

ANNALES DE PARASITOLOGIE

HUMAINE ET COMPARÉE

Tome 56

1981

N° 6

© Masson, Paris, 1981.

Annales de Parasitologie (Paris)
1981, t. 56, n° 6, pp. 563-574.

MÉMOIRES ORIGINAUX

ESSAI DE TAXONOMIE DES AMIBES LIBRES DU GENRE *ACANTHAMOEBA* (PROTOZOA, AMOEBIDA)

par l'analyse des caractères kystiques
en microscopie électronique à balayage

A. M. SIMITZIS-LE FLOHIC et F. LE GOFF

Collaboration technique : J. Quiviger

RÉSUMÉ. Pour vérifier l'apport de la microscopie électronique à balayage dans l'étude taxonomique des amibes libres, les auteurs ont étudiés 21 souches d'amibes libres représentant 20 espèces (1 *Naegleria gruberi*, 1 *Tetramitus rostratus* et 18 *Acanthamoeba* sp.), au seul stade de kystes. La méthode utilisée est satisfaisante pour faire la discrimination entre des genres différents. Mais pour le seul genre *Acanthamoeba* par contre, alors que par des méthodes optiques, il est possible d'individualiser trois groupes (I, II et III), regroupant respectivement 3, 10 et 5 espèces, par la microscopie électronique à balayage, les résultats sont moins précis. Le groupe II notamment ne comprend plus que quatre sous-groupes et le groupe III deux sous-groupes et une espèce, *A. culbertsoni*. Le groupe I par contre reste tout aussi valable.

Taxonomy-trial of the free-living amoebae belonging to the genus *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida) by means of the cyst-features in scanning electron microscopy.

SUMMARY. In order to verify the contribution of scanning electron microscopy to the taxonomic study of free-living amoebae, the authors studied at the encysted stage 21 strains of free-living amoebae representing 20 species (1 *Naegleria gruberi*, 1 *Tetramitus rostratus* and 18 *Acanthamoeba* sp.). The method utilized is satisfactory for distinguishing the different genera. Using optical methods, it is possible to differentiate three groups (I, II, III) of *Acanthamoeba*, including 3, 10 and 5 species, respectively. The results obtained with scanning electron microscopy, however, are less precise. In particular, group II can be divided into only four sub-groups and group III into only two sub-groups and one species, *A. culbertsoni*. The method remains valid for group I.

Laboratoire de Parasitologie (Pr C. Chastel) Faculté de Médecine, BP 815, F 29279 Brest Cedex.

Accepté le 5 mai 1981.

Par son élégance et ses capacités résolutes, la microscopie électronique à balayage (MEB) apparaît pour beaucoup comme une des méthodes de choix pour l'étude taxonomique de bon nombre d'échantillons biologiques. Plusieurs travaux préliminaires ont déjà été effectués en ce sens, notamment sur les kystes d'amibes libres, *Schyzopyrenidae* et *Hartmanellidae* (3, 4, 5). Il nous a paru intéressant de vérifier l'apport éventuel de la MEB dans l'étude taxonomique d'un genre déjà bien connu : le genre *Acanthamoeba* (2, 4, 6, 7).

Matériel et méthodes

Toutes les 19 souches d'*Acanthamoeba* que nous avons étudiées, — sauf une (*A. hatchetti*, souche ORL 561) (8) —, nous ont été fournies par M. Pussard et R. Pons et leur ont servi à établir une clé dichotomique du genre par examen des caractères kystiques (7).

Un point de comparaison, pour la qualité de notre technique de préparation des kystes, nous a été donné par une souche de *Naegleria gruberi*, provenant de l'Institut Prince Léopold d'Anvers et déjà bien étudiée en MEB par J. M. Jadin (4) et une souche de *Tetramitus rostratus* de même origine.

C'est donc au total 20 souches qui ont été cultivées en boîtes de Pétri sur gélose monoxénique à 2 % (bactérie, *Enterobacter cloacae*, préalablement autoclavée à 110° C pendant 10 minutes). Au minimum quinze jours avec l'enkystement des derniers trophozoïtes présents, — ceci afin d'éviter les formes kystiques immatures —, la totalité des kystes formés par chaque souche est rassemblée en eau distillée dans un tube de verre conique à vis, puis fixée pendant 3 jours à température ambiante dans de la glutaraldéhyde à 2,5 % en tampon phosphate 0,1M, pH 7,0. Après rinçage en eau distillée, les kystes sont déshydratés en éthanol puis acétate d'amyle et séchés soit en filtre de type Swinney par passage au point critique en CO₂ liquide, soit directement sur plot de cuivre avant d'être métallisés à l'or/palladium 40:60 dans un Coater Edward Zivy E 306, puis d'être examinés dans un Jeol JSM P. 15.

Résultats

La vérification de la bonne qualité de nos échantillons a été effectuée par l'analyse des kystes de *Naegleria gruberi* et de *Tetramitus rostratus*, espèces de l'ordre des *Schyzopyrenidae*.

Les kystes de *N. gruberi*, déjà étudiés par J. M. Jadin (4) sont parfaitement ronds avec une surface rugueuse trouée de place en place par des pores circulaires, non operculés et bordés d'un bourrelet régulier et plus ou moins saillant. Nos résultats concordent parfaitement avec ce que l'on sait de cette espèce (*fig. 1*).

Pour *T. rostratus*, nous avons observé des kystes ronds ou lenticulaires présentant un discret réseau de veines superficielles peu saillantes, comme appliquées sur la surface lisse du kyste. Des pores ronds ou à peine ovalisés, trouent la surface. Ces pores sont dépourvus de bourrelet. Nos résultats diffèrent donc sensiblement de ceux obtenus par d'autres auteurs (3) (*fig. 2*).

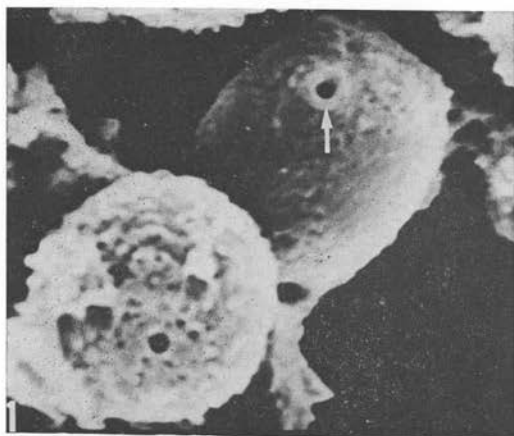


FIG. 1. — *Naegleria gruberi* ($\times 3\,800$).
Kystes rugueux avec pores (\leftarrow)
bordés d'un bourrelet.

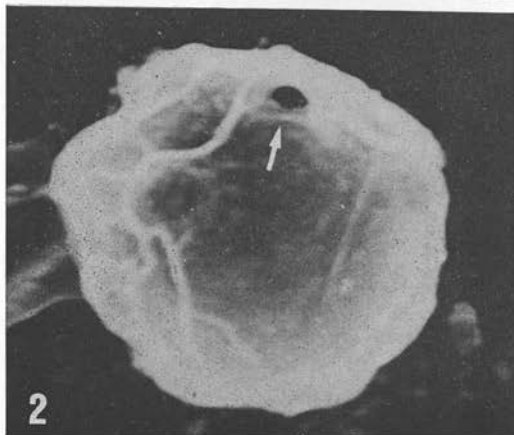


FIG. 2. — *Tetramitus rostratus* ($\times 4\,650$).
Kystes lisses délicatement veinés.
Pores plats (\rightarrow).

Analyse des kystes du genre *Acanthamoeba*.

Pussard et Pons, par des méthodes de microscopie optique exclusivement (7) identifient, au sein du genre *Acanthamoeba*, 3 groupes recouvrant les 18 espèces étudiées.

Par la MEB, nous avons retrouvé avec plus ou moins de bonheur ces 3 groupes :

LE GROUPE I (*A. astronyxis*, *A. commandoni* et *A. echinulata*) réunit les espèces dont les kystes sont les plus grands (plus de $18\ \mu\text{m}$). Les caractères communs au groupe I sont :

- kystes ronds avec une ossature étoilée bien visible par suite de l'engainement étroit des bras par l'exine ;
- opercules, petits et peu saillants, mais nettement visibles à l'extrémité distale de chaque bras ;

— surface de l'exine parfaitement lisse parcourue d'un réseau de plis stéréotypés avec anneau central en roue dentée et plis de refend partant de l'apex de chaque dent pour suivre le sommet de l'axe longitudinal des bras et mourir peu avant l'opercule.

A. astronyxis présente au mieux les caractères du groupe, d'autant que les bras (moins de 6 en moyenne) sont tous situés dans un même plan, ce qui confère au kyste la forme d'un disque aplati (fig. 3).

Avec *A. commandoni*, la structure géométrique régulière du kyste marque un début de désorganisation du fait du nombre supérieur des bras (6 à 9) et de leur disposition dans plusieurs plans. Mais, restent parfaitement visibles la surface lisse de l'exine et les plis de refend le long de l'axe longitudinal des bras (fig. 4).

Pour *A. echinulata*, la désorganisation est majeure : les bras (12 à 14) hérissant en tous sens le kyste dont l'exine reste lisse et parcourue de plis de refend qui s'interrompent peu avant l'opercule (fig. 5).

LE GROUPE II rassemble 10 espèces dont les kystes en MEB sont très difficilement individualisables les uns des autres.

Les kystes, de taille inférieure à 18 μm , apparaissent généralement globuleux, rarement polyédriques : triangulaires ou quadrangulaires. Les complexes operculaires se retrouvent aisément et la surface du kyste est hérissée d'une série de plis plus ou moins nombreux, larges et anastomosés entre eux et de complexe operculaire à complexe operculaire.

Trois espèces, *A. castellanii*, *A. mauritaniensis* et à un degré moindre *A. polyphaga*, présentent un bouillonnement superficiel de plis épais, charnus et anastomosés en tous sens, qui confèrent aux kystes un aspect de disque biconvexe hirsute. Les pores sont tous situés au niveau du bord externe du disque et entourés d'un pli circulaire bouillonné (fig. 6, 7, 8).

A. quina et *A. lugdunensis* présentent des kystes fréquemment polygonaux, dont les angles peu marqués correspondent aux complexes operculaires. Ces complexes operculaires larges sont entourés d'un repli circulaire saillant de l'exine, d'où partent des plis de refend irréguliers, nombreux, fréquemment anastomosés entre eux et de complexe operculaire à complexe operculaire, formant ainsi un réseau à mailles étroites et polygonales limitant de petites zones d'exine plus ou moins rugueuses et frippées (fig. 9, 10).

FIG. 3 à 8.

FIG. 3 à 5. — Groupe I. Noter les opercules (\rightarrow) et les plis (\Rightarrow).

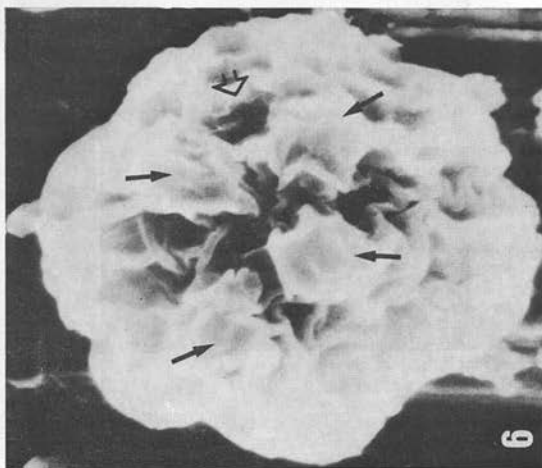
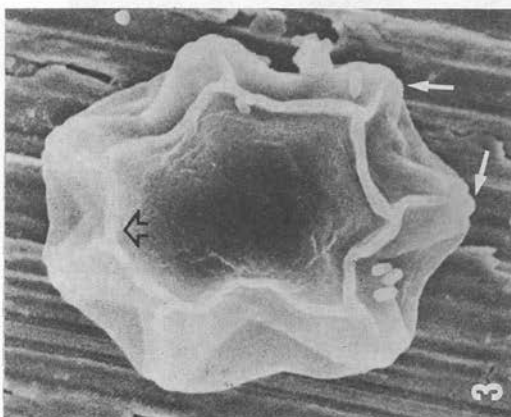
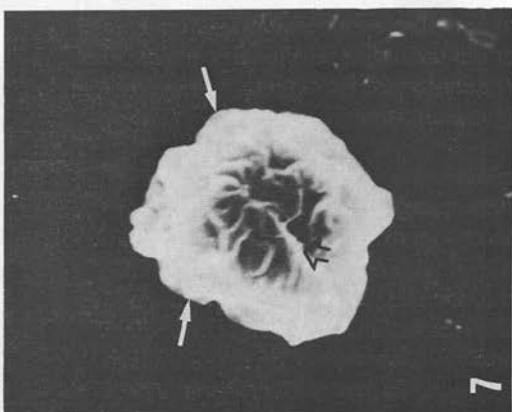
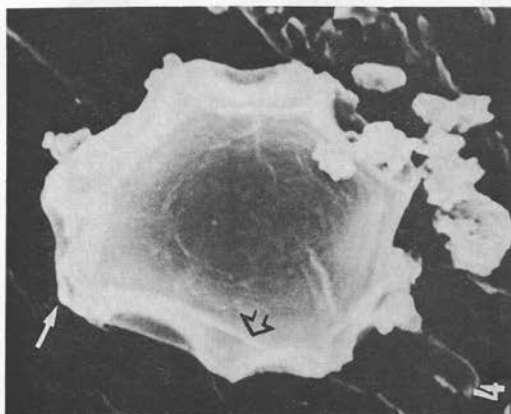
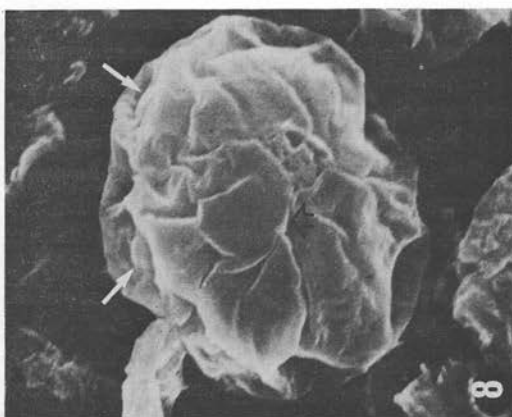
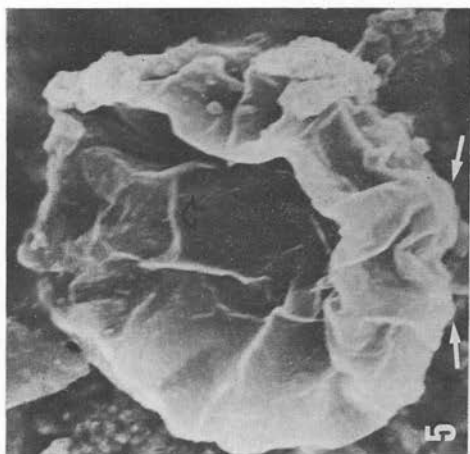
FIG. 3. — *A. astronyxis* ($\times 3\ 420$). Kystes étalés ; exine lisse avec réseau de plis stéréotypés.

FIG. 4. — *A. commandoni* ($\times 2\ 290$). Seuls quelques opercules sont visibles. FIG. 5. — *A. echinulata* ($\times 3\ 200$). Kyste vide.

FIG. 6 à 8. — Groupe II. Opercules (\rightarrow), plis (\Rightarrow).

FIG. 6. — *A. castellanii* ($\times 6\ 330$). Opercules saillants. La surface de l'exine est très tourmentée. FIG. 7. — *A. mauritaniensis* ($\times 4\ 200$). Plis moins profonds que ceux d'*A. castellanii*.

FIG. 8. — *A. polyphaga* ($\times 4\ 640$). Plis nombreux, plus charnus.



Un pas de plus vers la simplification est fait pour les deux espèces voisines *A. divionensis* et *A. paradivionensis* : les kystes de ces deux espèces polygonaux, sont hérissés en tous sens par des complexes operculaires petits et peu saillants, les plis de l'exine réguliers rejoignant presque directement les complexes operculaires

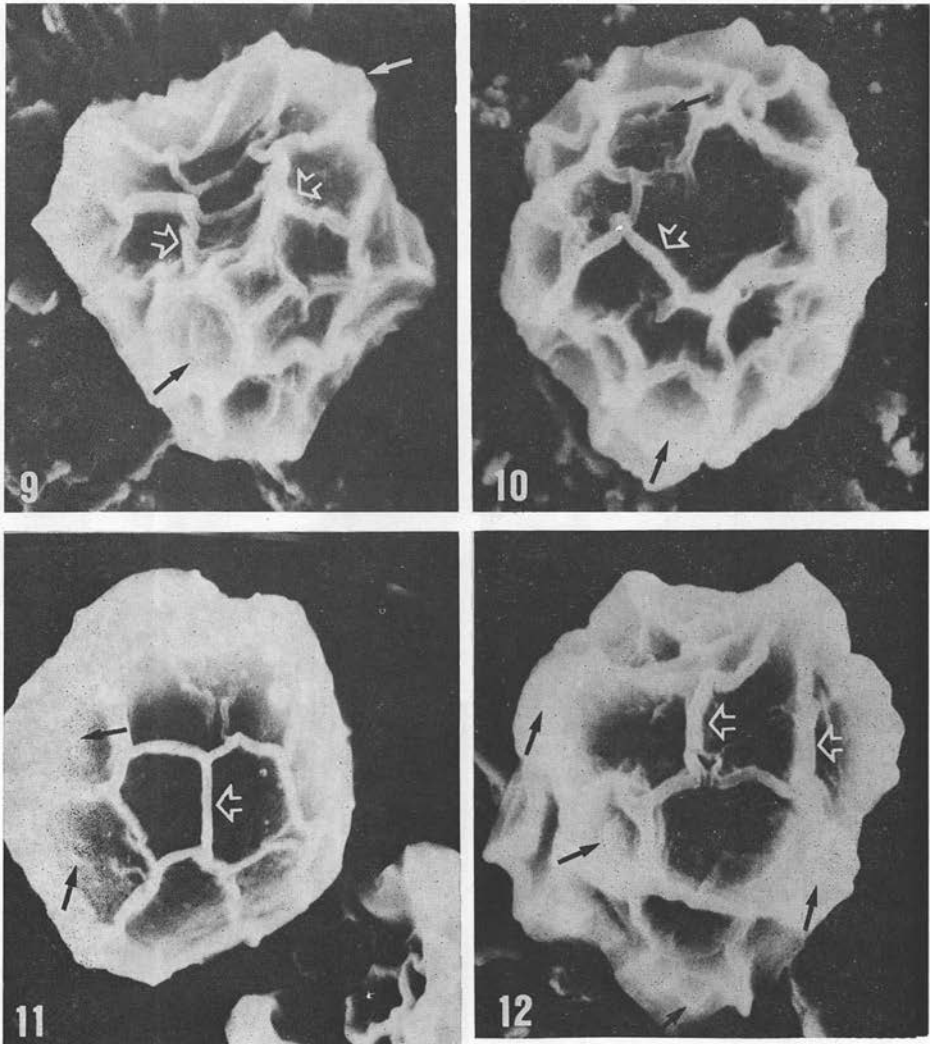


FIG. 9 à 12. — Groupe II. Opercules (→), plis (⇒).

FIG. 9. — *A. quina* ($\times 6\ 000$). Réseau à mailles fines. Opercules petits. FIG. 10. — *A. lugdunensis* ($\times 5\ 400$). Même aspect qu'*A. quina*. FIG. 11. — *A. divionensis* ($\times 6\ 200$). Réseau à mailles larges. Opercules grands. FIG. 12. — *A. paradivionensis* ($\times 6\ 000$). Même aspect qu'*A. divionensis*.

entre eux. Les mailles ainsi formées sont donc moins nombreuses, plus larges et tout aussi polygonales que pour le sous-groupe précédent (*A. quina* et *A. lugdunensis*). Mais entre ces mailles, la surface de l'exine apparaît le plus souvent lisse ou finement grenue (*fig. 11, 12*).

Le dernier sous-groupe rassemble trois espèces, *A. hatchetti*, *A. griffini* et *A. rhysoïdes*, dont la forme générale est très fortement polygonale du fait de la saillie massive des bras de l'endokyste qui semblent tendre par en-dessous l'exine. Les complexes operculaires larges et saillants sont entourés d'un repli circulaire de l'exine en forme de corolle. Ces corolles sont réunies entre elles par des replis rectilignes et très marqués de l'exine, laissant libres de grandes surfaces en cupules à pans coupés parfaitement lisses (*fig. 13, 14, 15, 16*).

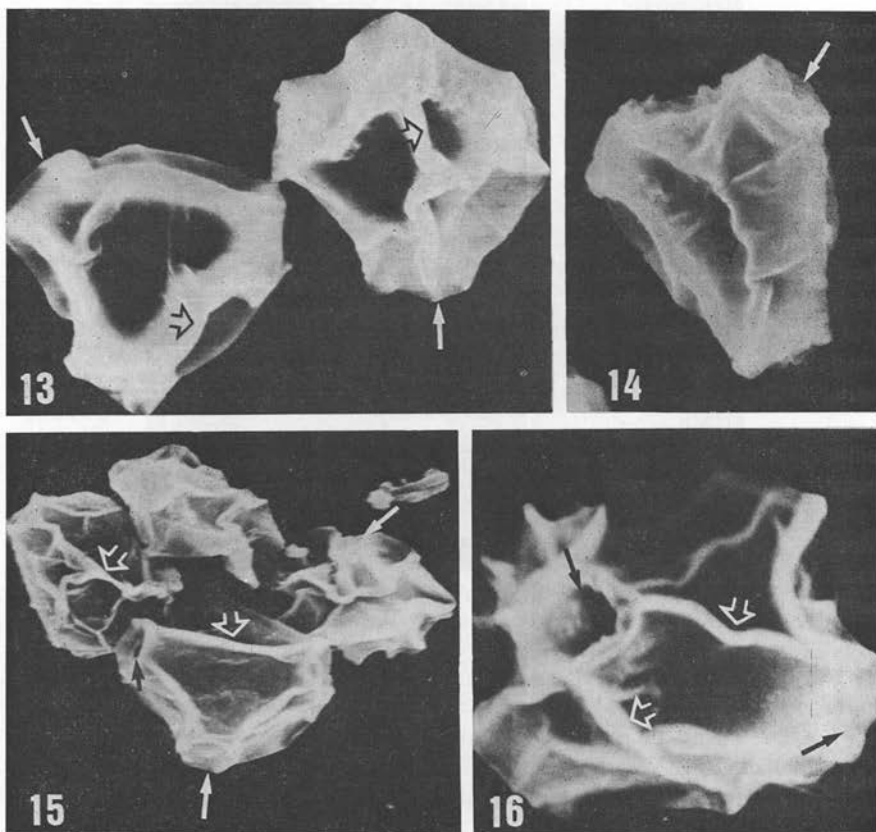


FIG. 13 à 16. — Groupe II. Opercules (→), plis (⇒).

FIG. 13. — *A. hatchetti* (souche ORL 561) ($\times 4\ 600$). Plis rares et rectilignes. FIG. 14. — *A. hatchetti* (souche SH 621-1) ($\times 4\ 200$). FIG. 15. — *A. griffini* ($\times 3\ 000$). FIG. 16. — *A. rhysoïdes* ($\times 5\ 200$).

POUR LE GROUPE III, qui, en microscopie optique, rassemble cinq espèces dont les kystes de taille moyenne (inférieure à 19 μm) sont ovoïdes ou globuleux, le problème se complique.

A. culbertsoni se caractérise par des kystes parfaitement ronds, sans opercules visibles. L'exine, le plus souvent grummeleuse, présente parfois de petites boursouffures sillonnées de rares plis à peine ébauchés (fig. 17).

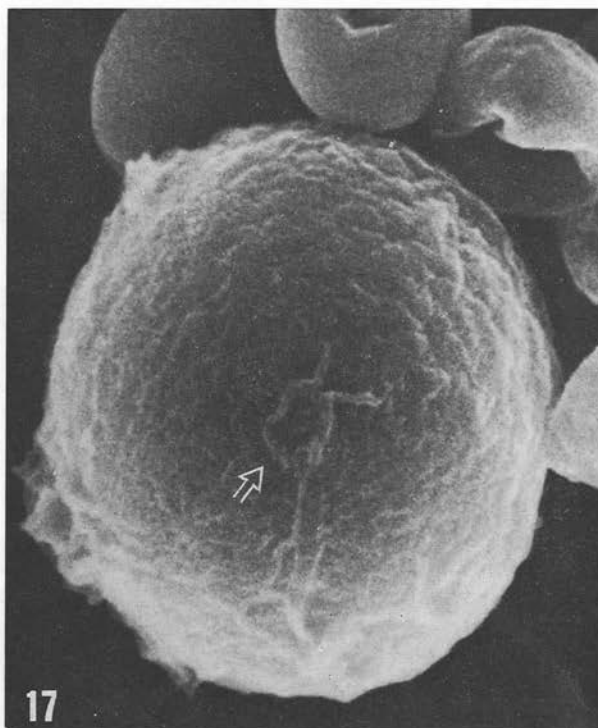


FIG. 17. — Groupe III. *A. culbertsoni* ($\times 7\ 100$).
Aspect finement plissé et régulier (\Rightarrow). Absence d'opercule visible.

A. palestinensis et *A. royreba* accentuent encore ce côté grummeleux de *A. culbertsoni*. L'exine forme de nombreux replis bouillonnés et anastomosés entre eux, les rapprochant ainsi de certaines espèces du groupe II (*A. mauritaniensis*). Les complexes operculaires sont visibles, mais peu saillants, et souvent au niveau du bord externe du kyste (fig. 18, 19).

Les deux dernières espèces, *A. pustulosa* et *A. lenticulata* semblent former une transition entre les groupes I et III : leurs kystes sont parfaitement ronds, ce qui les rattache au groupe II. Mais leur exine, forme une résille à mailles fines et régulières qui s'apparente assez aux plis superficiels du groupe I. En outre, entre les mailles

de la résille, la surface de l'exine est parfaitement lisse. Les complexes operculaires, enfin, sont peu saillants simples voussures analogues à celles de *A. palestinensis* et *A. royreba* (fig. 20, 21).

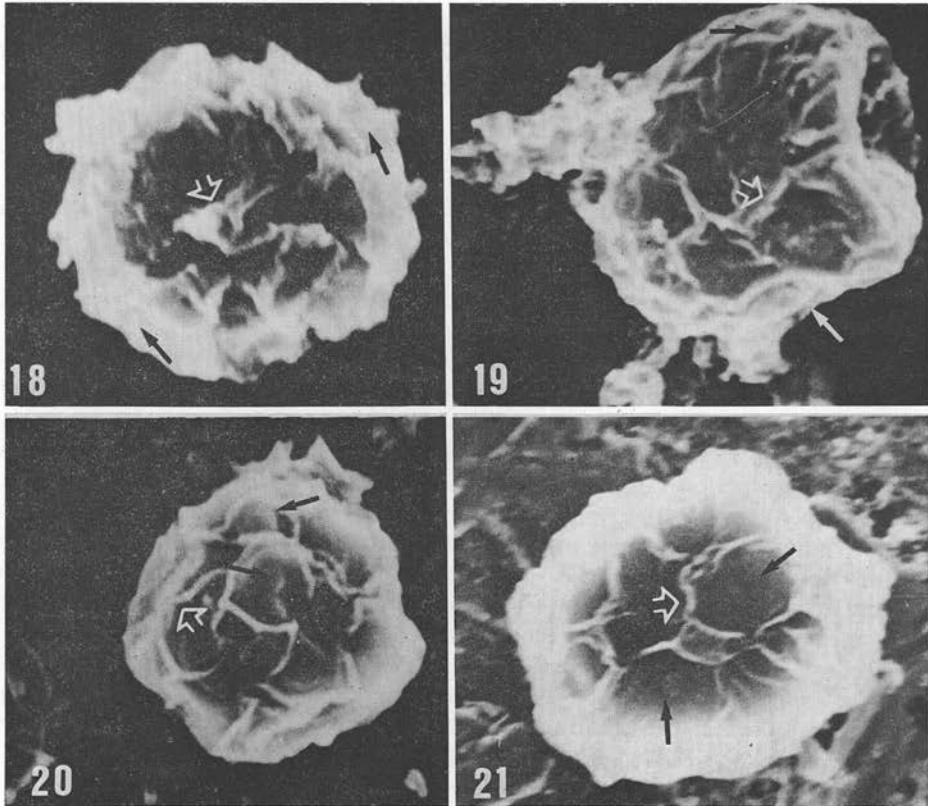


FIG. 18 à 21. — Groupe III. Opercules (\leftarrow), plis (\Rightarrow).

FIG. 18. — *A. palestinensis* ($\times 4\ 000$). Aspect plissé irrégulier. FIG. 19. — *A. royreba* ($\times 4\ 000$). Nombreux plis irréguliers et profonds. FIG. 20. — *A. pustulosa* ($\times 3\ 800$). Réseau de mailles appliqué sur l'exine. FIG. 21. — *A. lenticulata* ($\times 5\ 100$). Même aspect que *A. pustulosa*.

Discussion

Au terme de cette étude, il apparaît clairement que l'apport de la MEB est d'un intérêt limité dans l'étude taxonomique des kystes d'amibes libres.

Il est certain que la méthode peut présenter un intérêt réel pour l'étude de genres différents. Ainsi, la structure générale des *Acanthamoeba* peut s'opposer aisément à celle des *Naegleria* ou des *Tetramitus*.

Mais si le but recherché est de discriminer les différentes espèces d'un même genre, les résultats ne sont pas très encourageants. Ainsi, pour le genre *Acanthamoeba*, les 18 espèces que nous avons examinées, à la suite de Pussard et Pons, posent plusieurs problèmes.

Le groupe I, déjà individualisé par Pussard et Pons, l'est également en MEB : les caractères communs aux trois espèces de ce groupe en sont suffisamment tranchés (aspect bien étoilé dû au fort développement des bras sous l'exine lisse avec réseau de plis superficiels bien systématisé). En outre, chacune de ces trois espèces (*A. astro-nyxis*, *A. commandoni* et *A. echinulata*) présente des caractères individuels aisément repérables pour permettre le diagnostic d'espèce à partir du kyste : bras en nombre déterminé (6, 6 à 9 ou 12 à 14) et disposés dans un ou plusieurs plans.

Le groupe II, mis en évidence par Pussard et Pons, regroupe 10 espèces. Mais en MEB, plusieurs de ces espèces se ressemblent suffisamment pour former des sous-groupes indissociables en espèces :

- sous-groupe 1 (espèce type : *A. castellanii*), kyste en disque, exine bouillonnée, et complexes operculaires en périphérie du disque.
- Sous-groupe 2 (espèce type : *A. lugdunensis*), kyste polygonal et complexe operculaire large à chaque angle, replis de l'exine, nombreux et superficiels, formant un réseau à mailles étroites et fines tout autour du kyste et autour des opercules.
- Sous-groupe 3 (espèce type : *A. divionensis*) avec kyste polygonal, complexes operculaires petits et saillants entourés d'un repli de l'exine et reliés les uns aux autres par des replis souples et irréguliers formant un réseau à mailles plus larges.
- Sous-groupe 4 (espèce type : *A. hatchetti*) kyste polygonal, saillie importante des bras de l'endokyste et complexes operculaires larges bordés d'une corolle formée par l'exine. Des plis rectilignes de l'exine réunissent les corolles entre elles et bordent de larges dépressions cupulaires à pans coupés.

Mais une fois reconnue l'appartenance de l'espèce considérée à l'un de ces sous-groupes, il est impossible de pousser plus loin l'analyse : le nombre exact de bras, ou de complexes operculaires, n'est qu'approché, la structure de l'intine reste inconnue et celle de l'endokyste n'est pas toujours décelable sous les couches superficielles.

Pour le groupe III, le problème est identique :

- *A. culbertsoni* apparaît nettement à part avec sa forme ronde et son aspect grummeux, sans complexes operculaires visibles.
- *A. palestinensis* et *A. royreba*, mise à part leur forme ronde, se rapprochent plus ou moins d'*A. mauritaniensis*.
- *A. pustulosa* et *A. lenticulata* rassemblent certains caractères propres aux groupes I et III.

Conclusion

Il semble donc que, pour si belle et élégante qu'elle soit, la MEB ne puisse, à elle seule, permettre l'étude taxonomique des amibes libres au stade kystique, alors que les méthodes optiques mises au point par Pussard et Pons se révèlent satisfaisantes. En outre, la MEB impose l'emploi d'un appareillage complexe et coûteux, alors que les méthodes optiques restent à la portée de tous laboratoires.

BIBLIOGRAPHIE

1. ALLEN D., DIDIO L. J. : *Hartmannella culbertsoni* as revealed in scanning electron microscopy. *Ohio J. of Science*, 1976, 76, 167-171.
2. CHAMBERS J. A., THOMPSON J. E. : A scanning electron microscopic study of the excystment process of *Acanthamoeba castellanii*. *Exp. Cell. Res.*, 1972, 73, 415-421.
3. CIUERA-VAN SAANEN : Étude comparative des kystes de *Naegleria* et d'*Acanthamoeba* (*Hartmannella*) au microscope électronique à balayage. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 1980, 55, 645-657.
4. JADIN J. M., ESCHBACH H. L., VERHEYEN F., WILLAERT E. : Études comparatives des kystes de *Naegleria* et d'*Acanthamoeba*. *Ann. Soc. Belge Med. Trop.*, 1974, 54, 259-265.
5. LASTOVICA A. J. : Scanning electron microscopy of pathogenic and non-pathogenic *Naegleria* cysts. *Intern. J. Parasitol.*, 1974, 4, 139-147.
6. PASTERNAK J. J., THOMPSON J. E., SCHULTZ T. M. G., ZACHARIAH K. A. : A scanning electron microscopic study of the encystment of *Acanthamoeba castellanii*. *Exp. Cell. Res.*, 1970, 60, 290-297.
7. PUSSARD M., PONS R. : Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). *Protistologica*, 1977, 13, 557-598.
8. SIMITZIS-LE FLOHIC A. M., LE GOFF F., L'AZOU M. T. : Isolement d'amibes libres de la muqueuse nasale de l'homme. Risque éventuel. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 1979, 54, 121-127.