse en immunofluorescence indirecte au moyen d'antisérum spécifique. Beaucoup plus d'identifications devront encore être exécutées avant que la méthode puisse être acceptée en analyse courante comme très spécifique, et que l'identification des espèces puisse être faite sans confirmation par d'autres méthodes. Il faut donc, encore être prudent dans l'interprétation des résultats obtenus par l'immunofluorescence indirecte et le seul moyen pour identifier la présence d'une amibe virulente est l'inoculer chez la souris afin de démontrer sa pathogénicité.

ANTIGENES		ANTISERUMS							
Genre	Souches	<u>A. culbertsoni</u>		<u>A. castellanii</u>		<u>A. polyphaga</u>		<u>A. astronyxis</u>	
		1/32	1/64	1/32	1/64	1/32	1/64	1/32	1/64
- 154 -	<u>Acanthamoeba</u> ITMAP 1042	0	0	+++	++	+++	++	0	0
	ITMAP 1302	0	0	+++	++	+++	++	0	0
	ITMAP 1395	0	0	0	0	++	0	0	0
	IMVS RUS 19	0	0	++	0	++	0	0	0
	IMVS RUS 22	0	0	0	0	0	0	0	0
	IMVS RU 32	0	0	++	0	0	0	0	0
	IMVS HDV 6-2	0	0	++	0	0	0	0	0

Tableau 37 : Identification par l'immunofluorescence indirecte de quelques souches d'amibes libres appartenant au genre Acanthamoeba.

4. Identification de l'agent étiologique de la méningo-encéphalite amibienne primitive dans les coupes histologiques.

L'identité de l'agent étiologique de la méningo-encéphalite amibienne primitive est généralement, depuis ces dernières années, établie par l'isolement in vitro de l'amibe responsable. Néanmoins, plusieurs cas de méningo-encéphalite amibienne primitive ont été reconnus rétrospectivement, soit par la symptomatologie, soit par la présence d'amibes dans des préparations histologiques du cerveau des patients décédés. Certains cas de méningo-encéphalite amibienne primitive sont néanmoins supposés d'avoir été provoqués non pas par N. fowleri mais par une espèce appartenant au genre Acanthamoeba. L'aspect morphologique de ces amibes dans les coupes histologiques permettent difficilement de les différencier, à moins de retrouver des kystes d'Acanthamoeba.

Jager et Stamm (1972), à l'aide de l'immunofluorescence indirecte ont pu mettre en évidence la présence d'Acanthamoeba dans le cerveau d'un patient mort, après 11 ans de traitement, d'une maladie de Hodgkin. Ils ont retrouvé également des kystes d'Acanthamoeba dans ces préparations.

Parelkar et al. (1971) ont montré que des trophozoïtes d'E. histolytica peuvent être spécifiquement identifiés par la technique d'immunofluorescence indirecte dans des coupes histologiques ainsi que dans les selles. Cette méthode a été confirmée par Wéry-Paskoff et al. (1972).

J. Martinez (Medical Commonwealth College, Virginia, USA) nous avait demandé d'identifier l'agent responsable de trois cas de méningo-encéphalite amibienne primitive rétrospective, suspects d'être causés par Acanthamoeba. Avant d'appliquer cette technique sur les coupes de cerveau humain nous avons vérifié la spécificité de l'antisérum anti-N. fowleri sur des coupes de cerveau de souris infectées préalablement avec N. fowleri.

Il nous a été demandé également d'identifier A. castellanii et A. polyphaga sur des coupes histologiques de poumons et de cerveau de souris expérimentalement infectées avec ces souches. L'identification de ces souches que nous avait confiées J. Martinez a été préalablement effectuée en se basant sur les caractères morphologiques par Page (Martinez, 1975),

Il nous a été adressé des coupes histologiques de muqueuse gastrique et de foie d'un singe (Pygathrix nemaeus) montrant de nombreuses amibes identifiées comme étant probablement E. histolytica. Ces coupes nous ont été envoyées par Krampitz et Geisel (Tropeninstitut, Munchen, DBR) pour confirmation.

4.1. Identification de N. fowleri dans des préparations histologiques de cerveau de souris.

On instille par voie intra-nasale une suspension de trophozoïtes de N. fowleri, souche Morgan à des souris. Une souris reçoit environ 5.000 amibes. Les souris sont sacrifiées dès qu'elles présentent les symptômes d'une méningo-encéphalite amibienne primitive. Certains cerveaux prélevés sont fixés dans 10% formol - eau physiologique, les autres au Carnoy. Les coupes sont ensuite réalisées suivant les techniques classiques. Après déparaffinage, nous avons successivement opposé les antisérums anti-N. fowleri Morgan et anti-A. culbertsoni A-1 à ces sections fixées des deux façons. Les résultats sont rassemblés dans le tableau 38.

Tableau 38 : Immunofluorescence indirecte sur coupes de cerveau de souris infesté par N. fowleri.

ANTIGENES	ANTISERUMS					
	<u>N. fowleri</u>			<u>A. culbertsoni</u>		
<u>N. fowleri</u>	1/16	1/32	1/64	1/16	1/32	1/64
Fixation au Carnoy	++	0	0	0	0	0
Fixation au Formol	++++	++++	+++	0	0	0

Les résultats obtenus indiquent que la fixation des pièces anatomiques par le formol se montre plus favorable que la fixation par le Carnoy pour effectuer les techniques d'immunofluorescence. Stamm (1974) a fait la même observation mais constate que, quand on traite préalablement ces coupes fixées par des fixateurs au mercure, à l'iode-alcool; celles-ci peuvent être employées pour la fluorescence. Néanmoins, l'intensité de la fluorescence est beaucoup plus faible que sur les coupes fixées par le formol.

D'après nos résultats, l'antisérum anti-N. fowleri sera employé à 1/32 (maximum brillance) ainsi que l'antisérum anti-A. culbertsoni, puisqu'à 1/32 aucune réaction croisée n'est observée.

4.2. Confirmation de la présence de N. fowleri dans le tissu cérébral provenant des cas de méningo-encéphalite amibienne primitive chez l'homme.

Nous avons pu examiner, grâce à l'obligeance de J. Martin (Institut Bunge, Anvers) des prélèvements de cerveau de trois cas de méningoencéphalite amibienne primitive survenus à Anvers. Les pièces anatomiques ont été fixées au formol.

Les résultats obtenus avec les antisérums anti-N. fowleri et anti-A. culbertsoni sont indiqués dans le tableau 39.

Tableau 39 : Réaction d'immunofluorescence indirecte sur les coupes de cerveau de 3 cas de méningoencéphalite amibienne primitive détectés à Anvers.

Cas MEAP	Antisérums	Anti- <u>N. fowleri</u> 1/32	Anti- <u>A. culbertsoni</u> 1/32
1)1402 V.B.		++++ Amibes très nombreuses	négative
2)1395 W		+++ peu d'amibes	négative
3)1575 M		+++ peu d'amibes	négative

Ces résultats confirment la présence de N.fowleri dans les coupes de cerveau de cas de méningoencéphalite amibienne primitive (fig.65). Après la réaction d'immunofluorescence indirecte, ces coupes ont été colorées à l'hématoxyline-éosine et les amibes ont pu être localisées au mêmes endroits où elles avaient été observées en immunofluorescence. Aucune amibe n'a été rendue fluorescente après contact avec l'antisérum anti-A.culbertsoni.

L'emploi successif de différents antisérums sur une même coupe influence peu l'importance de la réaction. Les coupes ayant été opposées d'abord à l'antisérum anti-A.culbertsoni sans résultat, ont été mises en contact avec l'antisérum anti-N.fowleri. Après un temps d'incubation normal les amibes montrent une fluorescence brillante. Dans ces cas, la contre-coloration par le bleu d'Evans n'est appliquée que lors de la mise en contact avec le dernier antisérum pour éviter l'atténuation de la fluorescence.

En plus de ces trois cas anversoïis, nous avons pu confirmer également la présence de N.fowleri dans le cas A 251-69 de méningo-encéphalite amibienne primitive provenant de Virginie (Medical College, Richmond, Virginia).

4.3. Identification rétrospective de l'agent étiologique dans trois cas suspects de méningo-encéphalite amibienne primitive provenant des Etats-Unis.

En 1970, dos Santos retrouve cinq cas de méningo-encéphalite amibienne primitive en Virginie après l'examen histologique de 16.174 pièces d'autopsie dont 542 appartenaient à des sujets ayant présenté des symptômes de méningites.

L'identification spécifique de l'agent étiologique dans 3 cas sur 5 a été rendue difficile par la faible présence d'amibes dans les coupes. Des coupes histologiques, provenant de différents endroits de ces cerveaux ont été mises à notre disposition par J. Martinez.

Certaines de ces coupes ont été mises en contact avec le premier temps avec l'antisérum anti-N. fowleri et puis avec l'antisérum anti-N. fowleri. Après la réaction de l'immunofluorescence indirecte toutes les coupes ont été mises à l'hexatoxiline-éosine pour vérifier la localisation des zones identifiées par l'immunofluorescence. Les résultats sont consignés dans le tableau II.

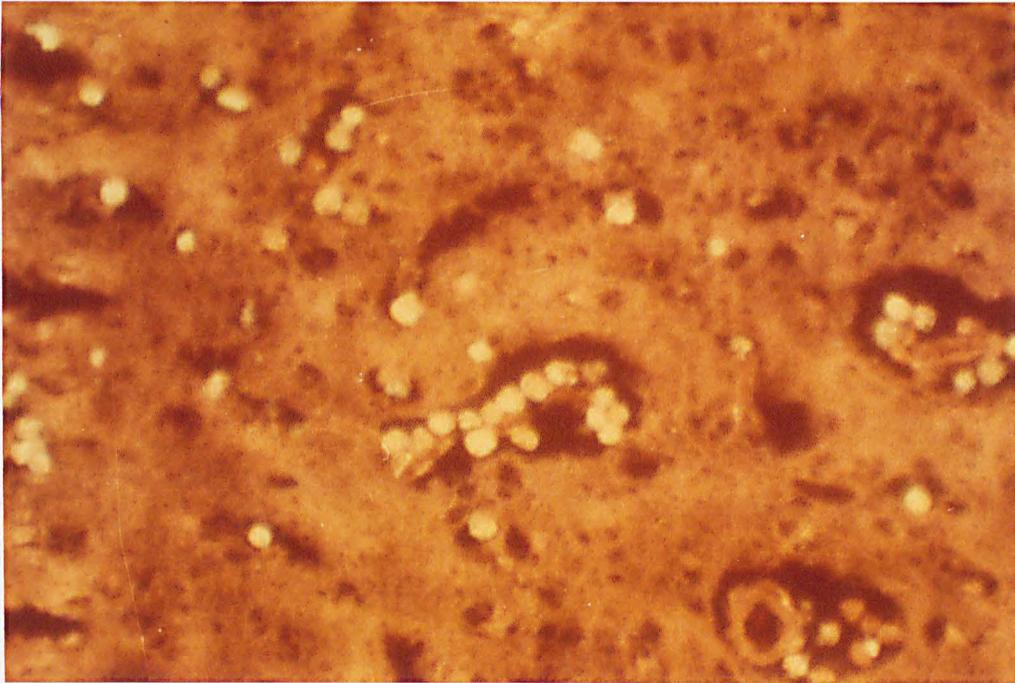


Fig. 65. Immunofluorescence indirecte positive à l'aide d'un immun-sérum anti-N. fowleri sur coupe de cerveau humain.

Certaines de ces coupes ont été mises en contact dans un premier temps avec l'antisérum anti-A.culbertsoni puis ensuite avec l'antisérum anti-N.fowleri. Après la réaction d'immunofluorescence indirecte toutes les coupes ont été colorées à l'hématoxyline-éosine pour vérifier la localisation des amibes identifiées par l'immunofluorescence. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 40.

Tableau 40 : Réaction d'immunofluorescence indirecte sur les coupes provenant de 3 cas rétrospectifs survenus en Virginie.

Cas MEAP	Coupe n°	Réaction d'immunofluorescence indirecte	
		Anti- <u>N.fowleri</u>	Anti- <u>A.culbertsoni</u>
A. 6467 -	20	N.R	négative
	26	++	N.R.
	27	+++	négative
A. 6832 -	28	négative	négative
	34	++ quelques amibes	N.R.
	35	N.R.	négative
	36	++ quelques amibes	négative
A 9802 -	16	++ quelques amibes	N.R
	22	N.R.	négative
	25	++	négative

N.R. = non réalisée

Ces résultats nous permettent de conclure que ces trois cas sont dûs à N. fowleri, néanmoins dans le cas A 6832 très peu d'amibes ont été observées. Depuis, ces résultats ont été confirmés par Stamm (1974) sauf pour le cas A 6832 où il n'a pas trouvé d'amibes.

Ce diagnostic a été répété pour les trois cas sur plusieurs coupes histologiques provenant de différents endroits du cerveau. Très peu d'amibes ont été retrouvées chez ces trois cas. Parfois 4 à 5 amibes seulement ont été reconnues dans une coupe. L'utilisation des coordonnées du Vernier de la platine du microscope permet de localiser les amibes sur les coupes. Après l'analyse par immunofluorescence indirecte, les préparations sont lavées dans un tampon et séchées. Ensuite elles sont colorées à l'hématoxyline-éosine et les amibes sont retrouvées aux endroits répertoriés en immunofluorescence. Suivant Parelkar et al., (1971) les sections peuvent être colorées avant la réaction d'immunofluorescence indirecte, mais ces auteurs observent en plus d'autres corps fluorescents non identifiés ressemblant à des amibes.

Ce procédé nous a permis de confirmer la présence de N.fowleri dans le cerveau de cas confirmés de méningo-encéphalite amibienne primitive et d'identifier cette même amibe dans des cas rétrospectifs suspects.

#### 4.4. Essai d'identification par l'immunofluorescence indirecte d'amibes appartenant au genre Acanthamoeba.

A la demande de J.Martinez (Medical College, Virginia) nous avons essayé de confirmer l'identité de deux espèces d'amibes appartenant au genre Acanthamoeba lesquelles ont expérimentalement montré une pathogénicité modérée pour la souris.

Ces amibes ont été identifiées par Page comme étant A. castellanii et A. polyphaga. Plusieurs coupes de cerveau et de poumons de souris infectées ont été opposées aux antisérums anti-A.castellanii, anti-A. polyphaga, anti-A.astronyxis et anti-A.culbertsoni.

Les expériences R.2-3 et R.2-2 (tableau 41) ont été produites avec une souche identifiée comme A. polyphaga et les expériences G 70-3, G 70-5 et 66 G 3 avec une souche identifiée comme étant A.castellanii.

Les résultats que nous avons obtenus avec les différents antisérums sont rassemblés dans le tableau 41.

Tableau 41: Essai d'identification d'espèces du genre Acanthamoeba dans des coupes histologiques de souris expérimentalement infectées.

Expérience	ANTISERUMS			
	Anti- <u>A.culbertsoni</u>	Anti <u>A.astronyxis</u> ;	Anti <u>A.castellanii</u>	Anti <u>A.polyphaga</u>
R 2-3 a	N.R.	+(très faible=0)	+++	++
b	+(très faible=0 kystes fluorescents	N.R.	+++	++ (Fluorescence granuleuse)
R 2-2 a	+(très faible=0)	négative	+(très faible= 0)	+++
b	++(fluoresc.granul)	N.R.	++	négative
G 70-3 a	+++ (quelques amibes dans cerveau) poumons = négative	négative	négative	++
b	négative	N.R.	++	++
G 70-5 a	+(faible=0)	N.R.	++	++
b			négative	+(très faible =0)
66 G-3 a	+(très faible=0)	N.R.	++	++
b			+++	++

N.R. = non réalisée

Ces résultats ne nous permettent pas d'identifier avec certitude l'espèce responsable de l'infection chez la souris.

Dans les expériences R 2-2 et R 2-3, les résultats obtenus avec l'antisérum anti-A.castellanii sont un peu plus significatifs que ceux obtenus avec l'antisérum anti-A.polyphaga; mais la différence n'est pas assez marquée pour identifier avec certitude l'espèce en cause.

Les mêmes résultats peuvent être observés dans les expériences G 70-3, G 70-5 et 66 G-6. A l'aide de ces résultats il ne nous est pas possible d'identifier avec certitude A. polyphaga ou A. castellanii. De plus, les résultats montrent que les amibes présentes dans les coupes n'appartiennent pas aux espèces A. astronyxis ou A. culbertsoni. Néanmoins, dans les coupes du cerveau de l'expérience G 70-3, nous avons trouvé plusieurs amibes rendues fluorescentes au contact de l'antisérum anti-A. culbertsoni. Cette observation attire l'attention sur une hétérogénéité possible de la population employée lors de l'infection expérimentale.

En conclusion, les amibes présentes dans toutes les coupes peuvent être identifiées comme appartenant au groupe A. castellanii

Comme nous l'avons établi, à l'aide de l'analyse immunoelectrophorétique, il existe au sein du genre Acanthamoeba un groupe d'espèces antigéniquement très apparenté. Ce groupe est constitué par les espèces A. castellanii, A. polyphaga, et A. rhyssodes. Par l'intermédiaire de J. Martinez, nous avons reçu des coupes histologiques de cerveau humain provenant d'un cas récent de méningo-encéphalite amibienne primitive survenu au Texas (Sotelo-Avila et al., 1974). Ce cas a fait l'objet d'une controverse au sujet de la diagnose de l'agent étiologique : Naegleria, Hartmannella ou Acanthamoeba sont suggérés comme agent causal mais également cryptococcus neoformans.

Après examen des coupes histologiques, J. Martinez met en évidence la présence de kystes d'Acanthamoeba. Nous avons pu les retrouver également dans les coupes colorées et l'immunofluorescence a permis de les mettre en évidence.

Nous avons mis en contact ces coupes avec les différents immunosérums d'étude et nous avons obtenus les résultats suivants :

Tableau 42 : Immunofluorescence indirecte sur coupes de cerveau humain d'un cas suspect de méningo-encéphalite amibienne primitive.

Immunsérums	Titre	Résultat
<u>A.culbertsoni</u>	1/16	Négatif
<u>N.fowleri</u>	1/32	Négatif
<u>E.histolytica</u>	1/32	Négatif
<u>A.castellanii</u>	1/16	Positif ++
<u>A.astronyxis</u>	1/8	Négatif
<u>A.polyphaga</u>	1/8	Positif ++

Ce résultat montre qu'il s'agit bien d'une amibe et que l'agent responsable de ce cas de méningo-encéphalite appartient au groupe A.castellanii - A. polyphaga - A. rhysodes. Ce résultat a été confirmé par W.P. Stamm (communication personnelle de J. Martinez).

#### 4.5. Identification par l'immunofluorescence indirecte d'E. histolytica dans des coupes histologiques.

Des coupes histologiques de muqueuse gastrique et de foie d'un singe (Pygathrix nemaeus), importé en Allemagne venant d'Asie, mort de malnutrition, montrent de nombreuses amibes. Geisel et Krampitz identifient cette amibe étant E.histolytica.

A l'aide d'un antisérum anti-E.histolytica (souche HK9) et d'antisérums anti-Naegleria et anti-Acanthamoeba, nous confirmons l'espèce.

Les résultats obtenus avec différents antisérums sont rassemblés dans le tableau 43.

Tableau 43 : Immunofluorescence indirecte sur coupes histologiques d'un singe (Pygathrix nemaeus).

ANTISERUMS	COUPES	
	Muqueuse gastrique	Foie
Anti- <u>A.culbertsoni</u> 1/16	négative	négative
Anti- <u>N.fowleri</u> 1/32	négative	négative
Anti- <u>N.gruberi</u> 1/32	négative	négative
Anti- <u>E.histolytica</u> 1/32	++++	+++
1/64	++++	+++
1/128	++++	++
1/256	++	+
1/512	+ trace (=0)	négative
1/1024	négative	négative

D'après les résultats obtenus l'identité de l'espèce responsable de l'invasion parasitaire est incontestable. Nous confirmons donc la présence de E.histolytica dans ces coupes. Il est intéressant de noter qu'aucune réaction croisée n'est observée entre les différents antisérums employés dans cette étude.

#### 4.6. Conclusions.

L'étude par l'immunofluorescence indirecte nous a permis de confirmer les observations faites à l'aide de l'analyse immunoelectrophorétique. Ces résultats permettent de confirmer l'homogénéité observée pour l'espèce N.fowleri, ainsi que la distinction respective des espèces appartenant au genre Naegleria.

Etant donné l'absence totale de parentés sérologiques entre les différents genres, l'identification rapide à l'aide d'antisérums, rendus spécifiques grâce aux dilutions, peut être envisagée favorablement.

Au sein du genre Acanthamoeba une réaction croisée importante est observée entre quelques espèces. Celles-ci appartiennent au groupe que nous avons délimité par l'analyse immunoelectrophorétique. Par contre,

A. culbertsoni se différencie nettement de ce groupe.

A l'aide d'un antisérum rendu spécifique il est possible de mettre en évidence N.fowleri ainsi que d'autres espèces, dans des coupes histologiques. On peut ainsi identifier et confirmer des cas de méningo-encéphalite amibienne primitive.

L'immunofluorescence indirecte, exécutée à l'aide d'immunsérum rendu spécifique nous semble être un moyen rapide et valable pour l'identification d'amibes dans du matériel suspect.

CHAPITRE 7

---

Etude morphologique et biologique de N.jadini

"Rien n'est plus difficile, en effet,  
que de déterminer une amibe ".

Dangeard 1900.

L'homogénéité morphologique du genre Naegleria rend délicate la distinction de ses espèces constitutives. C'est l'analyse immunoélectrophorétique des structures antigéniques des espèces appartenant au genre Naegleria qui nous a permis d'établir indiscutablement l'indépendance génétique de N.jadini.

Néanmoins, en plus des caractères immunoélectrophorétiques différentiels de N.jadini par rapport à N.gruberi et N.fowleri, nous avons voulu mettre en évidence quelques caractères morphologiques et biologiques propres à cette espèce, pour pouvoir justifier entièrement la création d'une nouvelle espèce au sein du genre Naegleria.

Le genre Naegleria Alexeieff, 1912, emend. Calkins, 1913, appartient à la famille des Vahlkampfiidae Jollos, 1917, de l'ordre des Amœbida Kent, 1880. Il se caractérise, tout comme d'autres genres de la famille par l'existence temporaire d'un stade flagellé (fig.66).

L'existence d'amibes susceptibles de se transformer en formes flagellées avait été mentionnée par Dujardin en 1841 et par Kent en 1880 (Fulton, 1970). N.gruberi est la première espèce dont la description minutieuse de la transformation d'amibe en flagellate ait été faite par Schardinger (1899) à propos d'un organisme isolé de selles diarrhéiques. Par la suite, à plusieurs reprises, N.gruberi fut mise en synonymie avec N.bistadialis, N.soli et N.aquatilis (Fulton, 1970) en raison de descriptions peu précises et la non conservation des souches.

Depuis Schardinger en 1899, N.gruberi a été pendant longtemps la seule espèce appartenant au genre Naegleria.

Il fallait attendre 1970, pour que Carter décrivit une nouvelle espèce sous le nom de N.fowleri (Carter, 1970). Cette nouvelle espèce fut isolée en 1965, à partir d'un liquide céphalo-rachidien d'un sujet humain atteint de méningo-encéphalite foudroyante. Cette amibe, sera isolée par la suite et par plusieurs auteurs à partir de sujets morts ou atteints d'une nouvelle maladie fatale : la "méningo-encéphalite amibienne primitive". La différenciation entre

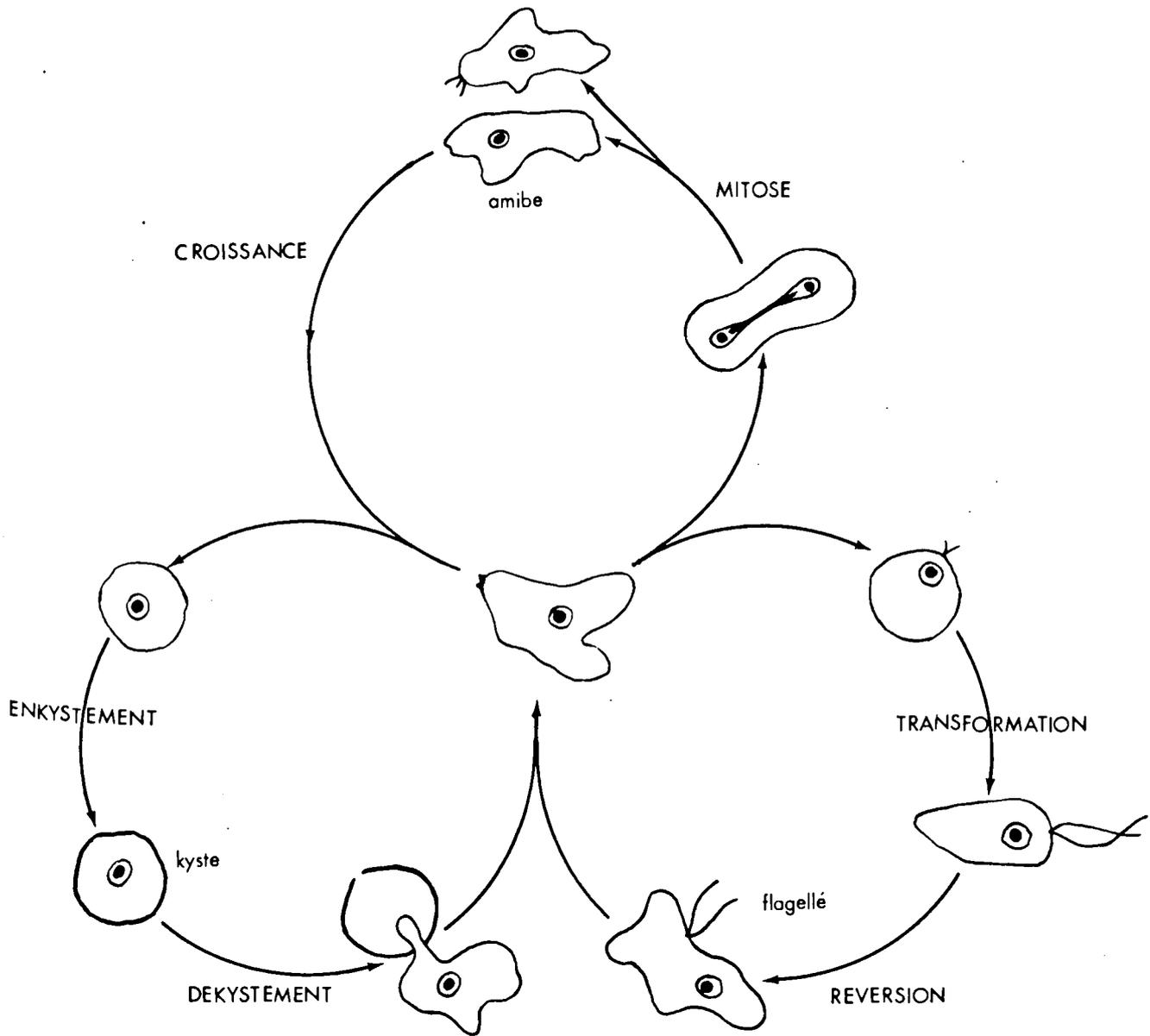


Figure 66.  
 Représentation schématique du cycle de Naegleria  
 (d'après C.Fulton).

N.gruberi et N.fowleri caractérisée par la présence du caractère "pathogène" chez ce dernier, suffit déjà pour faire une distinction entre ces deux espèces, en prenant en considération les théories de Hoare (1955, 1966) à propos des protozoaires parasites.

Néanmoins des caractères morphologiques différentiels furent établis par Carter (1970) et Singh et Das (1970).

Ultérieurement, cette espèce a été décrite sous le nom de N. aerobia (Singh et Das, 1970) et de N. invades (Chang, 1971), celles-ci se sont montrées antigéniquement identiques à N. fowleri et distinctes de N.gruberi (Willaert et al., 1972, 1974; Anderson et al., 1973).

Au cours de l'isolement d'une série de souches appartenant au genre Naegleria, nous avons pu mettre en évidence l'existence d'un amoebo-flagellate se distinguant nettement de N.gruberi et de N.fowleri au niveau des structures immuno-chimiques (Willaert et al., 1973). Afin d'en préciser le statut taxonomique nous avons entrepris l'étude comparative des caractères morphologiques et biologiques de cet organisme. Il semblait s'agir d'une espèce nouvelle que nous avons proposé d'appeler N.jadini (Willaert et Le Ray, 1973) en hommage à notre maître le Professeur J.B.Jadin.

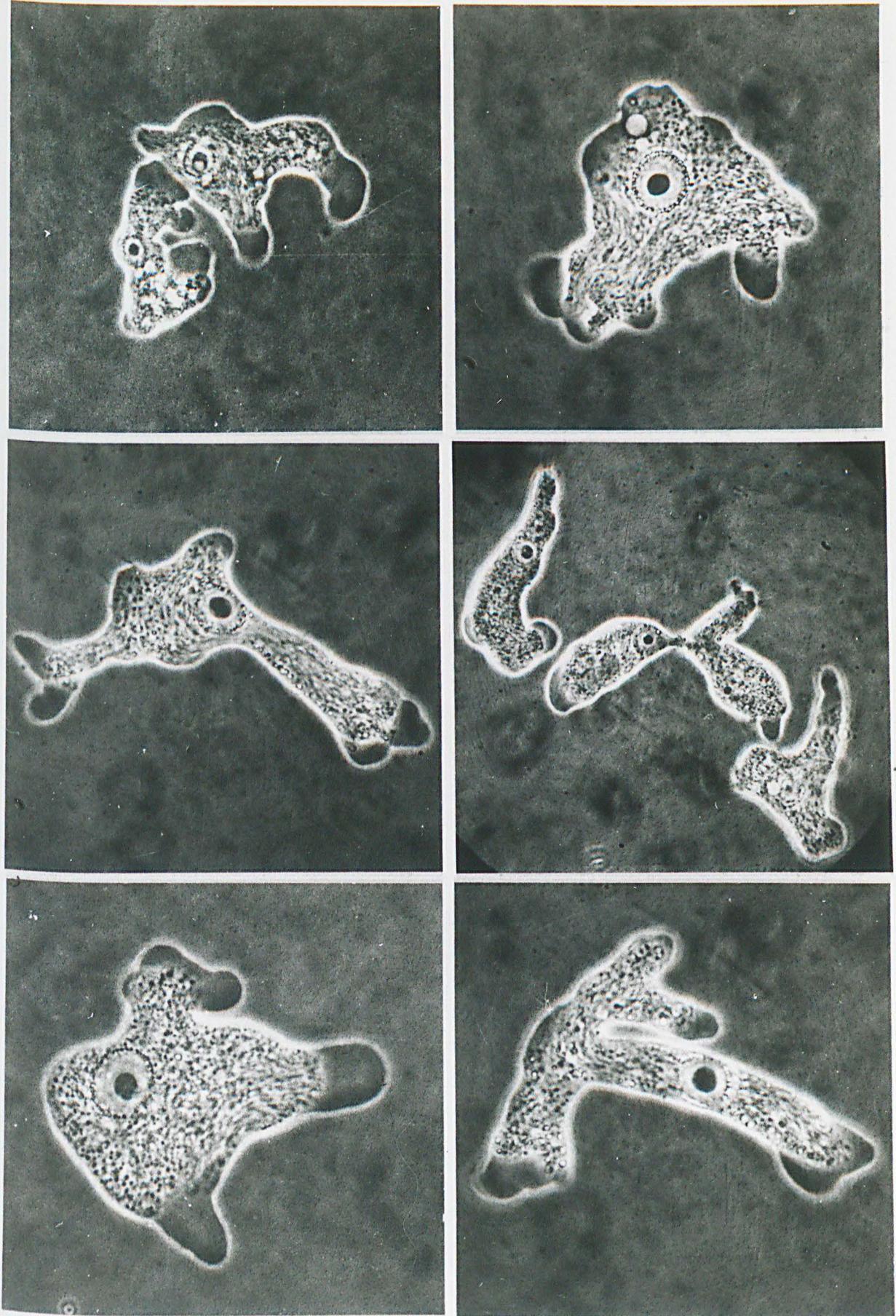
## 1. Etude morphologique

### 1.1. Observations en microscopie photonique

#### 1.1.1. Forme amoebienne

L'aspect général est comparable à celui de N.gruberi et de N.fowleri. L'endoplasme se distingue nettement de l'ectoplasme. L'organisme se déplace par formation d'un lobopode hyalin (fig.67). Il y a parfois formation simultanée de petits pseudopodes diversément orientés (fig. 67, 80). L'extrémité antérieure est généralement plus large que l'extrémité postérieure, caractérisée par la formation de filaments uroïdes. Les dimensions des trophozoïtes varient sensiblement suivant le milieu de culture d'origine comme l'indique le tableau suivant.

Figure 67



Trophozoïtes de *N. jadini* (contraste de phase : x1000)

Tableau 44 : Dimensions des trophozoïtes mobiles de N.jadini  
(en microns)

Milieu de culture	Longueur	Largeur
Agar + bactéries	15 à 37,5 ( $\bar{m}$ = 23,2)	4,5 à 12 ( $\bar{m}$ = 7,65)
Culture axénique	27 à 45 ( $\bar{m}$ = 35,1)	9 à 15 ( $\bar{m}$ = 11,4)

Le noyau, de type vésiculaire, mesure de 3 à 5 microns et contient un caryosome central de 2 à 3 microns de diamètre. Le noyau, limité par une membrane simple est entouré d'une couronne de granules périnucléaires. Des trophozoïtes contenant deux à cinq noyaux sont fréquents dans les cultures jeunes en milieu axénique.

La reproduction se fait par division binaire simple. La division nucléaire est identique à celle de N.gruberi (Rafalko, 1947; Singh, 1952; Page, 1967) et de N.fowleri (Carter, 1970; Singh et Das, 1970). Elle est du type promitotique, avec persistance de la membrane nucléaire et formation de masses polaires dérivées du nucléole. Avec Das (Das et al., 1974) nous avons étudié en détail la division nucléaire de N.jadini.

#### Division nucléaire.

##### a) Noyau en interphase

Chez N.jadini à l'état vivante, le noyau en interphase comporte un nucléole sphérique, central et distinct entouré par une zone claire - le suc nucléaire, contenu par la membrane nucléaire. Dans les préparations colorées par l'hématoxyline ferrique des structures filiformes irradiant à partir du nucléole sont visibles dans certains noyaux. (fig.68). Le nucléole se colore plus intensément que les granules chromatiques et résiste à la décoloration par l'alun ferrique à 1% beaucoup plus longtemps que la substance chromatique. Généralement un seul noyau est présent dans

chaque amibe mais deux et plusieurs noyaux peuvent être trouvés dans une seule amibe.

b) Prophase

Les trophozoïtes restent mobiles et ne s'arrondissent pas pendant la division. Le début de la division nucléaire est indiqué par un gonflement du noyau et l'allongement du nucléole (fig. 69). Les substances chromatiques se trouvent à côté du nucléole et sont dans certains cas nettement visibles. Ces granules commencent à fusionner et occasionnellement on peut observer un anneau solide de matériel chromatique autour du nucléole (fig. 69, 70). Ensuite, le nucléole prend habituellement une apparence en forme d'haltère et se divise en deux moitiés formant ainsi les masses polaires.

c) Métaphase

Après la formation des masses polaires, une masse solide de chromatine apparaît occupant la position de la plaque équatoriale (fig. 69, 70, 71). Des chromosomes individuels ne sont pas rencontrés. Le fuseau reliant les masses polaires ne peut être observé mais des filaments de fuseau se distinguent. Aucune division de chromosomes n'a été observée. Des capsules achromatiques, connues sous le nom de "capsules polaires" (Ford, 1914), peuvent être observées chez certaines amibes, entre les extrémités du caryosome étiré et la membrane nucléaire (fig. 71).

d) Anaphase.

La bande de matériel chromatique se divise en deux et chaque moitié se dirige vers son pôle. A ce stade, le matériel chromatique se trouve en contact avec les "masses polaires". Après que le matériel chromatique se soit dirigé aux deux pôles, une certaine substance granulaire non-chromatique, appelée "corps interzonal" (Rafalko, 1974), peut être observée (fig. 72, 73, 74, 75) à mi-chemin entre les deux "masses polaires". Le corps interzonal augmente de volume et se divise en deux. La membrane nucléaire persiste durant toute la division; celle-ci devient allongée et s'étrangle au milieu, donnant lieu à deux noyaux-fils.

Mitose de N.jadini.

Figure 68

Noyau en interphase et fin d'une télophase (X2.000)

Figure 69

Prophase et métaphase (X 2.000).

Figure 70, 71

Métaphase (X 1.500 et X 1.000).

Figure 72, 73

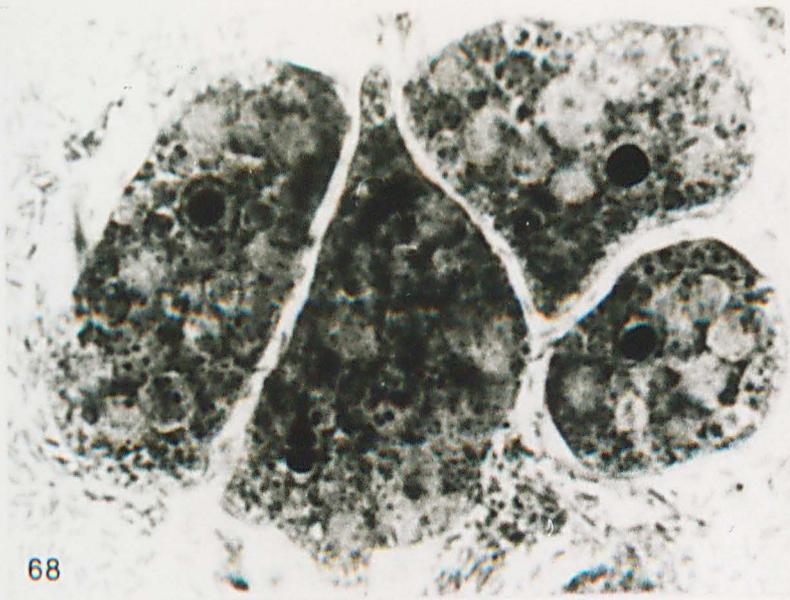
Anaphase, division du corps interzonal (X 1.500, X 1.000).

Figure 74

Début de la télophase. Les corps interzonaux sont encore reliés par une structure filiforme. (X 1.000).

Figure 75

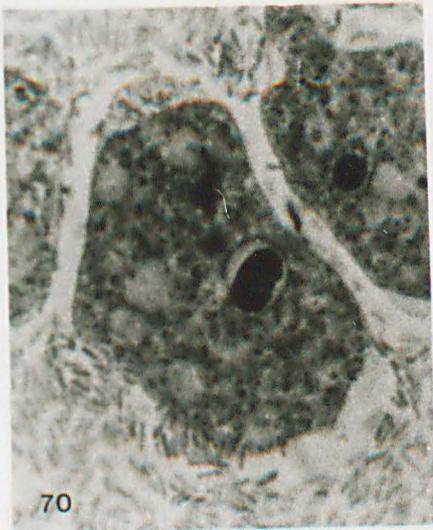
Télophase, division du cytoplasme. (X 1.000).



68



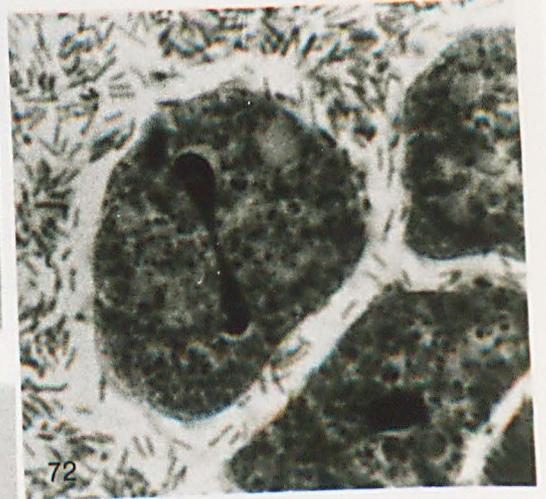
69



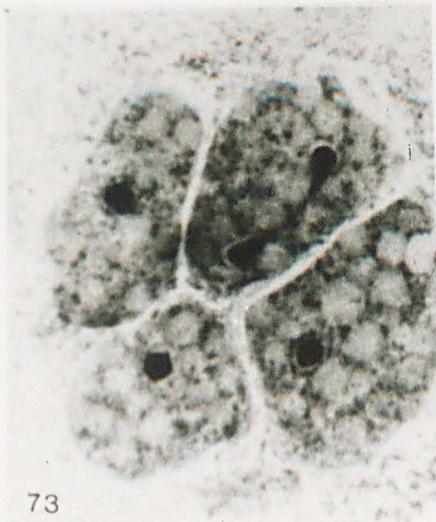
70



71



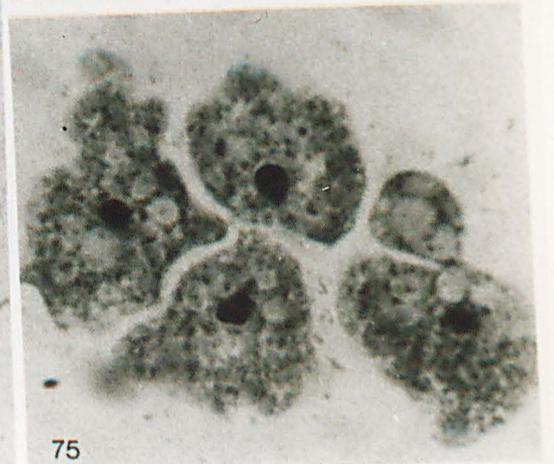
72



73



74



75

e) Télophase

Après la division du noyau, les corps interzonaux sont encore reliés pendant un certain temps par une structure filiforme (fig. 73,74). Plus tard, l'amibe s'étire, s'étrangle au milieu, donnant lieu à deux cellules-filles (fig. 68,75). Le corps interzonal et la masse polaire du noyau-fils fusionnent et forment ainsi le nucléole. Le matériel chromatique est dispersé en granules et ceux-ci vont occuper une position identique à celle observée dans le noyau en interphase.

Le cytoplasme contient une à trois vacuoles pulsatiles, de nombreux granules réfringents et des vacuoles alimentaires de petite taille. Celles-ci sont beaucoup plus nombreuses en culture sur bactéries qu'en culture axénique.

1.1.2. Forme flagellée

Le caractère le plus remarquable de ces organismes est d'être tantôt des amibes tantôt des flagellates.

Les Naegleria sont sujettes à trois changements morphologiques fondamentaux pendant leur transformation en flagellates :

- 1) la forme amiboïde change en forme flagellée relativement stable;
- 2) les grandes organelles préexistantes, c.à.d. la vacuole pulsatile et le noyau, se déplacent continuellement chez les formes amiboïdes et semblent avoir une localisation stable chez la forme flagellée et
- 3) l'apparition de nouvelles organelles de l'appareil flagellaire (flagelles, corps baseaux et rhizoplastes).

Ces changements morphologiques pendant la transformation ont été décrits à propos de N.gruberi, après observation en microscopie électronique par Dingle et Fulton (1966) et par Preston et O'Dell (1973).

En ce qui concerne N. jadini, nous possédons seulement quelques observations en microscopie photonique.

Figure 76

Forme flagellée de N.jadini avec une apparence piriforme.

Figure 77

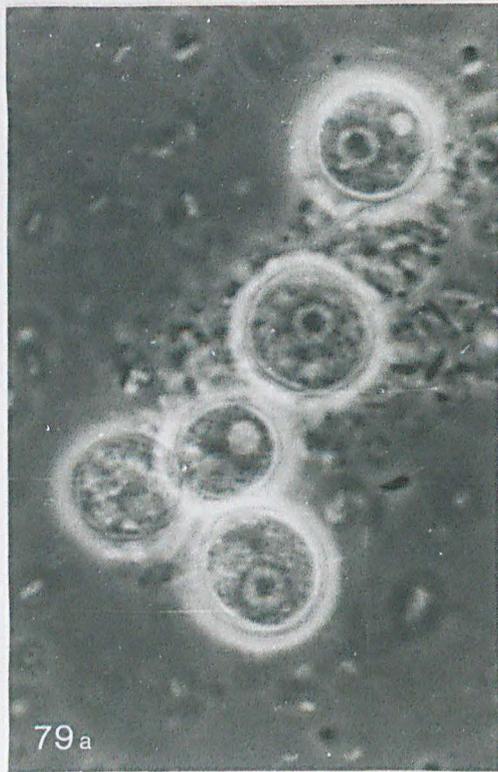
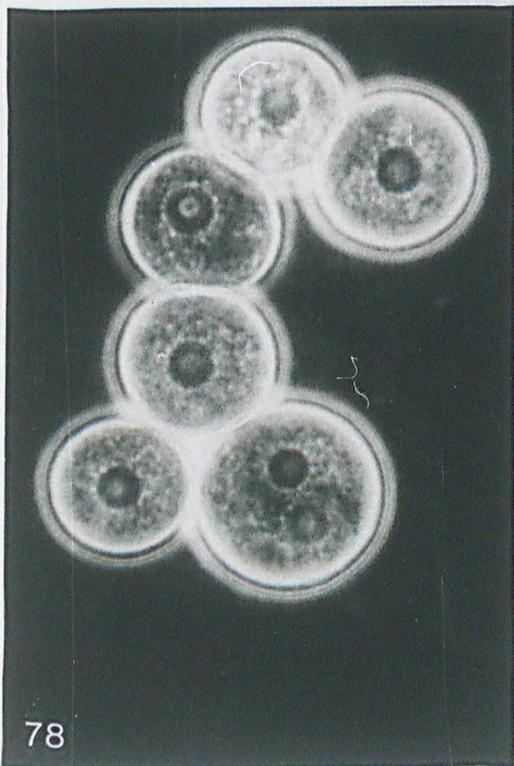
Forme flagellée de N.jadini à quatre flagellés.

Figure 78

Kystes de N.jadini

Figure 79

- a) Kystes de N.jadini avec apparition de vacuoles.
- b) Kyste vide montrant la rupture de la paroi.



Les formes flagellées peuvent se rencontrer spontanément dans les cultures axéniques liquides. D'autre part, des formes amiboïdes, récoltées sur agar-bactéries et incubées en eau distillée, peuvent se transformer en flagellés au bout de deux heures ou plus. Nous n'avons pas recherché les conditions optimales pour obtenir la transformation en flagellés de populations entières de formes amiboïdes. Les conditions à respecter pour obtenir cette transformation massive ont été décrites par Fulton (1970).

Les formes flagellées, d'abord amiboïdes s'allongent et acquièrent rapidement une apparence piriforme (fig. 76) et possèdent normalement deux flagelles de même longueur. L'extrémité postérieure est pointue, le noyau est antérieur et situé près des flagelles. La base des flagelles est légèrement épaissie et semble s'attacher à la membrane nucléaire. Le mouvement des flagelles est intense et procède par battements plutôt que par ondulations. On peut rencontrer des formes à quatre flagelles qui possèdent soit un, soit deux noyaux (fig. 77). Les formes binuclées résultent soit de la division d'une forme flagellée, soit d'une amibe ayant acquit des flagelles durant la caryocinèse.

### 1.1.3. Kystes.

Des kystes de N. jadini peuvent être obtenus rapidement après ensemencement sur agar-bactéries, en culture axénique nous n'avons jamais observé la formation de kystes.

Les kystes sont sphériques et ont un diamètre de 9 à 18 microns avec une moyenne de 13,9 microns. Leur paroi, très réfringente en contraste de phase, est lisse, simple et apparemment dépourvue de pores (fig. 78, 81).

Les kystes sont généralement uninuclées, bien que l'on observe fréquemment des kystes renfermant deux à sept noyaux. Le noyau est généralement bien visible avec un gros caryosome central et une membrane nucléaire entourée d'une couronne de granules périnucléaires.



Fig. 80. Forme végétative de N. jadini.

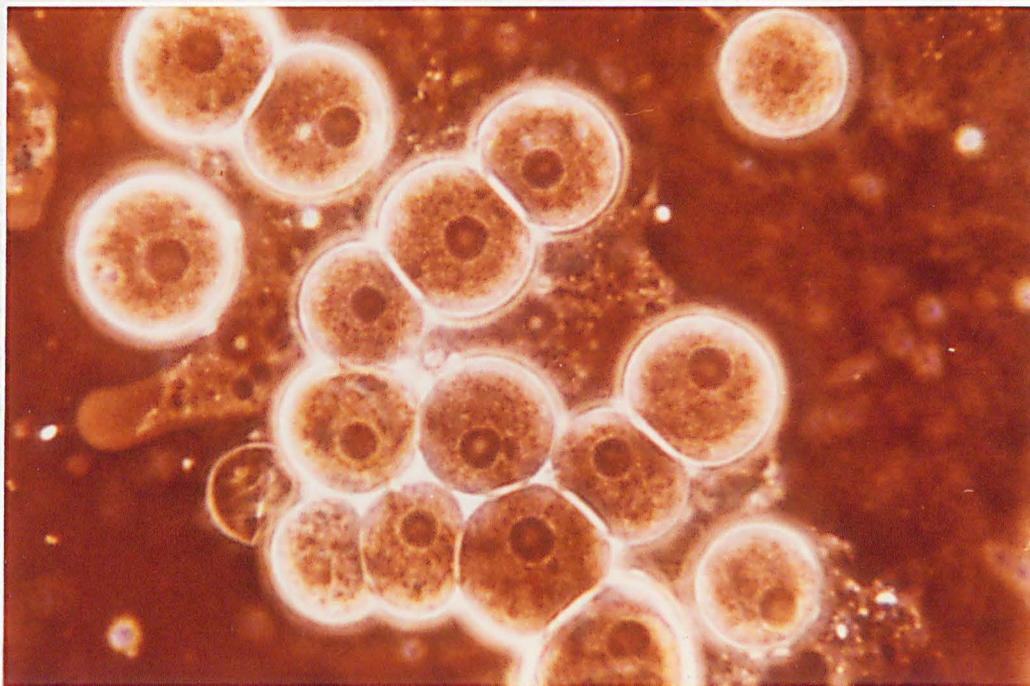


Fig. 81. Kyste de N. jadini.

Le dékystement s'effectue probablement par rupture de la paroi du kyste. Lors du dékystement, une vacuole prend naissance dans le cytoplasme, puis augmente de volume et provoque la rupture de la paroi kystique (fig. 79 a et b).

## 1.2. Observations en microscopie électronique.

Ces observations ont pu être réalisées grâce à la collaboration de J.M. Jadin et de G. Carosi (Pavia, Italie).

Cette étude ultrastructurale de N. jadini ne constitue qu'une étude préliminaire du trophozoïte examiné à partir de cultures axéniques. Le kyste a été à peine envisagé.

### 1.2.1. Ultrastructure du trophozoïte.

Un examen général d'une série de microphotographies montre que les caractéristiques ultrastructurales sont retrouvées chez toutes les amibes examinées. L'endoplasme est difficilement différencié de l'ectoplasme, sauf quand celui-ci est exempt d'inclusions.

1.2.1.1. Paroi cellulaire.- La paroi cellulaire de N. jadini se présente telle qu'elle a été décrite par Robertson (1964) comme "unit membrane", elle consiste en deux couches opaques aux électrons, entourant une couche transparente aux électrons. D'après Jadin, (1971) cette membrane peut se déformer facilement, lors du processus d'endocytose. Des portions de la membrane peuvent s'invaginer, puis les lèvres de cette invagination fusionnent et introduisent dans le cytoplasme une vacuole dont la membrane est dérivée de la membrane cellulaire.

Nous n'avons pas pu observer à la face externe de la paroi cellulaire un revêtement cellulaire ou glycocalyx chez ces amibes cultivées axéniquement.

Figure 86.

Modèle d'organisation ultrastructurale de N. jadini.

Abréviations utilisées dans la figure.

- AG : Appareil de Golgi
- L : Lysosome
- M : Mitochondrie
- MN : Membrane nucléaire
- N : Noyau
- PC : Paroi cellulaire
- PL : Phagolysosome
- PP : Pseudopode
- R : Ribosome
- RE : Réticulum endoplasmique
- VL : Vacuole lipidique
- VP : Vacuole pulsatile
- VPN : Vacuoles périnucléaires.

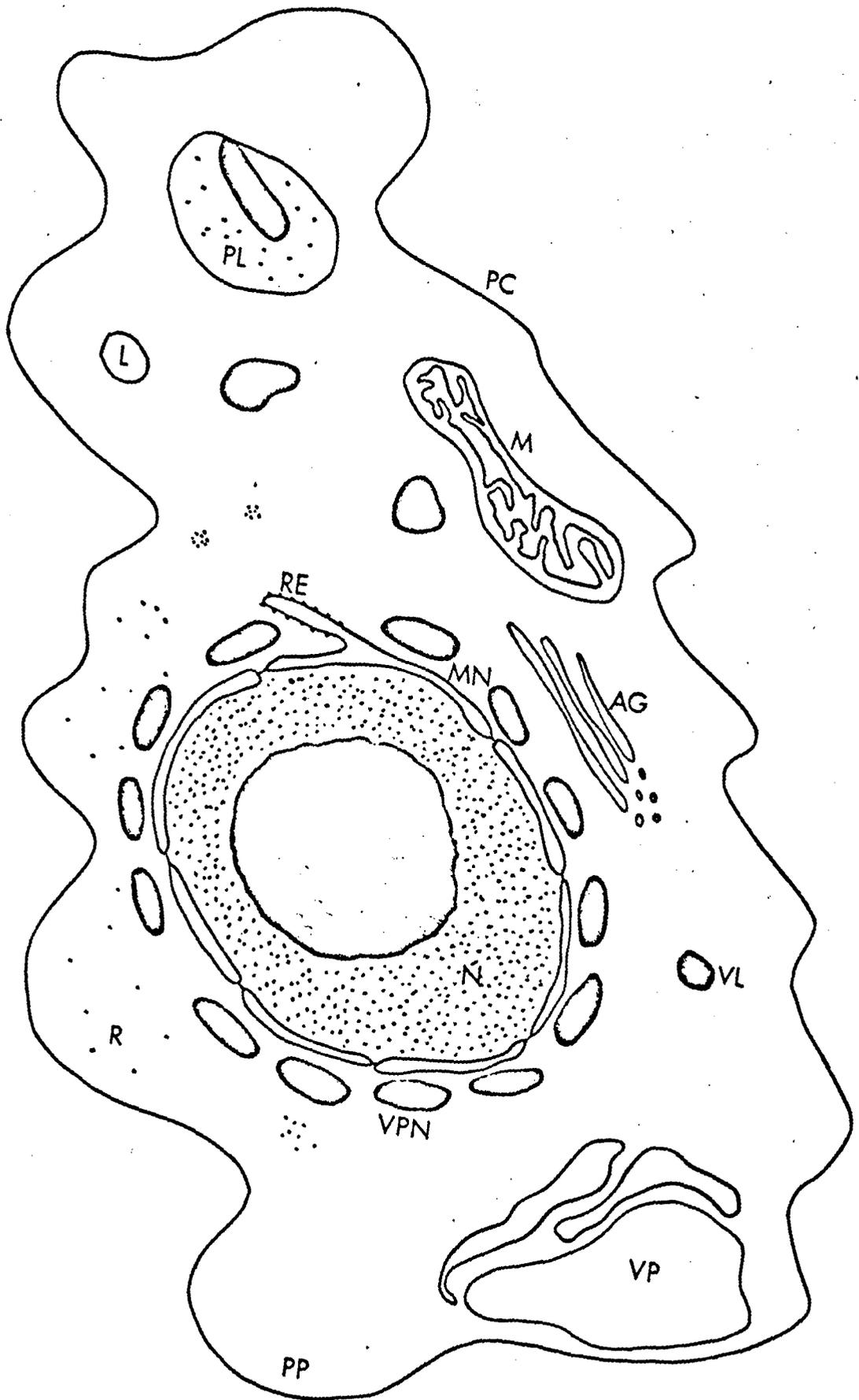


Figure 82.

Trophozoïte de Naegleria jadini montrant le noyau avec un volumineux nucléole central. Le noyau est entouré de nombreuses vacuoles. A proximité du noyau, on distingue un gros phagocytosome contenant des éléments figurés. L'organisme renferme plusieurs grosses vacuoles électrons transparents. Le cytoplasme contient de nombreuses mitochondries polymorphes et du réticulum endoplasmique irrégulièrement distribué (pas en association régulière avec les mitochondries)(x 9.200).

Figure 83.

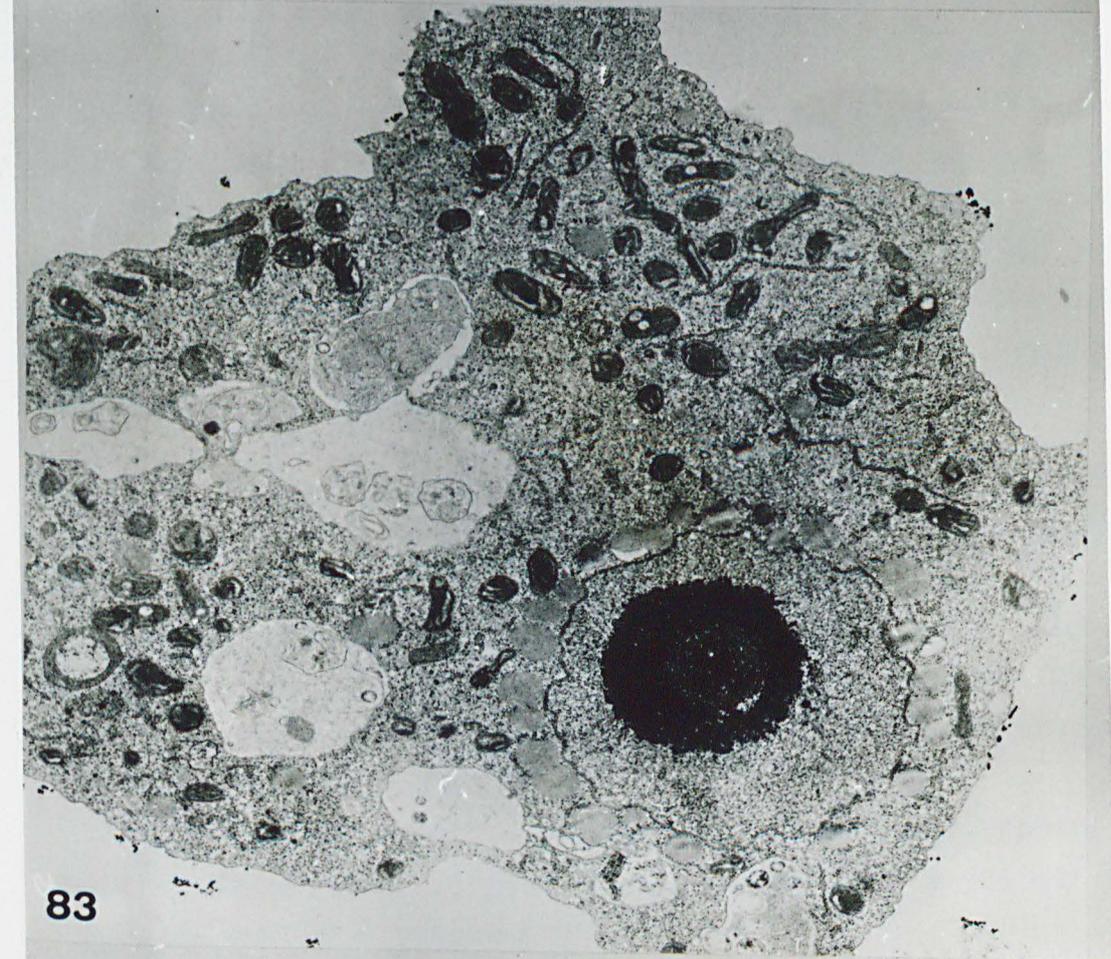
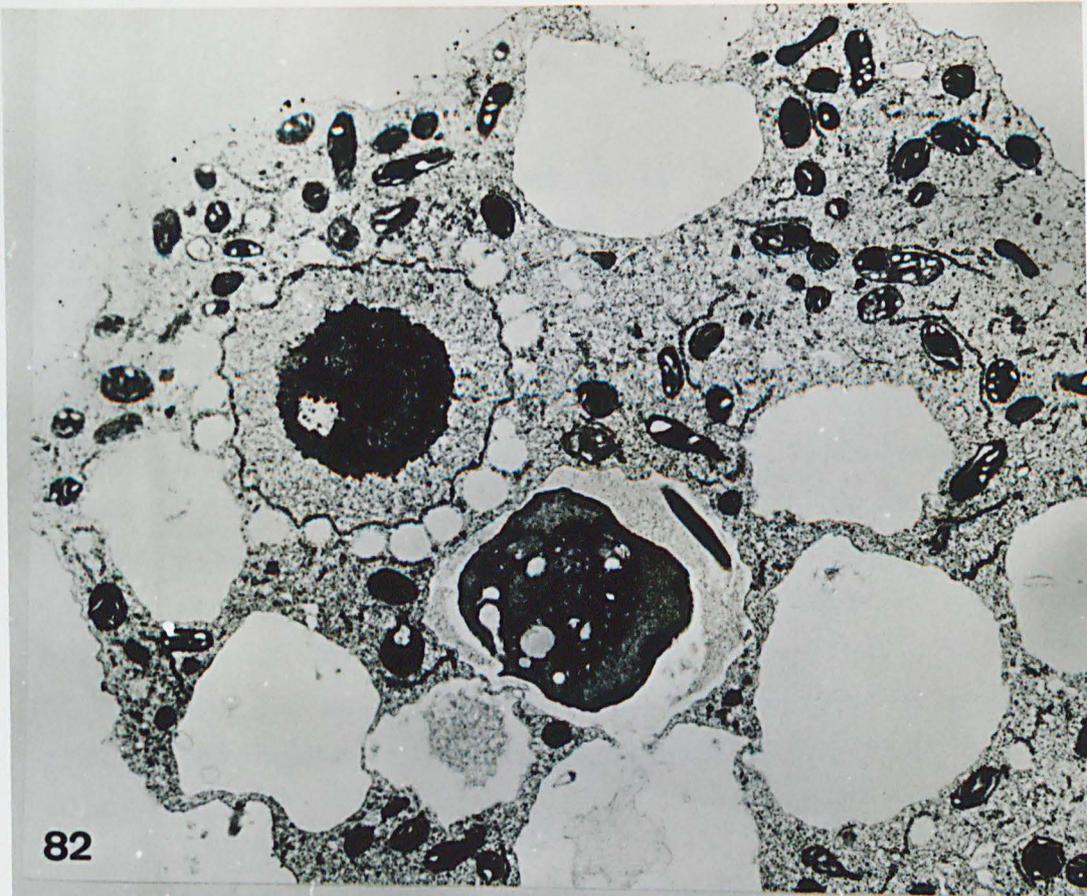
Coupe d'un trophozoïte de N. jadini montrant les mêmes organites que ceux de l'image précédente (x 10.500).

Figure 82.

Trophozoïte de Naegleria jadini montrant le noyau avec un volumineux nucléole central. Le noyau est entouré de nombreuses vacuoles. A proximité du noyau, on distingue un gros phagolysosome contenant des éléments figurés. L'organisme renferme plusieurs grosses vacuoles électrons transparents. Le cytoplasme contient de nombreuses mitochondries polymorphes et du réticulum endoplasmique irrégulièrement distribué (pas en association régulière avec les mitochondries)(x 9.200).

Figure 83.

Coupe d'un trophozoïte de N. jadini montrant les mêmes organites que ceux de l'image précédente (x 10.500).



1.2.1.2. Cytoplasme.- Dans le cytoplasme on retrouve les mêmes organites que chez N. gruberi et N. fowleri. Ces éléments figurés sont : le noyau, les mitochondries, les ribosomes, les lysosomes, vacuoles pulsatiles, réticulum endoplasmique et des vacuoles lipidiques (fig. 86).

1.2.1.3. Noyau.- (fig. 84). Le noyau proéminent contient un nucléole central bien évident constitué de gros particules granulaires opaques aux électrons. Un endroit plus transparent aux électrons est régulièrement rencontré dans le nucléole. La membrane nucléaire est constituée de deux feuilletts séparés, externe et interne laissant une espace transparente aux électrons. Les pores nucléaires souvent diaphragmés, ont été facilement mis en évidence (fig. 84, 87).

1.2.1.4. Mitochondries.- Les inclusions endoplasmiques les plus proéminentes sont peut être les mitochondries. Celle-ci sont généralement de forme différente suivant les espèces d'amibes (Vickerman, 1962). Le cytoplasme de N. jadini contient un grand nombre de mitochondries. Elles se présentent généralement sous une forme ovalaire et allongée, rarement arrondie. Comme dans le cas de N. fowleri, N. jadini présente régulièrement des mitochondries en forme d'haltère et en forme d'anneau ("cup-shaped"). La matrice mitochondriale est très opaque aux électrons et montre une structure criblée (fig. 85).

1.2.1.5. Vacuoles alimentaires.- Les vacuoles alimentaires sont délimitées par une membrane simple. Ces vacuoles contiennent des débris non identifiables. Il s'agit probablement de débris d'amibes lysées qui sont phagocytées. Chez les amibes cultivées en présence de bactéries on peut identifier des débris bactériens dans les vacuoles. Les vacuoles comprenant des structures laminaires complexes sont rencontrées.

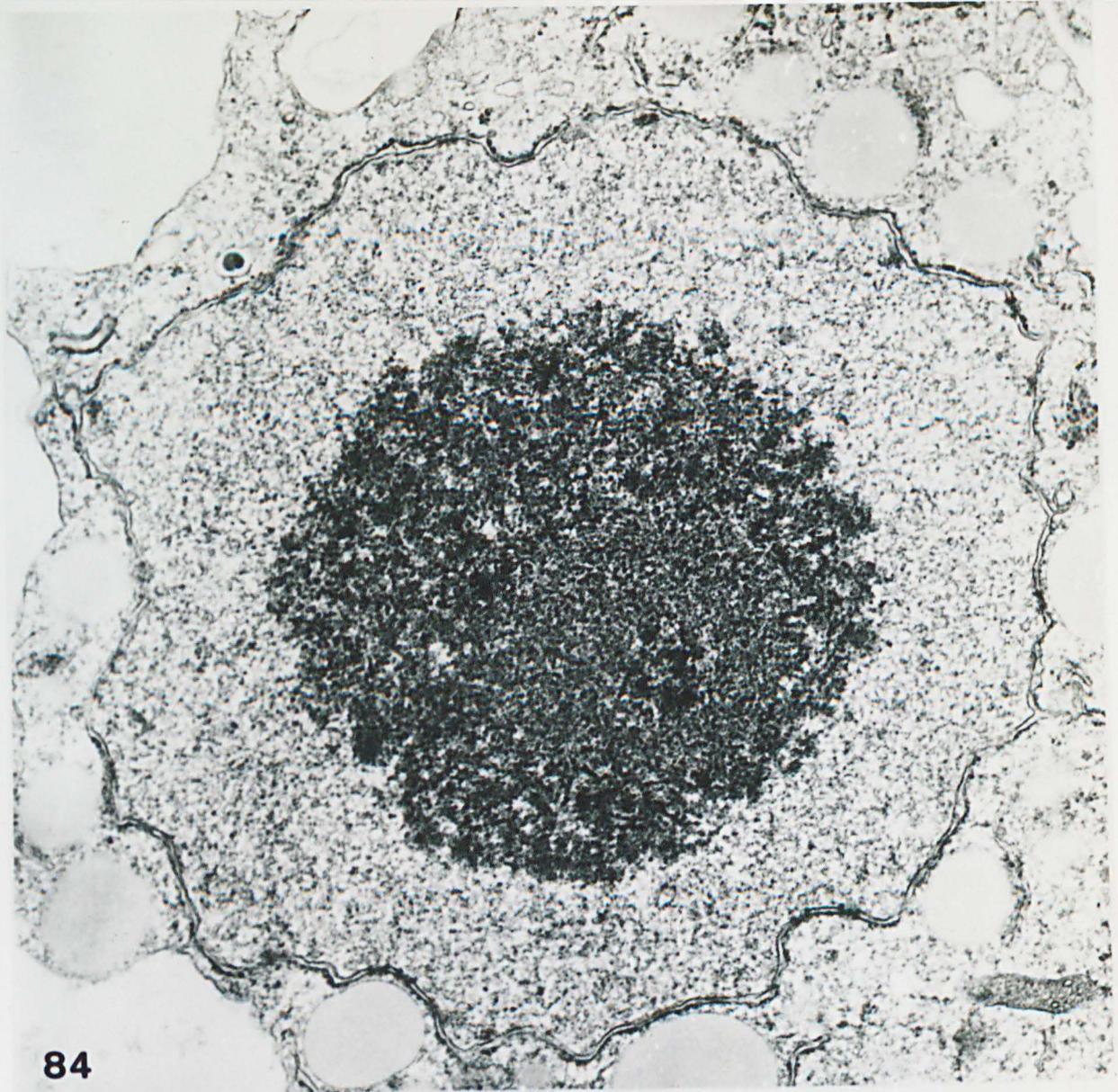
Un appareil de Golgi n'a pas été clairement observé, mais de structures membranaires ressemblant à celles de l'appareil de Golgi ont été rencontrées.

Figure 84.

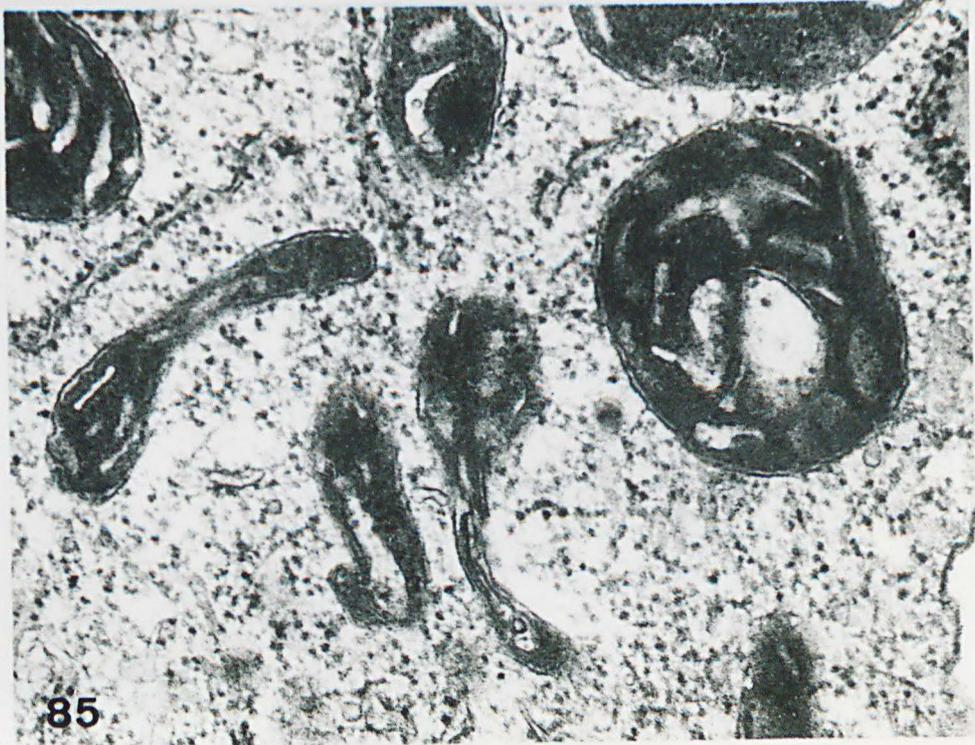
Section à travers le noyau d'un trophozoïte de N. jadini. Elle montre les feuilletts externe et interne de la membrane nucléaire, de nombreuses vacuoles périnucléaires et un volumineux nucléole occupant le centre du noyau (x 28.750).

Figure 85.

Coupe du cytoplasme d'un trophozoïte de N. jadini contenant plusieurs mitochondries. La section de ces mitochondries se présente sous une forme allongée, en haltère et en anneau, "cup-shaped" (x 65.700).



84



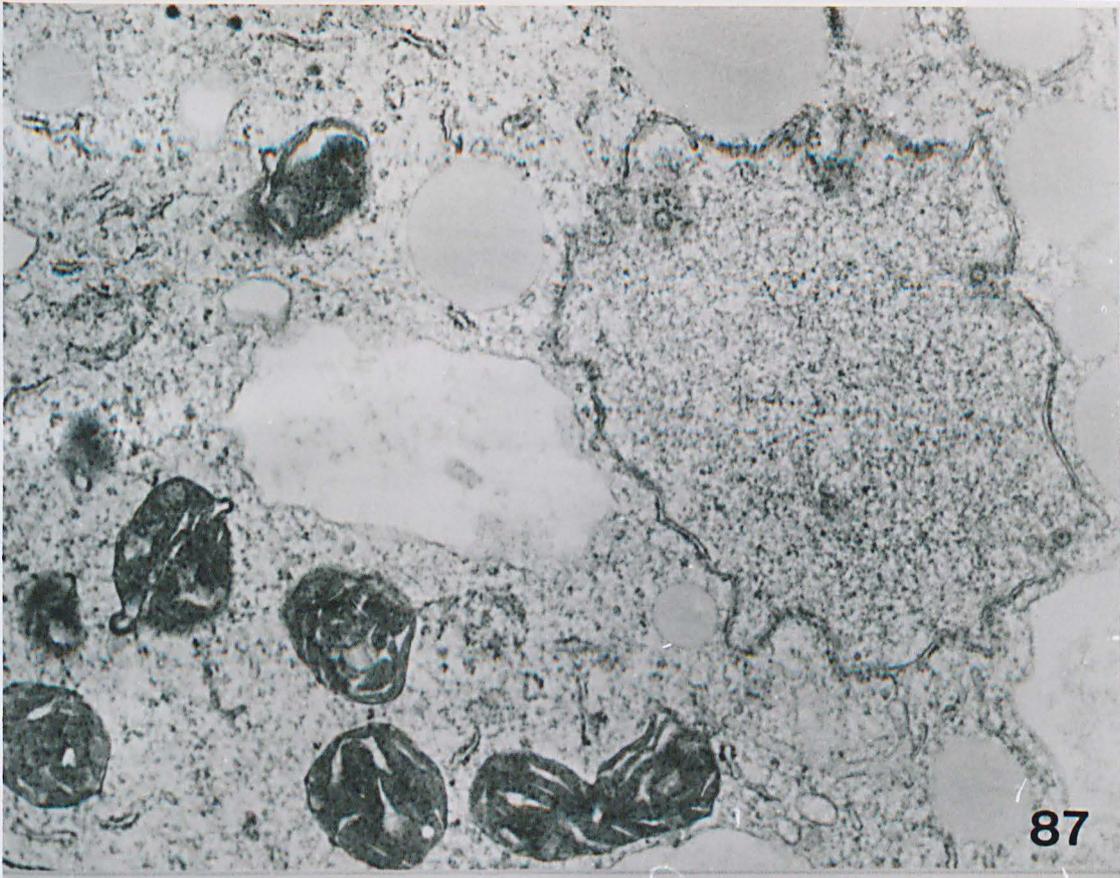
85

Figure 87.

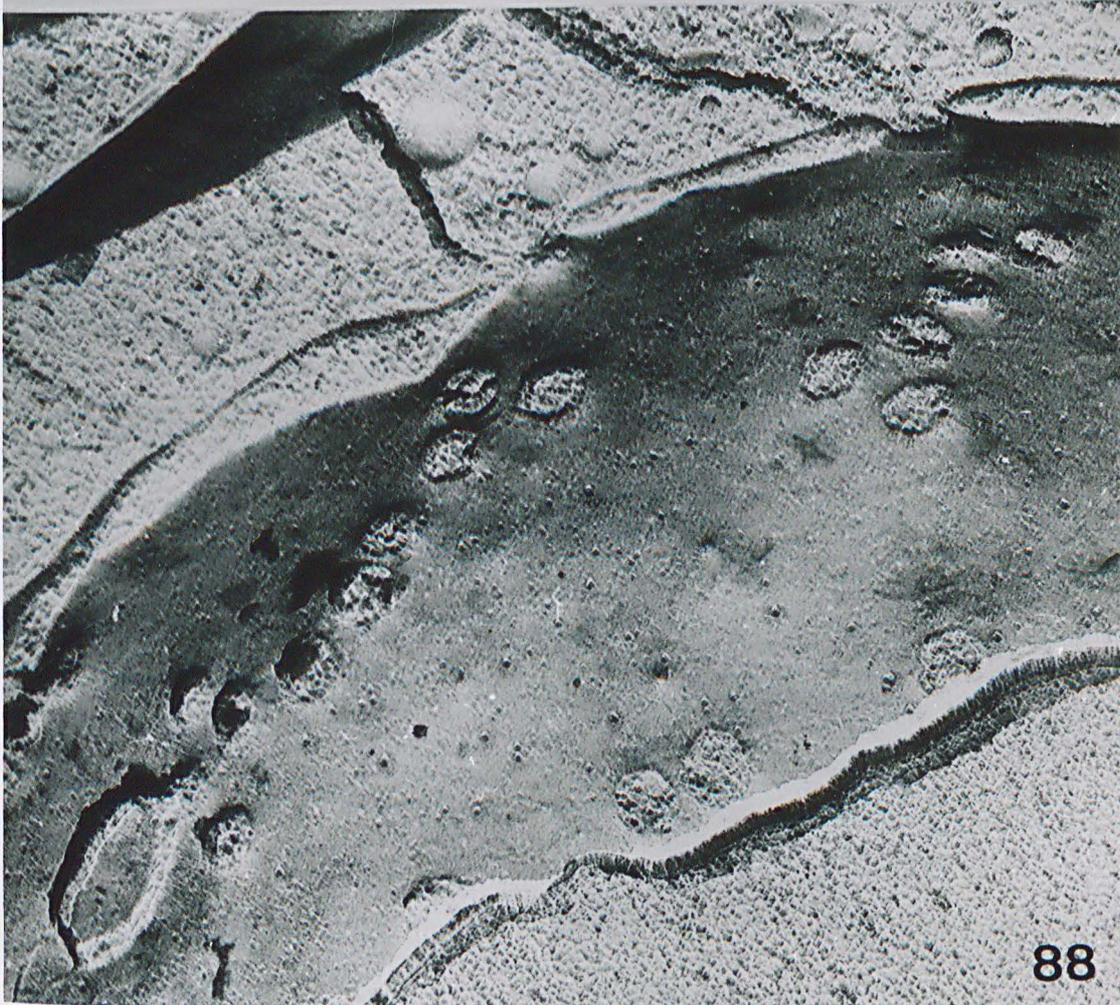
Section du noyau (à droite) d'un trophozoïte de N. jadini. La membrane périnucléaire est granuleuse et montre de nombreux pores (coupe tangente au plan de la membrane nucléaire) (x 26.775).

Figure 88.

Micrographie d'un noyau d'un lymphocyte de souris préparé par cryodécoupage et examiné au microscope électronique. Cette section intéresse la membrane nucléaire, examinée légèrement en relief, après une légère sublimation des liquides cytoplasmiques. Elle se présente et en oblique et en tranche de section. On distingue nettement les pores de la membrane nucléaire dont la conformation rappelle les structures de l'image précédente (x 43.400).



87



88

1.2.1.6. Vacuoles pulsatiles.- Une ou plusieurs de ces vacuoles sont retrouvées dans une cellule, leur contenu est transparent aux électrons et elles sont délimitées par une membrane simple.

1.2.1.7. Autres inclusions cytoplasmiques.- Des globules ou vacuoles lipidiques sont très communs dans le cytoplasme des amibes de ce genre (Vickerman, 1962; Schuster, 1963). Chez N. jadini, ces vacuoles lipidiques sont fréquemment observées. Elles sont délimitées par une membrane simple. Autour de la membrane nucléaire on retrouve également des vacuoles lipidiques; celles-ci sont délimitées par une double membrane. Le suc cytoplasmique est rempli de ribosomes libres et en rosette. Un réticulum endoplasmique, garni de ribosomes est irrégulièrement distribué dans le cytoplasme. Ses tubules sont rencontrées, réunies avec la membrane nucléaire.

Enfin, des structures ressemblants à des virus ou "Virus like particles" sont régulièrement rencontrées dans le cytoplasme de N. jadini.

### 1.2.2. Ultrastructure du kyste.

Les kystes ont une paroi opaque aux électrons. Certains endroits de la paroi kystique montrent une dépression. Cette dépression représente-t-elle un pore ? Nous n'avons pu observer dans aucune section la présence certaine d'un pore (fig. 89, 90).

Les amibes enkystées sont rétractées dans toutes les sections des kystes examinées. Ceci est probablement dû à une mauvaise fixation.

A l'intérieur de la cellule on distingue des mitochondries, des vacuoles, des ribosomes. Aucun stade d'enkystement ou de dékystement n'a été observé.

### 1.2.3. Microscopie électronique à balayage.

Seuls les kystes ont été examinés. Ils ont un aspect sphérique occasionnellement légèrement aplati ou ovalaire. Leur surface est lisse (fig. 91, 92). Les pores sont facilement

Figure 89.

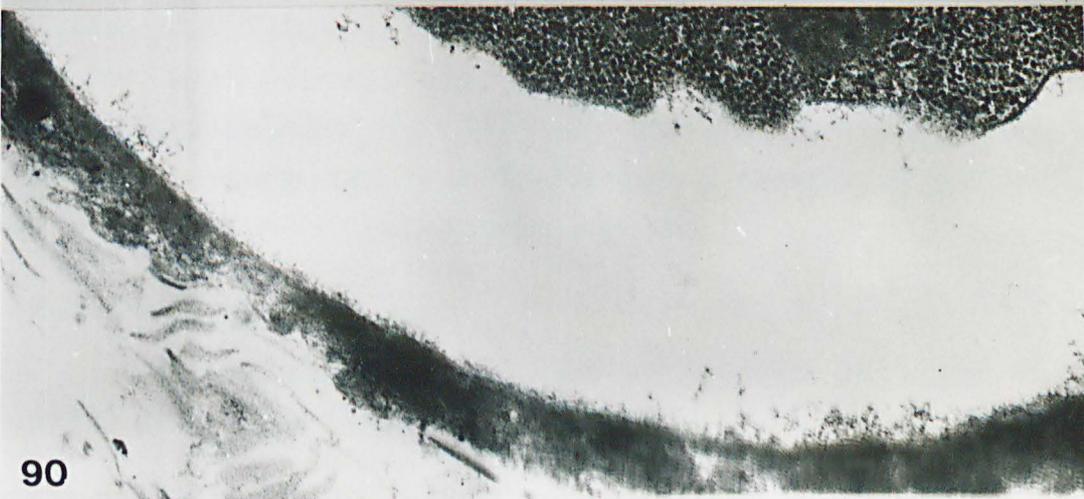
Section d'un kyste de N. jadini. La paroi kystique montre plusieurs dépressions pouvant représenter des pores. A l'intérieur du kyste la cellule s'est rétractée. Elle contient des mitochondries, des vacuoles et des ribosomes (x 20.000).

Figure 90.

Détail de la partie inférieure gauche de l'image précédente montrant une dépression (pore ?) de la paroi kystique (x 43.400).



89



90

observés chez N. jadini, contrairement à ce que l'on observe en microscopie photonique. Un nombre moyen de 1, 2 pores a été observé. Jamais plus que deux pores n'ont été trouvés, ce qui nous laisse supposer que N. jadini possède en réalité deux pores. Les bords des pores apparaissent lisses sans replis. Le diamètre moyen de ces pores est de 0,8 micron et l'épaisseur moyenne de la paroi est de l'ordre de 0,4 micron.

Nous n'avons pas pu observer de kystes montrant des invaginations ou des phases de rupture de la paroi kystique lors du dékystement; ceci aurait permis de démontrer le mode de dékystement de N. jadini.

## 2. Caractères biologiques.

La souche N. jadini ITMAP 400 a été isolée par le Professeur J.B. Jadin en juillet 1971, à partir de concrétions récoltées sur les paroi et le fond d'une piscine à Anvers (Jadin et Willaert, 1972). Ces concrétions, à l'aspect de minuscules pyramides, ressemblent en coupe, à <sup>un</sup> labyrinthe dont les couloirs sont remplis de bactéries et d'amibes.

### 2.1. Culture.

#### 2.1.1. Isolement.

Après broyage, ces concrétions sont ensemencées en milieu C.G.V.S. A 37°C, on observe une multiplication modérée durant sept jours, suivie d'une lyse générale. A 28°C en revanche, la multiplication est d'emblée rapide et vigoureuse. L'ensemencement ultérieur sur agar-bactéries a permis le clonage de la souche à partir d'une population enkystée.

#### 2.1.2. Entretien.

La souche peut être entretenue soit sur milieu solide, soit en milieu liquide.

a) Milieu solide.

N. jadini se cultive aisément à 28°C sur agar recouvert d'Aerobacter aerogenes tués par la chaleur. Les kystes se forment après 48 heures et restent viables au moins pendant un an à 28°C. Ce milieu permet un entretien aisé, ne nécessitant que des repiquages mensuels. L'incorporation de 0,5 % NaCl à l'agar n'influence pas la croissance de N. jadini. Les essais de culture sur agar à 37°C échouent après quelques repiquages.

b) Milieu liquide

N. jadini se cultive axéniquement en milieu liquide C.G.V.S. à la température de 28°C. L'entretien est assuré par ensemencement hebdomadaire de 3ml de milieu à l'aide d'un inoculum de 0,5 ml prélevé au fond du tube. Ce milieu permet l'obtention en 8 jours de  $2 \times 10^6$  organismes par ml en moyenne. N. jadini est très sensible aux changements de lots de sérum de veau. Certains lots se montrent peu ou non favorables. L'emploi de sérum de veau foetal présente un avantage marqué. Le sérum humain entraîne une lyse rapide et complète des organismes.

2.1.3. Conservation.

La souche de N. jadini ITMAP 400 peut être conservée par stabilisation à basse température en présence de diméthylsulfoxyde (concentration finale : 7,5 %), par congélation lente (1°C par minute jusqu'à -70°C, puis 5°C par minute jusqu'à -100°C) et par conservation à -196°C dans l'azote liquide. La décongélation se fait brusquement par immersion de l'ampoule dans un bain-marie à 40°C.

2.2. Pouvoir pathogène.

Une fois prélevées, sur les parois de la piscine, les concrétions sont broyées puis administrées à 2 lots de 4 souris, soit par voie intracérébrale soit par voie intranasale.

### 2.2.1. Inoculation intracérébrale.

Parmi les souris inoculées par voie intracérébrale, l'une est morte le jour même, des suites de l'injection. La deuxième, malade, fut sacrifiée le lendemain. Après avoir constaté la présence d'amibes dans le cerveau (examen direct, culture), celui-ci fut broyé et inoculé à quatre souris saines. Quinze jours plus tard, trois de ces souris manifestèrent des troubles mais il fut impossible de constater chez elles la présence d'amibes. De même tous les essais soit de culture soit de subinoculation avec des broyats de leur encéphale restèrent négatifs.

### 2.2.2. Instillation intranasale.

Par voie intranasale, nous effectuons cinq passages successifs en utilisant des lots de quatre souris. A chaque passage, poumons et cerveaux sont broyés et examinés à frais et par culture.

Au premier passage, les poumons sont hémorragiques et hépatisés, le cerveau est légèrement hémorragique. Des amibes nombreuses et peu mobiles sont retrouvées dans les poumons mais pas dans le cerveau. La culture du broyat de poumons est positive.

Au deuxième et troisième passages, une souris meurt spontanément et une autre est cachectique avec dyspnée après onze jours. Les cerveaux sont normaux et indemnes d'amibes. Les poumons, hémorragiques, renferment quelques éléments suspects. Les cultures d'organes restent négatives.

Au quatrième passage, une seule souris présente des signes cliniques. Les organes sont normaux. Quelques éléments suspects sont retrouvés dans les poumons. Les cultures restent négatives.

Au cinquième passage, les souris restent en observation pendant soixante-quinze jours sans manifester de signes cliniques. Elles sont alors autopsiées. Les organes sont normaux et indemnes de parasites.

Au cours de plus de trois ans de culture en milieu axénique ou sur agar-bactéries tuées, l'inoculation intracérébrale, ou l'instillation intranasale de N. jadini a été effectuée à une dizaine de reprises. En aucun cas une action pathogène à l'égard de la souris n'a été constatée.

### 3. Etude comparative des kystes de Naegleria et d'Acanthamoeba en microscopie électronique à balayage.

Cette étude comparative de la morphologie extérieure des kystes de différentes espèces appartenant au genre Naegleria et au genre Acanthamoeba a été exécutée sur un grand nombre de spécimens (plus d'un millier de kystes examinés). (Jadin J.M. et al., 1974).

Cette étude comparative a permis d'attirer l'attention sur l'existence de caractères morphologiques constants et peu ou pas visibles en microscopie photonique à l'aide du contraste de phase ou d'un contraste interférentiel. Ces caractères deviennent appréciables en microscopie électronique à balayage. Néanmoins, il semble que par certaines méthodes cytologiques ces caractères peuvent être mis en évidence, du moins chez certaines espèces (Page, 1974).

Les caractères mis en évidence en microscopie électronique à balayage concernent particulièrement :

- la surface du kyste;
- son pore et la fréquence de sa présence et
- les caractères morphologiques des bords de ces pores. Il nous semble que ces caractères pourraient servir de critères taxonomiques en vue de l'identification et de la séparation des différentes souches appartenant à ces deux genres étudiés.

Toutes les souches étudiées ont été cultivées de la même manière (chap. 2.2) et récoltées lors du vieillissement des cultures lorsque celles-ci ne présentaient que des kystes.

### 3.1. Observation

Les observations que nous avons pu faire se sont avérées constantes chez différentes populations d'une souche déterminée malgré le nombre de subcultures.

#### 3.1.1. Genre Naegleria

Au sein du genre Naegleria, certaines distinctions, observées à l'aide du microscope électronique à balayage, peuvent apporter des renseignements morphologiques supplémentaires à la séparation et l'identification des différentes espèces. Les kystes de toutes les espèces étudiées ont un aspect sphérique, parfois légèrement ovale. La surface des kystes n'est pas plissée. Cette surface est lisse chez la plupart des espèces, parfois finement réticulée. Néanmoins chez N. gruberi, la surface de son kyste est rugueuse (fig. 93). Des pores ont été observés chez toutes les souches, sauf chez la souche N.a-1 (N. fowleri). Le nombre moyen de pores par kyste s'établit comme suit : 7,2 pour N. gruberi; 2,5 pour Naegleria sp. A; 1,6 pour N. fowleri et 1,2 pour N. jadini.

Les bords des pores apparaissent lisses chez toutes les espèces de Naegleria (fig. 91, 92, 94) à l'exception de N. gruberi (fig. 93) où les pores sont entourés d'une véritable évagination de la paroi. Schuster (1963), Fulton (1970) et Lastovica (1974) ont déjà montré que chez N. gruberi il existe des pores de sortie bien définis. L'épaisseur moyenne de la paroi des pores des kystes est dans toutes les espèces de l'ordre de 0,4 micron, sauf chez N. gruberi chez qui elle est de 1 micron.

Chez la plupart des kystes la perforation des pores est bien visible; seulement chez de rares kystes on aperçoit encore le bouchon laissant le pore fermé. Le bouchon en matériau polysaccharidique est probablement dissout par l'amibe lors du dékystement, comme l'a montré Schuster (1963).

Kystes de Naerleria en microscopie électronique à balayage.

Figure 91.

Kyste de N. jadini montrant un pore (x 11.000).

Figure 92.

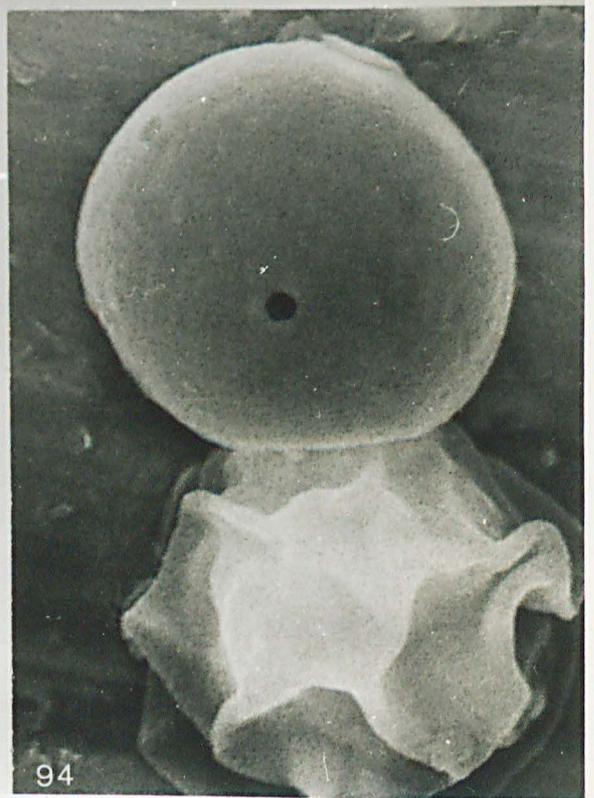
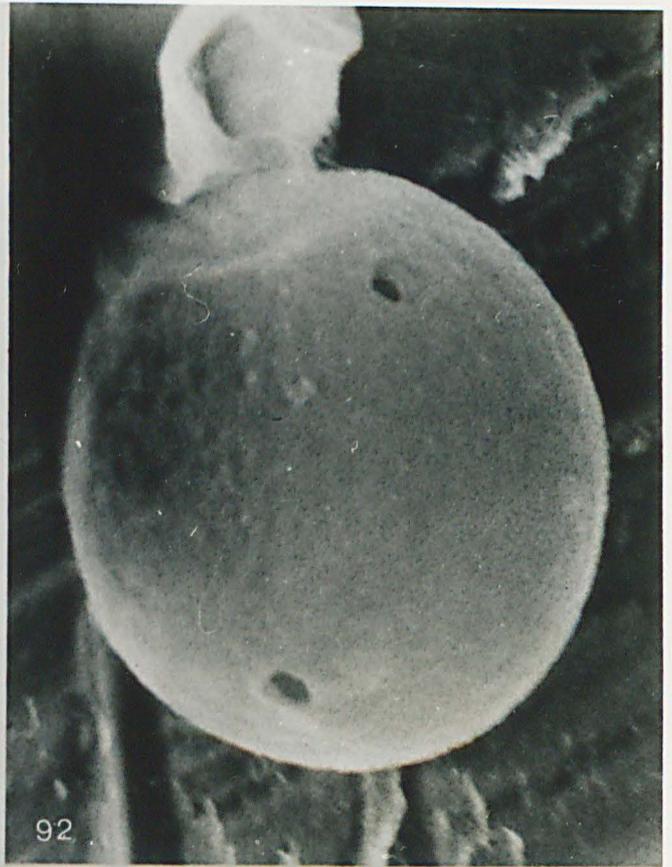
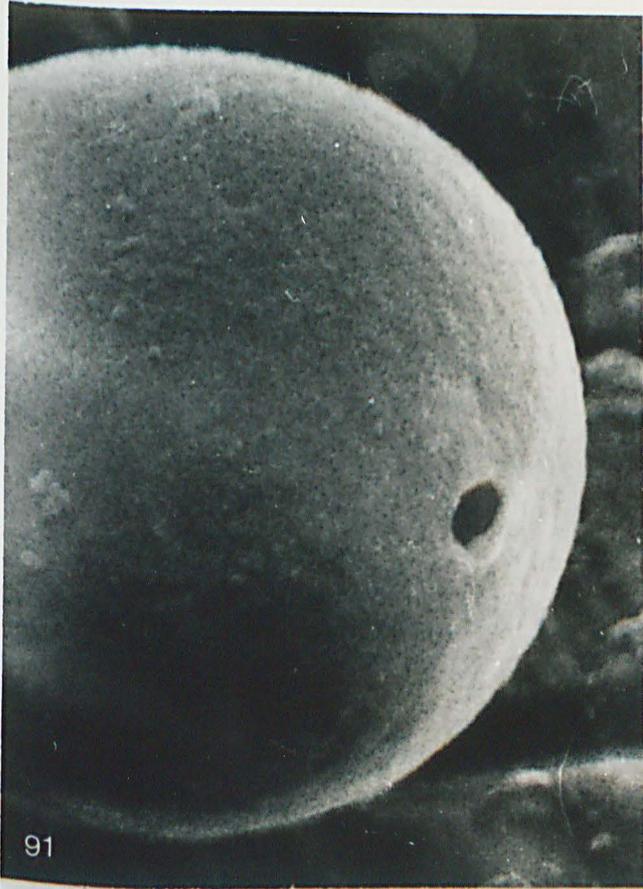
Kyste de N. jadini montrant deux pores (x 8.800).

Figure 93.

Kystes de N. gruberi montrant jusqu'à six pores dont l'évagination de la paroi est bien visible.(x 3.575).

Figure 94.

Kyste de N. fowleri montrant un pore (x 5.830).



### 3.1.2. Genre Acanthamoeba.

Les kystes formés par les espèces appartenant au genre Acanthamoeba présentent en général un aspect sphérique. Leur surface est parsemée de plis.

Les kystes de A. culbertsoni et de A. rhyodes présentent une surface plissée, avec des replis peu profonds et peu nombreux (fig. 95). Les plis semblent plus nombreux chez A. rhyodes que chez A. culbertsoni. Entre ces replis, la surface des kystes est lisse. Quelques rares pores ont pu être observés (fig. 95). Il est cependant probable que les pores soient cachés par certains replis et ne soient donc pas visibles. L'observation en microscopie photonique des kystes d'Acanthamoeba permet dans une certaine mesure de prévoir que les pores ne puissent être facilement mis en évidence par le microscope à balayage. L'enveloppe externe paraît en effet former la surface externe de l'opercule sans solution de continuité (fig. 97). De plus, le bourrelet entourant le pore s'intègre dans le système de plis superficiels caractéristiques des kystes de ces Acanthamoeba (Pussard, 1966).

Les kystes de A. castellanii et A. polyphaga présentent une surface très plissée avec des replis très profonds (fig. 96). La surface entre les replis est lisse. Nous n'avons pas observé de pores. Morphologiquement nous ne pouvons pas faire une distinction entre les kystes de A. polyphaga et d'A. castellanii.

### 3.1.3. Synthèse.

Nos observations chez les différentes espèces du genre Naegleria et du genre Acanthamoeba sont reprises dans le tableau 45.

L'aspect de la surface des kystes permet à lui seul de faire une distinction entre les amibes du genre Naegleria d'une part et du genre Acanthamoeba d'autre part en se basant sur la présence ou l'absence des plis.

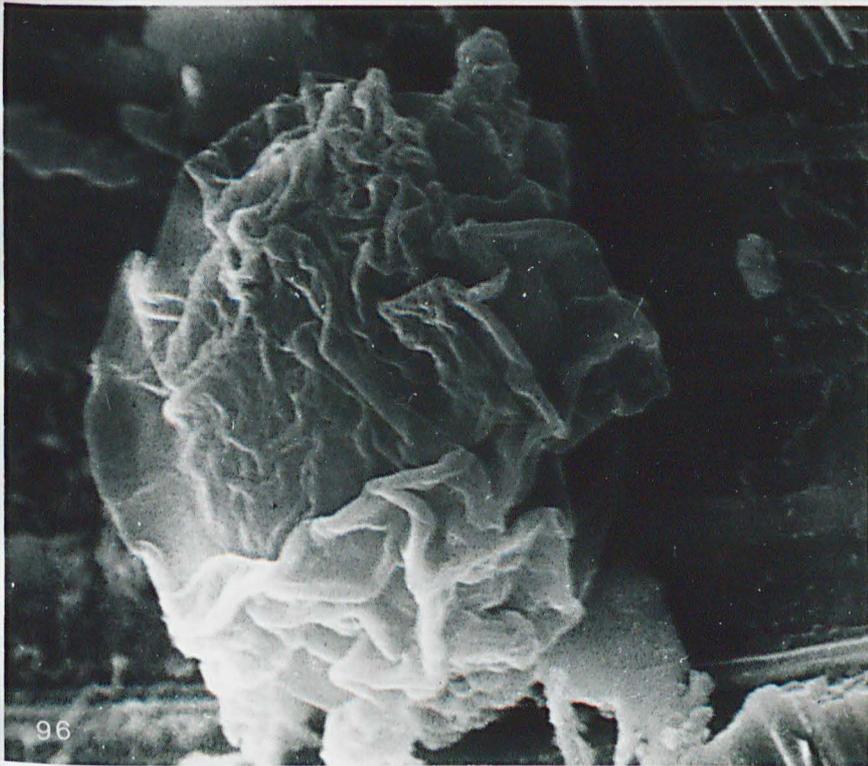
Kystes d'Acanthamoeba en microscopie électronique à balayage.

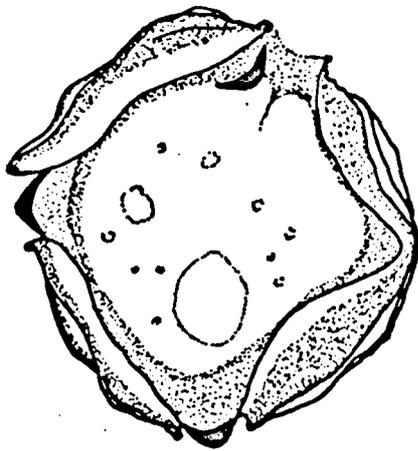
Figure 95.

Kystes d'A. culbertsoni montrant des replis superficiels de la paroi. Un kyste avec la présence d'un pore ouvert (x 4.000).

Figure 96.

Kyste d'A. polyphaga avec des replis profonds de la paroi kystique (x 7.000).





97

Kyste d'Acanthamoeba (d'après Volkonsky 1931)

Tableau 45 : Caractères morphologiques distinctifs de la surface des kystes de Naegleria et d'Acanthamoeba en microscopie électronique à balayage.

Souches	Présence de replis	Aspect de la surface	Nombre moyen de pores
<u>Naegleria</u>			
<u>N.fowleri</u> ITMAP 359,360	Aucun	lisse	1,6
<u>N.fowleri</u> N.a.-1	"	lisse	(A)
<u>N.jadini</u>	"	lisse	1,2
<u>N.gruberi</u>	"	rugueux	7,2
<u>Acanthamoeba</u>			
<u>A. castellanii</u>	très nombreux profonds	lisse	(B)
<u>A. polyphaga</u>		lisse	(B)
<u>A. culbertsoni</u>	nombreux superficiels	lisse	<1
<u>A. rhyodes</u>		lisse	(B)

(A) Aucun pore observé

(B) Pores probablement cachés entre les plis de la membrane externe.

Ensuite, l'aspect de la surface des kystes des Naegleria et le nombre moyen des pores permet de séparer aisément N. gruberi des autres espèces du même genre. Quant à la différenciation de celles-ci, les caractères observés chez le kyste ne nous permettent pas d'identifier définitivement ces espèces.

Parmi les quatre espèces du genre Acanthamoeba étudiées, nous observons deux groupes dont la morphologie des kystes ne permet pas de distinguer les espèces au sein du groupe.

#### 4. Etude comparative du pouvoir pathogène de quelques souches de Naegleria et d'Acanthamoeba.

---

L'inoculation à l'animal est jusqu'à maintenant le seul recours déterminant pour constater le caractère "pathogène" d'une souche de Naegleria ou d'Acanthamoeba.

Parmi les méthodes, autre que l'inoculation à l'animal, nous citons le sérodiagnostic de l'espèce, la culture à température élevée et l'effet cytopathogène que ces organismes peuvent manifester.

Comme sérodiagnostic, citons l'agglutination (Anderson et Jamieson, 1972; Singh et Das, 1970) et l'immunofluorescence (Cervà, 1966; Van Dijck et al., 1974; De Jonckheere et al., 1974 et Willaert et al., 1974). Certes, ces méthodes permettent d'identifier N. fowleri mais elles ne permettent pas de constater son caractère pathogène. De plus, cette méthode nécessite des anticorps spécifiques, pour assurer un diagnostic précis. Or, jusqu'à présent la plupart des chercheurs travaillent avec des antisera donnant des réactions croisées, parfois très importantes entre différentes espèces.

La différenciation par incubation d'une souche d'amibes à des températures élevées ne nous semble pas non plus une solution définitive permettant d'apprécier le caractère pathogène.

Griffin (1972), a démontré que N.fowleri se maintient et se cultive à 43 °C, tandis que les espèces non-pathogènes ne disposent pas de cette capacité. Néanmoins Griffin (in litt., 1974) isole une souche de Naegleria se cultivant à 43°C mais lors de l'inoculation à l'animal aucune mortalité n'est observée. Nous même, avons constaté à plusieurs reprises la croissance de souches d'amibes à la température de 43°C sans que ces souches présentent un pouvoir pathogène pour la souris.

L'effet cytopathogène élevé que présente N.fowleri, lors de son incubation avec des cultures cellulaires, est typique pour les souches pathogènes (Chang, 1974). Mais n'oublions pas que certaines souches de Naegleria non-pathogène pour la souris, peuvent présenter cet effet cytopathogène vis-à-vis des cultures cellulaires (Schuster et Dunnebach, 1969, 1974).

En conclusion, il est absolument indispensable de recourir à l'inoculation d'une souche chez l'animal avant de conclure à son pouvoir pathogène.

Lors de nos recherches, toutes les souches, isolées chez l'homme et dans l'environnement, ont été systématiquement inoculées à la souris, soit par inoculation intracérébrale, soit par instillation intranasale ou encore simultanément par les deux voies.

Nous n'avons pas l'intention de mentionner tous les tests de pathogénicité que nous avons pratiqués depuis quatre ans avec les souches isolées chez l'homme et dans l'environnement.

Nous nous sommes demandés si les souches entretenues en culture continue, parfois depuis plus de quatre ans, sont capables de présenter une perte de leur virulence ou une acquisition du pouvoir pathogène, du moins pour certaines espèces. Pour ces raisons nous avons testé un nombre de souches de Naegleria et quelques souches d'Acanthamoeba entretenues en culture continue dans le laboratoire du Professeur Jadin. Les résultats de ces investigations sont rapportés dans le tableau 46.

La durée de culture continue in vitro, indiquée dans ce tableau concerne seulement celle effectuée dans notre laboratoire. Il ne nous était pas possible de tenir compte du temps de culture de ces souches avant l'acquisition de celles-ci à notre collection. De plus, nous avons essayé d'obtenir un inoculum standard pour toutes les souches afin que la comparaison de la virulence des différentes souches étudiées puisse être valable. Chaque souche a été inoculée par voie intranasale et par voie intracérébrale. Nous avons pris soin d'inoculer, par voie intracérébrale, une suspension contenant environ 1.000 amibes en moins que dans l'inoculum servant à instillation intranasale. Les souris sont restées sous observation pendant un minimum de deux mois. La présence d'amibes, dans le cerveau ou dans les poumons des souris, a été vérifiée à frais au microscope en contraste de phase et souvent (en particulier pour Acanthamoeba) par mise en culture des organes.

Tableau 46 : Virulence de quelques souches de Naegleria et d'Acanthamoeba entretenues en culture continue.

Souches	Durée de culture continue (en mois)	Voie d'inoculation I.N. Intra-nasale I.C. Intra-cérébrale	Nombre d'amibes par souris	Mortalité jours après inoculation	Survie
<b>1. <u>Naegleria</u></b>					
<u>N.fowleri</u> PA-90	29	I.N.	5.500	6,6,6,7,7	-
		I.C.	4.400	4,4,4,7,7	-
<u>N.fowleri</u> MW-4U	28	I.N.	6.000	4,5,5,6,6	-
		I.C.	5.000	4,4,4,4,5	-
<u>N.fowleri</u> PA a	21	I.N.	5.000	6,7,7,9,13	-
		I.C.	4.000	4,4,4,4,5	-
<u>N.fowleri</u> HB-1	46	I.N.	5.000	4,5,5,7,8	-
		I.C.	4.000	7,8,8,9,12	-
<u>N.fowleri</u> 359	46	I.N.	4.750	3,3,3,4,5	-
		I.C.	3.500	6,6,7,7,7	-
<u>N.fowleri</u> C-66	10	I.N.	5.000	9,9,10,10,11	-
		I.C.	4.000	4,4,5,5,16	-
<u>N.fowleri</u> 838	23	I.N.	5.500	10,14,14	2/5
		I.C.	4.400	4,9,10	2/5
<u>N.fowleri</u> LEE	6	I.N.	5.000	8,8,8,18	1/5
		I.C.	4.000	3,3,4,4,8	-
<u>N.fowleri</u> VITEK	46	I.N.	6.000	8,8,9,12	1/5
		I.C.	5.000	7,7,7,8,8.	-
<u>N.fowleri</u> Morgan	29	I.N.	6.000	7,8,8	2/5
		I.C.	5.000	7,7,7,7,14	-
<u>N.fowleri</u> 1230	14	I.N.	6.000	7,8,12	2/5
		I.C.	5.000	3,4,6,9,9	-

Suite tableau 46

<u>N.jadini</u> 400	32	I.N.	12.500	-	5/5
		I.C.	10.000	-	5/5
<hr/>					
<u>N.gruberi</u> 1518	35	I.N.	4.750	-	5/5
		I.C.	3.500	-	5/5
<u>N.gruberi</u> EG <sub>S</sub>	31	I.N.	5.000	-	5/5
		I.C.	4.000	-	5/5
<hr/>					
<u>Naegleria</u> sp 1164	16	I.N.	5.500	-	5/5
		I.C.	4.400	-	5/5
<u>Naegleria</u> sp A 2	21	I.N.	5.000	-	5/5
		I.C.	4.800	-	5/5
<u>Naegleria</u> sp PPMFB 6	21	I.N.	6.000	-	5/5
		I.C.	4.000	-	5/5
<hr/>					
2. <u>Acanthamoeba</u>					
<u>A.culbertsoni</u> A.1	35	I.N.	5.000	6,6,7,8,11	-
		I.C.	4.000	4,4,4,4,4	-
<u>A.castellanii</u> 1930	3	I.N.	4.750	4,5,7	2/5
		I.C.	3.500	2	4/5
<u>Acanthamoeba</u> sp RUS 22	7	I.N.	5.250	5,5,8,9,13	-
		I.C.	4.300	5,6,7,7,12	-

Ce tableau nous montre que N.gruberi, espèce non pathogène ainsi que les Naegleria sp.A.2, PPMFB-6 et 1164 ne se sont pas montrées pathogènes pour la souris ni par inoculation intracérébrale ni par voie intranasale. Ces souches n'ont montrée aucune pathogénicité lors de l'isolement ou lors de leur réception dans notre laboratoire. N.jadini, n'a provoqué la mort d'aucune souris comme nous l'avons déjà mentionné. Néanmoins, lors de son isolement et de l'inoculation, quelques souris ont été trouvées malades et des amibes ont été retrouvées dans les organes.

Parmi les souches de Naegleri fowleri isolées chez l'homme nous remarquons que seulement les souches HB-1, 359 et C-66 tuent toutes les souris, tant par voie intranasale que par voie intracérébrale. Il est aussi intéressant de noter que pour les souches HB-1 et 359 l'instillation intranasale des amibes chez la souris les tuent plus rapidement qu'après l'inoculation intracérébrale. Contrairement, chez la souche C-66 les souris meurent plus rapidement après l'inoculation intracérébrale.

Chez les souris infestées avec les souches Lee, Vitek, Morgan et 1230, une survie de, une à deux souris est observée après inoculation intranasale. L'inoculation intracérébrale n'a laissé aucune survie parmi les souris inoculées avec ces souches. La survie chez les souris instillées par voie intranasale peut être contribue à une erreur de manipulation (erreur de dosage ou sédimentation des amibes dans la seringue) ou bien à une diminution de la virulence de ces souches. Remarquons encore que la mortalité observée parmi ces lots de souris sont dans un délai comparable à celui observé chez les souris inoculées avec les souches donnant 100 pourcent de mortalité. Un plus grand nombre de souris devrait être inoculées, et à plusieurs reprises, pour conclure à une diminution de la virulence chez ces souches.

N.fowleri souche 838 se comporte un peu différemment des autres souches humaines. La survie de deux souris sur cinq est observée, tant chez les souris inoculées par voie intranasale que chez celles inoculées par voie intracérébrale. De plus, le délai de mortalité est élevé. Peut être que chez cette souche, la virulence est vraiment affaiblie.

Chez les souches PA-90, MW-4U et PAa, isolées dans l'environnement, aucune survie des souris est observée et les souris sont mortes dans les délais normales.

Au sein du genre Acanthamoeba, A.culbertsoni souche A-1 reste toujours aussi virulente que lors de sa réception au laboratoire. Plusieurs auteurs, néanmoins ont confirmé que la souche A-1 est susceptible de perdre de sa virulence du cours de son entretien in vitro en culture continue (culbertson,1971; Stevens, communication personnelle,1974).

A.castellanii souche 1930, nous montre contre toutes prévisions une mortalité partielle chez les lots de souris inoculées. Par voie intracérébrale une souris meurt 48 heures après l'inoculation. Des amibes ont été mises en évidence après culture sur agar-bactéries. Nous pensons néanmoins que la souris a succombé à cause de l'inoculation. Les amibes n'ont pas été retrouvées après observation à frais au microscope en contraste de phase. Aucune corrélation peut être faite entre la mort de la souris et la présence d'amibes après culture. Il est évident que nous avons introduit directement dans le cerveau les amibes et qu'elles peuvent être capable de survivre un certain temps sans néanmoins s'y multiplier. Par voie intranasale, trois souris sont mortes. En aucune occasion des amibes n'ont été retrouvées dans les cerveaux, ni à frais, ni après culture, mais des amibes ont été mises en évidence dans les poumons après culture. Plusieurs auteurs ont rapporté récemment le pouvoir pathogène de cette espèce, jusque là considérée comme étant non pathogène. (Proca-ciobanu et al. 1973; Jadin et al., 1973; Martinez et al., 1975). D'ailleurs certains cas humains de méningo-encéphalite amibienne primitive ont été récemment diagnostiqués comme étant provoqué par Acanthamoeba sp. (Jager et Stamm, 1972; Robert et Rorke, 1973 et Sotelo-Avila et al., 1975).

Acanthamoeba sp. RUS 22 dont nous pensons qu'il s'agit probablement d'A.castellani se montre aussi virulent après sept mois de culture in vitro que lors de son isolement par Jamieson et de sa réception dans notre laboratoire.

Ces observations faites au sein du genre Acanthamoeba nous montrent qu'outre A.culbertsoni d'autres espèces du genre Acanthamoeba peuvent présenter une virulence pour la souris. Dans le genre Naegleria, seulement N.fowleri se montre virulent pour la souris.

=====

CHAPITRE 8

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

On prouve tout ce qu'on veut,  
et la vraie difficulté est de  
savoir ce qu'on veut prouver.

Alain

Ce travail a pu être entrepris, grâce aux nombreuses souches que nous avons rassemblées, provenant de nos isollements comme des collections étrangères. La mise au point des milieux de culture et l'adaptation aux cultures massives et axéniques représentent un travail de base, indispensable pour atteindre notre but envisagé. Ajoutons que la cryoconservation des souches est des plus importantes pour des études comparatives et élimine la possibilité de confusion de souches examinées et permet de conserver les caractères des primocultures. Pour ces raisons nous avons été amené à décrire longuement la mise au point des techniques.

Les caractères antigéniques accessibles à l'analyse immunoélectrophorétique sont susceptibles d'apporter des arguments complémentaires ou nouveaux aux critères traditionnels de la taxonomie (Capron et Afchain, 1970). Ils se sont révélés particulièrement significatifs au cours des études consacrées aux Protophytes (Brown et Walne, 1967), aux protozoaires parasites (Le Ray et al., 1971; Le Ray, 1972; Le Ray, 1974; Dwyer, 1972; Afchain et al., 1973) aux Champignons (Biguet et al., 1965), aux Mycobactéries (Stanford, 1973), aux Helminthes (Capron et al., 1968, 1972) et aux Vertébrés (Capron et Afchain, 1970). Ces études ont permis de mettre en évidence des parentés antigéniques significatives au sein du groupe-famille. Ces parentés vont en s'accroissant de la famille au genre et du genre à l'espèce. L'analyse immunoélectrophorétique semble donc être une méthode de choix pour la comparaison de diverses espèces appartenant à un même genre et dans certains cas de genres différents appartenant à une même famille. L'homogénéité morphologique d'espèces d'amibes appartenant aux genres Naegleria et Acanthamoeba nous a conduit à prendre en considération leurs caractères antigéniques.

Il est à souligner que les résultats acquis au cours de cette étude ne concernent que les antigènes accessibles à l'analyse immunoélectrophorétique. Néanmoins, leur signification taxonomique et phylétique démontrent qu'ils représentent une partie importante, et hautement significative de la structure antigénique des espèces que nous avons étudiées.

Nous avons pu mettre en évidence pour chaque espèce étudiée entre 25 et 35 composants immunoélectrophorétiques distincts. La complexité antigénique témoignée par ces Protozoaires libres est comparable à celle des Protozoaires parasites Trypanosoma brucei brucei (Le Ray, 1974), des Champignons (Biguet et al., 1965), des Invertébrés et des Vertébrés (Capron et al., 1968; Capron et Afchain, 1970). La révélation de cette complexité immunostructurale requiert une méthodologie adéquate dont les principes ont été établis par l'école lilloise de Biguet et Capron (Biguet et al., 1965; Capron, 1970) principes que nous avons précisés et appliqués au matériel protozocologique avec D. Le Ray et D. Afchain.

Le but de notre travail était en premier lieu de souligner l'indépendance taxonomique de l'espèce N. fowleri, dont la mise en évidence du caractère pathogène avait complètement bouleversé nos connaissances actuelles au sujet des Protozoaires libres.

La structure antigénique de N. fowleri s'avère être une "mosaïque" complexe mais d'expression stable dont sa spécificité reflète fidèlement la position taxonomique de l'organisme.

#### 8.1. Antigènes hétérospécifiques.

Les antigènes hétérospécifiques généralement rencontrés chez les Protozoaires concernent essentiellement des antigènes partagés par le milieu de culture, par des antigènes ubiquistes, dont les plus connus sont les agglutinogènes de type Forssman, certains déterminants de groupes sanguins et des polyosides analogue à la substance C; par des antigènes non identifiés mais retrouvés occasionnellement chez des organismes non apparentés.

Ces antigènes hétérospécifiques rencontrés au cours de cette étude constituent un dixième environ de la structure immunoélectrophorétique des espèces appartenant au genre Naegleria.

L'existence d'affinités antigéniques entre les parasites et leurs hôtes apparaît actuellement être un fait d'occurrence générale (Capron, 1970). Néanmoins, chez N. fowleri nous n'avons pas pu mettre en évidence des antigènes partagés avec l'hôte vertébré. Différents hyperimmunsérums anti-N. fowleri ont

été opposés à des extraits antigéniques préparés à partir de foie humain, de cerveau humain et de selles humaines. Aucun résultat positif n'a été observé. Or, cette espèce, parasite facultatif, n'est pas encore adaptée à son hôte et tue celui-ci en 8 à 14 jours après sa pénétration à travers les muqueuses nasales.

Chez N. fowleri, l'analyse immunoélectrophorétique révèle la présence d'au moins cinq protéines sériques de veau dans les extraits des formes de culture. Ces composants hétérospécifiques sont localisés dans la zone des albumines sériques et des globulines de mobilité intermédiaire. La même situation est retrouvée chez T. brucei, formes de culture (Le Ray, 1974) où au moins sept protéines sériques de veau ont été localisées. La comparaison immunoélectrophorétique des eaux de lavage et des extraits d'amibes à l'aide d'hyperimmunsérums anti-milieu de culture démontre que la présence de composants de type "milieu de culture" dans les extraits d'amibes dépend des conditions de lavage.

Les antigènes ubiquistes des Protozoaires n'ont guère été étudiés. Ces antigènes peuvent fausser les résultats des comparaisons immunotaxonomiques, en particulier lorsque les organismes considérés sont peu apparentés et ne partagent qu'un nombre réduit d'antigènes.

La présence d'antigènes de type Forssman a été signalée chez T. brucei (Houba et Allison, 1966; Houba et al., 1969) et chez T. cruzi (Enos et Elton, 1950). Toutefois, ces antigènes membranaires, de même que les déterminants des groupes sanguins, ne sont ordinairement pas détectés par les techniques de précipitation en gel.

Des substances analogues au polyoside C de la capsule de Diplococcus pneumoniae se rencontrent fréquemment dans les extraits antigéniques de mycètes et d'helminthes (Biguet et al., 1965; Capron et al., 1965). En présence d'ions  $Ca^{++}$ , ces substances se complexent avec la globuline sérique dite protéine C-réactive et déterminent une réaction de floculation réversible, non spécifique ne correspondant pas à une réaction antigène-anticorps (Tillet et Francis, 1930; Baldo et Fletcher, 1973). Nous avons pu observer la présence de substances de type C en particulier chez N. jadini et A. culbertsoni.

L'intervention de complexes dûs à la substance C dans nos résultats immuno-électrophorétiques a été écartée en incubant systématiquement les floculats en présence de citrate trisodique.

L'existence de parentés de hasard susceptibles de falsifier les comparaisons immunoélectrophorétiques a été considérée en confrontant N. fowleri, N. jadini, A. culbertsoni et A. castellanii à une série d'organismes étrangers au phylum.

Deux précautions méthodologiques se sont montrées indispensables avant de pouvoir attribuer à des parentés de hasard les réactions croisées observées dans ces circonstances. D'une part, ces réactions se sont généralement manifestées par un seul arc de précipitation, localisé à hauteur du puits de dépôt de l'extrait et le plus souvent partiellement sensible au citrate trisodique. Ces deux caractères font mettre en doute l'authenticité antigénique du composant ainsi visualisé qui pourrait être apparenté à la substance C. De ce fait, la prolongation pendant 15 heures de l'incubation des précipitats dans la solution de citrate trisodique entraîne souvent la disparition de la majorité de ces réactions.

D'autre part, il s'est avéré que le sérum des animaux d'expérience pouvait renfermer des anticorps précipitants avant l'immunisation expérimentale. Ces anticorps sont élaborés à la suite d'un contact naturel indépendant de l'immunisation; ils peuvent entraîner de fausses réactions croisées lors de la confrontation de l'immunsérum à un organisme hétérologue. Cette éventualité impose une saignée de contrôle avant toute immunisation. La preuve définitive de la spécificité des réactions croisées subsistant malgré ces précautions est fournie par l'absorption de l'immunsérum à l'aide de l'organisme homologue : la disparition des réactions croisées qui en résulte démontre la présence effective chez ce dernier d'antigènes ubiquistes.

Dans ces conditions, l'analyse de vingt espèces fongiques et de treize espèces d'helminthes à l'aide des hyperimmunsérums anti-Naegleria et anti-Acanthamoeba démontre chez ceux-ci la présence exceptionnelle d'antigènes ubiquistes (tableaux 15, 16, 17 et 18). Entre N. fowleri et les trente-trois organismes considérés, des réactions croisées ne s'observent que dans cinq cas, tous fongiques, et ne s'expriment que par un seul arc souvent partiellement dissous par le citrate trisodique.

Entre N. jadini et les trente-trois organismes considérés, une réaction croisée s'observe avec C. albicans, mais par contre trois réactions croisées sont observées avec des helminthes. Entre Acanthamoeba et ces organismes, les réactions croisées ne s'observent que dans deux cas, fongiques, et ne s'expriment que par un seul arc.

Des résultats analogues ont été observés chez T.(T.) brucei où sur quarante-deux organismes considérés, cinq donnent des réactions croisées, tous d'origine fongique, et ne s'expriment que par un seul arc (Le Ray, 1974).

## 8.2. Antigènes ambiens.

Nous entendons par antigènes ambiens, les antigènes qu'un organisme possède en propre ou qu'il partage avec d'autres organismes apparentés.

Nos résultats établissent que les antigènes ambiens constituent les neuf dixièmes de la mosaïque antigénique de N. fowleri visualisée par l'immuno-électrophorèse. Ces antigènes paraissent être d'expression constante au cours de la différenciation cellulaire. Ils montrent une spécificité large et traduisent au niveau moléculaire les affinités taxonomiques et phylétiques de l'organisme.

La structure antigénique de N. fowleri, ainsi que d'autres espèces appartenant aux genres Naegleria et Acanthamoeba s'est avérée qualitativement stable en culture in vitro. Elle ne se modifie pas au cours d'un entretien prolongé. La stabilité antigénique initialement établie par Seed (1964), chez T. brucei est confirmée par Le Ray (1969) au niveau des antigènes somatiques. La stabilité antigénique en culture apparaît être un caractère général des Trypanosomatidae (Afchain et al., 1974; Le Ray, 1974) tout comme chez les Amoebida (Willaert, 1975). Une conclusion similaire a été rapportée par Bray et Lainson (1966) à propos du genre Leishmania. Il n'en est pas de même chez les Trichomonadida; le maintien en culture stimule la synthèse de plusieurs systèmes antigéniques chez Trichomonas (Goldman et Honigberg, 1968; Stepzowski et Honigberg, 1972) et chez Histomonas (Dwyer, 1971; Dwyer et Honigberg, 1972).

De plus, cette constance antigénique exprimée par N. fowleri a été confirmée par des antigènes obtenus à partir de la même souche cultivée in vitro à différentes températures. Cette observation apporte un caractère supplémentaire au sujet de la stabilité antigénique des Protozoaires en culture in vitro.

### 8.2.1. Taxonomie.

L'application de l'analyse immunoélectrophorétique à la systématique des Protistes est encore très limitée. Cette constatation est plutôt surprenante eu égard aux possibilités parfois limitées de la caractérisation morphologique qui rend difficile l'identification des organismes dans certaines branches du phylum.

L'étude comparative d'organismes au niveau moléculaire, par des techniques de précipitation en gel et tout particulièrement l'immunoélectrophorèse a fourni au cours de ces dernières années une quantité appréciable d'informations nouvelles dans le domaine de la systématique botanique et zoologique (Boyden, 1964; Hawkes, 1968; Backhaus, 1967). L'analyse des caractères immunochimiques a permis non seulement de caractériser les catégories taxonomiques mais également de dégager leurs relations phylétiques.

Les genres Naegleria et Acanthamoeba rassemblent des organismes d'une remarquable similitude morphologique posant un problème taxonomique difficile à résoudre par les seuls caractères morphologiques.

Nous envisageons les parentés antigéniques de N. fowleri de façon hiérarchisée d'abord au sein du genre, puis au niveau de la famille et ensuite au niveau des différentes catégories de la famille et dans le cadre du phylum. L'étude des parentés antigéniques d'A. culbertsoni et d'A. castellanii ont été envisagées d'une façon moins approfondie.

#### 8.2.1.1. Groupe-espèce.

La définition de l'espèce est particulièrement difficile à poser chez les Protozoaires. La difficulté à disposer de caractères morphologiques distinctifs a conduit parfois à mettre en doute la réalité de l'existence de l'espèce dans le phylum en raison de problèmes méthodologiques. Sokal (1973) envisage le problème actuel de l'espèce comme un problème de définition et de genèse. Le problème de la spéciation est que divers chercheurs ont des conceptions différentes au sujet de la définition de la catégorie d'espèce, d'une part pour des raisons historiques et idéologiques, d'autre part parce qu'ils travaillent avec un matériel différent. Du point de vue strictement scientifique la

définition de l'espèce est d'une importance capitale. L'espèce constitue l'unité fondamentale de la nomenclature linnéenne, dont l'application détermine la compréhension des relations entre les êtres vivants. Les critères taxonomiques classiques souvent en défaillance devraient inciter un plus grand nombre de chercheurs à s'adresser à des caractères nouveaux, à condition que ceux-ci soient intrinsèques et objectifs. Les techniques d'analyse moléculaire, par leur appréhension directe de l'expression génétique, se prêtent particulièrement bien à ce but. Crick (1958) a suggéré qu'une taxonomie des protéines serait l'expression la plus fidèle possible du phénotype.

Notre but a été d'évaluer à l'aide de l'analyse immunoélectrophorétique l'importance des parentés et des spécificités antigéniques des amibes libres dans leurs diverses catégories taxonomiques. Le problème de systématique le plus urgent est d'éliminer la confusion actuelle due au double emploi de plusieurs noms génériques et spécifiques.

Etant donné la stabilité antigénique en culture in vitro des amibes libres des genres Naegleria et Acanthamoeba, ces formes nous ont permis de prendre en considération l'analyse taxonomique du groupe espèce.

Au niveau infraspécifique, nos résultats établissent la constance immunoélectrophorétique qualitative des formes de culture de N. fowleri et d'A. castellanii.

L'analyse immunoélectrophorétique comparative de sept souches de N. fowleri d'origine humaine et d'une distribution géographique différente démontre l'isologie complète de leur structure. La mosaïque antigénique n'est donc pas affectée qualitativement par l'origine géographique, ni par les modalités de leur entretien en laboratoire.

De plus, cette analyse nous a également permis de démontrer l'isologie complète de souches isolées à partir de l'eau et de la boue d'égout avec celles isolées chez l'homme. Ceci constitue un exemple frappant de la constance antigénique de l'espèce. La comparaison de populations isolées à l'état parasitaire et à l'état libre en Océanie, en Amérique, en Asie et en Europe démontre leur identité immunoélectrophorétique. Leur homogénéité génétique est particulièrement significative si l'on considère la diversité des biotopes où évoluaient

les organismes étudiés; l'isolement géographique qui les sépare et particulièrement l'absence de pression sélective exercée immunologiquement par l'hôte sur les parasites obligés (Capron et al., 1968).

L'isologie complète de ces souches nous a permis d'éliminer une première confusion de synonymie. En effet, parmi ces souches d'origine humaine, l'une d'elles, la souche HB-1 isolée par Butt (1966) aux Etats-Unis, a été décrite et définie par Singh et Das (1970) comme représentant l'espèce N. aerobia et ensuite par Chang (1972) comme étant N. invades. Cependant, deux mois avant la prise de position de Singh, Carter (1970) définit l'espèce N. fowleri comme étant l'agent étiologique de la méningo-encéphalite amibienne primitive en Australie du Sud. Les caractères morphologiques et biologiques connus de N. fowleri, N. aerobia et N. invades sont comparables.

Ces observations supportées par nos résultats et en tenant compte du Code International de la Nomenclature Zoologique (1964), confirment la priorité de N. fowleri (Carter, 1970) dont N. aerobia et N. invades sont des synonymes juniors non valides.

De plus, les souches que nous venons d'étudier sont agglutinées au même titre que les souches australienne par un antisérum anti-N. fowleri d'origine australienne, préalablement épuisé par N. gruberi; cette méthode établit également leur identité (Anderson et al., 1972, 1973).

L'étude immunoélectrophorétique comparative de N. fowleri avec la souche, IMVS PAa, isolée à partir du sol en Australie, ne nous a pas permis de constater une isologie complète avec les souches isolées chez l'homme et dans l'environnement. Néanmoins, cette souche possède les mêmes caractères morphologiques, biologiques et sérologiques que N. fowleri d'origine humaine. Cette souche se distingue des autres par un composant immunoélectrophorétique ou par une partie de ce composant immunoélectrophorétique. Elle semble avoir en moins, un composant présent chez N. fowleri. Néanmoins, un hyperimmunsérum anti-IMVS-PAa absorbé par un extrait de N. fowleri d'origine humaine montre une isologie complète. Cette souche appartient-elle à l'espèce N. fowleri, est-elle un variant de l'espèce N. fowleri ou est-elle un organisme intermédiaire ne se distinguant que par un seul arc de précipitation d'observation constante ? Nous pensons qu'il est encore prématuré de prendre une position définitive à cet égard. Ce résultat

devrait être confirmé par l'analyse immunoélectrophorétique d'une autre souche d'un comportement analogue ainsi que par d'autres études approfondies (études enzymatiques, dosage de l'ADN, etc).

A propos de la constance antigénique de l'espèce une situation analogue est également rencontrée au sein du genre Acanthamoeba. L'espèce A. castellanii, la plus connue et la plus répandue des amibes libres confirme nos observations acquises chez N. fowleri.

L'analyse immunoélectrophorétique comparative de quatre souches (Acanthamoeba sp. Neff, A. castellanii souche Hutner, A. castellanii souche 1930 et A. terricola) partageant une morphologie identique nous a permis de constater une isologie complète de leur mosaïque immunoélectrophorétique. Il s'ensuit que Acanthamoeba sp. Neff, et A. terricola deviennent synonymes d'A. castellanii.

Du point de vue morphologique, Page (1967) suggère également qu'Acanthamoeba sp. Neff est une souche de A. castellanii et conclut de la description d' A. terricola (Pussard, 1964) que celle-ci ressemble également à A. castellanii (Page, in litt., 1974). D'ailleurs Pussard (communication personnelle) considère que ces deux souches sont très semblables, sinon identiques.

Les travaux d'Adam et Blewett (1973, 1974) démontrent également une homogénéité parmi plusieurs souches d'A. castellanii. Parmi sept souches étudiées ils observent une constance dans la proportion de l'ADN nucléaire (61 % G, C) et l'ADN mitochondriale (34 % G, C). De plus, ils obtiennent un haut pourcentage d'hybridation de l'ADN (95 à 100 % d'ADN accouplé) chez ces souches supposées être A. castellanii.

Le Ray (Le Ray et al., 1971; Le Ray, 1974) en étudiant les Trypanosomatidae, compare trois souches de T.b. brucei isolées en Afrique à partir d'hôtes vertébrés distincts. L'analyse immunoélectrophorétique qualitative des formes de culture de ces souches démontre l'isologie complète de leur structure. Chez T. cruzi, l'existence de différences antigéniques entre souches en culture a été décrite (Nussenzweig et al., 1963; Nussenzweig et Goble, 1966; Gonzalez Cappa et Kagan, 1969). Néanmoins, Afchain (Afchain et al., 1974) vient de mettre en évidence dans des conditions techniques normalisées,

l'isologie complète de trois souches de T. cruzi d'origine géographique et parasitaire distincte.

En conclusion, les résultats actuellement acquis à propos des Amibes et des Flagellés (Le Ray, 1974; Afchain et al., 1974) permettent de constater une constance de la structure immunoélectrophorétique exprimée par des organismes d'une même espèce évoluant dans des conditions écologiques variées.

Chez un organisme se différenciant d'un autre organisme par un seul composant immunoélectrophorétique, il est à prendre en considération la valeur taxonomique de l'analyse immunoélectrophorétique pour distinguer des formes infraspécifiques d'une espèce. L'analyse immunoélectrophorétique bidimensionnelle est peut être capable de nous apporter des renseignements supplémentaires dans des situations analogues. Nous pensons qu'il faut être prudent quant à l'interprétation de cette observation en prenant en considération la ressemblance morphologique et biologique de ces deux organismes.

#### 8.2.1.2. Groupe-genre

Le genre Naegleria, connu jusqu'à ces dernières années par la seule espèce N. gruberi, rassemble des organismes morphologiquement similaires dont les caractères biologiques dénotent cependant une plus grande hétérogénéité (Carter, 1972; Griffin, 1972; Willaert et Le Ray, 1973 et Chang, 1974).

L'analyse immunoélectrophorétique du genre Naegleria met en évidence de profondes divergences antigéniques sous-jacentes au conservatisme des caractères morphologiques.

L'analyse immunoélectrophorétique nous a permis d'établir indiscutablement l'indépendance génétique de N. fowleri, de N. jadini et de N. gruberi au sein du genre Naegleria. Ces différences ne paraissent pas attribuables à une variabilité infraspécifique comme nous venons de le voir (8.2.1.1.) et peuvent être considérées comme l'expression de profondes différences génétiques.

N.jadini, espèce nouvelle (Willaert et Le Ray, 1973) se distingue de N.gruberi comme de N.fowleri par les deux-tiers de ses composants antigéniques. Cette différence accusée entre espèces voisines de Protozoaires libres témoigne d'un potentiel évolutif marqué de la part du groupe. Cette diversification est d'autant plus frappante que les espèces de Naegleria sont morphologiquement très semblables entre elles.

N.jadini possède en propre que le quart de ses composants antigéniques révélés. Les autres composants sont engagés dans les parentés l'unissant soit à N.gruberi, soit à N.fowleri. De plus, N.jadini occupe une place intermédiaire sur l'axe évolutif reliant N.gruberi à N.fowleri.

Le genre Naegleria renferme d'autres espèces distinctes. L'analyse immunoélectrophorétique met en évidence chez les souches "A" et "PPMFB" une différence antigénique concernant le tiers des composants immunoélectrophorétiques de N.fowleri, et la moitié environ des composants de N. gruberi et de N.jadini. Par contre, les parentés entre Naegleria sp. A et Naegleria sp. PPMFB concernent la presque totalité de leur mosaïque antigénique. Mais une distinction a été mise en évidence à l'aide d'un hyperimmunsérum de chaque espèce. Ces deux organismes appartenant au genre Naegleria peuvent être considérés comme espèces nouvelles du point de vue immunochimique. Il serait néanmoins préférable de confirmer ces constatations à l'aide de plusieurs hyperimmunsérums, ainsi que par des caractères morphologiques et biologiques.

Au sein du genre Naegleria, nous distinguons au moins cinq espèces dont les parentés ainsi que leurs spécificités antigéniques sont importantes mise à part celles partagées par les souches "A" et "PPMFB". Ces nouvelles espèces semblent être intermédiaires entre N.fowleri et N.gruberi. Néanmoins, les trois espèces actuellement reconnues au sein du genre se distinguent par les deux tiers de leurs composants immunoélectrophorétiques. Leur divergence antigénique importante traduit une dérive génétique insoupçonnable suivant les caractères conventionnels. Il apparaît donc que les espèces d'un même genre se caractérisent par des spécificités immunoélectrophorétiques constantes et parfois importantes, même lorsque ces espèces sont morphologiquement homogènes.

Au sein de la famille des Vahlkampfiidae, les parentés antigéniques observées, partagées par les espèces du genre Naegleria, avec Tetramitus rostratus et Vahlkampfia avara sont du même ordre. Ces parentés sont déjà très réduites quand on considère les parentés observées au sein de la famille des Trypanosomatidae (Le Ray, 1974). Néanmoins, vu la très grande divergence antigénique observée au sein du genre Naegleria, ces parentés entre genres différents d'une même famille ne sont pas négligeables.

Au niveau des composants antigéniques accessibles à l'analyse immunoélectrophorétique une disparité antigénique importante, presque totale s'observe entre les différentes espèces du genre Naegleria étudiées et les genres Tetramitus et Vahlkampfia.

N. gruberi, l'espèce la plus anciennement connue de ce genre partage le plus grand nombre de composants immunoélectrophorétiques aussi bien avec l'amoébo-flagellate T. rostratus qu'avec l'espèce V. avara, laquelle ne semble pas présenter un stade flagellé au cours de son évolution. Néanmoins, l'absence d'un stade flagellé chez Vahlkampfia ne semble pas constituer un fait acquis. Page (in litt., 1974) soupçonne, que sous certaines conditions, il serait possible d'induire la phase flagellée chez certaines espèces appartenant au genre Vahlkampfia. D'ailleurs, Singh (1952) en créant l'espèce Didascalus thornstoni constate qu'elle ressemble fort à V. soli (Martin et Lewin, 1914). Leur division nucléaire est identique (absence de corps interzonaux) et un stade flagellé temporaire est difficile à mettre en évidence, comme nous avons pu le constater. Seule la mise en évidence de ce stade flagellé a incité Singh (1952) à créer le genre Didascalus et y inclure N. fowleri (Singh, 1974) en se basant sur l'observation de Carter (1968), à savoir la présence d'une manière inconstante des corps interzonaux durant la mitose de N. fowleri. Pourtant Singh et Das (1970) mettent en évidence d'une manière constante la présence de corps interzonaux durant la mitose de N. aerobia (N. fowleri).

Le degré d'isologie antigénique exprimé par Naegleria au niveau de la famille des Vahlkampfiidae est en accord avec la diversification antigénique observée au sein du genre Naegleria. Ce degré d'isologie semble être en accord avec la classification de Page (1967).

L'étude que nous avons commencée au sein du genre Acanthamoeba nous apprend qu'il existe diverses espèces antigéniquement bien déterminées qui diffèrent l'une de l'autre. Mais il nous semble encore prématuré d'envisager des conclusions définitives au sujet de ce genre. En effet, ce genre renferme un nombre d'espèces décrites plus importantes que celui étudié dans ce travail. Néanmoins, les observations que nous avons faites apportent des confirmations ou des faits nouveaux au sujet de ce genre.

Parmi les espèces étudiées à l'aide de l'analyse immunoélectrophorétique une divergence antigénique nette s'observe entre A.culbertsoni, A.castellanii, A.palestinensis et A. astronyxis.

D'autre part, il semble se constituer un groupe de plusieurs espèces, antigéniquement très apparentées mais néanmoins distinctes. Ce groupe fait d'ailleurs l'objet d'une discussion basée sur les critères morphologiques à propos de leur séparation. Ce groupe est constitué par A. castellanii, A.polyphaga et A.rhysodes; morphologiquement très homogène, les espèces sont difficilement identifiables par les seuls caractères morphologiques. Néanmoins elles se différencient par trois à quatre composants immunoélectrophorétiques. Ces différences ne paraissent être attribuables à une variabilité antigénique infraspécifique. Nous avons déjà démontré l'identité immunostructurelle de quatre souches appartenant à l'espèce A.castellanii.

Les parentés antigéniques partagées par A.castellanii, A.polyphaga et A.rhysodes sont très importantes et concernent plus des quatre cinquièmes de la structure antigénique totale d'A.castellanii. Ces observations restent encore à confirmer à l'aide d'hyperimmunsérums anti-A.polyphaga et anti-A.rhysodes.

A ce sujet, il convient de rappeler les travaux de Adam (1964,1973), qui à l'aide d'un test d'immobilisation et par l'hybridation de DNA constate l'identité de A.castellanii avec A.rhysodes et Acanthamoeba sp. Neff et une différence avec A.polyphaga. Page (1967, in litt.,1974) défend également cette position du point de vue morphologique et ajoute que la

différenciation d'espèces au sein du genre Acanthamoeba est extrêmement difficile. Il constate même que certaines souches d'A.polyphaga, montrant une morphologie assez variable, sont plus semblables à A.castellanii.

Pussard (1964) de son côté décrit A.terricola, nouvelle espèce dont nous venons de démontrer l'identité avec A.castellanii. Il existe donc au sein du genre Acanthamoeba des espèces bien distinctes d'une part et d'autre part des groupes dont les espèces sont étroitement liées.

Parmi ces espèces bien distinctes, il se trouve A.palestinensis, décrit originalement comme étant Mayorella palestinensis (Reich, 1933). Cette nomenclature, toujours employée (Lassman, 1963, 1973 et Lassman et Reich, 1965) devrait être éliminée dans la taxonomie moderne puisque les caractères morphologiques et immunostructurels ont apportés des preuves indiscutables de l'appartenance de cette espèce au genre Acanthamoeba.

Page (in litt., 1974) inclut dans un même groupe A.culbertsoni et A.palestinensis en se basant sur leurs caractères morphologiques. Néanmoins, leurs caractères immunoélectrophorétiques plaident pour une indépendance absolue de ces deux espèces. A.culbertsoni se différencie par les deux cinquièmes de sa structure antigénique d' A.palestinensis. Ainsi, nous ne voyons aucune raison d'inclure ces deux espèces dans un groupe, comme nous l'avons fait pour A.castellanii - A.polyphaga - A.rhysodes, lesquelles montrent une structure immunoélectrophorétique particulièrement proche, mais néanmoins distincte.

A.castellanii et A.culbertsoni se distinguent d'A.astronyxis par un peu moins que la moitié de leurs structures immunoélectrophorétiques. Cette espèce se différencie facilement, par ses caractères morphologiques, des autres espèces étudiées. A.commandoni (Pussard, 1964) ressemble très fort à cette espèce et en est probablement un synonyme ou fait partie d'un groupe A.astronyxis - A.commandoni (Pussard, 1972) selon leurs caractères morphologiques semblables. Page (in litt., 1974) est également de cet avis. Malheureusement, nous n'avons pas encore pu étudier du point de vue antigénique les structures de ces deux espèces pour des raisons techniques de culture.

Au niveau des composants antigéniques accessibles à l'analyse immunoélectrophorétique une disparité antigénique importante, et même totale s'observe entre les genres Acanthamoeba et Hartmannella. Ces deux genres appartiennent à la même famille, celle des Hartmannellidae dont le genre Hartmannella est le genre-type. Ces deux genres distincts, à notre avis, sont mis en synonymie par Singh (1952) et Singh et Das (1970) à cause de l'identité de leurs caractères mitotiques. Déjà un nombre importants de caractères morphologiques plaident en faveur de la séparation de ces deux genres. Nos observations soutiennent cette séparation et semblent même soulever la question de l'appartenance de ces deux genres à la même famille. Selon nos résultats, le degré d'isologie antigénique exprimé par Acanthamoeba au niveau de la famille des Hartmannellidae ne correspond absolument pas avec sa situation taxonomique actuelle. En effet, les parentés antigéniques observées en ce qui concerne le genre Acanthamoeba et certains genres appartenant à une autre famille sont plus importantes que les parentés observées entre Acanthamoeba et Hartmannella. Néanmoins il est encore prématuré de considérer éventuellement à dégager le genre Acanthamoeba de la famille des Hartmannellidae comme l'a suggéré Adam (1964). En accord avec Page (1967) nous pensons que des informations complémentaires sont souhaitables avant d'envisager cette éventualité. Une reconsidération de la classification doit reposer sur des caractères valides.

En conclusion, l'analyse immunoélectrophorétique appliquée au groupe-genre s'avère particulièrement informatrice. Des informations acquises par nos travaux et comparées aux résultats des enquêtes menées chez les Vertébrés et chez les Helminthes (Capron et al., 1968; Capron et Afchain, 1970; Capron et al., 1972) il s'ensuit que l'analyse immunoélectrophorétique se présente comme une méthode de choix pour la comparaison d'espèces d'amibes appartenant à un même genre, parfois à une même famille.

Les Naegleria et Acanthamoeba constituent des genres dont les espèces sont remarquablement homogène du point de vue morphologique. Cette homogénéité et la diversité ainsi témoignées ne permettent pas d'envisager favorablement une analyse objective de la phylogénèse des genres Naegleria et Acanthamoeba au sein de leurs familles respectives.

### 8.2.1.3. Parentés suprafamiliales.

L'apparentement antigénique au niveau de l'ordre des Amoebida a été évalué par confrontation des genres Naegleria et Acanthamoeba aux familles des Vahlkampfiidae, Hartmannellidae et Entamoebidae. Ensuite ces deux genres ont été confrontés au niveau de la classe des Flagellés à la famille des Trypanosomatidae et à deux Phytoflagellés appartenant à des ordres distincts, l'euglénien Euglena et la Chrysomonadine Monas. En dernier lieu, nous avons confronté Naegleria et Acanthamoeba avec un représentant de la classe des Ciliata : Tetrahymena pyriformis.

#### 1. Parentés suprafamiliales du genre Naegleria.

Les parentés unissant le genre Naegleria à la famille des Hartmannellidae, représentée par Acanthamoeba et Hartmannella, sont réduites. Les relations antigéniques entre Naegleria et Acanthamoeba sont les plus importantes rencontrées au niveau suprafamiliales. Elles concernent un à trois composants immunoélectrophorétiques partagés en particulier entre les espèces du genre Naegleria et A.castellanii et A.culbertsoni. Leur présence paraît significative bien qu'ils ne déterminent pas régulièrement l'élaboration d'anticorps précipitants de toutes les souches au cours de l'hyperimmunisation. Les antigènes en question n'ont pas le caractère flocculant des polysaccharides ubiquistes du type de la substance C. Ceci rend peu vraisemblable l'attribution à des parentés de hasard et suggère leur valeur phylétique.

Les relations antigéniques entre Naegleria et Hartmannella sont négligeables; seul un composant immunoélectrophorétique est mis en évidence entre N.fowleri et H.vermiformis. Les autres réactions croisées, avec d'autres espèces du genre Naegleria étant nulles.

L'apparentement antigénique des Naegleria à E.histolytica, seul représentant de la famille des Entamoebidae que nous avons étudié, se traduit par la présence d'un seul composant immunoélectrophorétique entre N.jadini, N.fowleri et E.histolytica. Ces réactions croisées mises en évidence par les hyperimmunsérums anti-Naegleria ne se sont pas montrées reproductibles à l'aide d'un hyperimmunsérum anti-E.histolytica.

En conclusion, les relations antigéniques entre Naegleria et Entamoeba ne sont pas très significatives mais ne peuvent être attribuées complètement à des parentés de hasard, en prenant en considération la très grande divergence antigénique existant déjà entre différentes espèces appartenant à un même genre. De ce fait, leur présence peut être pris en considération et suggère alors une valeur phylétique.

Au niveau taxonomique supérieur, l'analyse immunoélectrophorétique ne met pas en évidence de parentés entre les Trypanosomidae et Naegleria, comparés à l'aide de leurs hyperimmunsérums respectifs : N.fowleri en particulier ne partage pas de composants immunoélectrophorétiques avec T.brucei brucei , T.brucei gambiense , T.cruzi et L.donovani. Un hyperimmunsérum anti-T.cruzi a permis de mettre en évidence un composant antigénique vis-à-vis de N.fowleri. Néanmoins, cette constatation ne s'est pas montrée reproductible à l'aide d'autres hyperimmunsérums anti-T.cruzi. Cette parenté peut être attribué à une parenté de hasard.

L'analyse immunoélectrophorétique d'un extrait d'Euglena gracilis (forme chlorophyllienne) par les hyperimmunsérums anti-N.fowleri et anti-N.jadini n'a pas permis de révéler une parenté antigénique.

L'examen d'un organisme aplastidié, Monas sp. à l'aide d'un hyperimmunsérum anti-N.fowleri met en évidence la présence d'un composant antigénique.

A un niveau taxonomique supérieur à la classe, l'analyse immunoélectrophorétique ne met pas en évidence de parentés entre les amoeboflagellates Naegleria et le cilié Tetrahymena pyriformis.

## 2. Parentés suprafamiliales du genre Acanthamoeba.

Les parentés unissant le genre Acanthamoeba à Naegleria sont très réduites et concernent en moyenne moins d'un composant antigénique. Ces parentés concernent un à deux composants antigéniques spécifiquement partagés par quelques espèces, mais irrégulièrement reconnus par les lapins.

Les parentés antigéniques entre le genre Acanthamoeba et Tetramitus sont inexistantes. Dans la même famille que Tetramitus, le genre Vahlkampfia se montre plus apparenté à Acanthamoeba, par un à deux composants immuno-électrophorétiques. Ces parentés révélées se montrent plus importantes que celles observées entre Acanthamoeba et Hartmannella, appartenant à une même famille. Cette observation est un argument en faveur au sujet de l'appartenance du genre Acanthamoeba à la famille des Hartmannellidae.

Aucune parenté entre Acanthamoeba et Entamoeba n'a été observée à l'aide des hyperimmunsérums anti-Acanthamoeba. A l'aide d'un hyperimmunsérum anti-E.histolytica une parenté se traduisant par un composant immunoélectrophorétique entre E.histolytica et A.astronyxis est mis en évidence.

Au niveau taxonomique supérieur, l'analyse immunoélectrophorétique ne met pas en évidence de parentés entre les Trypanosomidae et Acanthamoeba, comparés à l'aide de leurs hyperimmunsérums respectifs. Les Acanthamoeba ne partagent pas de composants immunoélectrophorétiques avec T.brucei brucei, T.brucei gambiense, T.cruzi et L.donovani.

L'analyse immunoélectrophorétique d'un extrait d'Euglena gracilis par les hyperimmunsérums anti-A.castellani et anti-A.culbertsoni n'a pas permis de révéler un apparentement immunoélectrophorétique.

Les relations antigéniques entre Acanthamoeba et Monas sp. sont relativement importantes et concernent un à deux composants immunoélectrophorétiques. Néanmoins, ces relations sont difficiles à expliquer.

Au niveau taxonomique supérieur à la classe, l'analyse immuno-électrophorétique ne permet pas de mettre en évidence une parenté antigénique entre Acanthamoeba et le cilié Tetrahymena pyriformis.

Il convient ici de rappeler les travaux de Sen, Mukerjee et Ray (1961) qui, les premiers, à l'aide d'un antiserum anti-E.histolytica objectivant trois arcs de précipitation en immunodiffusion en réaction homologue, n'observent pas de réaction croisée avec N.gruberi, S.russelli et E.moshkovski. De plus, Siddiqui et Balamuth (1966) et Balamuth et Kawamaki (1967) constatent qu'aucune parenté antigénique n'existe entre les amibes

parasites (E.histolytica, E.invadens et E. moshkovski), les amibes libres (Naegleria et Tetramitus) et les Hartmannella.

Il existe donc un apparentement antigénique apparemment plus important entre genres appartenant à différentes familles au sein de l'ordre des Amoebida qu'entre les genres Naegleria et Acanthamoeba et les Flagellés et Ciliés. L'interprétation de ces observations doit être abordé néanmoins avec prudence. Sous réserve d'une investigation plus large, ces parentés nous paraissent toutefois significatives. D'une part, elles démontrent l'existence chez les Amoebida, d'un apparentement antigénique accessible à l'analyse immunoélectrophorétique au niveau de l'ordre. D'autre part, elles mettent en évidence, au niveau taxonomique supérieur, une disparité généralement presque totale entre les Amoebida, les Flagellés et les Ciliés.

L'indépendance antigénique des Amoebida vis-à-vis des Flagellés, en particulier avec les Trypanosomatidae est intéressante à considérer. Le genre Naegleria rassemble des organismes passant par un stade flagellé au cours de leur cycle. Certains l'insèrent dans un ordre de position taxonomique controversée, les Rhizomastigida Doflein, placé "for convenience" parmi les Flagellés (Committee on Taxonomy, 1964). L'indépendance antigénique de Naegleria et des Trypanosomatidae d'une part, l'apparentement des Flagellés jusqu'au rang de la classe d'autre part (Le Ray, 1974), ne justifient pas le rapprochement de ces amoeboflagellates : Naegleria et Tetramitus avec les Flagellés. L'existence de parentés immunoélectrophorétiques entre Naegleria, Tetramitus et Vahlkampfia, passant ou non par un stade flagellé et plusieurs familles de Sarcodina : Hartmannellidae, Entamoebidae démontre l'appartenance du genre Naegleria à l'ordre des Amoebida.

Dans le phylum des Protozoaires, les parentés antigéniques des Amoebida avec les taxa supérieur sont peu marquées ou inexistantes. Les Amoebida se montrent antigéniquement indépendants des Flagellés libres et parasites. L'apparentement immunostructurel entre Flagellés et amibes caractérisé par Dwyer (1974) ne permet cependant pas d'affirmer l'autonomie antigénique de ces deux superclasses.

### 8.2.2. Phylogénèse.

Malgré les résultats obtenus actuellement concernant les six genres appartenant à trois familles différentes, il paraît encore précoce et délicat d'aborder la phylogénèse.

Néanmoins, au sein du genre Naegleria, les espèces étudiées peuvent être placées sur un axe évolutif, suivant l'importance des parentés observées sans que l'on puisse indiquer sa direction. Aux deux extrémités de l'axe on trouvera N.gruberi et N.fowleri, les autres espèces étant intermédiaires (Fig. 98).

Dans cette figure nous avons inscrit dans un cercle les groupes antigéniquement homogènes. Ces groupes sont reliés par un nombre de traits correspondant à celui des antigènes apparentés. Les caractères morphologiques et immunochimiques suggèrent de placer dans un même complexe Naegleria, Tetramitus et Vahlkampfia, représenté par un cercle marqué par des traits interrompus.

Nous avons pu constater également que les parentés observées entre les amoebo-flagellates Naegleria et Tetramitus sont les plus importantes observées entre genres différents. Ces parentés, trop faibles pour envisager l'appartenance de T.rostratus au genre Naegleria, suffisent néanmoins pour les grouper dans une même famille. Il en est de même pour V.avara. Il semble que l'on ne soit pas autorisé à envisager une seule famille constituée d'amoebo-flagellates ainsi que Kudo (1956) l'a précisé.

Au sein de la famille des Vahlkampfiidae un apparentement antigénique représentatif semble faire jour, cependant qu'au sein de la famille des Hartmannellidae les parentés entre les deux genres étudiés sont à peine exprimées.

Nous pensons qu'une opinion définitive concernant les relations au niveau des différentes familles, comme nous l'envisageons, semble prématuré. Plusieurs genres et espèces représentant ces familles doivent encore être étudiées avant d'aborder leur position phylogénique.

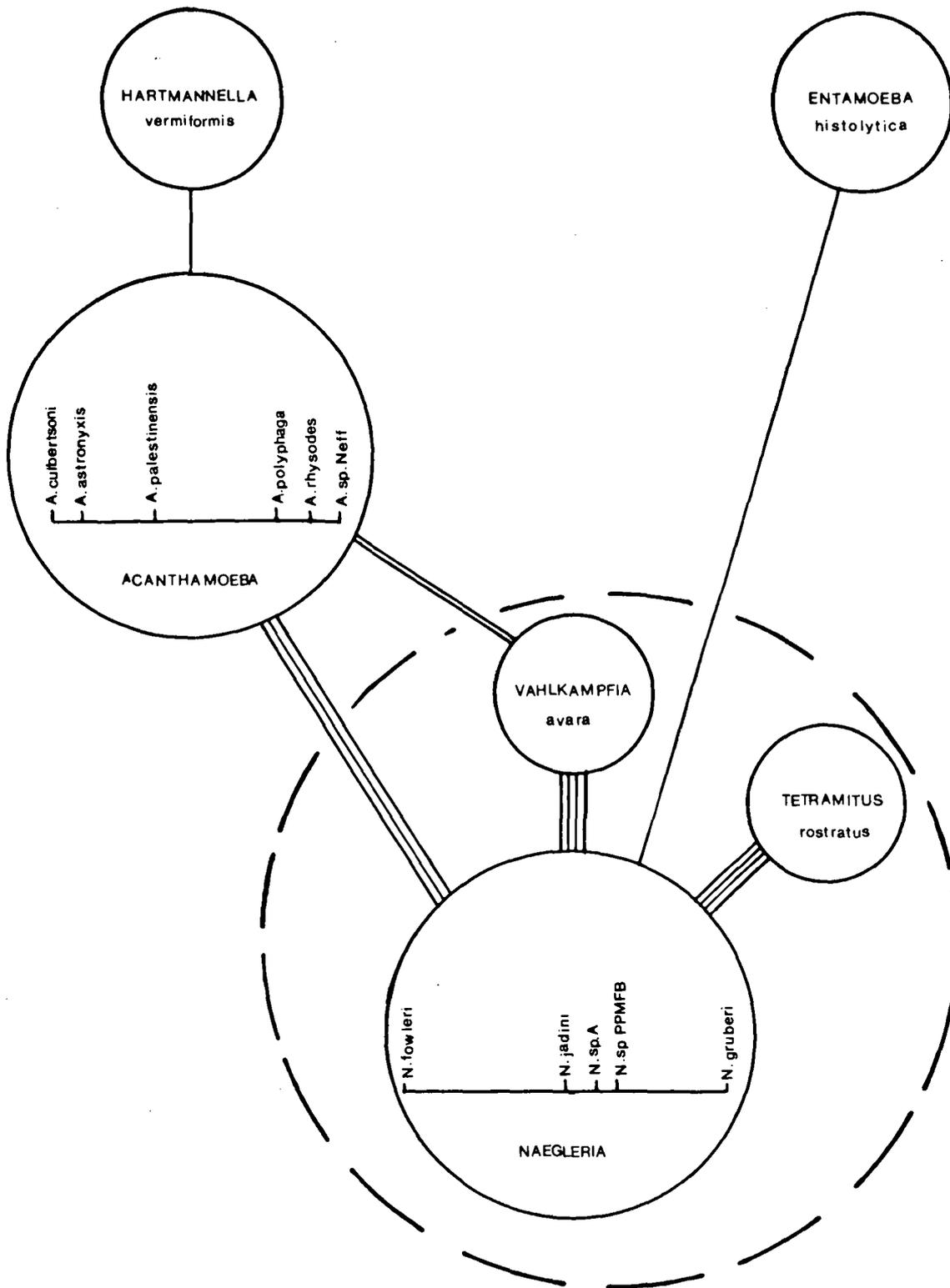


Figure 96.  
 Relations antigéniques et phylogénétiques du genre Naegleria.

### 8.3. Immunofluorescence indirecte .

L'analyse immunoélectrophorétique de protéines hydrosolubles extraites de souches de Naegleria et Acanthamoeba nous a permis d'identifier et de séparer les différentes espèces appartenant à ces genres. Néanmoins, cette méthode est fastidieuse et requiert la culture massive axénique des organismes à étudier. Cette méthode ne peut être recommandée comme analyse de routine dans un laboratoire. Pour cette raison nous avons essayé de mettre au point l'identification de ces organismes à l'aide de techniques immunologiques simples et sensibles tel que l'immunofluorescence indirecte.

Pour parvenir à ce but nous avons eu recours à des immunsérums d'un pouvoir discriminatif élevé et fidèle. Nous avons constaté que les immunisations classiques avec un broyat, un lysat ou les cellules entières donnent des réactions croisées trop importantes pour pouvoir distinguer ces organismes d'apparence identique.

Ce sont les sites antigéniques les plus spécifiques qui sont susceptibles de déterminer la réponse immunologique la plus précoce et la plus importante. L'exemple le plus frappant (Van Meirvenne et al., 1975 et Willaert et al., 1974) est apporté par le pouvoir discriminatif élevé et fidèle des immunsérums expérimentaux prélevés les premiers jours suivant l'immunisation et appliqués en réaction d'immunofluorescence à ces unicellulaires parasites ou libres d'apparence identique mais dont les spécificités antigéniques avaient été révélées par l'analyse immunoélectrophorétique. (Le Ray et al., 1973; Willaert et Le Ray, 1973 et Willaert, 1974).

Le principe de l'immunogénicité privilégiée des constituants les plus spécifiques de l'organisme ouvre des perspectives neuves et passionnantes aux investigations taxonomiques, diagnostiques, écologiques et épidémiologiques en particulier lorsque celles-ci ont à considérer un complexe de Protozoaires morphologiquement peu ou non différenciés. L'obtention d'immunsérums d'une haute spécificité vis-à-vis d'une série d'organismes de référence et le recours à des techniques immunologiques simples et sensibles telle l'immunofluorescence indirecte, rend possible la détermination

immédiate de la nature et de la composition de populations sauvages sans nécessiter leur maintien préalable en laboratoire. Cette approche préserve l'intérêt fondamental de l'analyse immunoélectrophorétique dans le contrôle préalable ou subséquent de la spécificité des organismes ainsi distingués.

L'étude par l'immunofluorescence indirecte nous a permis de confirmer les résultats obtenus par l'analyse immunoélectrophorétique du genre Naegleria et du genre Acanthamoeba.

Les résultats obtenus permettent de confirmer, une fois de plus, l'homogénéité observée chez N.fowleri, ainsi que la distinction respective des espèces appartenant aux genres Naegleria et Acanthamoeba à l'aide d'immunsérums employés au taux spécifiques.

L'individualité de Naegleria sp. A est également mise en évidence par un antisérum spécifique et confirmé en réaction hétérologue. Une absence totale de parentés sérologiques entre les différents genres est observée, ce qui plaide en faveur de cette analyse concernant l'identification rapide des organismes considérés.

Ceci confirme les travaux de Cervà (1973) qui a observé, grâce à l'immunofluorescence indirecte, des réactions croisées entre des souches pathogènes du genre Naegleria et établi l'absence de parentés sérologiques de celui-ci avec le genre Acanthamoeba. Van Dijck et al. (1974) identifient N.fowleri dans un nouveau cas de méningo-encéphalite amibienne primitive en Belgique et établissent une distinction sérologique avec N.gruberi. Néanmoins, ces mêmes auteurs (De Jonckheere et al., 1974) ne parviennent pas à distinguer des espèces intermédiaires entre N.fowleri et N.gruberi.

Nous avons pu identifier en immunofluorescence indirecte (Willaert et al., 1974) quelques espèces, appartenant au genre Naegleria et au genre Acanthamoeba, isolées au laboratoire au cours de nos recherches.

L'identification par l'immunofluorescence indirecte de Naegleria et d'Acanthamoeba peut être facilement effectuée sur des populations hétérogènes à partir de cultures sur agar-bactéries et ainsi fournir rapidement un diagnostic ou une identification.

De plus à l'aide d'antisérums au taux spécifiques, il est possible de rechercher les amibes dans des coupes histologiques de cas de méningo-encéphalite amibienne primitive et d'identifier ainsi dans des cas rétrospectifs l'agent étiologique comme Stamm (1974) l'a précisé.

Trois cas belges et un cas de Virginie ont été confirmés par l'immunofluorescence indirecte et trois cas rétrospectifs de Virginie ont été identifiés étant causés par N. fowleri.

Un cas récent survenu au Texas (Sotelo et al., 1974) a été mis en évidence par l'immunofluorescence indirecte et l'amibe responsable a été identifié comme appartenant au groupe d'A. castellanii.

L'immunofluorescence indirecte à l'aide d'immunsérums employés au taux spécifiques nous permet d'identifier rapidement les différentes espèces d'amibes libres. Mais des études complémentaires doivent être entreprises avant d'envisager l'application courante de cette méthode dans des laboratoires non spécialisés. Néanmoins, une telle méthode sera d'un secours vers la détermination des espèces, mais seul l'inoculation à l'animal permettra de démontrer la pathogénicité.

#### 8.4. Morphologie et biologie de N. jadini.

##### 8.4.1. Caractères morphologiques.

Microscopie photonique.

L'homogénéité morphologique du genre Naegleria rend délicate la distinction de ses espèces constitutives. Trois caractères accessibles à la microscopie photonique sont actuellement proposés comme responsables d'une différence spécifique, à savoir :

- a) la présence de corps interzonaux pendant la division nucléaire;
- b) la dimension des kystes,
- c) la présence de pores dans la paroi kystique.

Lors de la promitose, initialement décrite par Vahlkampf (1905), la formation de corps interzonaux "interzonal bodies" a été observée chez N. gruberi par Rafalko (1947) et chez N. aerobia (synonyme junior de N. fowleri)

par Singh et Das (1970). Ce dernier crée le genre Didascalus en le distinguant du genre Naegleria par l'absence de ces formations. Carter (1970) n'a pu retrouver ces corps interzonaux chez N. fowleri. Nous-même avons pu les mettre en évidence, de manière régulière chez N. jadini (Das et al., 1974). Néanmoins la révélation de ces structures paraît dépendre des procédés de fixation et de coloration. Pittam (1963), Page (1967) et Carter (1970) considèrent l'existence de ces corps interzonaux comme trop inconstante pour pouvoir servir de moyen d'identification. Il s'ensuit que la définition du genre Didascalus, sur la base de ce seul caractère serait insuffisante.

La dimension des kystes se montre très variable au sein d'une même espèce.

Chez N. gruberi, Schardinger (1899) observe des valeurs assez constantes, de 14 à 16 microns. Page (1967) étudie plusieurs souches dont les diamètres vont de 9,9 microns à 14,3 microns. Fulton (1970) relève des diamètres de 8 à 18 microns.

Chez N. fowleri, les diamètres des kystes sont en moyenne de 9 microns (Carter, 1970), de 10 microns (Duma et al., 1971) ou très variables (Singh et Das, 1970).

Nos observations, portant sur trois espèces, suggèrent d'attribuer cette variabilité à l'influence prépondérante des conditions de culture sur la taille des trophozoïtes et, par voie de conséquence, sur les dimensions des kystes qui en résultent. Pour être significatives, les études biométriques comparatives doivent être menées dans des conditions de culture rigoureusement identiques, ainsi que l'a précédemment souligné Saygi (1971).

Le dernier caractère morphologique proposé, et le plus significatif à notre avis, est l'observation constante d'un ou de plusieurs pores dans les kystes de N. gruberi (Schardinger, 1899; Page, 1967), pendant que chez N. fowleri et N. jadini ces structures ne sont mises en évidence en microscopie photonique. Chez ces espèces le dékystement semble se faire par développement d'une vacuole interne provoquant, après gonflement, la rupture de la paroi kystique. Chez N. fowleri néanmoins des structures ressemblant à des pores ont été parfois décrites (Culbertson, 1971; Saygi, 1971; Duma, 1971).

En conclusion, la présence de pores évidents dans la paroi kystique de N. gruberi, permet semble-t-il de distinguer cette espèce de N. jadini et de N. fowleri.

Il convient de souligner cependant qu'à eux seuls les caractères morphologiques, du moins ceux que l'on observe en microscopie photonique, ne sauraient permettre une spéciation certaine au sein du genre Naegleria.

Microscopie électronique.

Des différences ultrastructurales se retrouvent dans la forme et la structure des mitochondries. Chez N. gruberi, seulement des mitochondries ovalaires et cylindriques sont rencontrées tandis que chez N. jadini et N. fowleri on observe des mitochondries en forme d'haltère et en forme d'anneau. Carter (1970) et Lastovica (communication personnelle) observent également cette différence ultrastructurale entre N. gruberi et N. fowleri. Un appareil de Golgi n'a pas encore été clairement observé chez aucune des espèces de Naegleria (Vickerman, 1962; Schuster, 1963; Martinez, 1971 et Carosi, 1974).

Des structures ressemblantes à des virus ou "Virus-like particles" ont été observées chez N. gruberi (Schuster et Dunnebacke, 1969, 1974; Stevens, communication personnelle) et chez N. fowleri (Maitra et al., 1974; Lastovica, 1974 et Stevens, communication personnelle). Nous avons pu observer des structures semblables chez N. jadini. La présence de ces particules ne semble pas être en rapport avec la virulence exprimée par N. fowleri.

Au microscope électronique à balayage une différence évidente entre les kystes de N. gruberi d'une part et les kystes de N. fowleri et N. jadini d'autre part est observée. N. gruberi se distingue des autres espèces par sa paroi kystique rugueuse et la présence de nombreux pores en forme de cratères. Chez N. fowleri et N. jadini des pores ont été observés, mais ils sont moins nombreux et les bords sont lisses. La surface de leur kyste est lisse.

En conclusion, des différences ultrastructurales entre N. gruberi d'une part et N. jadini et N. fowleri, d'autre part concernent essentiellement la structure mitochondriale et la structure kystique. N. gruberi se différencie clairement de N. jadini et N. fowleri par ses caractères ultrastructuraux. Entre N. jadini et N. fowleri ces différences ultrastructurales sont peu marquées ou inexistantes.

### 8.3.2. Caractères biologiques de N. jadini.

Les caractères biologiques en revanche plaident en faveur de l'autonomie des trois espèces de Naegleria précitées. Plusieurs caractères biologiques, en effet, s'expriment de manière constante dans les conditions expérimentales réalisées. Ils concernent essentiellement la dépendance des organismes vis-à-vis des bactéries, leur thermosensibilité et leur pouvoir pathogène.

En l'absence de bactéries, N. gruberi ne peut être maintenu en culture alors que N. fowleri et N. jadini peuvent être cultivés axéniquement. Cette observation est uniquement valable en présence de sérum de veau normal dans le milieu C.G.V.S. En ajoutant le sérum de veau foetal, N. gruberi peut être adapté et cultivé axéniquement. Ce caractère de culture peut encore servir à différencier N. jadini et N. gruberi.

A 37°C en milieu axénique, seul N. fowleri se multiplie. Il faut cependant ajouter que sur agar-bactéries, N. gruberi peut se multiplier à 37°C (Griffin, 1972) alors que N. jadini ne se développe pas.

De plus, sur agar-bactéries, N. gruberi et N. jadini tolèrent une concentration de 0,5 NaCl alors que la multiplication de N. fowleri est inhibée dans ces conditions.

Quant au pouvoir pathogène élevé de N. fowleri, il s'exprime naturellement vis-à-vis de l'homme et expérimentalement vis-à-vis de la souris (tant par instillation intranasale que par inoculation intracérébrale). En culture, N. fowleri conserve ce caractère de manière apparemment indéfinie. N. gruberi ne s'est montrée pathogène à aucune occasion. N. jadini a présenté apparemment un faible pouvoir pathogène à l'isolement, vraisemblablement dû aux contaminants bactériens et fongiques. Ce pouvoir pathogène n'a pu être exalté sur animal et ne s'est pas conservé en culture.

En conclusion, N. fowleri se caractérise biologiquement par un pouvoir hautement pathogène et stable.

L'ensemble des caractères biologiques envisagés suggère l'existence de trois races physiologiques. Parmi celles-ci; N. jadini paraît représenter une transition entre N. gruberi, amibe exclusivement libre, et N. fowleri, parasite facultatif.

L'homogénéité morphologique du genre Naegleria nous a conduit à prendre en considération les caractères biologiques et antigéniques. La valeur taxonomique des caractères biologiques est bien établie à propos des Protozoaires parasites (Hoare, 1955, 1966). Les caractères antigéniques accessibles à l'analyse immunoélectrophorétique sont susceptibles d'apporter des arguments complémentaires ou nouveaux aux critères traditionnels de la taxonomie (Capron et Afchain, 1970). Ils se sont révélés particulièrement significatifs au cours des études consacrées aux Protozoaires (Brown et Walne, 1967), aux Protozoaires parasites (Le Ray et al., 1971; Le Ray, 1972; Dwyer, 1972; Afchain et al., 1973), aux Champignons (Biguet et al., 1965, aux Helminthes (Capron et al., 1968, 1972) et aux Vertébrés (Capron et Afchain, 1970).

L'ensemble de nos observations permet de confirmer et d'illustrer, à propos d'un groupe de Protozoaires libres, la valeur taxonomique et phylogénétique privilégiée des caractères immunoélectrophorétiques.

La souche ITMAP 400 appartient à la famille des Vahlkampfiidae (division nucléaire par promitose) et au genre Naegleria (stade biflagellé temporaire). Elle se distingue de N. gruberi par l'aspect et le nombre de pores dans son kyste et de N. fowleri par son incapacité à cultiver à 37°C et par l'absence de pouvoir pathogène spontané. Elle se distingue de N. gruberi comme de N. fowleri par les deux-tiers de ses composants antigéniques.

Nous considérons la souche ITMAP 400 comme une espèce nouvelle. Nous l'avons appelé Naegleria jadini, en hommage au Professeur J.B. Jadin. Conformément à la classification révisée du phylum des Protozoaires (1964), l'organisme est classé comme suit :

Phylum Protozoa Goldfuss, 1818; emend. Von Siebold, 1845.

Classe Rhizopodea Von Siebold, 1845.

Ordre Amoebida Kent, 1880.

Famille Vahlkampfiidae Jollos, 1917; Zulueta, 1917.

Genre Naegleria Alexeieff, 1912; emend. Calkins, 1913

Naegleria jadini sp. nov.

RESUME.

Un bref aperçu de l'histoire des amibes libres, faisant objet de la présente étude est exposé ainsi que les problèmes taxonomiques existantes au sein de l'ordre des Amoebida.

Les modalités du maintien in vitro des amibes des genres Naegleria et Acanthamoeba sont exposées en fonction de l'isolement, de l'adaptation et de l'entretien des souches ainsi que leur culture en masse. Les conditions optimales de la préparation des extraits antigéniques, de l'immunisation, des épreuves de précipitation en gel et de l'épreuve d'absorption croisée ont été recherchées.

L'analyse antigénique des Protozoaires libres, Naegleria et Acanthamoeba, met en évidence la valeur informatrice de la méthode immunoélectrophorétique. Elle semble être une méthode de choix pour le contrôle de la purification et la standardisation des extraits antigéniques.

La reproductibilité et la finesse de l'analyse immunoélectrophorétique permettent d'attribuer à cette méthode un rôle privilégié pour l'identification d'espèces appartenant à un genre bien défini, dont l'homogénéité des caractères morphologiques rend difficile leur identification. L'analyse immunoélectrophorétique permet ainsi de révéler l'existence de profonds remaniements moléculaires sous-jacents au conservatisme des structures morphologiques.

L'identité immunostructurelle de plusieurs souches humaines et libres de N. fowleri établit l'homogénéité antigénique de l'espèce et permet de considérer N. fowleri Carter, 1970 comme agent étiologique de la méningo-encéphalite amibienne primitive. N. aerobia Singh et Das, 1970 et N. invades Chang, 1972 sont désormais synonyme de N. fowleri.

N. fowleri mène une existence libre dans notre environnement et peut être considéré comme un parasite facultatif.

L'analyse immunoélectrophorétique permet d'établir indiscutablement l'indépendance génétique de N. fowleri, N. gruberi et N. jadini au sein du genre Naegleria. Naegleria jadini sp. nov. (Willaert et Le Ray, 1973) se

différencie de N. gruberi comme de N. fowleri par ses caractères immunostructuraux et par ses caractères morphologiques et biologiques. N. jadini se distingue de N. gruberi par l'aspect de son kyste et de N. fowleri par son incapacité à cultiver à 37°C et par l'absence de pouvoir pathogène spontané. Elle se distingue de N. gruberi comme de N. fowleri par les deux-tiers de ses composants antigéniques.

Le genre renferme d'autres espèces distinctes : l'analyse immunoélectrophorétique met en évidence chez les souches " A " et " PPMFB " une différence antigénique concernant le tiers des composants de N. fowleri et la moitié environ des composants de N. gruberi et de N. jadini.

Les parentés importantes observées au sein du genre Naegleria sont de l'ordre de 10 à 19 composants antigéniques et d'autre part la spécificité marquée s'exprime au niveau de la moitié environ des antigènes. Ces différences accusées entre espèces voisines de Protozoaires libres témoignent d'un potentiel évolutif marqué de la part du genre.

Au sein du genre Acanthamoeba, nous avons pu démontrer l'identité de quatre souches d'A. castellanii ce qui nous permet d'envisager l'indépendance antigénique de cet espèce et d'éliminer la confusion de synonymie due au double emploi de noms spécifiques.

Les parentés antigéniques entre A. castellanii et A. polyphaga et A. rhyodes montrent une grande ressemblance de leurs structures antigéniques supportée par leur identité morphologique. Ces trois espèces constituent un groupe au sein du genre Acanthamoeba.

Les espèces A. culbertsoni, A. palestinensis et A. astronyxis se diversifient très nettement d'A. castellanii et leurs parentés antigéniques sont de l'ordre de la moitié environ du profil immunoélectrophorétique d'A. castellanii, sauf A. palestinensis qui en partage les deux-tiers.

A. culbertsoni, espèce potentiellement pathogène se diversifie, par sa spécificité antigénique marquée au niveau de la moitié environ de ses antigènes, des autres espèces étudiées.

L'étude immunoélectrophorétique des parentés antigéniques des genres Naegleria et Acanthamoeba met en évidence des caractères significatifs au point de vue taxonomique et phylogénique. Ces résultats permettent de dégager la valeur et de préciser les limites de la méthode d'analyse immunoélectrophorétique au sujet des amibes libres. Le degré d'isologie antigénique exprimé par le genre Naegleria au niveau de la famille est en accord avec la diversification antigénique observée au niveau du genre. Les parentés observées avec d'autres familles de l'ordre des Amoebida sont peu significatives et rendent difficile l'accès à la phylogénie de N. fowleri.

Au niveau du genre Acanthamoeba, son appartenance à la famille des Hartmannellidae est mise en question.

L'investigation immunoélectrophorétique au niveau de la famille des Hartmannellidae plaide pour la séparation des genres Hartmannella et Acanthamoeba

En dehors de l'ordre des Amoebida, les parentés antigéniques de Naegleria et d'Acanthamoeba avec les flagellés parasites, les Phytotflagellés et les Ciliates sont inexistantes ou négligeables.

Cette indépendance antigénique au niveau de l'ordre contraste avec les relations entre flagellés au niveau de la Classe et les relations entre les amoébo-flagellates et les amibes. Nous conseillons de ne pas considérer les Rhizomastigida comme des flagellés.

Le principe de l'immunogénicité privilégiée des constituants les plus spécifiques de l'organisme ouvre des perspectives neuves et passionnantes aux investigations taxonomiques, diagnostiques, écologiques et épidémiologiques, en particulier lorsque celles-ci ont à considérer un complexe de Protozoaires morphologiquement peu différenciés. L'obtention d'immunsérums d'une haute spécificité permet à l'aide de l'immunofluorescence indirecte une détermination rapide de la nature et de la composition d'une population sauvage.

L'immunofluorescence indirecte à l'aide d'immunsérums spécifiques, ou employés au taux spécifiques, permet d'identifier rapidement les espèces appartenant aux genres Naegleria et Acanthamoeba. Cette étude nous a permis de confirmer les résultats obtenus par l'analyse immunoélectrophorétique au sein des genres Naegleria et Acanthamoeba.

L'immunofluorescence indirecte, à l'aide d'antisérums spécifiques, permet également d'identifier et de confirmer la présence de N. fowleri dans le cerveau de cas de méningo-encéphalite amibienne primitive. Plusieurs cas rétrospectifs de Virginie ont été identifiés étant causés par N. fowleri et un cas survenu au Texas a été mis en évidence à l'aide de l'immunofluorescence indirecte et l'amibe responsable a été identifié comme appartenant au groupe d'A. castellanii.

Nous considérons l'immunofluorescence indirecte, à l'aide d'antisérums spécifiques, comme un moyen rapide et valable pour l'identification d'amibes dans du matériel suspect.

Les caractères morphologiques et biologiques mettent en évidence que N. jadini sp. nov. se distingue de N. gruberi par l'aspect et le nombre de pores dans son kyste et de N. fowleri par l'absence de pouvoir pathogène spontané et son incapacité à cultiver à 37°C.

L'ensemble de nos observations permet de confirmer et d'illustrer, à propos d'un groupe de Protozoaires libres, la valeur taxonomique privilégiée des caractères immunoelectrophorétiques et sérologiques.

Eddy WILLAERT  
Département de Protozoologie  
Institut de Médecine Tropicale  
Prince Léopold.  
Antwerpen.

BIBLIOGRAPHIE.

- ABELEV G.I. (1960) : Modification of the agar precipitation method for comparing two Antigen-Antiserum systems. *Folia Biol.* 6 : 56-58
- ADAM K. (1959) : The growth of Acanthamoeba sp. in a chemically defined medium. *J. Gen. Microbiol.* 21 : 519-529
- ADAM K. (1964) : A comparative study of Hartmannellid amoebae. *J. Protozool.* 11 : 433
- ADAM K. (1969) : Classification of amoebae. DNA and other criteria. *Progress in Protozoology, 3rd Int. Congr. Protozool. (Leningrad).*
- ADAM K. (1973) : Genetic variation in Acanthamoeba. *Progress in Protozool. Abstr. IVth. Int. Congr. Protozool. (Clermont-Ferrand)* : 4
- ADAM K. et BLEWETT D.A. (1974) : Studies on the DNA of Acanthamoeba. *Ann. Soc. belge Méd. trop.* 54 : 387-393
- AFCHAIN D. (1970) : Analyse immunoélectrophorétique des antigènes solubles de Trypanosoma cruzi. Applications à la trypanosomiase américaine humaine et expérimentale de la souris. Thèse cycle, Faculté des Sciences, Lille 56 pp.
- AFCHAIN D. et CAPRON A. (1969) : Etude préliminaire des antigènes solubles de Trypanosoma cruzi. Applications à la trypanosomiase expérimentale de la souris. *C.R. Acad. Sci. Paris D* 269 : 272-274
- AFCHAIN D. et CAPRON A. (1971) : Analyse immunoélectrophorétique des antigènes solubles de Trypanosoma cruzi. Applications à la trypanosomiase expérimentale de la souris. *Gaz. méd. Bahia* 71 : 7-95
- AFCHAIN D., LE RAY D., FRUIT J. et CAPRON A. (1974) : Comparative antigenic analysis of trypanosomes *Stercoraria*. Practical consequences. *Proc. 3rd Int. Congr. Parasit. (München)* : 216-217
- AFCHAIN D., LE RAY D., JADIN J. et CAPRON A. (1973) : Analyse antigénique comparée, par immunoélectrophorèse, des formes de culture de Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi, Trypanosoma (Trypanozoon) brucei et Leishmania donovani. Conséquences taxonomiques et diagnostiques. *Protistologica* 9 : 213-220

- ALEXEIEFF A. (1912) : Sur les caractères cytologiques et la systématique amibes du groupe limax (Naegleria nov. gen. et Hartmannia nov. gen.) et des amibes parasites des vertébrates (Protamoeba, nov. gen.). Bull. Soc. Zool.(France) 37 : 55-74
- ALI KHAN Z. et MEEROVITCH E. (1968) : A comparative study of the antigens of some of the Histolytica-type strains of Entamoeba. A qualitative and quantitative evaluation of antigens by indirect hemagglutination, gel-precipitation and immunoelectrophoresis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 17 : 528-539
- ALI KHAN Z. et MEEROVITCH E. (1970) : Studies on the purification of E. histolytica antigens by gel-filtration. I. Some physicochemical properties of the isolated fractions. Can. J. Microbiol. 16 : 485-492
- AMBROISE-THOMAS P. (1969) : Etude séro-immunologique de dix parasitoses par les techniques d'immunofluorescence. Thèse 1969.
- ANDERSON K. et JAMIESON A. (1972) : Agglutination test for the investigation of the genus Naegleria. Pathology 4 : 273-278
- ANDERSON K. et JAMIESON A. (1972) : Primary amoebic meningoencephalitis. The Lancet i : 902-903
- ANDERSON K. et JAMIESON A. (1972) : Primary amoebic meningoencephalitis. The Lancet ii : 379
- ANDERSON K., JAMIESON A., JADIN J.B. et WILLAERT E. (1973) : Primary amoebic meningoencephalitis. The Lancet i : 672
- ARMSTRONG J. et PEREIRA M. (1967) : Identification of "Ryan virus" as an amoeba of the genus Hartmannella. Brit. Med. J. 1 : 212-214
- AWERINZEW S. (1910) : Ueber die Stellung im System und die Klassifizierung der Protozoen. Biol. Centralbl. 30 : 465-475
- BACKHAUSZ (1967) : Immunodiffusion und Immunelektrophorese. Grundlagen, Methoden und Ergebnisse. Iena, Fischer Verlag, Chap. 9, pp 312-331
- BALAMUTH W. et KAWAKAMI T. (1967) : Antigenic relationships among selected hartmannellid amoebae and amoebae-flagellates. J. Protozool. 14 (suppl.) : 31
- BALDO B.A. et FLETCHER T.C. (1973) : C-reactive protein-like precipitins in plaice. Nature 246 : 145-146

- BAND R.N. (1961) : Biotin a growth requirement for four soil amoebae. *Nature* 192 : 674
- BAUD Ch.A. et MORARD J.C. (1953) : Introduction des caractères morphologiques submicroscopiques en taxonomie. Application à la classification systématique des amibes. Proc. 14th Int. Congr. Zoology (Copenhagen) : 182-183
- BICE D.E. et ZELEDON R. (1971) : Immunoelectrophoretic comparison of Trypanosoma vespertilionis and Trypanosoma cruzi. *Rev. Biol. trop.* 19 : 149-152
- BIGALKE R.D. (1966) : Observations on the antigens of some trypanosomes with special reference to common antigens. *Onderstepoort J. vet. Res.* 33 : 277-286
- BIGUET J., CAPRON A. et TRAN VAN KY P. (1962) : Les antigènes de Fasciola hepatica. Etude électrophorétique et immunoélectrophorétique. Identification des fractions et comparaison avec les antigènes correspondant à sept autres Helminthes. *Ann. Parasit. (Paris)* 37 : 221-231
- BIGUET J., CAPRON A., TRAN VAN KY P. et ROSE F. (1965) : Présence de substances de type C dans les antigènes vermineux et de protéine anti-C au cours des helminthiases humaines ou expérimentales. I. Etude immunologique préliminaire et répercussions pratiques. *Rev. Immunol. (Paris)* 29 : 233-240
- BIGUET J., ROSE F., CAPRON A. et TRAN VAN KY P. (1965) : Contribution de l'analyse immunoélectrophorétique à la connaissance des antigènes vermineux. Incidences pratiques sur leur standardisation, leur purification et le diagnostic des helminthiases par immunoélectrophorèse. *Rev. Immunol. (Paris)* 29 : 5-30
- BIGUET J., TRAN VAN KY P., ANDRIEU S. et DEGAEY R. (1965) : Etude immunoélectrophorétique de la nature et de l'ordre d'apparition des anticorps précipitants du sérum de lapin en jonction de leur mode d'immunisation contre Candida albicans. *Sabouraudia* 4 : 148-157
- BIGUET J., TRAN VAN KY P., ANDRIEU S. et FRUIT J. (1965) : Analyse immunoélectrophorétique des antigènes fongiques et systématique des champignons. Répercussions pratiques sur le diagnostic des mycoses. *Mycopath. Mycol. appl.* 26 : 241-256
- BOVEE E. (1953) : Morphological identification of free living Amoebida. *Proc. Iowa Acad. Sci.* 60 : 599-615

- BOVEE E. (1970) : The Lobose Amebas. I. A key to the suborder conopodina Bovee and Jahn, 1966 and descriptions of thirteen new or little known Mayorella. Arch. Protistenk. 112 : 178-227
- BOVEE E. et JAHN T.L. (1966) : Mechanism of movement in Taxonomy of Sarcodina. III. Orders, Suborders, Families and Subfamilies in the Superorder Lobida. Syst. Zool. 15 : 229-240
- BOYDEN A. (1964) : Perspectives in systematic serology. in Taxonomic biochemistry and serology. C.A. Leone, ed. New York, Ronald Press pp 79-99
- BROWN K.N. et WILLIAMSON J. (1964) : The chemical composition of trypanosomes. IV. Localisation of antigens in subcellular fractions of Trypanosoma rhodesiense. Exp. Parasit. 15 : 69-86
- BRAY R.S. et LAINSON R. (1966) : The immunology and serology of leishmaniosis. IV. Results of Ouchterlony double diffusion tests. Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg. 60 : 605-609
- BROWN R.M. et WALNE P.L. (1967) : Comparative immunology of selected wild types, varieties and mutants of Chlamydomonas. J. Protozool. 14 : 365-373
- BUTT C.C. (1966) : Primary amebic meningoencephalitis. New Engl. J. Med. 274 : 1473
- CALLICOT J.H., JONES M.M., NELSON E.C., SANTOS J.C. dos, UTZ J.P., DUMA R.J. et MORRIS J.V. (1968) : Meningo-encephalitis due to pathogenic free-living amoeba. J. Am. Med. Ass. 206 : 579
- CALKINS G.N. (1913) : Genera and species of amoeba. Trans. 15th Int. Congr. Hyg. Demog. 2 : 287-305
- CAPRON A. (1970) : L'antigène parasitaire. Structure et fonction. J. Parasitol. 56 : Second Int. Congr. Parasit. Section II part 3 pp 515-521
- CAPRON A. et AFCHAIN D. (1970) : Structure antigénique et taxonomie des Vertébrés inférieur. Bull. Museum nat. Hist. nat. 2e série 42 : 122-125
- CAPRON A., BIGUET J., VERNES A. et AFCHAIN D. (1968) : Structure antigénique des Helminthes. Aspects immunologiques des relations hôte-parasite. Path. Biol. 16 : 121-138
- CAPRON A., BIGUET J., VERNES A. et AFCHAIN D. (1969) : Structure antigénique des helminthes. Aspects immunologiques des relations Hôte-Parasite. Path. Biol. 16 : 121-138

- CAPRON A., BONNANGE M. et MAUROIS P. (1969) : Immunological aspects of host-parasite relationships in human and experimental filariasis. Conference on Parasitic Diseases, Mitt Washington D.C., August 4-6 1969, mimeographie, 4pp
- CAPRON A., BRYGCOO E.R. et AFCHAIN D. (1972) : Apport de l'étude de la structure antigénique à la phylogénie des Helminthes. Bull. M-seum nat. Hist. nat. 3e série 69 : 877-885
- CAPRON A., GENTILINI M. et VERNES A. (1968) : Le diagnostic immunologique des filarioses. Possibilités nouvelles offertes par l'immuno-électrophorèse. Path. Biol. 16 : 1039-1045
- CAPRON A., LE RAY D., AFCHAIN D., VAN MEIRVENNE N. et JADIN J.B. (1973) : Analyse antigénique des trypanosomes Salivaria et Stercoraria. Progress in Protozoology (Clermont-Ferrand, p 79
- CAPRON A., YOKOGAWA M., BIGUET J., TSUJI M. et LUPPAN G. (1965) : Diagnostic immunologique de la paragonisme humaine. Mise en évidence d'anticorps sériques spécifiques par immunoélectrophorèse. Bull. Soc. Path. exot. 58 : 474-487
- CAPRON A., VERNES A., NJEL G. et BOUVRY M. (1972) : Le diagnostic immunologique de l'amibiase. Med. Chir. Digest. 1 : 5-13
- CAROSI G. (1974) : Etude comparative de l'ultrastructure d'Entamoeba moshkovskii, des amibes parasites du genre Entamoeba et des amibes "Free-living" du groupe Hartmannella-Naegleria. Ann. Soc. belge Méd. trop. 54 : 265-277
- CARTER R.F. (1968) : Primary amoebic meningoencephalitis : clinical, pathological and epidemiological features of six fatal cases. J. Path. Bact. 96 : 1-25
- CARTER R.F. (1969) : Sensitivity to amphotericin B of a Naegleria sp. isolated from a case of primary amoebic meningoencephalitis. J. Clin. Path. 22 : 470
- CARTER R.F. (1970) : Description of a Naegleria species isolated from two cases of primary amoebic meningoencephalitis and of the experimental pathological changes induced by it. J. Path. 100 : 217-244
- CARTER R.F. (1972) : Primary amoebic meningoencephalitis. An appraisal of present knowledge. Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg. 66 : 193-213

- CASAGRANDE O. et BARBAGALLO P. (1895) : Entamoeba hominis s. Amoeba coli.  
(Lösch). Studio biologico e clinico. Annali d'Igiene VII : 103
- CASTELLANI A. (1930) : An amoeba found in cultures of a yeast. Preliminary  
note. J. Trop. Med. Hyg. 33 : 160
- CERVA L. (1966) : Use of fluorescent antibody technique to identify pathogenic  
Hartmannellae in tissues of experimental animals. Folia Parasitol.  
(Praha) 13 : 326-331
- CERVA L. (1967) : Immunological studies on Hartmannellid amoebae. Folia Parasit.  
(Praha) 14 : 19-25
- CERVA L. (1969) : Amoebic meningoencephalitis : axenic cultures of Naegleria.  
Science 163 : 576
- CERVA L. (1973) : Problems of the identity of pathogenic and free-living Naegleria.  
Progress in Protozoology. IVth Int. Congr. Protozool. (Clermont-  
Ferrand), 2-9 sept. : 83
- CERVA L., FERDINANDOVA M., NOVAK K., PTACKOVA V., SCHROTTENBAUM M. et ZIMAK V.  
(1969) : Meningoencephalitis durch amoebida Naegleriidae. Einer  
weiteren Fall in der Tschechoslowakei. Isolierung des Erregers. Munch.  
Med. Wschr. 111 : 2090-2094
- CERVA L. and KRAMAR J. (1973) : Antigenic relationships among several limax  
amoebae isolates assessed with the indirect fluorescent antibody test  
(IFAT). Folia Parasit. (Praha) 20 : 113-118
- CHAMBERS J.A. et THOMPSON J.E. (1972) : A scanning electron microscopic study  
of the excystment of A. castellanii. Exptl. Cell. Res. 73 : 415-421
- CHANG S.L. (1960) : Growth of small free-living amoebae in various bacterial and  
in bacteria-free cultures. Can. J. Microbiol. 6 : 397-405
- CHANG S.L. (1971) : Small, free-living amebas : cultivation, quantitation,  
identification, classification, pathogenesis and resistance. Curr. Top.  
comp. Pathobiol. 1 : 201-254
- CHANG S.L. (1972) : Pathogenic free-living amoebae and recreational waters.  
Proc. Water Pollution Research (Israël) 13 : 1-12

- CHANG S.L. (1974) : Cytopathic and pathogenic differences among geographic strain of pathogenic Naegleria and their bearing on epidemiology of Primary amoebic meningoencephalitis (PAME). Proc. 3th. Int. Congr. Parasit. Section A 12, 1 : 187-188
- CHANG R., PAN I. et ROSENAU B. (1966) : On the nature of lipovirus. J. Exp. Med. 124 : 1153-1166
- CHATTON E. (1910) : Essais sur la structure du noyau et la mitose chez les Amœbiens. Faits et theories. Arch. Zool. Exp. 45 : 267
- CHATTON E. (1912) : Sur quelques genres d'Amibes libres et parasites. Synonymies, homonymie, impropriété. Bull. Soc. Zool. (France) 37 : 109-117
- CHATTON E. (1953) : Ordre des Amœbiens nus ou Amœbaca. in Traité de Zoologie, P.P. Grassé, Paris, Masson . Tome I, deuxième fasc., pp 5-91
- CHATTON E. et LALUNG-BONNAIRE (1912) : Amoeba limax (Vahlkampfia n. gen.) dans l'intestin humain. Bull. Soc. Path. Exot.(Paris) 5 : 135-143
- CHI L., VOGEL J. et SHELOKOV A. (1959) : Selective phagocytosis of nucleated erythrocytes by cytotoxic amoeba in cell culture. Science 130 : 1763
- COONS A.H. (1951) : Fluorescent antibodies as histochemical tools. Federation Proceedings 10, 2 : 558-559
- CORLISS J.O. (1962) : Taxonomic procedures in classification of protozoa. Symp. Soc. gen. Microbiol. 12; 37-67
- CRICK F.H.C. (1958) : On protein synthesis. Symp. Soc. Exp. Biol. 12 : 138-163
- CULBERTSON C.G. (1971) : The pathogenicity of soil amebas. Ann. Rev. Microbiol. 25 : 231-254
- CULBERTSON C.G., ENSMINGER P.W., OVERTON W.M. (1965) : The isolation of additional strains of pathogenic Hartmannella sp. (Acanthamoeba). Proposed culture method for application to biological material. Am. J. Clin. Path. 43 : 383-387
- CULBERTSON C.G., SMITH J., COHEN H. et MINNER J. (1959) : Experimental infection of mice and monkeys by Acanthamoeba. Amer. J. Path. 35 : 185-187
- CULBERTSON C.G., SMITH J. et MINNER J. (1958) : Acanthamoeba : observations on animal pathogenicity. Science 127 : 1506

- DANGEARD P. (1900) : Etude de la karyokinèse chez Amoeba hyalina sp. nov.  
Le Botaniste 7 : 49-83
- DARMAN M. (1941) : Multiplication du Trypanosoma cruzi dans le sang périphérique de la souris par passages successifs. Recherches de la prémunition vis-à-vis des souches homologues et hétérologues. Ann. Parasit. (Paris) 18 : 166-179
- DAS S.R. (1972) : A simple and reliable method for obtaining clones of Entamoeba histolytica and other amoebae from cultures. Current Science 41 : 736
- DAS S.R., WILLAERT E. et JADIN J.B. (1974) : Studies on mitotic division in Naegleria jadini. Ann. Soc. belge Méd. trop. 54 : 141-146
- DE JONCKHEERE J., VAN DIJCK P. et VAN DE VOORDE H. (1974) : Evaluation of the indirect fluorescent antibody technique for identification of Naegleria species. Appl. Microbiol. 28 : 159-164
- DIAMOND L.S. (1968) : Techniques of axenic cultivation of E. histolytica Schaudinn, 1903 et E. histolytica-like amebae. J. Parasitol. 54 : 1047-1056
- DINGLE A. et FULTON C. (1966) : Development of the flagellar apparatus of Naegleria. J. Cell. Biol. 31 : 43-54
- DOBELL C. (1914) : Cytological studies on three species of amoeba. A. lacertae Hartmann, A. glebae n. sp., A. fluvialis n. sp. Arch. Protistenk. 34 : 138-189
- DODIN A. et FROMENTIN H. (1962) : Premier essai de culture de trypanosomes en milieu synthétique. Bull. Soc. Path. exot. 55 : 797-804
- DOS SANTOS J.G.N. (1970) : Fatal primary amebic meningoencephalitis. A retrospective study in Richmond, Virginia. Am. J. Clin. Path. 54 : 737-742
- DOUGLAS M. (1930) : Notes on the classification of the amoeba found by Castellani in cultures of a yeast-like fungus. J. trop. Med. Hyg. 33 : 258-259
- DUMA R.J., ROSENBLUM W.J., McGEHEE X.F., JONES M. et NELSON E.C. (1971) : Primary amoebic meningoencephalitis caused by Naegleria. Two new cases, response to amphotericin B, and a review. Ann. Intern. Med. 74 : 923-931

- DUJARDIN F. (1841) : Histoire Naturelle des Zoophytes Infusoires. Libraire Encyclopédique de Roret, Paris.
- DWYER D.H. (1971) : Immunologic analysis by gel diffusion of effects of prolonged cultivation on Histomonas meleagridis (Smith). J. Protozool. 18 : 372-377
- DWYER D.H. (1972) : Analysis of the antigenic relationships among Trichomonas, Histomonas, Dientamoeba and Entamoeba. II. Gel diffusion methods. J. Protozool. 19 : 326-332
- DWYER D.H. (1974) : Analysis of the antigenic relationships among Trichomonas, Histomonas, Dientamoeba et Entamoeba. III. Immunelectrophoresis technics. J. Protozool. 21 : 139-145
- DWYER D.H. et HONIGBERG B.M. (1972) : Immunologic analysis by quantitative fluorescent antibody methods of effects of prolonged cultivation on Histomonas meleagridis (Smith). Z. Parasitenk. 39 : 39-52
- EDEBO L. (1960) : A new press for the disruption of micro-organisms and other cells. J. Biochem. microbiol. Technol. Engng. 2 : 453-479
- ENOS W.F. et ELTON N.W. (1950) : Fatal acute Chagas'disease in a North American in the Canal Zone. Am. J. trop. Med. 30 : 829-833
- FORD E. (1914) : On the nuclear division of a free-living limax amoeba (Amoeba tachypodia Gläser). Arch. f. Protistenk. 34 : 190-197
- FOWLER M. et CARTER R.F. (1965) : Acute pyogenic meningitis probably due to Acanthamoeba sp. Brit. Med. J. 2 : 740-742
- FRENZEL J. (1892) : Untersuchungen über die mikroskopische Fauna Argentiniens I & II Abt. Die Rhizopoden und Helioamoben. Bibliotheca Zool. 12 : 1-114
- FROMENTIN H. (1971) : Contribution à l'étude comparée des besoins nutritifs chez diverses espèces du genre Trypanosoma. Possibilités et limites de la culture à 27°C en milieu semi-synthétique liquide. Ann. Parasit. (Paris) 46 : 337-445
- FULTON C. (1970) : Amebo-flagellates as research partners : the laboratory biology of Naegleria and Tetramitus. Meth. Cell. Physiol. 4 : 341-376

- GOLDMAN M. (1960) : Antigenic analysis of Entamoeba histolytica by means of fluorescent antibody. I. Instrumentation for microfluorimetry of stained amoebae. Exptl. Parasit. 9 : 25-36
- GOLDMAN M. et HONIGBERG B.M. (1968) : Immunologic analysis by gel diffusion technics of the effects of prolonged cultivation on Trichomonas gallinae. J. Protozool. 15 : 350-352
- GONZALEZ CAPPA S.H. et KAGAN I.G. (1969) : Agar gel immunoelectrophoretic analysis of several strains of Trypanosoma cruzi. Exp. Parasit. 25 : 50-57
- GORDEEVA L.M. (1973) : Isolation and cultivation of limax amoebae capable to grow at 37°C. Progress in Protozoology. IVth Int. Congr. Protozool. (Clermont-Ferrand) 2-9 sept. 1973 : 159
- GRIFFIN J.L. (1972) : Temperature tolerance of pathogenic and non pathogenic free-living amoebas. Science 178 : 869-870
- GRABAR P. et WILLIAMS C.A. (1953) : Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines. Application au sérum sanguin. Biochem. Biophys. Acta 10 : 193-194
- GRASS F.G. (1972) : An immobilisation antigen in Tetrahymena pyriformis expressed under conditions of high salt stress. J. Protozool. 19 : 505-511
- HARTMANN M. (1910) : Untersuchungen über parasitische Amöben. Arch. f. Protistenk. 18 : 207-220
- HAWKES J.G. (1968) : Chemotaxonomy and serotaxonomy. New York Acad. Press XVI, 299 pp
- HERMANNE J., JADIN J.B., MARTIN J.J. et WILLAERT E. (1974) : La méningo-encéphalite ambiénne primitive. Considérations à propos des cas belges. Rev. Prat. (Paris) 24 : 1241-1253
- HOARE C.A. (1955) : Intraspecific biological groups in pathogenic protozoa. Refuah Vet. 12 : 263-268
- HOARE C.A. (1966) : The classification of mammalian trypanosomes. Ergebn. Mikrobiol. 39 : 43-57

- HOGUE M. (1915) : Studies in the life history of an amoeba of the limax group, Vahlkampfia calkinsi. Arch. Protistenk. 35 : 154-163
- HOLLANDE A. (1942) : Etude cytologique et biologique de quelques flagellés libres. Arch. Zool. exp. Gen. 83 : 1-268
- HOUBA V. et ALLISON A.C. (1966) : M-antiglobulins (rheumatoid-factor like globulins) and other gamma-globulins in relation to tropical parasitic infections. Lancet 1 : 848-852
- HOUBA V., BROWN K.W. et ALLISON A.C. (1969) : Heterophile antibodies, M-antiglobulins and immunoglobulins in experimental trypanosomiasis. Clin. exp. Immunol. 4 : 113-123
- JADIN J.B. (1973) : De la méningo-encéphalite amibienne et du pouvoir pathogène des amibes "Limax". Ann. Biol. 12 : 305-342
- JADIN J.B. (1973) : Hypothèses au sujet de l'adaptation des amibes du groupe Limax à l'homme et aux animaux. Ann. Parasit. (Paris) 48 : 199-204
- JADIN J.B., HERMANNE J., ROBIJN G. et WILLAERT E. (1971) : Trois cas de méningo-encéphalite amibienne primitive en Europe occidentale, à Anvers. Bull. Acad. Nat. Méd. 155 : 232-238
- JADIN J.B., HERMANNE J., ROBIJN G., WILLAERT E., VAN MAERCKE Y. et STEVENS W. (1971) : Trois cas de méningo-encéphalite amibienne primitive observés à Anvers (Belgique). Ann. Soc. belge Méd. trop. 51 : 255-266
- JADIN J.B. et LE RAY D. (1969) : Acquisitions récentes dans les techniques de culture des Trypanosomes africains. Ann. Soc. belge Méd. trop. 49 : 331-340
- JADIN J.B. et PIERREUX G. (1960) : Un milieu de culture pour Trypanosomides. Ann. Soc. belge Méd. trop. 40 : 903-906
- JADIN J.B. et WERY M. (1963) : La culture des Trypanosomidae. Ann. Soc. belge Méd. trop. 43 : 831-842
- JADIN J.B. et WILLAERT E. (1972) : Au sujet de la dispersion des amibes du groupe "Limax". Protistologica 8 : 505-508
- JADIN J.B., WILLAERT E. et HERMANNE J. (1973) : Présence d'amibes limax dans l'intestin de l'homme et des animaux. ARSOM Bull. Séances 3 : 520-526

- JADIN J.M. (1971) : Cytologie et cytophysiologie des Trypanosomidae. Acta Zool. path. antverpiensia 53 : 1-168
- JADIN J.M., ESCHBACH H.L., VEFHEYEN F. et WILLAERT E. (1974) : Etudes comparatives des kystes de Naegleria et d'Acanthamoeba. Ann. Soc. belge Méd. trop. 54 : 259-264
- JAGER B.V. et STAMM W.P. (1972) : Brain abscess caused by free-living amoeba probably of the genus Hartmannella in a patient with Hodgkins' disease. Lancet : 1343-1345
- JAHNES W., FULLMER H. et LI C. (1957) : Free-living amoebae as contaminants in monkey kidney tissue culture. Proc. Soc. Expt. biol. Med. 96 : 484-488
- JAMIESON A. (1973) : The epidemiology of primary amoebic meningo-encephalitis in South Australia. Progress in Protozoology. IVth Int. Congr. Protozool. (Clermont-Ferrand) 2-9 sept. 1973 : 198
- JAMIESON A. et ANDERSON K. (1973) : A method for the isolation of Naegleria species from water samples. Pathology 5 : 55-58
- JIROVEC O. (1967) : Parasitisme artificiel des Protozoaires libres. Ann. Parasit. Hum. Comp. 42 : 133-140
- JOLLOS V. (1917) : Untersuchungen zur Morphologie der Amoebenteilung. Arch. Protistenk. 37 : 229-275
- KENNEY M. (1971) : The micro-Kolmer complement fixation test in routine screening for soil ameba infection. Health Lab. Sci. 8 : 5
- KENT W.S. (1880) : A manual of the Infusoria. David Bogue, London 1
- KUDO R.R. (1966) : Protozoology. Pringfield, Thomas, fifth ed. pp 518-564
- LASMAN M. (1963) : Problems in glucose metabolism of Mayorella palestinensis Reich. J. Protozool. 10 suppl. : 35
- LASMAN M. (1973) : Glucosidase activity in Mayorella palestinensis : effect of glucose and other sugars. J. Protozool. 20 suppl. : 532
- LASMAN M. et REICH K. (1965) : Intermediate metabolism of carbohydrates in Mayorella palestinensis. J. Protozool. 12 : 93-96
- LASTOVICA A.J. (1974) : Scanning electron microscopy of pathogenic and non-pathogenic Naegleria cysts. Int. J. Parasit. 4 : 139-142

- LAVERAN A. et MESNIL F. (1912) : Trypanosomes et trypanosomiasés. Paris, Masson, Viii + 1000
- LEIDY J. (1879) : Freshwater Rhizopods of North America. Repts. U.S. Geol. survey of the Territories 12 : 1-324
- LEPINE P., CADILLON J. et CHAUMONT L. (1964) : Manuel des inoculations et prélèvements chez les animaux de laboratoire. Masson (Paris) pp 119
- LE RAY D. (1969) : Analyse immunoélectrophorétique des formes de culture de Trypanosoma brucei. C.R. Soc. Biol. 163 : 2783-2787
- LE RAY D. (1972) : Parentées immunostructurelles de Trypanosoma (Trypanozoon) brucei et de Trypanosoma (Nannomonas) congolense. J. Protozool. 19 suppl. : 72
- LE RAY D. (1974) : Structures antigéniques de Trypanosoma brucei brucei (Protozoa, Kinetoplastida). Analyse immunoélectrophorétique et étude comparative. Dissertation Docteur en Sciences.
- LE RAY D., AFCHAIN D., JADIN J.B., CAPRON A. et FAMEREE L. (1971) : Interrelations immuno-taxonomiques de T. brucei, T. rhodesiense et T. gambiense. Ann. Parasit. (Paris) 46 : 523-532
- LE RAY D., AFCHAIN D., JADIN J.B., CAPRON A., YASAROL S., LANOTTE G. et FAMEREE L. Diagnostic immunoélectrophorétique de la leishmaniose viscérale à l'aide d'un extrait antigénique hydrosoluble de Leishmania donovani. Résultats préliminaires. Ann. Soc. belge Méd. trop. 53 : 31-41
- LE RAY D., JADIN J.B., FAMEREE L., WILLAERT E. et BECKERS A. (1970) : Quelques observations sur l'isolement et l'adaptation in vitro des trypanosomes africains pathogènes. Bull. Soc. Path. exot. 63 : 675-684
- LE RAY D., VAN MEIRVENNE N. et JADIN J.B. (1973) : Immuno-electrophoretic characterization of common and variable antigens of Trypanosoma brucei. Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg. 67 : 273-274
- LESAGE A. (1905) : Culture de l'amibe de la dysenterie des pays chauds. Ann. Inst. Pasteur 19 : 9-16
- LITTLE J. (1968) : Effect of ionizing radiation on cell division in an ameboid cell. Radiat. Res. 35 : 132-146

- LOVELOCK J.E. et BISHOP M.W.H. (1959) : Prevention of freezing damage to living cells by dimethylsulphoxide. *Nature* 183 : 1394-1395
- LUFT J.H. (1961) : Improvement in epoxy resin embedding methods. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9 : 409-414
- LUNDE M.N. et DIAMOND L.S. (1969) : Studies on antigens from axenically cultivated Entamoeba histolytica and Entamoeba histolytica-like amoebae. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 18 : 1-6
- MAITRA S.C., KRISNA PRASAD B.N., DAS S.R. et AGARWALA S.C. (1974) : Study of Naegleria aerobia by electron microscopy. *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.* 68 : 56-60
- MANDAL B.N., GUDEX D.J., FITCHETT M.R. et al. (1970) : Acute meningo-encephalitis due to amoeba of the order Myxomycetale (slime mould). *New Zeal. Med. J.* 71 : 16-23
- MARTIN C. et LEWIN K. (1914) : Some notes on soil protozoa. *Philos. Trans. Roy. Soc. London B* 205 : 77-95
- MARTINEZ A.J., DUMA R.J., FULTZ D.G. et FINLEY R.B. (1974) : Ultrastructural study of trophozoites and cysts of Acanthamoeba-Hartmannella and Naegleria species. 32nd Ann. Proc. Electron Microsc. Soc. Amer. St. Louis, Missouri.
- MARTINEZ J., DUMA R.J. et MARKOWITZ M. (1975) : Experimental Acanthamoeba pneumonitis and encephalitis in mice. Invasion of the central nervous system by Acanthamoeba : pathogenesis and ultrastructural features. (sous presse)
- MARTINEZ A.J., DUMA R.J., NELSON E.C. et MORETTA F.L. (1973) : Experimental Naegleria meningoencephalitis in mice. Penetration of the olfactory mucosal epithelium by Naegleria and pathologic changes produced: a light and electron microscope study. *Lab. Invest.* 29 : 121-134
- MARTINEZ A.J., NELSON E.C., JONES M.M., DUMA R.J. et ROSENBLUM W.I. (1971) : Experimental Naegleria meningoencephalitis in mice. An electron microscope study. *Lab. Invest.* 251 : 465-475
- MAZUR P. (1960) : Physical factors implicated in the death of microorganisms at subzero temperatures. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 85 : 610-629

- MAZUR P. (1966) : Physical and chemical basis of injury in single-celled micro-organisms subjected to freezing and thawing. in Cryobiology, H.T. Meryman ed., N.Y. Acad. Press, pp 213-315
- MERYMAN H.T. (1966) : Review of biological freezing. in Cryobiology, H.T. Meryman ed. N.Y., Acad. Press, pp 1-114
- MILLONIG G. (1961) : A modified procedure for lead staining of thin sections. J. Biophys. Biochem. Cytol. II : 736-739
- MUSGRAVE W.E. et CLEGG M.T. (1907) : The cultivation and pathogenesis of amoebae. Philipp. J. of Science : 1
- NAGLER K. (1909) : Entwicklungsgeschichtliche studien über Amöben. Arch. Protistenk. 15 : 1-53
- NEAL R.A. (1974) : Survival of Entamoeba and related amoebae at low temperature. I. Viability of Entamoeba cysts at 4°C. Int. J. Parasit. 4: 227-229
- NEFF R. (1957) : Purification, cultivation and description of a soil amoeba, Acanthamoeba sp. J. Protozool. 4 : 176-182
- NELSON E.C. et JONES M. (1970) : Culture isolation of agents of primary amebic meningoencephalitis. J. Parasit. 56 (sect. II) : 248
- NICOLL A.M. (1973) : Fatal primary amoebic meningoencephalitis. N.Z. Med. J. 78 : 108-112
- NJOGU A.R. et HUMPHRYES K.C. (1972) : The nature of the 4 S antigens of the brucei subgroup trypanosomes. Exp. Parasit. 31 : 178-187
- NOC F. (1909) : Recherches sur la dysenterie amibienne en Cochinchine. Ann. Inst. Pasteur 23 : 177-204
- NUSSENZWEIG V., DEANE L.H. et KLOETZEL J. (1963) : Differences in antigenic constitution of strains of Trypanosoma cruzi. Exp. Parasit. 14 : 221-232
- NUSSENZWEIG V. et GOBLE F.C. (1966) : Futher studies on the antigenic constitution of strains of Trypanosoma cruzi. Exp. Parasit. 18 : 224-230
- O'DELL W.D. et STEVENS A.R. (1973) : Quantitative growth of Naegleria in axenic culture. Applied Microbiol. 25 : 621-627
- OELERICH S. (1973) : Antigenanalysen und Kreuzreaktionen zwischen Leishmanien, Trypanosoma cruzi und Mycobacterium smegmatis. Z. Tropenmed. Parasit. 24 : 296-304

- OELERICH S. et MANNWEILER E. (1970) : Préparative Isolierung von Partialantigenen aus Trypanosoma rhodesiense und Trypanosoma gambiense.  
Z. Tropenmed. Parasit. 21 : 20-25
- OELERICH S. et MANNWEILER E. (1972) : Isolierung von Stamm- und Gruppenspezifischen Partialantigenen aus Trypanosomen der Bruceigruppe. Z. Immunforsch. 143 : 304-317
- OUCHTERLONY O. (1958) : Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. Progr. Allergy 5 : 1-78
- LOUDIN J. (1947) : L'analyse immuno-chimique du sérum cheval par précipitation spécifique en milieu gélifié. Premiers résultats. Bull. Soc. Chim. Biol. 29 : 140
- LOUDIN J. (1948) : L'analyse immuno-chimique qualitative. Méthode par diffusion des antigènes au sein de l'immunsérum précipitant gélose : première partie. Ann. Inst. Pasteur 75 : 30
- PAGE F. (1967) : Taxonomic criteria for limax amoebae with descriptions of 3 new species of Hartmannella and 3 of Vahlkampfia. J. Protozool. 14 : 499-521
- PAGE F. (1967) : Redefinition of the genus Acanthamoeba with descriptions of three species. J. Protozool. 14 : 709-724
- PAGE F. (1974) : Rosculus ithacus Haves 1963 (Amoebida, Flabellulidae) and the Amphizoid Tendency in Amoeba. Acta protozool. 13 : 143-154
- PAGE F. (1974) : A further study of taxonomic criteria for Limax Amoebae. With descriptions of new species and a key to genera. Arch. Protistenk. 116 : 149-184
- PARELKAR S.A., STAMM W.P. et HILL K.R. (1971) : Indirect immunofluorescent staining of Entamoeba histolytica in tissues. Lancet 1 : 212-213
- PARDUCZ B. (1964) : Ciliary movement coordination in ciliates. Int. Rev. Cytol. 21 : 91
- PASTERNAK J.J., THOMPSON J.E., SCHULTZ T.M.G. et ZACHARIAH K. (1970) : A scanning electron microscopic study of the encystment of Acanthamoeba castellanii. Expl. Cell. Res. 60 : 290-298
- PATRAS D. et ANDUJAR J. (1966) : Meningoencephalitis due to Hartmannella (Acanthamoeba). Amer. J. Clin. Path. 46 : 226-233

- PENARD E. (1890) : Les Rhizopodes de faune profonde dans le Lac Lemman. Mem. Soc. Phys. Hist. Nat. Genève 31 : 1-142
- PENARD E. (1902) : Faune Rhizopodique du Bassin de Lemman. Kündig, Genève pp 714
- PERTY M. (1852) : Zur Kenntniss kleinster Lebensformen nach Bau, Funktionen, Systematik, mit Specialverzeichniss der in der Schweiz beobachteten. Jentbund Reinert, Bern
- PILLOT J. (1972) : Spécificité et fidélité des réactions d'immunofluorescence. Bull. Inst. Past. 70 : 353-374
- PINTO C. (1922) : Sobre una Amoeba do genero Vahlkampfia encontrada no homem. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 15 : 122-126
- PITTAM M.D. (1963) : Studies of an amoeba-flagellate Naegleria gruberi Q. Journ. Micr. Sci. 104 : 513-529
- PREER J.B. et PREER L.B. (1959) : Gel diffusion studies on the antigens of isolated cellular components of Paramecium. J. Protozool. 6 : 88-100
- PRESTON T.M. et O'DELL D.S. (1973) : Deuterium oxide-induced reversion of Naegleria gruberi flagellates. J. Gen. Microbiol. 75 : 351-361
- PROCA-CIOBANU M. et CIPLEA A. (1973) : Contributions to the study of the experimental infection with Acanthamoeba castellanii at white mice : histopathological and histochemical data. Progress in Protozool. IVth Int. Congr. Protozool. (Clermont-Ferrand) 2-9 sept. 1973 : 330
- PUSCHKAREW B. (1913) : Uber die Verbreitung der Susswasserprotozoen durch die Luft. Arch. Protistenk. 23 : 323-362
- PUSSARD M. (1964) : Cytologie d'une amibe terricole Acanthamoeba terricola n.sp. Ann. Sci. Nat. Zool. (Paris) 6 : 565-600
- PUSSARD M. (1966) : Le genre Acanthamoeba Volkonsky 1931 (Hartmannellidae-Amoebida). Protistologica 2 : 71-93
- PUSSARD M. (1972) : Comparaison morphologique de quatre souches d'Acanthamoeba du groupe astronyxis commandoni. J. Protozool. 19 : 557
- PUSSARD M. (1973) : Modalités de la division nucléaire et taxonomie chez les amibes. Révision des notions de promitose, mésamitose et métamitose. Protistologica 9 : 163-173
- PUSSARD M. (1974) : La morphologie des amibes libres. Intérêt et principes d'étude. Ann. Soc. belge Méd. trop. 54 : 249-257

- RAFALCO J. (1947) : Cytological observations on the amoeba-flagellate, Naegleria gruberi. J. Morphol. 81 : 1-34
- RANQUE J., QUILICI M., DUNAN S. et ASSADOURIAN Y. (1969) : Etude de la structure antigénique de Crithidia (Strigomonas) fasciculata par les méthodes de précipitation en gélose. Protistologica 5 : 97-100
- RAY D. et HAYES R. (1954) : Hartmannella astronyxis : A new species of free-living amoeba. Cytology and life cycle. J. Morphol. 95 : 159-188
- REICH K. (1933) : Studien über die Bodenprotozoen Palestinas. Arch. Protistenk. 79 : 76-98
- RESSELER R., LE RAY D. et GOEDVRIEND J. (1965) : Conservation de protozoaires, particulièrement en culture, à la température de l'azote liquide. Ann. Soc. belge Méd. trop. 45 : 665-678
- REYNOLDS E.S. (1963) : The use of lead citrate at high pH as an electron opaque staining electron microscopy. J. Cell. Biol. 17 : 208-212
- ROBERT W.B. et RORKE L.B. (1973) : Primary amoebic encephalitis, probably from Acanthamoeba. Ann. Int. Med. 79 : 174-179
- 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
- RODHAIN J. (1934) : Entamoeba invadens n. sp. parasite de serpents. C.R. Soc. Biol. 117 : 1195
- ROSE F., OSTEUX R., ROSE G. et TRAN VAN KY P. (1966) : Application des techniques d'immunoélectrophorèse en agarose et d'électrophorèse en gel d'acrylamide à l'étude des mollusques. Planorbidae. Bull. Soc. Zool. France 91 : 345-351
- SAYGI G. (1971) : Studies on free-living amoebae. Ph.D. Thesis. Liverpool 1971.
- SCHAEFFER A. (1926) : Taxonomy of the amebas with descriptions of 39 new marine and freshwater species. Carnegie Inst. of Washington, Publication 345, iii : 116
- SCHAEFFER A. (1931) : On molecular organization in amoeba protoplasm. Science 74 : 47-51

- SCHARDINGER F. (1899) : Entwicklungskreis einer Amoeba lobosa(Gymnamoeba) :  
Amoeba gruberi. Sitzb. Kaiserl. Akad. Wiss. Wien Abt. 1, 108 :713-734
- SCHAUDINN F. von (1903) : Untersuchungen über die Fortpflanzung der Rhizopoden.  
Arb. Kais. Gesundheitsamte 19 : 547-576
- SCHEIDEGGER J.J. (1955) : Une microméthode de l'immunoélectrophorèse. Int.Arch.  
Allergy 7 : 103
- SCHMOLLER H. (1964) : Description of some cultivated amoebae of various origin.  
J. Protozool. 11 : 497-502
- SCHUSTER L. (1961) : Axenic cultivation of Naegleria gruberi. J. Protozool.  
8 suppl. : 19
- SCHUSTER F. (1963) : An electron microscope study of an amoeboflagellate  
Naegleria gruberi (Schardinger). I. The ameboid and flagellate stages.  
J. Protozool. 10 : 297-313
- SCHUSTER F. (1963) : An electron microscope study of the amoeboflagellate  
Naegleria gruberi (Schardinger). II. The cyst stage. J. Protozool.  
10 : 313-320
- SCHUSTER F. et DUNNEBACKE T.H. (1971) : Formation of bodies associated with virus-  
like particles in the amoeba flagellate Naegleria gruberi. J. Ultra-  
struct. Res. 36 : 659-668
- SCHUSTER F. et DUNNEBACKE T.H. (1973) : Transmission of virus-like particles  
in the EGS strain of Naegleria gruberi. J. Protozool. 20 suppl. : 520
- SCHUSTER F. et DUNNEBACKE T.H. (1974) : Growth at 37°C of the EGS strain of the  
amoeboflagellate Naegleria gruberi containing virus like particles.  
J. Invert. Pathol., in press.
- SEED J.R. (1963) : The characterization of antigens isolated from Trypanosoma  
rhodesiense. J. Protozool. 10 : 380-389
- SEED J.R. (1964) : Antigenic similarity among culture forms of the brucei group  
of trypanosomes. Parasit. 54 : 593-596
- SELLARDS A. (1911) : Immunity reactions with amoebae. Philippine J. Sci. B 6 :  
281-298
- SEN A., MUKERJEE S. et RAY J.C. (1961) : Observations on the antigenic make-  
up of amoebae. Ann. Biochem. exptl. Med. 21 : 323-326

- SIDDIQUI W. et BALAMUTH W. (1965) : Serological comparison of selected parasitic and free-living amoebae in vitro, using diffusion-precipitation and fluorescent-antibody techniques. J. Protozool. 13 : 175-182
- SIMPSON L. (1968) : The Leishmania-Leptomonad transformation of Leishmania donovani nutritional requirements, respiration changes and antigenic changes. J. Protozool. 15 : 201-207
- SINGH B.N. (1950) : A culture method for growing small free-living amoeba for the study of their nuclear division. Nature, 165 : 65
- SINGH B.N. (1952) : Nuclear division in nine species of small free-living amoebae and its bearing on the classification of the order Amoebida. Phil. Trans. Roy. Soc. London. Ser. B 236 : 405-461
- SINGH B.N. (1973) : Current status of the problem of exogenous and endogenous amoebiasis. J. Scient. Industr. Res. 32 : 399-432
- SINGH B.N. et DAS S.R. (1970) : Studies on pathogenic and non pathogenic small free-living amoebae and the bearing of nuclear division on the classification of the order amoebida. Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. 259 : 435-476
- SINGH B.N. et DAS S.R. (1972) : Occurrence of pathogenic Naegleria aerobia, H. culbertsoni and H. rhyssodes in sewage sludge samples of Lucknow. Curr. Sci. 41 : 277-281
- SOKAL R.R. (1973) : The species problem reconsidered. Syst. Zool. 22 : 360-374
- SOTELO AVILA C., MARTINEZ A.J., WILLAERT E. et STAMM W.P. (1975) : Amebic encephalitis, probably from Acanthamoeba sp. Clinical, morphological, immunofluorescent antibody and ultrastructural observations. Abstr. 27th Ann. meeting Amer. Acad. Neurol. (sous presse)
- SOTELO AVILA C., TAYLOR F.M. et EWING C.W. (1974) : Primary amebic meningoencephalitis in a healthy 7-year old boy. J. Ped. 85 : 131-136
- STAMM W.P. (1974) : The staining of free-living amoebae by indirect immunofluorescence. Ann. Soc. belge Méd. trop. 54 : 321-325
- STANFORD J.L. (1973) : Immunodiffusion analysis. A rational basis for the taxonomy of Mycobacteria. Ann. Soc. belge Méd. trop. 53 : 321-330

- STEPKOWSKI S. et HONIGBERG B.M. (1972) : Antigenic analysis of virulent and avirulent strains of Trichomonas gallinae by gel diffusion methods. J. Protozool. 19 : 306-345
- STEVENS A.R. et O'DELL W.D. (1973) : Influence of growth medium on axenic cultivation of virulent and avirulent Acanthamoeba. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 143 : 474-478
- STUTZ D.R. et FERRIS D.H. (1971) : Inclusion of erythrocytes in the Ouchterlony test for Plasmodium gallinaceum precipitins. Ann. trop. Med. Parasit. 65 : 131-133
- TAKAYANAGI T., ENRIGUEZ G.L., KAMBARA H. et OHRO Y. (1973) : An immuno-electron microscopy of the soluble antigen of Trypanosoma gambiense. Southeast Asian J. trop. Med. pub. Hlth. 4 : 165-166
- TAKAYANAGI T., KAMBARA H. et ENRIGUEZ G.L. (1973) : Studies on the agglutination antigen of Trypanosoma gambiense. Southeast asian J. trop. Med. pub. Hlth 4 : 27-31
- TALIS B. (1967) : Antigenic relationship among strains of Entamoeba histolytica, Dientamoeba fragilis and Entamoeba invadens. J. Protozool. 14 suppl.:31
- TALIS B. (1971) : Varying antigenicity within E. histolytica strains. J. Protozool. 18 suppl. : 35
- TALIS B., LAHAV M. et BEN-EFRIM S. (1962) : Differentiation of E. invadens from E. histolytica by gel diffusion and immunoelectrophoresis. Bull. Res. Counc. Israel 10 E : 110
- TALIS B., LAHAV M. et BEN-EFRIM S. (1963) : Immunological study on some strains of Entamoeba histolytica. Bull. Res. Counc. Israel 10 E : 130-136
- TILLET W.S. et FRANCIS T. (1930) : Serological reactions in pneumonia with a non protein somatic fraction of Pneumococcus. J. exp. Med. 52 :561-571
- VAITUKAITIS J., ROBBINS J.B., NIESCHLAG E. et ROSS G.T. (1971) : A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. J. Clin. Endocr. 33 : 988-991
- VANDEN DRIESSCHE E., VAN DE PITTE J., VAN DIJCK P.J., DE JONCKHEERE J. et VAN DE VOORDE H. (1973) : Primary amoebic meningoencephalitis after swimming in stream water. The Lancet, oct. 27 : 971

- VAN DIJCK P., DE JONCKHEERE J., REYBROUCK G. et VAN DE VOORDE H. (1974) : Rapid identification of Naegleria species by sero-agglutination and fluorescent antibodies. New possibilities for the water supply services. Zentbl. Bakt. Parasit. Kde. I, Orig. B 158 : 541-551
- VAN MEIRVENNE N., JANSSENS P.G. et MAGNUS E. (1975) : Antigenic variation in syringue-passed populations of Trypanosoma (Trypanozoon) brucei. I. Rationalisation of the experimental approach. Ann. Soc. belge Méd. trop. 55 : sous presse
- VAN MEIRVENNE N., LE RAY D., JANSSENS P.G. et MAGNUS E. (1973) : Immunogenic properties of common and variable antigens of T. brucei. Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg. 67 : 274-275
- VICKERMAN K. (1962) : Patterns of cellular organisation in limax amoebae. An electron microscope study. Exptl. Cell Res. 26 : 497-519
- VISVESVARA G.S. et HEALY G.R. (1973) : Comparative studies on pathogenic and free-living Naegleria species. I. Gel-diffusion and immunoelectrophoretic analysis. J. Protozool. 20 suppl. : 522
- VISVESVARA G.S. et HEALY G.R. (1974) : Isolation of a strain of pathogenic Naegleria fowleri from a human nasal swab. J. Protozool. 21 : 438
- VOLKONSKY M. (1931) : Hartmannella castellanii Douglas et classification des hartmannelles. Arch. Zool. Exp. Gen. 72 : 317-329
- VON ROSENHOF R. (1755) : Monatl. herausgegebene Insektenbelustigungen 3 : 622
- WALKER E. (1908) : The parasitic amoebae of the intestinal tract of man and other animals. J. Med. Res. 17 : 379-459
- WANG S. et FELDMAN H. (1961) : Occurrence of Acanthamoeba in tissue cultures inoculated with human pharyngeal swabs. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1 : 50-53
- WANG S. (1967) : Isolation of Hartmannella species from human throats. New Eng. J. Med. 277 : 1174-1179
- WELLER T.H. et COONS A.H. (1954) : Fluorescent antibody studies with agents of varicella and herpes zoster propagated in vitro. Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.) 86 : 789-794
- WELLS R. (1911) : Aerial contamination as a fallacy in the study of amebic infection. Parasitology 4 : 206

- WERY-PASKOFF S., RENOIRTE R., WERY M. et BENNIKE T. (1971) : Diagnostic sérologique de l'amibiase hépatique par immunofluorescence. Ann. Soc. belge Méd. trop. 51 : 221-228
- WEYNON (1926) : Protozoology. 2 Volumes, Baillièrre, Londres.
- WHITMORE H. (1911) : Studien über Kulturamoben aus Manilla. Arch. Protistenk. 23 : 81-95
- WILLAERT E. (1971) : Isolement et culture in vitro des amibes du genre Naegleria. Ann. Soc. belge Méd. trop. 51 : 701-708
- WILLAERT E. (1974) : Primary amoebic meningoencephalitis. A selected bibliography and tabular survey of cases. Ann. Soc. belge Méd. trop. 54 : 205-216
- WILLAERT E. (1974) : Etude immunotaxonomique du genre Naegleria. Ann. Soc. belge Méd. trop. 54 : 395-404
- WILLAERT E. (1975) : Recherches immuno-taxonomiques comparées sur les amibes du groupe "Limax". Acad. R. Sc. Outre-Mer, Mém. Classe Sc. nat. Méd. sous presse.
- WILLAERT E., JADIN J.B. et LE RAY D. (1972) : Structures immunochimiques comparées d'amibes du genre Naegleria. Protistologica 8 : 497-504
- WILLAERT E., JADIN J.B., JAMIESON A. et AFCHAIN D. (1974) : Rapid identification of Naegleria species with indirect fluorescent staining technique. Abstr. 3rd Int. Congr. Parasit. (München) 1, Sect. A 12 : 179-180
- WILLAERT E., JAMIESON A., JADIN J.B. et ANDERSON K. (1974) : Epidemiological and immunoelectrophoretic studies on human and environmental strains of Naegleria fowleri. Ann. Soc. belge Méd. trop. 54 : 333-342
- WILLAERT E. et LE RAY D. (1973) : Caractères morphologiques, biologiques et immunologiques de Naegleria jadini sp. nov. (Amoebida, Vahlkampfiidae). Protistologica 9 : 417-426
- WILLIAMSON J. et BROWN K.N. (1964) : The chemical composition of trypanosomes. Exp. Parasit. 15 : 44-68

- WILSON R.J.H., Mac GREGOR I.A., HALL P., WILLIAMS K. et BARTHOLOMEW R. (1969) :  
Antigens associated with Plasmodium falciparum infections in man.  
Lancet 2 : 201-205
- ZUCKERMAN A., SCHNUR L.F., GREENBLATT C.L. et MONTIGLIO B. (1973) : Excreted  
factors (EF) in the serotyping of Leishmanial strains. Progress in  
Protozool. IV Int. Congr. Protozool. (Clermont-Ferrand) : 455
- ZULJETA A. (1917) : Promitosis y sidieresis, dos modos de division nuclear  
co-existentes en amebas del grubo limax. Trabajos del Museo Nacional  
de Ciencias Naturales. Serie Zool. Madrid 33 : 1-55