

ANNALES DE PARASITOLOGIE

HUMAINE ET COMPARÉE

Tome 54

1979

N° 2

© Masson, Paris, 1979.

Annales de Parasitologie (Paris)
1979, t. 54, n° 2, pp. 121-127.

MÉMOIRES ORIGINAUX

Isolement d'amibes libres à partir de la muqueuse nasale de l'homme Risque éventuel

par A.-M. SIMITZIS, F. LE GOFF, et M.-T. L'AZOU *

* *Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Parasitologie (Service du Pr agr. C. Chastel),
Faculté de Médecine, B.P. 815, 29279 Brest Cedex.*

Résumé.

De mars 1976 à décembre 1978, nous avons analysé 1039 écouvillons nasaux dans le but de dépister les porteurs sains d'amibes libres. Nous avons ainsi isolé 9 souches amibiennes dont une *Hartmannella vermiformis*. Des 8 Acanthamibes restantes, une seule, O.R.L. 561 (*Acanthamoeba hatchetti*) est pathogène pour la souris, au même titre que les 2 souches identiques connues et *A. culbertsoni*.

Summary.

Isolation of free-living amoebae from the nasal mucosa of man. Potential risk.

From march 1976 until december 1978, we have analysed 1039 nasal swabs in order to discover the healthy free-living amoebae carriers. So, we have isolated 9 strains of which one *Hartmannella vermiformis*. From the 8 remaining Acanthamoebae, only one, ORL 561 (*Acanthamoeba hatchetti*) is as pathogenic for mice as the 2 other identical known strains and *A. culbertsoni*.

Accepté le 18 avril 1979.

Annales de Parasitologie humaine et comparée (Paris), t. 54, n° 2.

9

Si les cas de Meap à amibes libres de type *limax* restent fort rares, par contre, le nombre de sujets apparemment sains qui s'avèrent porteurs de telles amibes libres au niveau des fosses nasales, du pharynx, de la bouche ou même des selles (1, 11), semble loin d'être négligeable. Le but poursuivi par ce travail a donc été de préciser l'importance réelle de la dissémination des amibes libres au niveau des fosses nasales de porteur sains de la région brestoise, ainsi que l'existence éventuelle de souches amibiennes pathogènes.

Matériel et méthodes

1. Population étudiée.

Notre étude a porté sur une population non sélectionnée, mais composée en majorité de sujets jeunes :

— soit sains, soumis à une surveillance médicale régulière pour raison professionnelle ;

— soit malades, et hospitalisés dans les différents services de Médecine ou de chirurgie du C.H.R. de Brest.

Hormis cas exceptionnels, tous les sujets examinés sont français de souche, et résident à Brest depuis plusieurs mois. Certains ont fait des séjours à l'étranger, professionnels ou d'agrément, mais la majorité n'a jamais quitté le territoire français. Tous disposent d'un domicile présentant de bonnes conditions d'hygiène. Seuls quelques-uns fréquentent régulièrement ou non les piscines couvertes et chauffées de la ville.

2. Ecouvillonnements nasaux.

Pour les prélèvements, nous avons utilisé des écouvillons à usage unique stériles, humidifiés extemporanément en eau distillée également stérile. Les primocultures ont été réalisées en boîtes de Pétri garnies de gélose monoxénique à 2 % selon Singh, scellées au parafilm et incubées d'emblée à 37 °C.

Les contrôles microscopiques ont été effectués tous les jours au microscope inversé et les boîtes négatives éliminées après 30 jours. A partir des boîtes positives, et toujours au microscope inversé, nous avons effectué un clonage à la micropipette sur gélose monoxénique à 2 %.

3. Analyse des clones amibiens isolés.

Pour chaque clone amibien isolé, nous avons recherché le pouvoir pathogène par inoculation de trophozoïtes à la souris blanche (femelle adulte de 20 grammes et nouveau-nés de 24 h à 48 h). Les doses d'inoculation n'ont jamais dépassé 200 trophozoïtes/animal, et les voies d'inoculation ont été variées. Pour la voie intranasale, les trophozoïtes ont été récupérés directement à partir de cultures monoxéniques par triple centrifugation, lavage en eau distillée additionnée d'antibiotiques (pénicilline,

Streptomycine : 7 000 U.I./ml et 300 µg/ml). Pour les voies intracérébrale et intrapéritonéale, nous avons utilisé des trophozoïtes provenant de cultures axéniques, réalisées selon les méthodes classiques (5), mais en milieu de Eagle et non en milieu CGVS.

Les animaux trouvés morts ou présentant des troubles encéphaliques ont subi le même protocole : prélèvement aseptique du cerveau à fins de subcultures sur gélose monoxénique à 2 % et de la recherche d'une contamination microbienne sur bouillon nutritif ; et autopsie pour la recherche de lésions macroscopiques associées des organes abdominaux.

Le pouvoir cytopathogène a été recherché par inoculation de trophozoïtes à des cultures cellulaires : cellules diploïdes humaines et cellules rénales de *Cercopithecus aethiops* en milieu de Eagle (2). Les cultures cellulaires inoculées sont suivies quotidiennement au microscope inversé et en cas d'apparition d'un pouvoir cytopathogène, donnent lieu à une triple analyse :

— vérification de l'absence de tout contaminant, bactérien ou mycosique, susceptible de provoquer l'effet cytopathogène observé ;

— vérification de l'absence de tout pouvoir cytotoxique par subinoculation du filtrat de primoculture ;

— vérification de l'absence d'un éventuel virus cytopathogène par subinoculation du lysat des trophozoïtes de primoculture obtenu par congélation/décongélation.

Résultats

1. Résultats globaux.

De mars 1976 à décembre 1978, nous avons examiné 1 032 sujets (491 femmes et 541 hommes) pour lesquels nous disposons de 1 039 écouvillons dont la majorité (670) recueillie en automne.

Sur ces 1 032 sujets, plus de 340 ont moins de 20 ans et seulement 220 plus de 50 ans, ce qui nous donne un âge moyen de 32 ans.

La répartition socio-professionnelle des 762 adultes classés montre une nette prédominance des ouvriers et des agriculteurs qui représentent respectivement 44 % et 29 % du total, contre 23 % pour les étudiants et seulement 4 % pour les militaires et assimilés.

En outre, si l'on considère le motif de consultation, on constate que 36 % des sujets ont été vus en systématique, 45 % en Service de Médecine ou de Chirurgie et seulement 19 % en Service d'O.R.L.

2. Souches d'amibes limax découvertes.

Sur les 1 039 écouvillons mis en culture, seulement 9 ont permis la mise en évidence et l'isolement d'amibes libres, dont 3 en avril et mai 1976, et 6 en octobre et novembre 1978, soit au total moins de 1 % (0,86 %).

Quatre des porteurs sont des femmes et leur âge moyen est de 34 ans contre 27 ans pour les 5 hommes. Un fait semble mériter d'être souligné d'emblée : 3 des 28 militaires ou assimilés sont porteurs d'amibes limax, ce qui représente une proportion de 1/9, contre 1/45 pour les étudiants, 1/221 pour les fermiers et 1/330 pour les ouvriers.

En outre, toutes les souches isolées, à l'exclusion de la première (O.R.L. 28) qui est une *H. vermiformis*, appartiennent au genre *Acanthamoeba*. La souche O.R.L. 561 (*A. hatchetti*) présente quant à elle un intérêt particulier par ses caractéristiques.

Enfin, il ne nous a jamais été donné de trouver une seule poly-infestation.

3. Pouvoir pathogène sur la souris.

Ces 9 clones amibiens isolés de fosses nasales ont donné lieu à la recherche d'un pouvoir pathogène sur la souris.

Les 3 premières souches (O.R.L. 28, 74 et 76) ont été inoculées par voie intranasale ou intracérébrale. Pour les souches suivantes (O.R.L. 561, 593, 640, 704, 776 et 791), nous avons adopté la voie intrapéritonéale. Quelle que soit la voie d'inoculation choisie, nous n'avons jamais dépassé la dose de 200 trophozoïtes de façon à nous rapprocher autant que faire se peut des conditions « normales » d'inoculation accidentelle.

De toute la série d'inoculation que nous avons effectuée, seule la souche O.R.L. 561 se montre pathogène pour l'animal (*tableau I*), avec une mort se produisant au plus tard 15 jours après l'inoculation par voie intrapéritonéale (10).

Tableau I. *Essais de mise en évidence du pouvoir pathogène sur la souris.*

SOUCHE ORL	NOMBRE DE SOURIS Adulte/Nouveau-né	NOMBRE DE TROPHOZOÏTES Adulte/Nouveau-né	VOIE D'INOCULATION	NOMBRE DE DECES Adulte/Nouveau-né	TEMPS ENTRE INOCULATION ET DECES
28	9 / 12	160 / 160	IN / IC	0 / 0	-
74	16 / 10	200 / 160	IN / IC	0 / 0	-
76	24 / 12	180 / 180	IN / IC	0 / 0	-
561	16 / 45	200 / 150	IP	15 / 32	< 10 jours
593	8 / 12	200 / 150	IP	0 / 0	-
640	8 / 28	200 / 150	IP	0 / 0	-
704	8 / 9	200 / 150	IP	0 / 0	-
776	8 / 9	200 / 150	IP	0 / 0	-
791	8 / 12	200 / 150	IP	0 / 0	-

Nous avons confirmé ce pouvoir pathogène expérimental par voie intrapéritonéale en inoculant la même quantité de trophozoïtes à 8 souris femelles adultes par voie

intranasale : dans ce cas, la mort est survenue entre le 18^e et le 20^e jour pour 7 des 8 souris inoculées.

Cette souche O.R.L. 561 (identifiée comme *A. hatchetti*) présente donc un pouvoir pathogène identique à celui des 2 souches similaires découvertes aux U.S.A. et en France, et à celui d'*A. culbertsoni* (7, 8).

4. Pouvoir cytopathogène sur les cultures cellulaires.

A la suite des travaux de Cursons et Brown (2), nous avons employé des cultures cellulaires comme indicateur de la pathogénicité de nos 9 clones amibiens.

Dans un premier temps, nous inoculons 3 tubes de cultures cellulaires (diploïdes humaines et rénales de singe) par clone amibien, à raison de 200 trophozoïtes/tube. Pour tous les tubes qui montrent un effet cytopathogène, nous subinoculons des tubes de culture neufs avec :

- soit le filtrat du liquide de primoculture ;
- soit le lysat des trophozoïtes amibiens de primoculture.

Tableau II. Mise en évidence de l'effet cytopathogène sur les cultures cellulaires diploïdes humaines et rénales de singe.

SOUCHES O.R.L.	TROPHOZOÏTES		LYSAT		FILTRAT	
	Cellules diploïdes	Cellules rénales	Cellules diploïdes	Cellules rénales	Cellules diploïdes	Cellules rénales
28	-	-	-	-	-	-
74	-	-	-	-	-	-
76	+	+	-	-	+	-
561	+	+	-	-	-	-
593	+	+	-	+	+	-
640	+	+	-	-	+	-
704	+	+	-	-	+	-
776	+	+	-	-	+	-
791	+	+	-	-	+	-

De cette façon, nous pouvons confirmer que l'effet cytopathogène observé est bien dû aux amibes et non à un effet toxique (filtrat) ou à un virus (lysat).

Les résultats que nous avons obtenus sont les suivants :

- a) 6 de nos 9 souches ont un effet cytotoxique sur les seules cultures de cellules diploïdes humaines ;
- b) O.R.L. 593 témoigne d'un effet toxique d'origine virale sur les cellules rénales de singe ;
- c) seule, la souche O.R.L. 561 se révèle réellement cytopathogène sur les deux types de cultures cellulaires utilisées (*tableau II*).

Conclusion

De l'enquête entreprise en mars 1976, il ressort donc que le nombre de sujets apparemment sains, qui hébergent au niveau des fosses nasales des amibes libres, est minime (< 1 %) dans la région brestoise, alors que pour Cerva, il atteint 7 % à Prague (1).

Peut-être faut-il voir dans la représentation socio-professionnelle et l'éventail des âges la cause de la faible positivité enregistrée : nos 1 032 sujets examinés sont avant tout des ouvriers et des agriculteurs dont l'âge moyen est de 32 ans, alors que pour Cerva il s'agissait de jeunes recrues de 20 à 21 ans.

Confirme d'ailleurs cette hypothèse le fait que, parmi nos 9 porteurs, 4 sont des étudiants et 3 des militaires d'âge moyen : 20 ans.

Il est vraisemblable que cette disparité, vu la fréquence des infestations, tient à un mode de vie totalement différent : les étudiants et les militaires fréquentent les piscines couvertes et chauffées de la ville où des recherches préliminaires nous ont permis de retrouver très facilement des amibes libres.

Des 9 clones amibiens isolés entre mars 1976 et décembre 1978, un seul se montre pathogène pour la souris : il s'agit de la souche O.R.L. 561 qui présente des caractéristiques similaires à celles d'*Acanthamoeba hatchetti*, caractéristiques bien mises en évidence par M. M. Pussard grâce à ses techniques d'imprégnation argentique. Outre son origine et son pouvoir pathogène expérimental, cette souche O.R.L. 561 prend d'autant plus d'importance que nous venons d'isoler à partir des fosses nasales d'un porteur sain une souche morphologiquement très semblable. Comme dans le cas d'O.R.L. 561, cette nouvelle souche provient d'un étudiant qui fréquente assidûment la même piscine couverte et chauffée de la ville.

Si ces deux souches se révélaient identiques en tout point, se poserait le problème de la piscine fréquentée régulièrement par les deux porteurs, des études préliminaires nous ayant confirmé le danger potentiel offert compte tenu de l'abondance des amibes libres rencontrées et l'excessive fréquentation du bassin.

Bibliographie

1. Cerva L., Serbus C., Skocil V. (1975) : Isolation of *Limax amoebae* from the nasal mucosa of man. *Folia Parasitol. (Praha)*, 20, 97-103.
 2. Cursons T. M., Brown J. (1978) : Use of cell cultures as an indicator of pathogenicity of free-living amoebae. *J. Clin. Pathol.*, 31, 1-11.
 3. Derr-Harf C., Molet B., Schreiber J., Kremer M. (1978) : Epidémiologie des amibes libres dans les eaux de Strasbourg. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 53, 467-477.
 4. Molet B., Derr-Harf C., Schreiber J., Kremer M. (1976) : Etude des amibes libres dans les eaux de Strasbourg. Résultats préliminaires. *Ann. Parasitol. Hum. comp.*, 51, 401-406.
 5. Pernin P. (1976) : Recherche et essai d'identification par microscopie en contraste de phase des amibes libres des piscines lyonnaises. *Thèse Pharmacie*, Lyon.
 6. Pernin P., Riamy A. (1978) : Etude sur la présence d' « amibes libres » dans les eaux des piscines lyonnaises. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 53, 333-344.
 7. Pussard M., Pons R. (1977) : Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). *Protistologica*, 13,
 8. Sawyer K., Visvesvara S., Harke A. : Pathogenic amoebae from brackish and ocean sediments, with a description of *A. hatchetti*, n. sp., *Science*, 196, pp. 1324-1325.
 9. Simitzis-Le Flohic A.-M. (1976) : Présence d'amibes libres dans les réseaux d'alimentation urbaine et communale de la région brestoise. *Soc. Pathol. Exot.*, 69, 302-309.
 10. Simitzis-Le Flohic A.-M., Le Goff F., L'Azou M.-T. (1979) : Isolement d'une amibe libre de type *Limax* pathogène pour la souris à partir de la muqueuse nasale d'un porteur sain de la région brestoise. *Soc. Pathol. Exot.*, Séance du 14-2-79.
 11. Wang S., Feldman A. (1967) : Isolation of Hartmannella species from human throats. *New England J. Med.*, 1967, 277, pp. 1174-1179.
-