



HAL
open science

Amibes libres de l'environnement : écologie et interactions avec des micro-organismes pathogènes émergents

Vincent Thomas

► **To cite this version:**

Vincent Thomas. Amibes libres de l'environnement : écologie et interactions avec des micro-organismes pathogènes émergents. Microbiologie et Parasitologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. tel-00694418

HAL Id: tel-00694418

<https://theses.hal.science/tel-00694418>

Submitted on 4 May 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

***Amibes libres de l'environnement :
écologie et interactions avec des micro-
organismes pathogènes émergents***

Vincent Thomas

Mémoire présenté et soutenu publiquement le 11/05/2012

à l'Université Paris Sud-11, Faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry

pour l'obtention de l'

Habilitation à Diriger des Recherches

devant le Jury composé de

Pr Anne Collignon

Pr Gilbert Greub

Pr Yann Héchard

Pr Yves Lévi

Dr Jean-Yves Maillard

Remerciements

Merci à Anne Collignon, Gilbert Greub, Yann Héchard, Yves Lévi et Jean-Yves Maillard de m'avoir fait l'amitié de bien vouloir faire partie du jury de ce mémoire d'HDR.

Merci à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la construction de ma carrière scientifique de microbiologiste, soit dans l'ordre chronologique :

- Jacky Fourniat et Sylvie Bouttier à la Faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry (Laboratoire de Microbiologie Industrielle),
- Pierre Bourlioux, Anne Collignon et Hélène Bourreau à la Faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry (Dpt Microbiologie), ainsi que Joël Doré et Violaine Rochet à l'INRA de Jouy,
- Yves Lévi à la Faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry (Dpt Santé Publique), ainsi que Jean-François Loret et Michel Jousset (Suez), et Théodore Bouchez (Cemagref Antony),
- Gilbert Greub et David Baud à l'hôpital de Lausanne,
- Gerry McDonnell chez STERIS, ainsi qu'Emmanuel Comoy et Jean-Philippe Deslys au CEA de Fontenay et Romain Briandet à l'INRA de Massy.

Merci enfin à tous ceux avec qui j'ai pu collaborer / échanger au cours de ces années, dont je ne citerai pas les noms de peur d'en oublier...

Table des matières

Chapitre 1 : Introduction.....	7
1.1- Curriculum vitae.....	7
1.1.1- État civil.....	7
1.1.2- Adresse professionnelle.....	7
1.1.3- Titres universitaires.....	7
1.1.4- Parcours professionnel.....	8
1.1.5- Activités liées à l'administration.....	8
1.1.6- Activités liées à la recherche.....	8
1.1.7- Encadrement scientifique.....	9
1.2- Liste des publications.....	10
1.2.1- Revues à comité de lecture.....	10
1.2.2- Chapitres de livres.....	12
1.2.3- Conférences dans des congrès.....	12
Chapitre 2 : Contexte de nos travaux.....	14
Chapitre 3 : Écologie amibienne et résistance des amibes à la désinfection.....	18
3.1- Écologie et diversité des amibes et des bactéries résistantes aux amibes dans les réseaux d'eau : de la source au point d'usage.....	18
3.1.1- Publication : Biodiversité des amibes et des bactéries résistantes aux amibes dans une usine de production d'eau potable	20
3.1.2- Publication : Biodiversité des amibes et des bactéries résistantes aux amibes dans un réseau d'eau hospitalier.....	22
3.2- Résistance des amibes aux traitements de désinfection mis en œuvre dans les réseaux.....	23
3.2.1- Publication : Amibes dans les réseaux domestiques : résistance aux traitements de désinfection et implication dans la persistance des légionelles.....	23
3.2.2- Publication : Résistance des kystes d'Acanthamoeba aux traitements de désinfection utilisés dans les établissements de soins	25
3.2.3- Publication : Influence des conditions de croissance in vitro des Acanthamoeba sur la résistance des kystes dérivés.....	28
Chapitre 4 : Interactions amibes libres / micro-organismes	34
4.1- Les amibes libres de l'environnement : « melting-pot » du monde microbien.....	34
4.2- Interactions des amibes avec de nouvelles espèces bactériennes apparentées aux Chlamydia.....	36
4.2.1- Publication : Description d'une nouvelle espèce apparentée aux Chlamydia : Criblamydia sequanensis	38
4.2.2- Publication : Description d'une nouvelle espèce apparentée aux Chlamydia : Rhabdochlamydia crassificans (25).....	39
4.2.3- Publication : Implication de la nouvelle espèce apparentée aux Chlamydia : Waddlia chondrophila dans les avortements chez la femme	39
4.2.4- Publication : Capacité de survie dans l'environnement des nouvelles espèces bactériennes apparentées aux Chlamydia.....	40
4.3- Interactions des amibes avec les mycobactéries.....	43
4.3.1- Publication : Test de la virulence de différentes souches cliniques de Mycobacterium kansasii vis-à-vis d'Acanthamoeba castellanii.....	44
4.4- Interactions des amibes avec les virus NCLDV.....	45
4.4.1- Publication : Lausannevirus, un nouveau virus d'amibes.....	47
Chapitre 5 : Perspectives.....	51
5.1- Synthèse de nos travaux.....	51
5.2- Perspectives / développements envisagés.....	51
5.2.1- Protozoaires de l'environnement : interactions avec l'écosystème biofilm.....	52
5.2.2- Protozoaires de l'environnement : rôle dans la sélection et la dissémination de bactéries pathogènes	54
5.2.3- Protozoaires de l'environnement : amélioration des stratégies de contrôle.....	55
5.3- Collaborations en cours et envisagées.....	58
Références bibliographiques.....	59
Références fournies en annexe.....	64

Liste des Figures

Figure 1: Les amibes libres, chevaux de Troie du monde microbien.....	16
Figure 2 : Méthode de co-culture amibienne utilisée lors de nos différentes études environnementales....	19
Figure 3 : Lieux de prélèvements d'échantillons pour analyse de la flore amibienne et des micro-organismes résistants aux amibes dans une usine de potabilisation d'eau de rivière.....	20
Figure 4 : Diversité morphologique des amibes retrouvées aux différentes étapes de potabilisation.....	21
Figure 5 : Effet des traitements de désinfection sur les biofilms révélé en marquage Live/Dead.....	25
Figure 6 : Aspect en microscopie électronique des kystes obtenus à partir des différentes souches d'amibes.....	26
Figure 7 : Détection des kystes perméabilisés par le traitement SDS par marquage à l'iodure de propidium.....	28
Figure 8 : Proportion des kystes marqués par l'iodure de propidium avant et après traitement SDS.....	29
Figure 9 : Aspect en microscopie électronique à transmission des kystes produits à partir de trophozoites cultivés sur cellules HEp-2.....	29
Figure 10 : Analyse des populations de kystes en cytométrie après marquage au calcofluor.....	30
Figure 11 : Aspect des kystes en microscopie électronique à balayage.....	31
Figure 12 : Comparaison de l'efficacité des traitements de décontamination sur les kystes de 4 souches d' <i>Acanthamoeba</i> obtenus à partir de trophozoites cultivés en PYG ou sur cellules HEp-2.....	33
Figure 13 : Exemples d'échanges d'information génétique entre micro-organismes intra-amibiens.....	35
Figure 14 : Arbre phylogénétique mettant en évidence les relations phylogénétiques entre les gènes codant pour la sterol delta-7 reductase chez l'amibe <i>Naegleria gruberi</i> et chez les bactéries intracellulaires affiliées aux légionelles et aux <i>Chlamydiae</i>	35
Figure 15 : Arbre phylogénétique des <i>Chlamydiales</i> basé sur la séquence codant pour l'ARN ribosomal 16S.....	37
Figure 16 : infection d' <i>Acanthamoeba castellanii</i> par <i>Criblamydia sequanensis</i>	38

Figure 17 : Survie extra-cellulaire des <i>Chlamydia</i> -like et de <i>Chlamydia trachomatis</i>	42
Figure 18 : Détection de <i>Chlamydia trachomatis</i> dans la souche d' <i>Acanthamoeba</i> sp2.....	42
Figure 19 : Évolution du pourcentage d'amibes infectées et du nombre de bactéries par amibe lors de l'infection d' <i>Acanthamoeba castellanii</i> par différents sous-types de <i>Mycobacterium kansasii</i>	45
Figure 20 : Arbre phylogénétique de virus représentatifs du groupe des NCLDV (nucleocytoplasmic large DNA viruses).....	46
Figure 21 : Observation de Lausannevirus en coloration de Gimenez.....	47
Figure 22 : Observation de Lausannevirus en microscopie électronique à transmission.....	47
Figure 23 : déroulement du cycle d'infection d' <i>Acanthamoeba castellanii</i> par Lausannevirus.....	48
Figure 24 : Nuage de points construit à partir de l'emplacement dans le génome des protéines orthologues entre Lausannevirus et Marseillevirus.....	49
Figure 25 : Phylogénie et répartition des motifs d'histones trouvés chez Lausannevirus et Marseillevirus..	50

Liste des Tables

Table 1 : Répartition des isolats amibiens retrouvés aux différentes étapes de potabilisation.....	22
Table 2 : Effet des traitements de décontamination à base de glutaraldéhyde sur les trophozoites amibiens.....	27
Table 3 : Effet de différents traitements de décontamination sur les kystes amibiens.....	27
Table 4 : Pathologies associées aux nouvelles espèces bactériennes apparentées aux <i>Chlamydia</i>	36
Table 5 : Efficacité de l'infection de différentes souches d' <i>Acanthamoeba</i> par les <i>Chlamydia</i> -like.....	41
Table 6 : Efficacité des traitements de désinfection sur les <i>Chlamydia</i> -like.....	41

Abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARNr : Acide ribonucléique ribosomique

ATCC : American Type Culture Collection

EPA : US Environmental Protection Agency

GFP : Green Fluorescent Protein

IP : iodure de propidium

MALDI-TOF MS : Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation time-of-flight mass spectrometry

NCLDV : nucleocytoplasmic large DNA viruses

NNA : Non-Nutrient Agar (agar non-nutritif utilisé pour la culture des amibes sur *Escherichia coli*)

NTM : non-tuberculous mycobacteria

PCR : Polymerase Chain Reaction

PYG : Proteose peptone, Yeast extract, Glucose (milieu utilisé pour la culture axénique des amibes du genre *Acanthamoeba*)

SDS : sodium dodecyl sulfate

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

Chapitre 1 : Introduction

1.1- Curriculum vitae

1.1.1- État civil

- Nom et prénom : THOMAS, Vincent
- Date et lieu de naissance : 23 mai 1973 à Paris, 14ème arrondissement
- Nationalité : Français

1.1.2- Adresse professionnelle

- Laboratoire de Recherche de la société STERIS SA
Commissariat à l'Énergie Atomique (CEA)
18, route du Panorama - 92265 Fontenay-aux-Roses FRANCE
- E-mails : vincent_thomas@steris.com (professionnel) ; vincethom2009@yahoo.fr (personnel)
- Téléphone : +33 1 46 54 85 57 (fixe), +33 6 75 74 00 16 (portable)

1.1.3- Titres universitaires

- **2000-2004 : Thèse de doctorat en Écologie Microbienne**, Faculté de Pharmacie, Université Paris 11
 - Sujet : Écologie de *Legionella pneumophila* dans les réseaux de distribution d'eau potable – Interactions biofilms/amibes – Évaluation de l'efficacité des traitements biocides.
 - Travail sous forme de convention CIFRE entre le Laboratoire de Santé Publique Environnement de la Faculté de Pharmacie (P^r Yves Levi) et le Centre International de Recherche sur l'Eau et l'Environnement du Groupe SUEZ (CIRSEE, Le Pecq).
 - Diplômé avec mention du Jury.
 - Manuscrit téléchargeable à l'adresse suivante : <http://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00116971>
- **1997-1998 : Diplôme d'Études Approfondies** en Écologie Microbienne, Pathogénèse et Antibiothérapie, Faculté de Pharmacie, Université Paris 11
 - Sujet : Étude d'une flore de barrière à *Clostridium difficile*.
 - Travail collaboratif entre le Département de Microbiologie de la Faculté (P^r Pierre Bourlioux) et l'INRA de Jouy-en-Josas (D^r Joël Doré).
- **1991-1997 : Docteur en Pharmacie**, Faculté de Pharmacie, Université Paris 11. Filière Industrie, certificats de spécialisation en Bactériologie et Virologie.

1.1.4- Parcours professionnel

- *Depuis Mai 2006* : **Responsable R&D**, employé par la société STERIS pour développer et diriger un laboratoire de recherche en microbiologie hébergé dans les locaux du CEA de Fontenay-aux-Roses.
 - Responsable de cinq employés : un chercheur, deux techniciens et deux étudiants en thèse.
 - En charge de la coordination de plusieurs projets de recherche pour l'étude de pathogènes émergents et l'étude de l'efficacité des traitements biocides des vis-à-vis de nombreuses espèces/souches de bactéries, de protozoaires, de virus et de prions.
 - Collaborations avec des laboratoires de R&D publics et privés en Europe et aux États-Unis.
 - Représentant scientifique de la société STERIS dans divers congrès internationaux de microbiologie.
- *Mai 2004 - Avril 2006* : **Post-doctorat** dans le laboratoire de Recherche sur les Bactéries Intracellulaires, Institut de Microbiologie, Centre Hospitalier Universitaire de Lausanne, Suisse (D^r Gilbert Greub). Étude de l'écologie des amibes et de leurs hôtes intracellulaires : légionelles, mycobactéries, chlamydia, nouveaux virus ... Installation du laboratoire, prise en charge de plusieurs projets de recherche en vue d'une publication rapide de résultats. Formation de plusieurs étudiants et techniciens. Rédaction de demandes de financement et de rapports d'activité.
- *Novembre 1998 - Décembre 1999* : **Assistant de Recherche**, Faculté de Pharmacie, Université Paris 11. Développement d'outils moléculaires (PCR, sondes spécifiques de détection) pour l'étude du devenir *in vivo* de ferments lactiques. Projet mené au sein du Département de Microbiologie (P^r Pierre Bourlioux), en collaboration avec la compagnie Danone.

1.1.5- Activités liées à l'administration

Représentant de la société STERIS au Conseil d'Administration de la Fondation de Recherche Alliance Biosecure (www.fondation-alliance-biosecure.org). Fondation reconnue d'utilité publique qui lance une à deux fois par an des appels à projets dans le domaine de la compréhension et de la maîtrise du risque infectieux dans les produits biologiques. Participation à la vie de la Fondation : définition des objectifs, budgets, appels d'offre, suivi des projets financés ...

1.1.6- Activités liées à la recherche

- Coordinateur du projet « Plateforme Globale de Décontamination » labellisé par le pôle de compétitivité Medicen Région Ile-de-France : rédaction et présentation du projet devant les membres du pôle, coordination et suivi du projet (2007-2010). Ce projet doté d'une subvention de 3,5 millions d'Euros a fait intervenir plusieurs équipes de R&D publiques (INRA, CEA, AP-HP, INSERM) et privées (STERIS, LFB, Texcell, Genethon, Hutchinson Santé) .

- Participation à des Comités de Pilotage de Thèse :
 - Thèse de M^{elle} Emilie Fouque à l'Université de Poitiers (équipe P^r Yann Héchard, démarrage en novembre 2010) : Mise au point d'une stratégie innovante de maîtrise des amibes dans les biofilms
 - Thèse de M^r Arnaud Bridier réalisée à l'INRA de Massy (équipe D^r Romain Briandet, 2008 - 2011) : Étude de la formation de biofilms et de l'action de traitements biocides sur ces biofilms
- Plus de 25 articles de recherche reviewés pour des revues internationales avec comité de lecture depuis 2008. Reviewing de projets de R&D en réponse à différents appels d'offre.
- Organisation avec la Fondation Alliance Biosecure d'un colloque « Risques infectieux émergents liés aux biotechnologies : Principe de précaution et Innovation » qui s'est tenu en juin 2010 au Ministère de la Santé.
- Participation à des conseils scientifiques : CS du Colloque Réseau National Biofilm 2011.
- Nombreuses collaborations internationales en cours.

1.1.7- Encadrement scientifique

- Encadrement (à 75%) de la Thèse de M^{elle} Céline Coulon réalisée d'octobre 2007 à mars 2011 sous forme de convention CIFRE entre STERIS et la Faculté de Pharmacie (P^r Anne Collignon). Titre : « Amibes libres de l'environnement : Résistance aux traitements de désinfection et interactions avec les *Chlamydiales* ». Thèse soutenue en avril 2011 avec la mention Très Honorable et proposition à un prix de Thèse. Trois articles publiés dans « Journal of Clinical Microbiology », « Journal of Eukaryotic Microbiology » et « FEMS Immunology and Medical Microbiology ». Ces travaux ont aussi donné lieu à la présentation de cinq posters et une communication orale dans des congrès internationaux. Le manuscrit de la thèse est téléchargeable à l'adresse suivante : <http://www.theses.fr/2011PA114806#>
- Co-encadrement (à 25%) de la Thèse de M^{me} Angélique Egalon débutée en mars 2010 sous forme de convention CIFRE entre STERIS et le CEA de Fontenay-aux-Roses (D^r Jean-Philippe Deslys), en partenariat avec l'INRA de Jouy-en-Josas (D^r Human Rezaei). Titre de la Thèse : « Étude des mécanismes sous-tendant l'inactivation des prions et application aux autres protéines impliquées dans les pathologies amyloïdes ». Pas de publications ni de posters pour le moment.
- Encadrement (à 100%) du stage de Maîtrise de M^{elle} Hedia Arfaoui (2006-2007, Université Paris 7 Denis Diderot). Titre du mémoire : « Décontamination du matériel médical: efficacité du traitement au peroxyde d'hydrogène gazeux VHP STERIS ». Ce travail a donné lieu à la présentation d'un poster au congrès de la Société Américaine de Microbiologie (ASM) à Boston en 2008.
- Encadrement (à 75%) du stage « BN Forschung » de M^{me} Katia Herrera-Rimann (2005, Institut de Microbiologie de l'hôpital de Lausanne, Suisse). Thème de recherche : Interactions amibes-espèces bactériennes résistantes aux amibes. Ce travail a donné lieu à la publication d'un article dans « Applied and Environmental Microbiology » en 2006.

1.2- Liste des publications

1.2.1- Revues à comité de lecture

Liens internet sur le document électronique: cliquer sur les [caractères bleus](#) pour avoir accès au résumé de la publication correspondante, sur les [caractères rouges](#) pour avoir accès à l'article au format pdf (articles en libre accès). Les publications pour lesquelles les copies figurent en annexe de ce mémoire sont indiquées par la mention "[Publication en annexe](#)".

- *Publications liées aux travaux de DEA*

1. **Thomas, V.**, V. Rochet, H. Boureau, C. Ekstrand, S. Bulteau, J. Dore, A. Collignon, and P. Bourlioux. 2002. Molecular characterization and spatial analysis of a simplified gut microbiota displaying colonization resistance against *Clostridium difficile*. [Microb Ecol Health Dis](#) 14:203-210

- *Publications liées aux travaux de thèse*

2. **Thomas, V.**, T. Bouchez, V. Nicolas, S. Robert, J. F. Loret, and Y. Lévi. 2004. Amoebae in domestic water systems: resistance to disinfection treatments and implication in Legionella persistence. [J Appl Microbiol](#) 97:950-963. [Publication en annexe](#)
3. Loret, J., S. Robert, **V. Thomas**, A. J. Cooper, W. F. McCoy, and Y. Lévi. 2005. Comparison of disinfectants for biofilm, protozoa and legionella control. [Journal of Water and Health](#):423-433

- *Publications liées aux travaux de post-doctorat*

4. **Thomas, V.**, N. Casson, and G. Greub. 2006. *Criblamydia sequanensis*, a new intracellular *Chlamydiales* isolated from Seine river water using amoebal co-culture. [Environmental Microbiology](#) 8:2125-2135. [Publication en annexe](#)
5. **Thomas, V.**, K. Herrera-Rimann, D. S. Blanc, and G. Greub. 2006. Biodiversity of amoebae and amoebae-resisting bacteria in a hospital water network. [Applied and Environmental Microbiology](#) 72:2428–2438. [Publication en annexe](#)
6. Goy, G., **V. Thomas**, K. Rimann, K. Jaton, G. Prod'hom, and G. Greub. 2007. The Neff-strain of *Acanthamoeba castellanii*, a tool to test the virulence of *Mycobacterium kansasii*. [Research in Microbiology](#) 158:393-397. [Publication en annexe](#)
7. Corsaro, D., **V. Thomas**, G. Goy, D. Venditti, R. Radek, and G. Greub. 2007. '*Candidatus* Rhabdochlamydia crassificans', an intracellular bacterial pathogen of the cockroach *Blatta orientalis* (Insecta: Blattodea). [Syst Appl Microbiol](#) 30:221-228
8. Baud, D., **V. Thomas**, A. Arafa, L. Regan, and G. Greub. 2007. *Waddlia chondrophila*, a potential agent of human fetal death. [Emerg Infect Dis](#) 13:1239-43. [Publication en annexe](#)

9. **Thomas, V.**, N. Casson, and G. Greub. 2007. New *Afiplia* and *Bosea* strains isolated from various water sources by amoebal co-culture. [Syst Appl Microbiol](#) 30:572-9
 10. Loret, J. F., M. Jousset, S. Robert, G. Saucedo, F. Ribas, **V. Thomas**, and G. Greub. 2008. Amoebae-resisting bacteria in drinking water: risk assessment and management. [Water Sci Technol](#) 58:571-577
 11. **Thomas, V.**, J. F. Loret, M. Jousset, and G. Greub. 2008. Biodiversity of amoebae and amoebae-resisting bacteria in a drinking water treatment plant. [Environmental Microbiology](#) 10:2728-2745. **Publication en annexe**
- *Publications liées aux travaux menés depuis 2006*
12. **Thomas, V.**, and G. McDonnell. 2007. Relationship between mycobacteria and amoebae: ecological and epidemiological concerns. [Lett Appl Microbiol](#) 45:349-57. **Publication en annexe**
 13. Eterpi, M., G. McDonnell, and **V. Thomas**. 2009. Disinfection efficacy against parvoviruses in comparison to reference viruses. [Journal of Hospital Infection](#) 73:64-70
 14. Eterpi, M., G. McDonnell, and **V. Thomas**. 2010. Decontamination efficacy against *Mycoplasma*. [Letters in Applied Microbiology](#) 52:150–155
 15. Eterpi, M., G. McDonnell, and **V. Thomas**. 2010. Virucidal activity of disinfectants against parvoviruses and reference viruses. *Applied Biosafety: Journal of the American Biological Safety Association* 15:165-171
 16. Coulon, C., A. Collignon, G. McDonnell, and **V. Thomas**. 2010. Resistance of *Acanthamoeba* cysts to disinfection treatments used in health care settings. [Journal of Clinical Microbiology](#) 48:2689-97. **Publication en annexe**
 17. **Thomas, V.**, G. McDonnell, S. P. Denyer, and J.-Y. Maillard. 2010. Free-living amoebae and their intracellular pathogenic microorganisms: risks for water quality. [FEMS Microbiology Reviews](#) 34:231-259. **Publication en annexe**
 18. **Thomas, V.**, and G. Greub. 2010. Amoebae/amoebal symbionts genetic transfers: lessons from giant viruses neighbours. [Intervirology](#) 53:254-267. **Publication en annexe**
 19. Bridier, A., F. Dubois-Brissonnet, A. Boubetra, **V. Thomas**, and R. Briandet. 2010. The biofilm architecture of sixty opportunistic pathogens deciphered using a high throughput CLSM method. [Journal of Microbiological Methods](#) 82:64-70
 20. Bridier, A., D. Le Coq, F. Dubois-Brissonnet, **V. Thomas**, S. Aymerich, and R. Briandet. 2011. The spatial architecture of *Bacillus subtilis* biofilms deciphered using a surface-associated model and in situ imaging. [PLoS ONE](#) 6:e16177
 21. Bridier, A., E. Tischenko, F. Dubois-Brissonnet, J. M. Herry, **V. Thomas**, F. Daddi-Oubekka, F. Waharte, K. Steenkeste, M. P. Fontaine-Aupart, and R. Briandet. 2011. Deciphering biofilms structure and reactivity by multiscale time-resolved fluorescence analysis. [Advances in Experimental Medicine and Biology](#) 715:333-49
 22. Bridier, A., F. Dubois-Brissonnet, G. Greub, **V. Thomas**, and R. Briandet. 2011. Dynamics of the action of biocides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. [Antimicrobial Agents and Chemotherapy](#) 55:2648-54

23. Bridier, A., R. Briandet, **V. Thomas**, and F. Dubois-Brissonnet. 2011. Comparative biocidal activity of peracetic acid, benzalkonium chloride and ortho- phthalaldehyde on 77 bacterial strains. [Journal of Hospital Infection](#) 78:208-213
24. Bridier, A., R. Briandet, **V. Thomas**, and F. Dubois-Brissonnet. 2011. **Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review** *Biofouling* 27:1017-32
25. **Thomas, V.**, C. Bertelli, F. Collyn, N. Casson, A. Telenti, A. Goesmann, A. Croxatto, and G. Greub. 2011. Lausannevirus, a giant amoebal virus encoding histone doublets. [Environmental Microbiology](#) 13:1454-56.
Publication en annexe
26. Coulon, C., M. Eterpi, G. Greub, A. Collignon, G. McDonnell, and **V. Thomas**. 2012. Amoebal host-range, host-free survival and disinfection susceptibility of environmental Chlamydiae as compared to Chlamydia trachomatis. [FEMS Immunology and Medical Microbiology](#) - Accepted article - doi: 10.1111/j.1574-695X.2011.00919.x.
Publication en annexe
27. Coulon, C., N. Deschamps, T. Meylheuc, A. Collignon, G. McDonnell, and **V. Thomas**. 2012. The effect of in vitro growth conditions on the resistance of Acanthamoeba cysts. *Journal of Eukaryotic Microbiology* – In Press.
Publication en annexe
28. Fouque, E., M.-C. Trouilhé, **V. Thomas**, P. Hartemann, M.-H. Rodier, and Y. Héchard. 2012. Cellular and molecular changes during encystment of free-living amoebae. *Eukaryotic Cell* - In Press.

1.2.2- Chapitres de livres

1. **Thomas, V.** 2012. Sensitivity and resistance of protozoa to biocides. In A. Fraiese, Lambert, PA and Maillard, J-Y (ed.), [Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization](#) - 5th edition - In Press
2. **Thomas, V.** 2012. Ecology and diversity of amoebal symbionts and amoebal pathogens. *In* G. Greub (ed.), *Free-living amoebae: an evolutionary crib for emerging pathogens* – In Press

1.2.3- Conférences dans des congrès

1. **Thomas, V.** 2006. La mesure et la prédiction de la virulence. Presented at the Colloque Ecomicth : "Légionelles et légionellose : Avancées effectives et questions sensibles", Paris, France, 27 Octobre.
2. **Thomas, V.**, and J. Mills. 2008. Amsco V-Pro™ 1 – A new low temperature sterilization system by STERIS. Presented at the 30rd CEFH meeting, Nantes, France, 8 April.
3. **Thomas, V.** 2011. La stérilisation à la vapeur sèche H₂O₂. Presented at the 6ème Forum du Département Génie Biomédical de l'Ecole Supérieure d'Ingénieurs de Luminy Marseille, France, 30 November.
4. **Thomas, V.** 2011. A review of new sterilization technologies. Presented at the XIXth CEDEST Meeting Albacete, Spain, 11-13 May.

5. **Thomas, V.** 2011. Développement et évaluation de traitements biocides actifs contre les biofilms. Presented at the Colloque AdebioTech / Réseau National Biofilms: Gestion des biofilms, enjeux industriels, Romainville, France, 13 October.
6. **Thomas, V.** 2011. Amibes libres et pathogènes intra-amibiens : le risque ne se limite pas aux légionelles. Presented at the Colloque de l'Association Scientifique Européenne pour l'Eau et la Santé, Paris, France, 18 November.
7. De Broglie, V., and **V. Thomas.** 2011. Enhancing precompetitive research to increase safety of biological products in the field of emerging pathogens. Presented at the Ensuring Adventitious Agents Safety In Biologics, Munich, Germany, 18-19 October.
8. Coulon, C., A. Collignon, G. McDonnell, and **V. Thomas.** 2010. Resistance of amoebal cysts and trophozoites to disinfection treatments commonly used in healthcare settings. Presented at the ICAR 2010 meeting, Valladolid, Spain, 3-5 November.

Chapitre 2 : Contexte de nos travaux

La maîtrise du risque infectieux au sein de différents environnements (hôpitaux, industrie agroalimentaire...) passe par une meilleure compréhension des différents écosystèmes microbiologiques en place dans ces environnements. Ces deux dernières décennies ont ainsi vu émerger le concept de biofilm, communauté microbienne complexe constituée de multiples espèces bactériennes interagissant entre elles (interactions métaboliques, échanges génétiques) et avec leur environnement. L'étude de ces biofilms a clairement mis en évidence leur importance dans un grand nombre de problématiques ayant trait au risque infectieux : protection de micro-organismes pathogènes vis-à-vis de traitements biocides, barrière biologique empêchant l'implantation de flores pathogènes... Les biofilms rencontrés dans l'environnement sont complexes, composés de multiples espèces bactériennes mais aussi de virus (phages) et de micro-organismes eucaryotes. Une meilleure maîtrise de la composition de ces biofilms, et notamment de leur colonisation par des micro-organismes pathogènes, passe obligatoirement par une meilleure compréhension de l'écologie de ces biofilms et de l'impact des activités humaines (traitements biocides, pollutions...) sur leur composition. Des travaux de plus en plus nombreux montrent que les amibes libres de l'environnement jouent un rôle central dans l'écologie de l'écosystème biofilm. Ce sont des micro-organismes eucaryotes unicellulaires dont les ancêtres sont apparus avant les organismes pluricellulaires. Elles sont ubiquitaires, se nourrissant de bactéries qu'elles «broutent» à la surface des biofilms (Fig. 1), et régulent ainsi de manière importante les populations bactériennes de ces biofilms (47). Cependant de nombreuses espèces bactériennes (mais aussi eucaryotes et virales) ont développé la capacité de résister à ces «phagocytes professionnels» et peuvent tirer bénéfice de l'interaction avec les amibes en résistant à la digestion intracellulaire et/ou en proliférant de manière importante dans le trophozoite amibien (cellule en état de croissance active). Or les mécanismes permettant la résistance à la digestion par les amibes sont fréquemment similaires à ceux permettant aux micro-organismes infectieux de résister à la digestion par les macrophages ; la conséquence en est que les espèces bactériennes qui ont développé des mécanismes de résistance à la digestion par les amibes au cours de leur évolution sont aussi potentiellement pathogènes pour les organismes supérieurs, dont l'homme et les animaux. Ces similarités entre les mécanismes de virulence vis-à-vis des amibes et des eucaryotes supérieurs ont été largement démontrées pour l'espèce bactérienne *Legionella pneumophila* (22) mais aussi pour *Mycobacterium avium* (23) et plus récemment pour *Salmonella enterica* Typhimurium (72). Par ailleurs, parmi plus de 500 espèces bactériennes pathogènes pour l'homme et les animaux recensées par l'agence américaine de protection de l'environnement (EPA), une revue exhaustive de la littérature nous a permis de démontrer qu'au moins 20% sont capables de résister aux amibes ((96), **publication en annexe**). Une fois à l'intérieur des amibes les bactéries sont protégées vis-à-vis de l'action de traitements biocides utilisés dans les réseaux d'eau potable (chlore) qui sont peu efficaces vis-à-vis des trophozoites amibiens, et peuvent éventuellement se multiplier en grand nombre dans la cellule infectée (90). A titre d'exemple une amibe infectée par une légionelle peut libérer plus de 10^3 nouvelles bactéries en quelques heures (18). Les amibes constituent donc une niche écologique dans laquelle des bactéries potentiellement pathogènes peuvent survivre, se multiplier, mais

aussi échanger des informations génétiques : l'analyse des génomes de micro-organismes capables de survivre dans les amibes démontre clairement l'existence de ces échanges génétiques entre bactéries intracellulaires ainsi qu'avec l'hôte amibien et avec certains types de virus capables d'infecter les amibes (59, 75, 92). Un degré supplémentaire de protection des micro-organismes intra-amibiens vis-à-vis des traitements biocides est apporté par la capacité de certaines de ces espèces bactériennes à survivre dans les kystes amibiens. Ces kystes sont les formes de dormance dans lesquelles se différencient les amibes en réaction à différents stress, leur paroi contient notamment de la cellulose et ils sont extrêmement résistants aux températures élevées, à la dessiccation et à différents types de traitements biocides (26, 96). En plus de nombreuses espèces responsables d'infections nosocomiales (*Legionella*, mycobactéries, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*...), de nombreuses espèces bactériennes pathogènes de première importance dans le domaine des industries agro-alimentaires sont concernées par ces interactions avec les amibes (87, 96) :

- Survie dans les trophozoites pour différentes espèces de *Listeria* (contesté), différentes espèces d'*Aeromonas*, *Coxiella burnetii* et *Helicobacter pylori* ;
- Survie et croissance dans les trophozoites pour *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157H7, *Francisella philomiragia*, *Rhodococcus equi*, *Salmonella typhimurium* ;
- Survie et croissance dans les trophozoites ainsi que survie dans les kystes pour *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (ainsi que la plupart des autres espèces de mycobactéries), *Francisella tularensis*, *Shigella sonnei* et *Shigella dysenteriae*.

De nouvelles espèces bactériennes considérées comme pathogènes émergents sont aussi capables de se multiplier en grand nombre dans les amibes : c'est le cas notamment de nouvelles espèces environnementales de *Chlamydiales* regroupées sous le terme «*Chlamydia-like*» qui sont aujourd'hui considérées comme responsables probables de pneumonies d'étiologie inconnue et d'avortements spontanés chez l'homme ainsi que d'avortements chez les bovins (9, 12, 55).

Les amibes résistent aux traitements mis en œuvre pour la potabilisation de l'eau (94) et sont donc retrouvées dans la plupart des réseaux d'eau domestique ou industrielle. Elles ont été isolées de plus de 90% des réseaux d'eau d'habitations (82), ainsi que des réseaux d'eau hospitaliers (93), de tours aéro-réfrigérantes (67) ... Elles ont aussi été détectées dans des élevages de volaille (8), dans des réfrigérateurs (100), sur des surfaces de travail d'abattoirs (98), dans des sols potentiellement utilisés pour le pâturage (amibes infectées par *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*) (102)... Il est donc de plus en plus évident que les amibes constituent les "Chevaux de Troie" du monde microbien, permettant la sélection, la dissémination et la prolifération d'espèces bactériennes pathogènes via les réseaux d'eau (Fig.1).

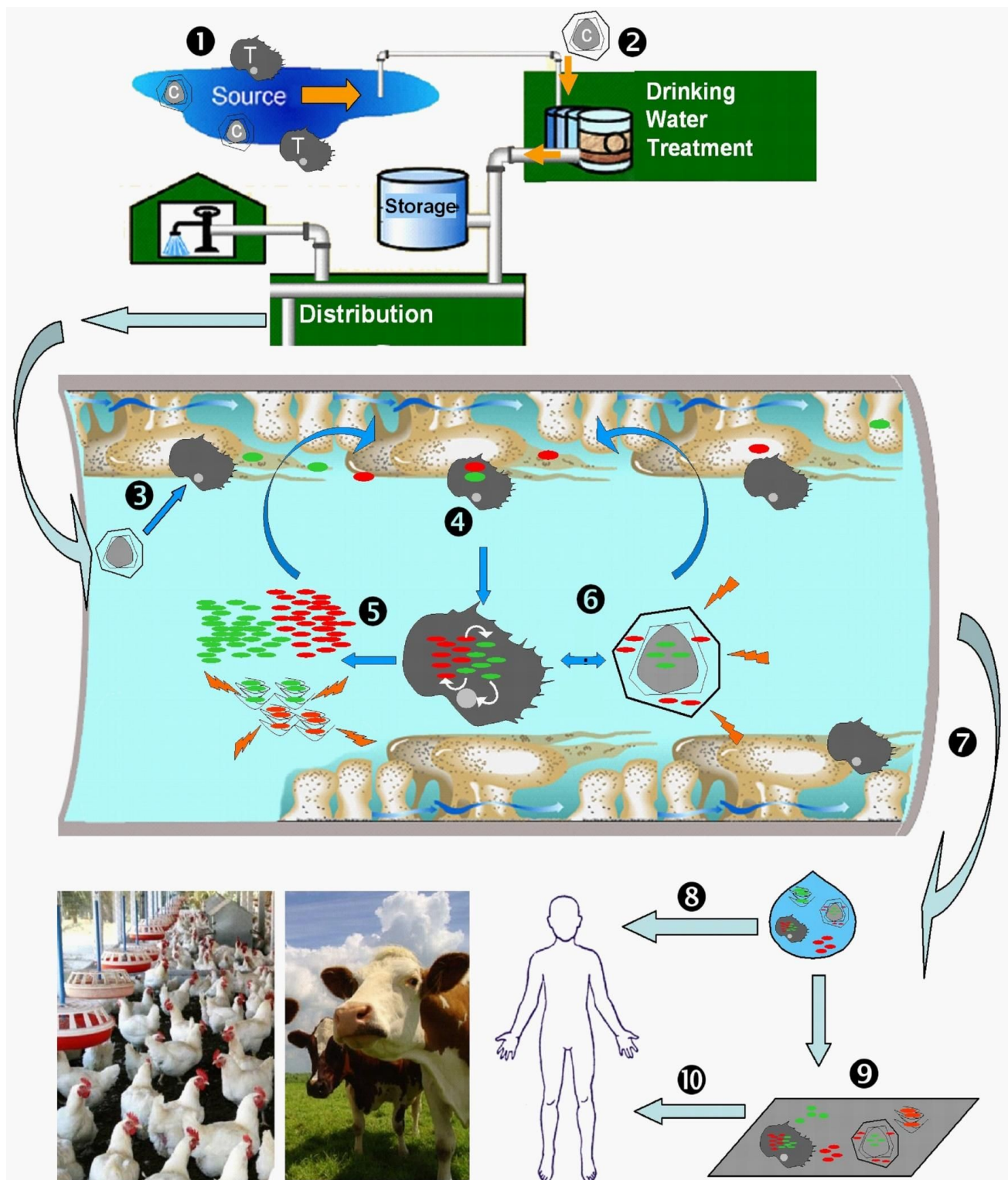


Figure 1: Les amibes libres, chevaux de Troie du monde microbien.

❶ Les kystes (c) et les trophozoïtes (T) amibiens sont naturellement présents dans les eaux de surfaces utilisées pour la production d'eau potable, ❷ les kystes résistent aux traitements mis en œuvre pour la potabilisation de l'eau, ❸ une fois dans le réseau les amibes se désenkystent et se nourrissent en ingérant les bactéries des biofilms, ❹ les bactéries résistant à la digestion par les amibes peuvent éventuellement se multiplier dans les trophozoïtes et échanger des informations génétiques entre elles et avec l'hôte, ❺ des quantités importantes de bactéries ainsi que des vésicules remplies de bactéries sont libérées à partir des amibes infectées, ❻ en cas de stress environnemental les trophozoïtes peuvent former des kystes dans lesquels certaines espèces bactériennes peuvent survivre (démonstré pour les légionelles, les mycobactéries, *Vibrio cholerae* et *Francisella*), ❼ l'eau contaminée peut servir de vecteur d'infection pour l'homme et l'animal par ❽ inhalation ou ingestion de bactéries libres, d'amibes infectées ou de vésicules chargées de bactéries, ou ❾ par contamination de surfaces ou de sols qui contamineront par la suite l'homme et les animaux ❿. Illustration du biofilm adaptée de Center for Biofilm Engineering, MSU-Bozeman 1996.

Plan de présentation de nos travaux de recherche

Afin de permettre une compréhension plus aisée par le lecteur ces travaux ne sont pas repris dans leur ordre chronologique de publication. Dans un premier temps nous reprenons dans le chapitre 3 le cheminement décrit dans la Figure 1 : étude environnementale de la diversité des amibes et des bactéries résistantes aux amibes depuis la source servant à la production d'eau potable jusqu'au point d'usage dans les réseaux, et résistance des kystes amibiens aux traitements de désinfection mis en œuvre dans ces systèmes. Dans le chapitre 4, nous décrivons plus précisément les interactions des amibes avec de nouveaux microorganismes pathogènes potentiels isolés lors de nos études environnementales : nouvelles espèces de *Chlamydiae*, mycobactéries et nouveau virus.

Chapitre 3 : Écologie amibienne et résistance des amibes à la désinfection

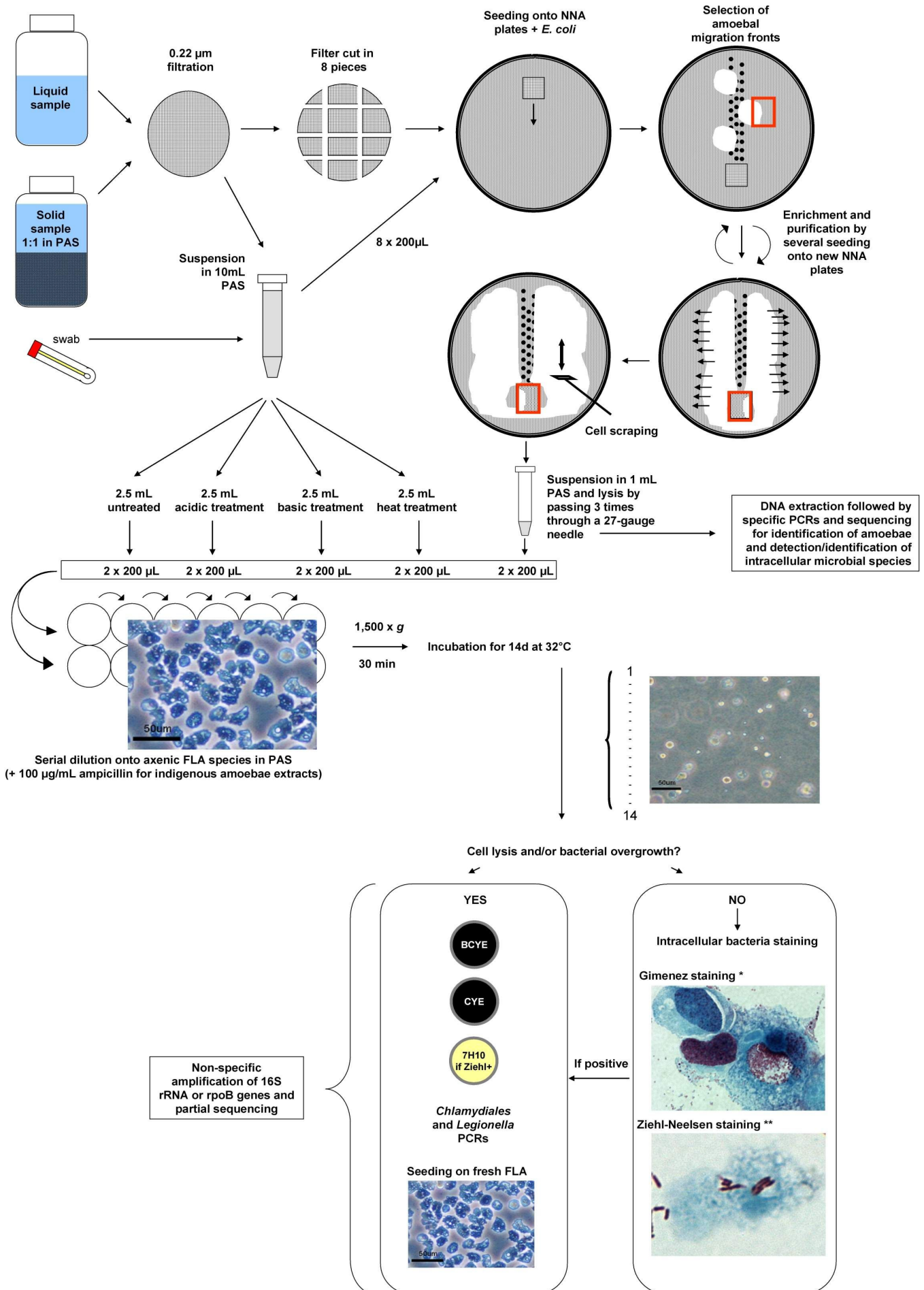
3.1- Écologie et diversité des amibes et des bactéries résistantes aux amibes dans les réseaux d'eau : de la source au point d'usage

Durant notre post-doctorat réalisé au sein de l'Institut de Microbiologie de l'Hôpital de Lausanne, en Suisse, nous avons étudié l'écologie et la diversité des amibes dans différents types d'environnements, ainsi que leurs interactions avec différents types de micro-organismes. Nous avons adapté (34) une méthode de **co-culture amibienne** consistant à ensemencer des échantillons environnementaux (eau filtrée sur membrane, biofilms) sur des amibes provenant de l'American Type Culture Collection (souche *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010), et à surveiller la prolifération éventuelle de micro-organismes dans les amibes inoculées à l'aide de différents outils (colorations non spécifiques, coloration de Ziehl pour les mycobactéries, PCR spécifiques de légionelles ou de *Chlamydiae*...) (Fig. 2). En cas de détection de micro-organismes dans les co-cultures amibiennes, différentes stratégies étaient mises en œuvre pour isoler et purifier les micro-organismes : culture sur milieux spécifiques des mycobactéries, culture sur milieux spécifiques des légionelles, ré-ensemencement en dilution limite sur *A. castellanii* ATCC 30010... L'objectif était d'isoler de nouvelles espèces bactériennes non détectées par culture sur les milieux classiques : intracellulaires stricts non cultivables ou intracellulaires facultatifs qui, mêmes s'ils sont cultivables, sont normalement masqués par la flore majoritaire. L'intérêt de la méthode est donc double : élimination de la flore majoritaire non pathogène qui est phagocytée et digérée par les amibes, et sélection de micro-organismes dont la capacité à résister à la digestion et à survivre dans les amibes pourrait éventuellement indiquer une pathogénicité pour l'homme et/ou l'animal. La méthode a été appliquée à deux types d'environnements particulièrement critiques : usine de production d'eau potable à partir de l'eau de Seine et eau du réseau de l'hôpital de Lausanne. Dans les deux cas les échantillons d'eau et de biofilms étaient ensemencés sur la souche d'amibe *A. castellanii* ATCC 30010 et une **recherche d'amibes « indigènes »** naturellement présentes dans les échantillons était réalisée sur ces mêmes échantillons afin de mieux préciser l'étendue de la colonisation et de la diversité amibienne dans ces environnements. Les bactéries et les amibes étaient identifiées par PCR et séquençage avec des amorces ciblant l'ARNr 16S et l'ARNr 18S, respectivement.

Figure 2 (page suivante) : Méthode de co-culture amibienne utilisée lors de nos différentes études environnementales.

Les échantillons étaient traités afin :

- (1) d'isoler les amibes indigènes naturellement présentes dans les échantillons par ensemencement des échantillons concentrés sur géloses non-nutritives + *Es coli* et repiquages successifs des amibes détectées,
- (2) d'isoler les micro-organismes résistants aux amibes par ensemencement des échantillons concentrés et décontaminés (pH acide, pH basique, traitement à la chaleur) sur la souche d'*Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010.



3.1.1- Publication : Biodiversité des amibes et des bactéries résistantes aux amibes dans une usine de production d'eau potable

Référence (94), [publication en annexe](#)

Les études réalisées sur l'usine de production d'eau potable ont consisté à appliquer les méthodes de co-culture amibienne et d'isolement des amibes indigènes sur des échantillons d'eau et de biofilms prélevés à différentes étapes du procédé de potabilisation (Fig. 3).

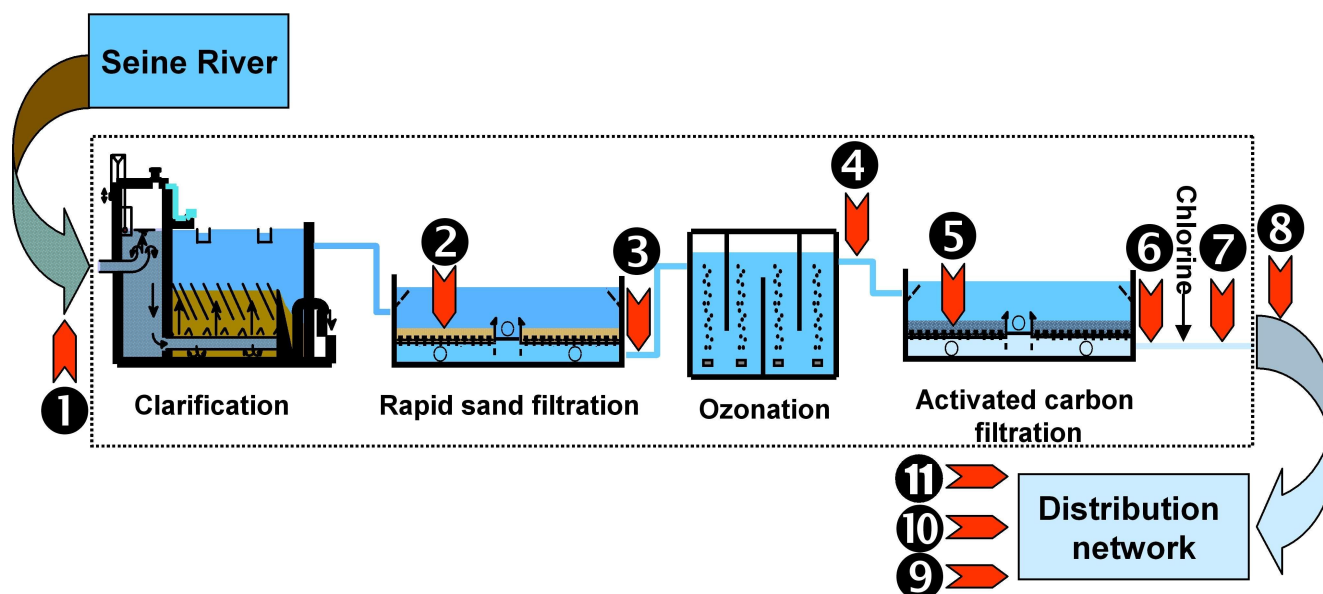


Figure 3 : Lieux de prélèvements d'échantillons pour analyse de la flore amibienne et des micro-organismes résistants aux amibes dans une usine de potabilisation d'eau de rivière.

① eau de rivière, ② biofilm déposé sur le sable utilisé pour la première étape de filtration, ③ eau filtrée sur sable, ④ eau traitée par ozonation, ⑤ biofilm déposé sur les granules de charbon actif, ⑥ eau filtrée sur charbon actif, ⑦ eau chlorée, ⑧ eau en sortie d'usine et ⑨ eau potable prélevée en différents points du réseau.

Ces travaux, réalisés en partenariat avec SUEZ et l'Institut de Microbiologie de Lausanne, avaient pour objectif de déterminer si les usines qui produisent l'eau potable à partir d'eau de rivière sont colonisées par les amibes, si oui à quel niveau préférentiel du processus de potabilisation et si les amibes sont finalement relarguées dans l'eau potable. La recherche de pathogènes par co-culture avait pour objectif d'étudier la distribution de nouvelles espèces microbiennes éventuellement pathogènes dans l'usine afin de permettre une meilleure connaissance de leur écologie, et donc une meilleure gestion du risque éventuel. Cinquante isolats amibiens indigènes ont été cultivés, principalement à partir de l'eau de rivière (19 isolats) mais aussi à partir des biofilms développés sur le lit de sable (étape 2, 15 isolats) (Fig. 4). Quatorze isolats ont été retrouvés après l'étape de filtration sur sable : 3 dans l'eau filtrée sur sable (étape 3), 3 après l'étape d'ozonation (étape 4), 6 sur le biofilm déposé sur les granules de charbon actif (étape 5) et 2 dans l'eau filtrée sur charbon (étape 6). De manière intéressante la diversité amibienne changeait dans l'usine : alors que des amibes appartenant principalement aux genres *Acanthamoeba*, *Naegleria* et *Vannella* étaient principalement retrouvées dans la rivière et dans le biofilm sur sable (Table 1), on retrouvait ensuite principalement des *Hartmannella* et des *Echinamoeba* dans l'usine. Ces deux genres étaient aussi présents dans l'eau de rivière mais de façon minoritaire ; leur prévalence dans l'usine suggère que le processus de

potabilisation sélectionne préférentiellement les amibes appartenant à ces genres (amibes de petite taille, souvent thermo-résistantes). Aucune amibe n'a été retrouvée en sortie d'usine mais cela est sans doute dû aux faibles volumes d'eau et de biofilms prélevés plutôt qu'à une efficacité réelle de la chloration sur les amibes car plusieurs études rapportent une efficacité limitée du chlore sur les kystes amibiens (96). Concernant les bactéries, quatre souches de bactéries ont été retrouvées à partir des amibes indigènes, dont une mycobactérie (*M. mucogenicum*) cultivée à partir d'une souche d'amibe (*Echinamoeba*) retrouvée dans l'eau traitée à l'ozone. La co-culture des échantillons d'eau et de biofilm avec l'amibe *A. castellanii* ATCC 30010 a permis d'identifier 27 mycobactéries (dont 8 dans l'usine après filtration sur sable) et 65 isolats bactériens appartenant à différentes classes (dont 21 dans l'usine après filtration sur sable). Parmi ces 65 isolats figuraient notamment des légionelles ainsi que deux espèces de *Chlamydiae* environnementales (cf § « *Chlamydiae* » plus loin): l'espèce déjà décrite *Parachlamydia acanthamoebae* (retrouvée à partir de l'eau de rivière et du biofilm sur charbon actif) et le premier représentant d'un nouveau genre de *Chlamydiales* : *Criblamydia sequanensis* (isolée à partir de l'eau de rivière). Nous avons aussi détecté la présence de petites particules colorées en coloration de Gimenez dans une des co-cultures réalisées à partir de l'eau de rivière. Aucun ADN bactérien ne pouvait être amplifié à l'aide d'amorces universelles 16S ; ces particules se sont révélées être un nouveau virus d'amibe que nous avons décrit par la suite (cf § « Lausannevirus » plus loin). Ces travaux ont donc clairement démontré la présence d'amibes et de bactéries capables de croître dans les amibes dans l'usine de potabilisation, surtout dans les échantillons de biofilms prélevés sur le filtre à sable et sur le filtre à charbon actif. Ces travaux, publiés en 2008 (94) ont permis à SUEZ de proposer une optimisation des procédures de rétro-lavage de ces filtres, ceci afin de réduire la colonisation par les biofilms, les amibes et les bactéries potentiellement pathogènes associées à ces amibes. Par ailleurs ces travaux s'inscrivent dans des études visant à promouvoir l'utilisation de membranes d'ultrafiltration en sortie d'usine afin d'éviter le relargage de micro-organismes dans les réseaux de distribution.

Figure 4 : Diversité morphologique des amibes retrouvées aux différentes étapes de potabilisation. Amibes affiliées aux genres *Playtamoeba* (A), *Acanthamoeba* (B, D et K), *Vanella* (C), *Glaeseria* (E), *Hartmannella* (F et I), *Naegleria* (G et H) et *Echinamoeba* (J) sur la base du séquençage partiel du gène codant pour l'ARNr 18S.

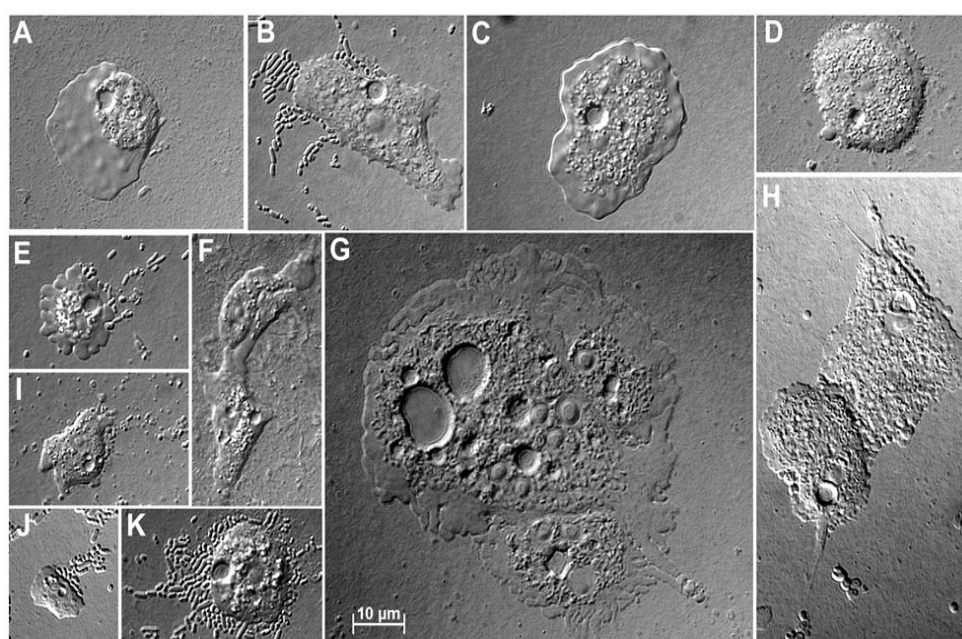


Table 1 : Répartition des isolats ambiens retrouvés aux différentes étapes de potabilisation.

Les isolats indiqués par les flèches verte (*Echinamoeba exundans*) et rouge (*Hartmannella vermiformis*) présentaient des séquences d'ARNr18S identiques, suggérant qu'il pourrait s'agir de la même souche retrouvée tout le long du procédé de potabilisation.

Location	Number of isolates	Closest previously described species or subspecies
River water	2	<i>Acanthamoeba castellanii</i>
	1	<i>Acanthamoeba palestinensis</i>
	1	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>
	1	<i>Acanthamoeba quina</i>
	2	<i>Echinamoeba exundans</i> ←
	1	<i>Glaeseria mira</i>
	3	<i>Hartmannella vermiformis</i> ←
	1	<i>Naegleria clarki</i>
	1	<i>Naegleria fultoni</i>
	2	<i>Naegleria gruberi</i>
	1	<i>Platyamoeba placida</i>
	2	<i>Vannella miroides</i>
	1	<i>Vannella persistens</i>
	Sand biofilm	2
2		<i>Echinamoeba exundans</i>
1		<i>Echinamoeba exundans</i> ←
1		<i>Echinamoeba exundans</i>
1		<i>Hartmannella vermiformis</i> ←
3		<i>Naegleria andersoni</i>
1		<i>Naegleria clarki</i>
1		<i>Naegleria fultoni</i>
2		<i>Naegleria gruberi</i>
1		<i>Vannella miroides</i>
Sand-filtered	3	<i>Hartmannella vermiformis</i> ←
Ozonated	2	<i>Echinamoeba exundans</i> ←
	1	<i>Hartmannella vermiformis</i> ←
Carbon biofilm	1	<i>Echinamoeba exundans</i> ←
	1	<i>Echinamoeba exundans</i>
	1	<i>Echinamoeba exundans</i>
	1	<i>Echinamoeba exundans</i>
	1	<i>Naegleria clarki</i>
	1	<i>Vannella persistens</i>
Carbon-filtered	1	<i>Echinamoeba exundans</i> ←
	1	<i>Hartmannella vermiformis</i> ←
Distant points	1	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>
	1	<i>Lagenoeca sp. antarctica</i>

3.1.2- Publication : Biodiversité des amibes et des bactéries résistantes aux amibes dans un réseau d'eau hospitalier

Référence (93), [publication en annexe](#)

Une étude semblable (et antérieure) à celle décrite ci-dessus a été entreprise à l'hôpital universitaire de Lausanne. Il s'agissait là aussi de prélever de l'eau et des biofilms dans différents services (réanimation, chirurgie...) et d'étudier la prévalence des amibes et la présence de nouvelles espèces bactériennes résistantes aux amibes. L'étiologie des infections acquises à l'hôpital n'étant pas toujours connue, nous suspectons que de nouveaux agents infectieux difficiles à cultiver pourraient être responsables d'une part de ces infections, notamment des pneumonies. La co-culture amibienne pourrait être un bon moyen de détecter ces nouveaux agents infectieux et c'est donc avec cet objectif que ces travaux ont été initiés. Sur 200 échantillons analysés au cours de cette étude 13 ont été retrouvés colonisés par deux souches différentes de l'amibe *Hartmannella vermiformis* (dont une thermorésistante capable de croître à 44°C, et l'autre présentant un intron dans la séquence codant pour l'ARNr18S), 1 par une souche d'*Acanthamoeba polyphaga* et 1 par une nouvelle espèce amibienne non clairement identifiée. Une souche indigène d'*H. vermiformis* était colonisée par *L. pneumophila*. Par ailleurs la co-culture des 200 échantillons avec la souche d'amibe *A. castellanii* ATCC 30010 a permis l'amplification sur gélose de 125 isolats bactériens (42,3% des échantillons d'eau, 52,4% des biofilms prélevés sur les pommeaux de douches, 45,1% des biofilms prélevés sur les robinets d'eau). En particulier, 43 isolats de mycobactéries ont été identifiés (espèce peu pathogène

Mycobacterium gordonae majoritairement, mais aussi espèces pathogènes *Mycobacterium kansasii* et *Mycobacterium xenopi*), ainsi que 11 isolats de légionelles (espèce pathogène *Legionella anisa* majoritairement, ainsi que *L. pneumophila*). Les échantillons positifs pour des amibes indigènes étaient statistiquement plus fréquemment colonisés par des légionelles, ce qui avait déjà été rapporté dans la littérature, mais aussi par des mycobactéries, démontrant pour la première fois une association écologique mycobactéries-amibes. Ce dernier point était important à souligner à l'heure où les infections à mycobactéries atypiques (ou mycobactéries à croissance rapide) sont de plus en plus fréquemment rapportées, avec une résistance généralement élevée de ces mycobactéries aux traitements antibiotiques ainsi qu'à certains types de biocides. Par ailleurs nous avons aussi isolé de nouvelles espèces bactériennes. Parmi elles une espèce d'Alphaprotéobactérie appartenant au genre *Rhodoplanes* a été retrouvée dans 23 échantillons, suggérant une colonisation importante du réseau d'eau de l'hôpital. Il est à noter qu'une souche de *Rhodoplanes* phylogénétiquement proche de celle isolée dans notre étude a été récemment impliquée pour la première fois dans une infection fatale chez l'homme (105). Les autres souches isolées par co-culture amibienne comprenaient deux souches de *Pseudomonas aeruginosa* ainsi que de nombreuses Alphaprotéobactéries. Ces travaux publiés en 2006 (93) sont fréquemment cités dans les publications ayant trait à la thématique de la contamination amibienne des réseaux et aux relations mycobactéries-amibes, ils ont contribué à une meilleure connaissance de cette problématique.

3.2- Résistance des amibes aux traitements de désinfection mis en œuvre dans les réseaux

Sachant que les amibes sont présentes dans les réseaux de distribution d'eau, la question se pose de savoir comment contrôler le risque infectieux potentiel causé par les amibes et les bactéries associées. Dans cette partie nous exposons plusieurs études entreprises afin de contribuer à répondre à cette question. La première étude porte sur l'**efficacité des désinfectants** utilisés en faible concentration résiduelle ou en traitement de choc pour traiter l'eau potable dans les réseaux. La deuxième étude porte sur l'**efficacité des biocides** utilisés pour traiter des matériels et des surfaces éventuellement en contact avec l'eau du réseau : surfaces de travail, matériels lavés dans des machines à laver alimentées en eau de réseau par exemple. Enfin la troisième étude confirme l'**importance cruciale des méthodes** mises en œuvre pour cultiver les trophozoïtes et produire des kystes amibiens, avec des sensibilités des kystes à la désinfection qui varient énormément en fonction de ces méthodes.

3.2.1- Publication : Amibes dans les réseaux domestiques : résistance aux traitements de désinfection et implication dans la persistance des légionelles

Référence (90), **publication en annexe**

Nos travaux de thèse ont porté sur l'étude de l'activité de traitements biocides couramment utilisés pour la maîtrise du risque infectieux dans l'eau potable. Ces traitements sont utilisés de façon relativement empirique et leur impact réel sur les différentes populations bactériennes et les amibes présentes dans les biofilms sont peu ou mal connus. Ces travaux ont été menés en collaboration avec le centre de recherche

sur l'eau et l'environnement (CIRSEE) de la société SUEZ, toute particulièrement concernée par la problématique de la colonisation des réseaux par les amibes et les légionelles (*L. pneumophila*) qui constituaient à l'époque et constituent aujourd'hui encore un problème majeur de santé publique (épidémies à répétition dans plusieurs grandes villes françaises dont Paris pendant la coupe du monde de football de 1998, épidémie dans le tout nouvel hôpital européen Georges Pompidou en 2000...). L'enjeu principal de l'étude était de déterminer si certains traitements sont plus à même de contrôler la prolifération des amibes et des légionelles dans les réseaux, voire même de les éradiquer. Afin d'évaluer l'efficacité de 6 traitements biocides différents nous avons d'abord mis en place un pilote reproduisant un réseau d'eau intérieur. Ce pilote comprenait 7 boucles parallèles, avec pour chacune un bras principal en acier galvanisé (circulation d'eau en continu) et un bras mort en cuivre (eau stagnante). Le pilote a d'abord été alimenté avec de l'eau de rivière filtrée sur sable, progressivement remplacée par de l'eau du réseau pour permettre la colonisation par une flore microbienne représentative. Des systèmes de coupons amovibles et de cartouches de billes de verre étaient installés sur le pilote afin de permettre des prélèvements de biofilms pour analyse qualitative et quantitative, respectivement. Lors de l'étape de colonisation nous avons dopé la flore en légionelles isolées à partir du pilote. Une fois la flore stabilisée nous avons évalué l'action de 6 traitements différents (+1 boucle témoin) sur la flore. Nous avons utilisé des méthodes de quantification des différentes populations bactériennes (hybridation fluorescente *in situ* avec des sondes spécifiques de groupe, détection en microscopie confocale et quantification par analyse d'images) et amibiennes (dénombrement) afin de mettre en évidence les changements de composition des populations induits par les traitements. Des méthodes d'évaluation de la viabilité des populations bactériennes (marquage fluorescent Live/Dead couplé à une détection en microscopie confocale) ont aussi été utilisées pour mesurer l'efficacité biocide des traitements. Les résultats obtenus ont clairement démontré que si parmi les 6 traitements testés (chlore, dioxyde de chlore, monochloramine, ozone, ionisation cuivre-argent et électro-chloration) le dioxyde de chlore paraissait être le plus efficace pour contrôler les proliférations dans le bras mort, aucun traitement n'était en revanche capable d'éradiquer complètement les biofilms bactériens ainsi que les bactéries du genre *Legionella* et les amibes associées aux biofilms. La plupart des traitements permettaient de diminuer de façon plus ou moins importante la flore totale ainsi que les légionelles et les amibes dénombrées sur gélose mais leur interruption menait invariablement à une ré-apparition rapide de la flore, y compris les amibes et les légionelles. Par ailleurs les amibes semblaient proliférer sur les biofilms traités par certains biocides, se nourrissant de bactéries mortes (Fig. 5). Ces travaux démontrent donc que des traitements mal maîtrisés peuvent conduire à une prolifération de ces micro-organismes eucaryotes et des pathogènes associés dans les réseaux. Ces travaux ont été publiés en 2004 (90). Ils ont contribué à une meilleure compréhension de l'efficacité relative des biocides sur la flore des réseaux en conditions proches des conditions réelles.

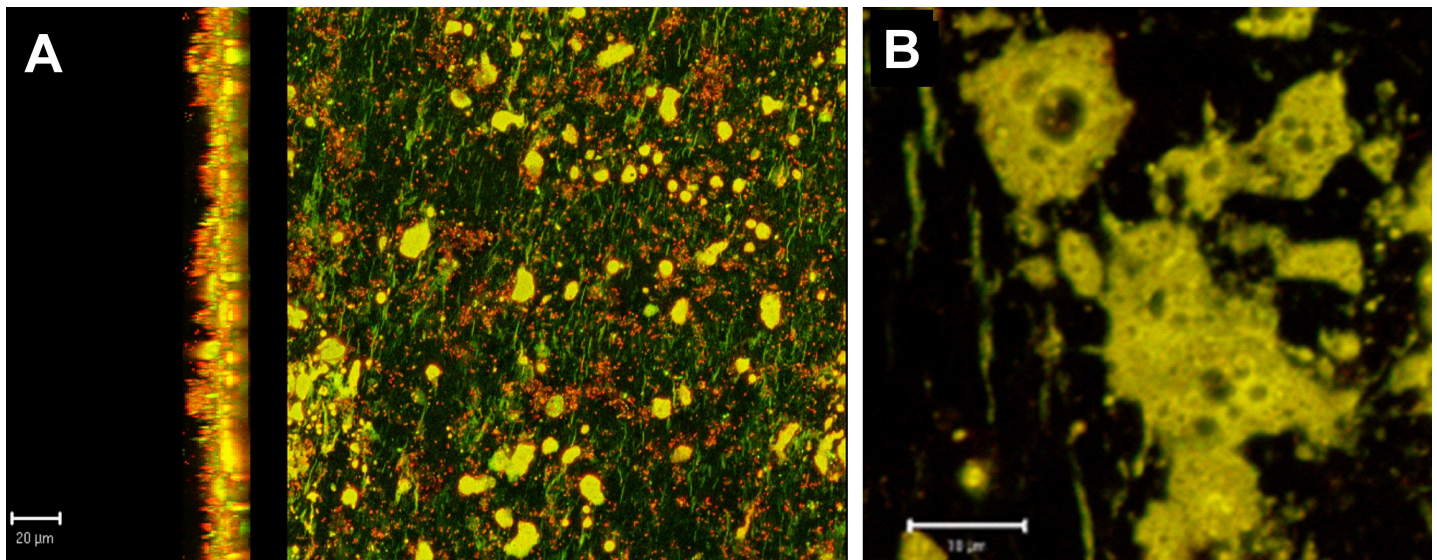


Figure 5 : Effet des traitements de désinfection sur les biofilms révélé en marquage Live/Dead. Le biofilm traité au dioxyde de chlore est majoritairement constitué d'une flore bactérienne morte (marquage IP) mais de nombreuses amibes sont présentes (nombreuses tâches jaunes, agrandies en B), suggérant un effet limité du traitement sur les amibes.

3.2.2- Publication : Résistance des kystes d'*Acanthamoeba* aux traitements de désinfection utilisés dans les établissements de soins

Référence (26), [publication en annexe](#)

Suite à deux revues exhaustives de la littérature portant sur l'efficacité des traitements biocides sur les protozoaires (88) et plus particulièrement sur les amibes libres de l'environnement (96), nous avons constaté qu'il existait des études évaluant les traitements utilisés pour la potabilisation de l'eau ou pour la sanitisation des lentilles de contact (problème des kératite amibiennes) mais qu'il n'existait que très peu de données sur les biocides couramment utilisés pour traiter les surfaces et les matériels à l'hôpital mais aussi dans l'industrie agro-alimentaire et l'industrie pharmaceutique. Or les amibes sont bien présentes à l'hôpital (cf étude ci-dessus à l'hôpital de Lausanne), et il semblerait que dans certains cas elles puissent coloniser des matériels médicaux (74). Elles sont aussi présentes dans les industries agroalimentaires où elles sont notamment suspectées de servir de vecteur d'infection des élevages de volailles par les campylobactéries (6, 7, 78). Nous avons donc initié des travaux visant à déterminer quels biocides utilisés pour traiter les surfaces sont susceptibles d'être efficaces contre les amibes sous forme de trophozoite (forme active) ou de kyste (forme dormante). Alors que la plupart du temps seule une à deux souches sont testées dans les études d'efficacité des biocides sur les amibes nous avons utilisé 9 souches différentes d'*Acanthamoeba*, dont 3 souches de collection et six souches isolées lors des études à l'hôpital et dans l'usine de potabilisation. L'efficacité des traitements a été évaluée contre les trophozoites (forme active) et contre les kystes (forme dormante) en utilisant une simple méthode de mise en contact avec les produits à tester suivie d'une neutralisation de l'activité du biocide et d'un ensemencement des amibes traitées sur géloses non nutritives + *Escherichia coli* (les amibes se développent en ingérant les bactérie, formant de véritables « plages de lyse » sur la couche d'*E. coli*). Concernant les trophozoites (Table 2), tous les biocides se sont révélés pleinement efficaces à l'exception notable de la glutaraldéhyde à 2% (seule ou en formulation) qui même après un temps de contact de 30 minutes ne permettait pas d'éradiquer les amibes, certaines souches présentant moins de 1

log de réduction. Concernant les kystes (Table 3) nous avons mis en évidence leur résistance à une exposition à la chaleur (55°C) ainsi qu'à de nombreux traitements (glutaraldéhyde, eau de Javel à 250 ppm, peroxyde d'hydrogène à 7,5%) tandis que d'autres traitements étaient nettement plus efficaces (peroxyde d'hydrogène en formulation, acide peracétique...). Par ailleurs nous avons constaté que la paroi des kystes des souches environnementales était plus épaisse que celle des souches de collection, et que ces souches environnementales étaient plus résistantes à la désinfection (Fig. 6). Parmi elles, les souches isolées de l'hôpital de Lausanne étaient les plus résistantes. Ceci peut s'expliquer par la mise en œuvre régulière de traitements chocs de désinfection à la chaleur ou au chlore dans ces réseaux, et donc la sélection de souches plus résistantes. Ces travaux ont été publiés en 2010 (26), ils ont permis de préciser l'efficacité relative des traitements biocides vis-à-vis des amibes, et de montrer que les souches de collection généralement utilisées dans ces essais sont peu représentatives des souches de terrain.

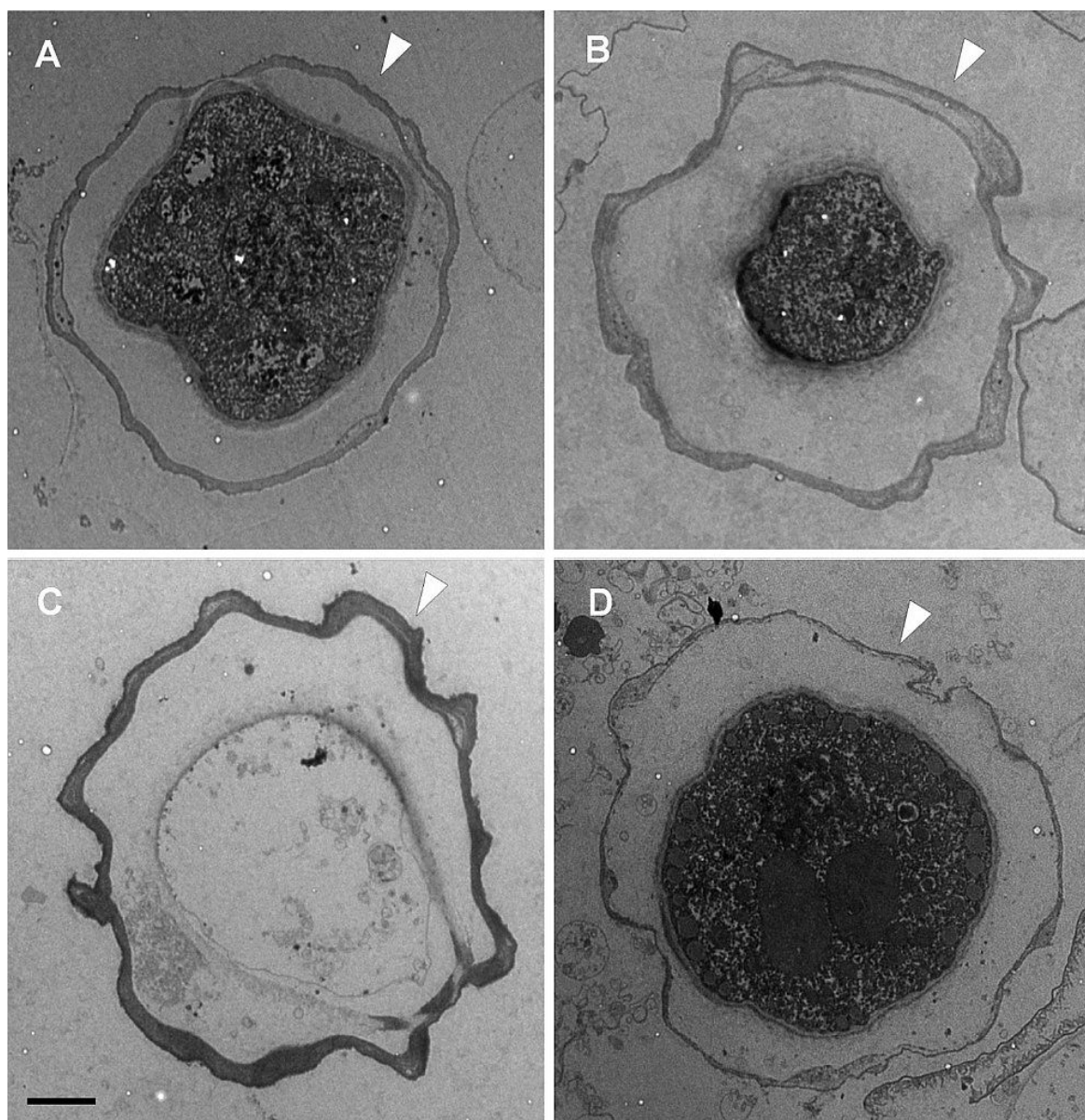


Figure 6 : Aspect en microscopie électronique des kystes obtenus à partir des différentes souches d'amibes. Kystes obtenus à partir de souches de terrain isolées à partir d'eau de rivière (A) ou d'eaux de réseaux hospitaliers (B et C), et kystes obtenus à partir de la souche de collection *Acanthamoeba polyphaga* CCAP 1501/18. Barre : 2 µm.

Biocides tested	Acanthamoeba spp. environmental isolates						A. castellanii CCAP 1501/10	A. castellanii ATCC 30010	A. polyphaga CCAP 1501/18	
	Contact times	1 (river water)	2 (river water)	3 (hospital)	4 (hospital)	5 (river water)				6 (river water)
Glutaraldehyde 2%	30 min	4.1 ± 0.2	1.9 ± 0.8	0.9 ± 0.7	1.9 ± 0.1	1.4 ± 0.3	3.3 ± 0.2	4.6 ± 0.2	3.6 ± 0.1	3.9 ± 0.4
Glutaraldehyde -based product	30 min	4.1 ± 0.2	1.8 ± 0.6	1.0 ± 0.7	2.2 ± 0.2	1.6 ± 0.1	3.4 ± 0.0	4.5 ± 0.1	3.9 ± 0.1	3.9 ± 0.3
Biocides tested	Acanthamoeba spp. environmental isolates						A. castellanii CCAP 1501/10	A. castellanii ATCC 30010	A. polyphaga CCAP 1501/18	
	Contact times	1 (river water)	2 (river water)	3 (hospital)	4 (hospital)	5 (river water)				6 (river water)
55°C	10min	0.5 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.5 ± 0.0	0.8 ± 0.1	1.0 ± 0.1	0.5 ± 0.2	0.6 ± 0.1
65°C	10min	>4.7	>4.8	>4.7	>4.7	>4.8	>4.1	>5.1	>4.7	>4.5
Sodium hypochlorite 2.5%	10min	>4.7	>4.8	>4.7	>4.7	>4.8	>4.1	>5.1	>4.7	>4.5
Sodium hypochlorite 0.25%	10min	2.9 ± 0.1	3.5 ± 0.2	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.1	1.3 ± 0.2	>4.1	>5.1	2.9 ± 0.2	1.8 ± 0.2
	20min	>4.7	>4.8	1.4 ± 0.1	3.6 ± 0.1	>4.8	/	/	>4.7	>4.5
	30min	/	/	2.6 ± 0.2	>4.7	/	/	/	/	/
Ethanol 70%	10min	>4.7	>4.8	2.8 ± 0.1	4.3 ± 0.3	3.5 ± 0.2	>4.1	>5.1	>4.7	>4.5
Glutaraldehyde 2%	10min	1.6 ± 0.4	0.2 ± 0.2	0.0 ± 0.1	1.1 ± 0.6	4.6 ± 0.1	>4.1	2.6 ± 0.1	1.5 ± 0.2	1.3 ± 0.3
Glutaraldehyde-based pdct	10min	1.3 ± 0.2	0.6 ± 0.1	0.2 ± 0.0	0.3 ± 0.8	0.5 ± 0.3	1.6 ± 0.2	2.8 ± 0.2	1.3 ± 0.3	1.2 ± 0.1
	20min	3.9 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.0 ± 0.0	1.9 ± 0.2	2.4 ± 0.1	2.2 ± 0.2	2.8 ± 0.2	2.4 ± 0.1	>4.5
	30min	>4.7	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.1	>4.7	2.5 ± 0.1	2.3 ± 0.2	2.8 ± 0.1	>4.7	/
Orthophthalaldehyde (OPA) 0.55%	10min	>4.7	>4.8	3.7 ± 0.2	1.1 ± 0.3	>4.8	>4.1	>5.1	>4.7	>4.5
OPA-based product	10min	2.8 ± 0.2	3.8 ± 0.1	2.6 ± 0.2	1.1 ± 0.1	4.6 ± 0.0	>4.1	3.0 ± 0.1	2.6 ± 0.1	2.2 ± 0.1
	20min	>4.7	>4.8	2.9 ± 0.1	3.7 ± 0.1	/	/	>5.1	>4.7	>4.5
	30min	/	/	>4.7	>4.7	/	/	/	/	/
Hydrogen peroxide 7.5%	10min	1.1 ± 0.5	0.3 ± 0.3	1.2 ± 0.1	1.1 ± 0.3	2.7 ± 0.2	1.6 ± 0.2	0.8 ± 0.6	0.4 ± 0.3	2.5 ± 0.4
	20min	3.3 ± 0.1	1.2 ± 0.2	0.5 ± 0.2	1.2 ± 0.2	>4.8	>4.1	2.7 ± 0.2	2.2 ± 0.1	>4.5
	30min	3.8 ± 0.1	1.4 ± 0.2	0.9 ± 0.1	1.7 ± 0.2	/	/	3.1 ± 0.1	2.8 ± 0.2	/
Hydrogen peroxide-based Resert	10min	>4.7	>4.8	>4.7	4.3 ± 0.4	>4.8	>4.1	>5.1	>4.7	>4.5
Hydrogen peroxide-based SporKlenz RTU	10min	>4.7	3.6 ± 0.5	1.6 ± 0.2	1.7 ± 0.8	4.1 ± 0.2	>4.1	>5.1	>4.7	>4.5
	20min	/	>4.8	>4.7	4.1 ± 0.8	/	/	/	/	/
	30min	/	/	/	>4.5	/	/	/	/	/
Peracetic Acid 0.2%	10min	>4.7	0.9 ± 0.3	>4.7	0.2 ± 0.2	>4.8	>4.1	>5.1	2.1 ± 0.5	>4.5
PAA-based STERIS-20 (exposure at 55°C)	10min	>4.7	>4.8	>4.7	4.0 ± 0.2	>4.8	>4.1	>5.1	>4.7	>4.5

Tables 2 (en haut) et 3 (en bas) : Effet des traitements de décontamination sur les trophozoïtes ambiens (en haut) et sur les kystes ambiens (en bas). Les abattements logarithmiques sont indiqués. Seuls les traitements à base de glutaraldéhyde sont mentionnés pour les trophozoïtes car tous les autres traitements (cf kystes) se sont révélés complètement efficaces.

3.2.3- Publication : Influence des conditions de croissance *in vitro* des *Acanthamoeba* sur la résistance des kystes dérivés

Référence (27), **publication en annexe**

Lors des travaux réalisés en 2010 nous avons utilisé des méthodes classiques de culture des amibes en milieu synthétique Peptone-Yeast-Glucose (PYG) suivies d'un enkystement en tampon Neff afin de produire les kystes à soumettre aux traitements de décontamination (65). Nous savions cependant que plusieurs auteurs ont rapporté la formation de kystes relativement peu matures lorsque ces méthodes sont utilisées, ceci d'autant plus si les souches d'amibes utilisées ont été cultivées pendant de nombreuses générations en PYG (14, 17, 46, 54, 68). Par ailleurs des travaux publiés en 2009 indiquent que si les trophozoites amibiens sont cultivés sur couches de cellules HEp-2 plutôt qu'en milieu PYG stérile la virulence et la capacité d'enkystement sont réactivées (53). A l'heure où les méthodes à utiliser pour évaluer l'efficacité des traitements de désinfection sur les kystes amibiens sont en discussion (4), il nous a semblé intéressant d'explorer la résistance des kystes amibiens issus de trophozoites cultivés sur cellules HEp-2, ceci afin de pouvoir éventuellement proposer cette méthode de culture dans les futures normes d'essais de « cysticidie ».

Brièvement, les amibes ont été :

- cultivées en milieu PYG puis enkystées par incubation en tampon Neff pendant 7 jours à 33°C,
- ou cultivées sur cellules HEp-2 puis enkystées par incubation en tampon Neff pendant 7 jours à 33°C.

La fragilité relative des kystes produits suivant les deux méthodes a été évaluée grâce à un double marquage calcofluor (marquage de la cellulose contenue dans la paroi des kystes) et iodure de propidium (IP, intercalant ADN ne pénétrant que dans les kystes perméabilisés) avant et après traitement SDS 0,5% pendant 10 min (Fig. 7 & 8). Cette première caractérisation a permis de démontrer que les kystes produits à partir de trophozoites cultivés en milieu PYG sont généralement plus fragiles, donc plus perméabilisés par le traitement SDS et marqués en plus grande proportion par l'IP.

Figure 7 : Détection des kystes perméabilisés par le traitement SDS par marquage à l'iodure de propidium.

Le marquage au calcofluor (bleu) et à l'iodure de propidium (rouge) permet de distinguer les kystes perméabilisés par le traitement SDS. La proportion de kystes marqués IP est généralement plus importante chez les kystes produits à partir de trophozoites cultivés en PYG, ceci aussi bien avant (A) qu'après (B) le traitement SDS. Chez les kystes produits à partir de trophozoites cultivés sur cellules HEp-2 la proportion moins importante de kystes marqués IP avant (C) et après (D) traitement SDS traduit une moindre perméabilité et une plus grande résistance au SDS.

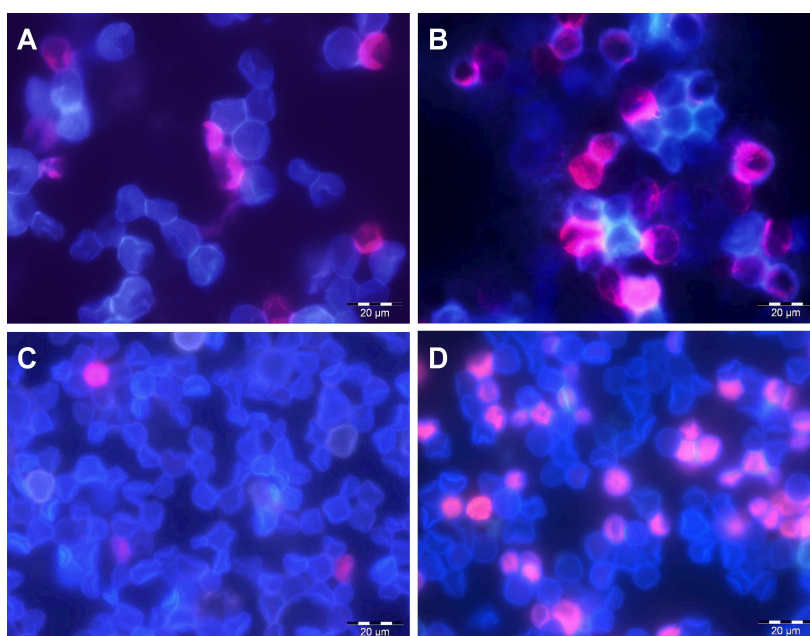
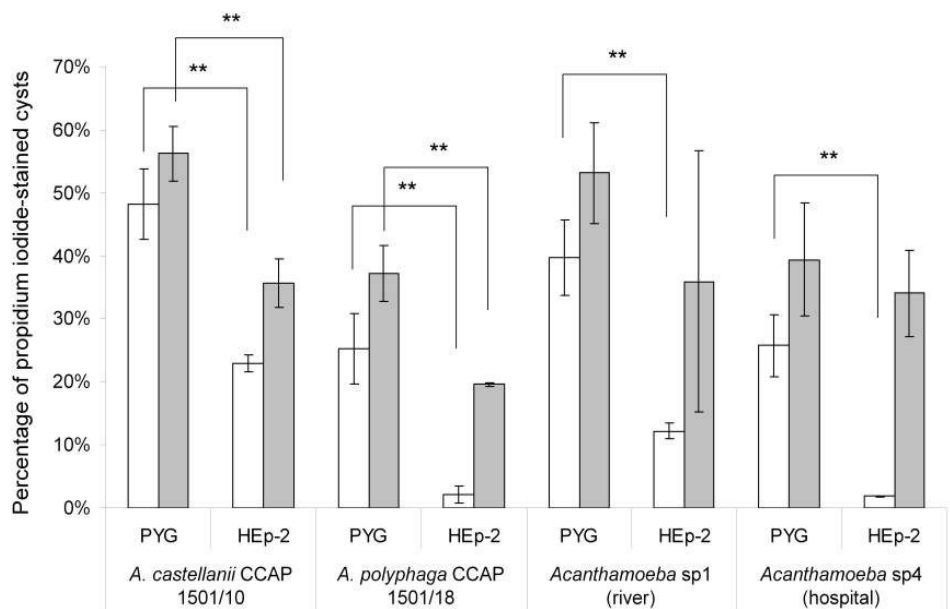
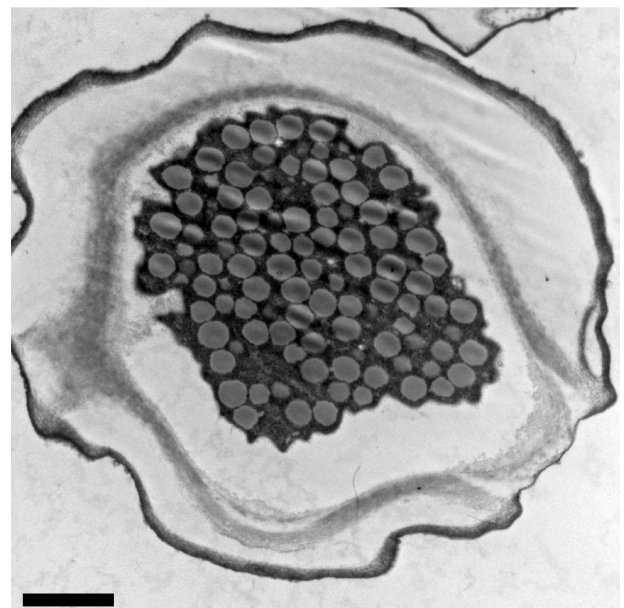


Figure 8 : Proportion des kystes marqués IP avant (colonnes blanches) et après (colonnes grises) traitement SDS pour les kystes des 4 souches d'*Acanthamoeba* obtenus à partir de trophozoites cultivés en PYG ou sur cellules HEp-2.



Des observations en microscopie électronique à transmission ont de plus permis de mettre en évidence un nombre important de vacuoles lipidiques dans les kystes issus de trophozoites cultivés sur cellules HEp-2 (Fig. 9) tandis qu'elles n'étaient pas ou que peu présentes chez les kystes issus de trophozoites cultivés en PYG. Ces vacuoles lipidiques sont généralement associées aux kystes matures (15). L'analyse en cytométrie en flux des kystes marqués au calcofluor (reflet du contenu en cellulose) a confirmé ces observations, avec une population hétérogène constituée de kystes matures (contenu en cellulose élevé) et immatures (contenu en cellulose moins élevé) chez les kystes issus de trophozoites cultivés en PYG, tandis que les kystes produits à partir de trophozoites cultivés sur cellules HEp-2 étaient essentiellement matures (Fig. 10). Les observations réalisées en microscopie électronique à balayage sur une souche d'*Acanthamoeba* ont confirmé ces différences, avec des kystes matures (aspect plissé) et immatures (aspect arrondi) chez les kystes issus de trophozoites cultivés en PYG, et essentiellement des kystes matures chez les kystes produits à partir de trophozoites cultivés sur cellules HEp-2 (Fig. 11).

Figure 9 : Aspect en microscopie électronique à transmission des kystes produits à partir de trophozoites cultivés sur cellules HEp-2. De nombreuses gouttelettes lipidiques sont visibles dans le corps cellulaire. Barre : 2 µm.



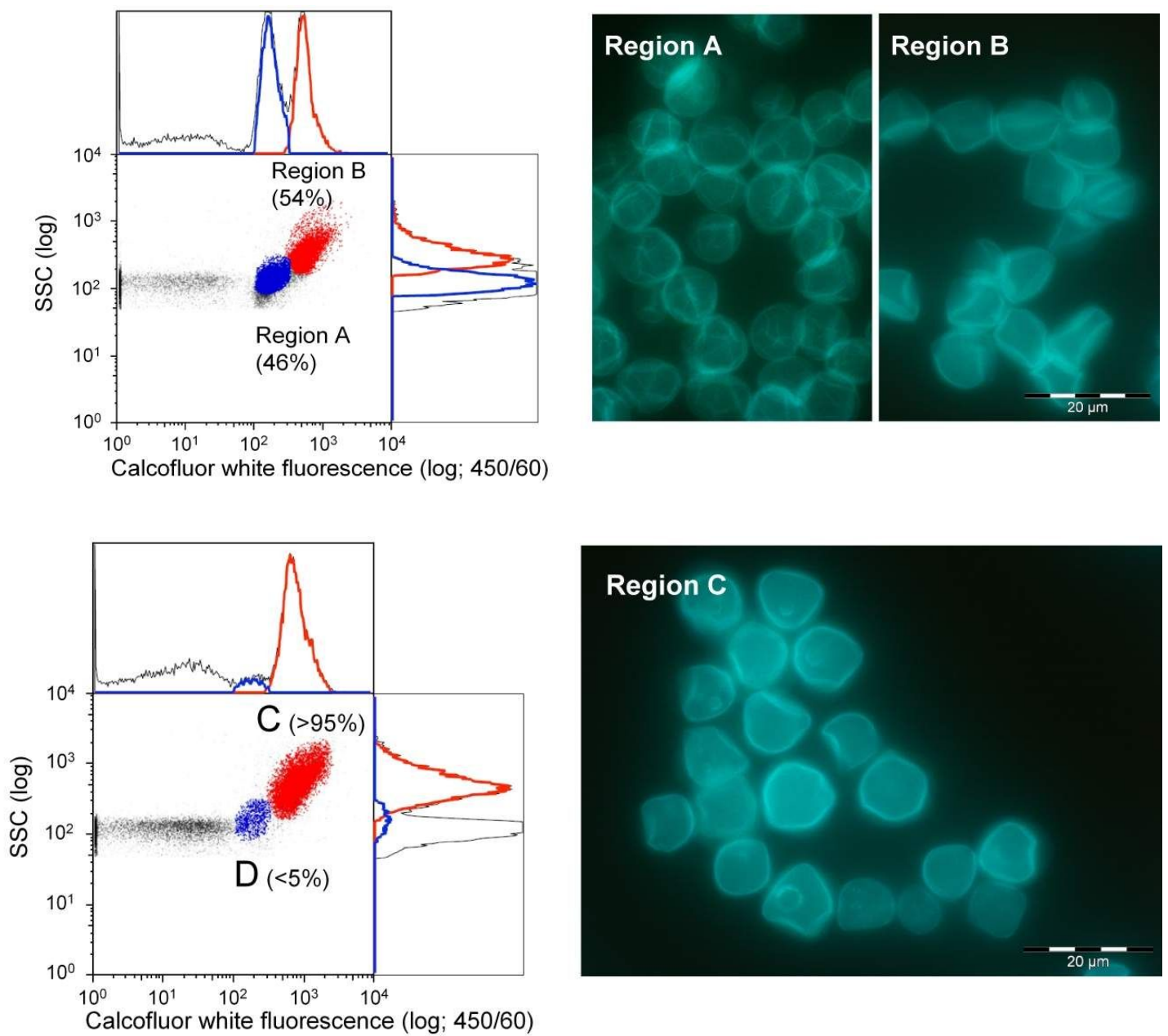


Figure 10 : Analyse des populations de kystes en cytométrie après marquage au calcofluor. Les kystes issus de trophozoites cultivés en PYG sont constitués de deux populations : région A correspondant aux kystes immatures et B correspondant aux kystes matures. Les kystes issus de trophozoites cultivés sur cellules HEP-2 sont majoritairement constitués d'une population homogène de kystes matures (région C, la région D correspondant essentiellement à des débris cellulaires).

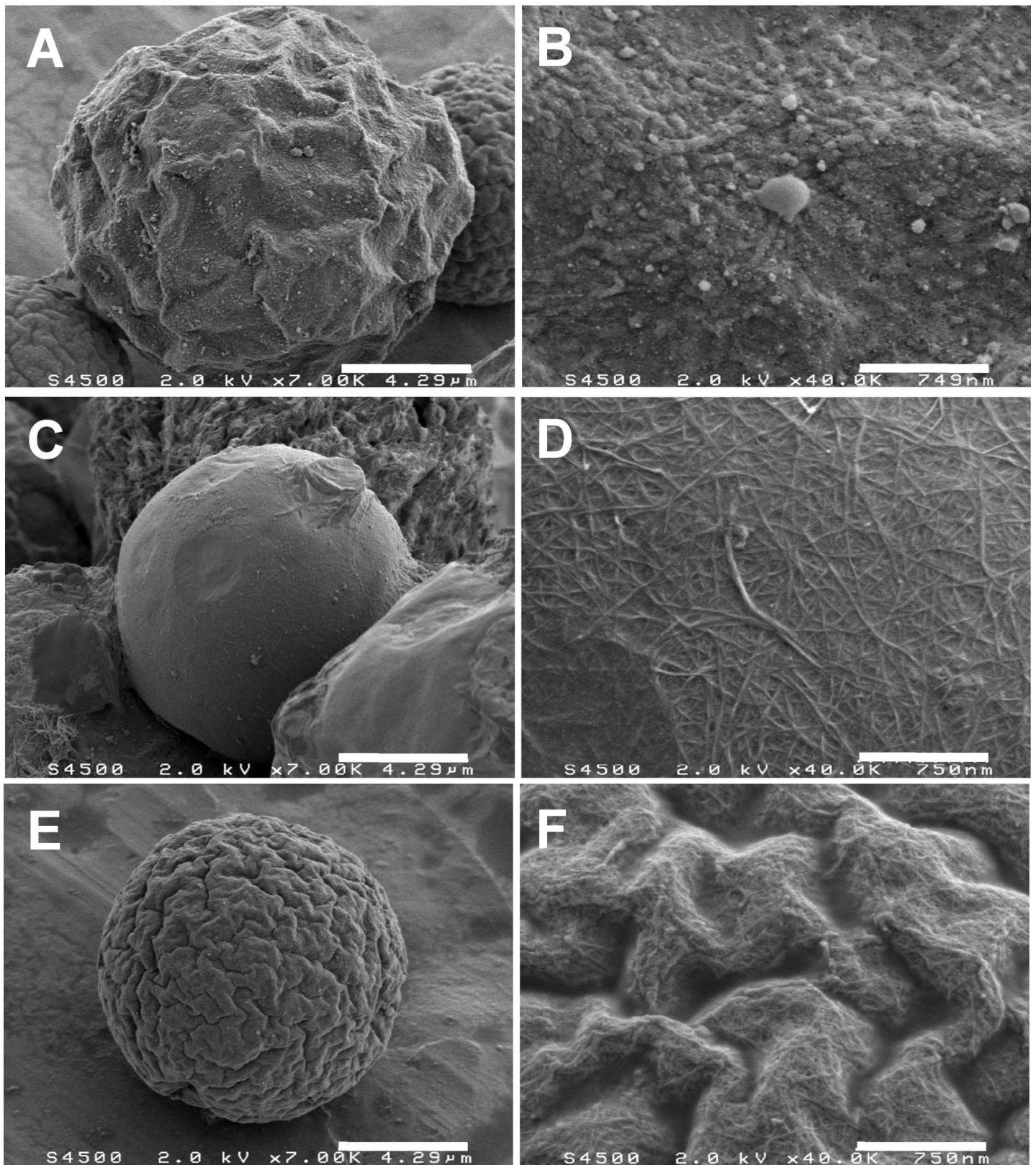


Figure 11 : Aspect des kystes en microscopie électronique à balayage.

Les kystes matures (photos du haut) ont un aspect plissé (A) et une surface d'apparence granuleuse (B). Les kystes immatures (photos du milieu) sont arrondis (C) et présentent une surface d'apparence fibreuse (D). Des kystes présentant un aspect intermédiaire ont été observés dans les populations issues des trophozoïtes cultivés sur cellules HEp-2 (photos du bas): apparence crénelée (E) avec une surface fibreuse (F).

Les kystes produits à partir de trophozoites cultivés suivant les deux méthodes ont par la suite été soumis à des traitements de décontamination. Les résultats montrent clairement que les kystes issus de trophozoites cultivés sur cellules HEP-2 sont souvent plus, voire beaucoup plus résistants à certains traitements (Fig.12 page suivante): chaleur (65°C), eau de javel diluée à 0,25%, produit à base de glutaraldéhyde 2%, peroxyde d'hydrogène à 7,5% et produit à base d'orthophtaldéhyde 0,55% voient leur efficacité diminuée de manière plus ou moins importante suivant les souches d'amibes considérées. Le produit à base d'acide peracétique 0,2% conserve son efficacité. Ces résultats sont à mettre en perspective avec l'utilisation faite de certains de ces traitements sur le terrain. La glutaraldéhyde est encore fréquemment utilisée comme désinfectant de haut niveau dans certains pays européens et aux US ; d'autres auteurs avaient déjà rapporté une efficacité limitée de cette molécule sur les kystes amibiens (43). Les données concernant l'efficacité de la chaleur varient d'une étude à l'autre. Turner *et al* rapportent qu'une exposition à 46°C pendant 30 min est efficace contre les trophozoites, tandis qu'une exposition pendant 30 min à 56°C est nécessaire pour inactiver les kystes obtenus à partir de trophozoites cultivés en PYG et enkystés en tampon Neff (97). Aksozek *et al* rapportent qu'une exposition à une température de 65°C pendant plus de 5 min est efficace pour inactiver des kystes obtenus à partir de trophozoites cultivés en PYG et enkystés sur géloses non nutritives (3), tandis que Ludwig *et al* rapportent que des kystes de *A. castellanii* et *A. polyphaga* produits par enkystement en milieu PYG ne sont inactivés qu'après exposition à 80°C pendant 10 min (57). Inversement, des kystes d'une souche thermotolérante d'*Acanthamoeba* infectés par *L. pneumophila* n'ont pas été inactivés après une exposition à 80°C pendant 10 min (83). La résistance accrue des kystes à la chaleur observée dans notre étude est un point important car des chocs thermiques à 65°C sont fréquemment utilisés pour contrôler la prolifération de *L. pneumophila* dans les réseaux d'eau (63). Une efficacité limitée de ces chocs sur les kystes d'*Acanthamoeba* pourrait donc entraîner un risque accru de contamination des réseaux.

Globalement, ces travaux confirment l'intérêt de la méthode de culture des trophozoites amibiens sur cellules HEP-2 plutôt qu'en milieu synthétique PYG, permettant d'obtenir des kystes plus matures contre lesquels les traitements de décontamination peuvent être testés de façon pertinente. Ils appellent d'autres études de validation afin de mettre en place des méthodes standardisées d'évaluation de l'efficacité des traitements sur les kystes.

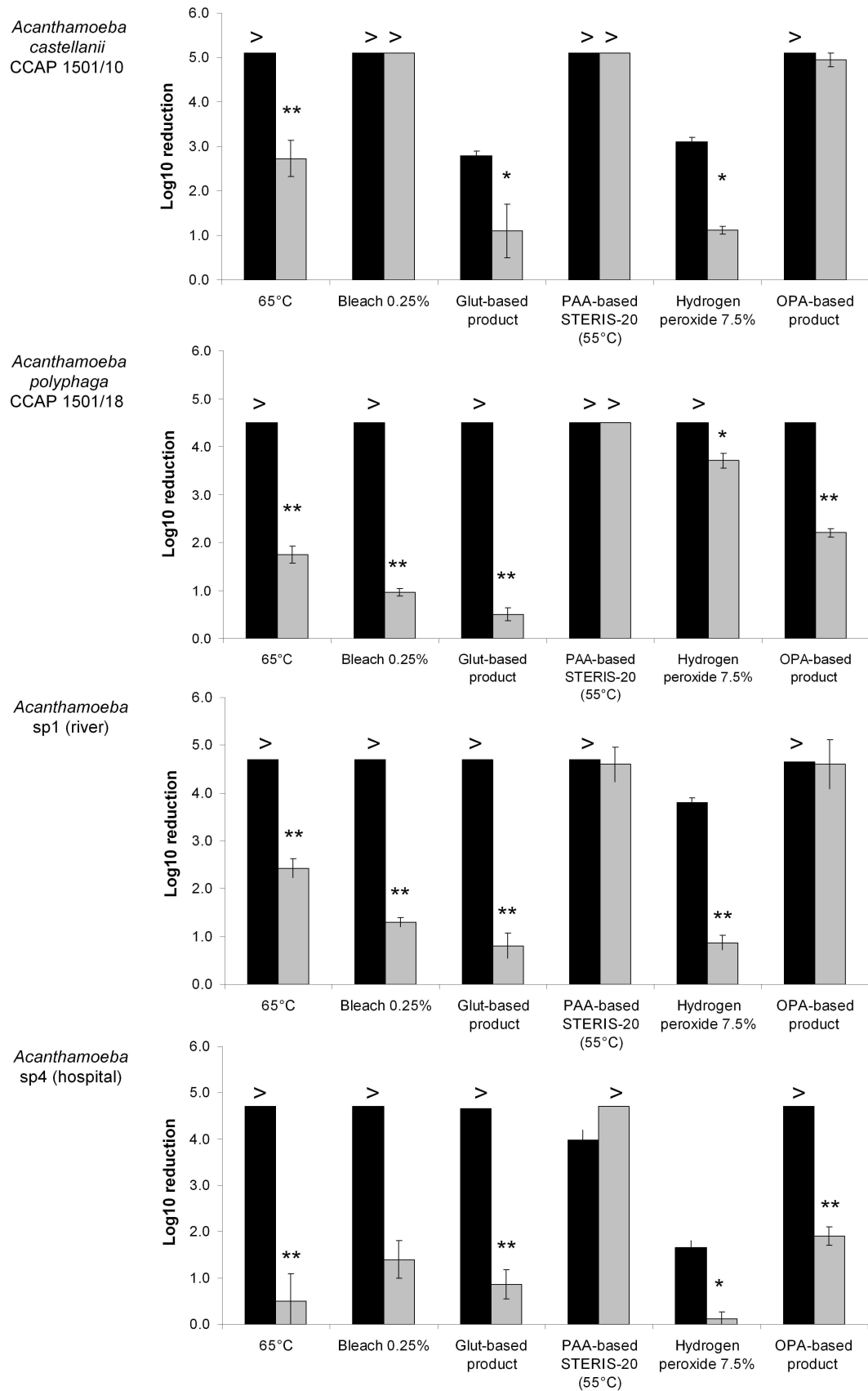


Figure 12 : Comparaison de l'efficacité des traitements de décontamination sur les kystes de 4 souches d'*Acanthamoeba* obtenus à partir de trophozoites cultivés en PYG (colonnes noires) ou sur cellules HEP-2 (colonnes grises). > réduction maximale observable ; * différence significative avec $P < 0,05$; ** différence significative avec $P < 0,001$.

Chapitre 4 : Interactions amibes libres / micro-organismes

Lors des études environnementales menées sur l'usine de potabilisation nous avons isolé par co-culture amibienne deux micro-organismes d'intérêt qui ont été étudiés de manière plus approfondie par la suite, donnant lieu à deux publications scientifiques. Par ailleurs nous avons participé à plusieurs descriptions de nouvelles espèces et à des études visant à déterminer la pathogénicité de ces nouvelles espèces. Nous nous sommes aussi intéressés aux interactions amibes-mycobactéries ainsi qu'aux échanges de gènes entre micro-organismes intracellulaires (bactéries et virus) et entre micro-organismes intracellulaires et hôtes amibiens. Ces travaux sont brièvement résumés dans ce chapitre.

4.1- Les amibes libres de l'environnement : « melting-pot » du monde microbien

Le concept d'amibes faisant office de « melting-pot » permettant l'échange de gènes entre micro-organismes intracellulaires (bactéries et virus) ainsi qu'entre micro-organismes intracellulaires et hôte amibien a émergé ces dernières années (pour une revue, voir (59)). Dans une revue publiée en 2010 nous avons cherché à illustrer l'importance qu'ont eu et continuent à avoir les échanges d'information génétique entre bactéries, virus et protozoaires dans l'évolution des micro-organismes ((92), **publication en annexe**). Nous avons exposé de nombreux exemples tirés d'une littérature scientifique de plus en plus abondante concernant ce sujet : importance des *Chlamydiae* dans l'apparition des cellules végétales, transferts de gènes entre protozoaires et légionelles, entre protozoaires et rickettsies, entre protozoaires et la bactérie symbiote d'amibes *Ca Amoebophilus asiaticus*, entre protozoaires et virus « géants » d'amibes (Fig. 13). Par ailleurs nous avons souligné la proximité phylogénétique et/ou évolutive de certaines espèces bactériennes ou de certains virus trouvés chez les amibes avec d'autres espèces bactériennes ou virus trouvés chez les insectes : par exemple les plus proches voisins phylogénétiques de l'espèce symbiotique d'amibes *Ca Amoebophilus asiaticus* sont les bactéries symbiotiques d'insecte appartenant au genre *Cardinium*. Ces observations, encore très préliminaires étant donné le faible nombre de génomes de protozoaires disponibles pour le moment, permettent de construire des scénarios évolutifs sur la base de l'observation de transferts de gènes entre micro-organismes. Un exemple intrigant de transfert a été donné par Moliner et al (60) concernant l'échange du gène codant pour la stérol delta-7 réductase. Les études initiales rapportaient la présence de copies phylogénétiquement proches de ce gène chez *Legionella drancourtii*, *Coxiella burnetii* et *Protochlamydia amoebophila*, suggérant que le gène avait été acquis à partir de cellules de plantes par l'ancêtre des *Chlamydiae*, puis transmis aux intra-cellulaires d'amibes lors de co-infections *Chlamydiae*-légionelles (60). En prenant en compte le génome récemment publié de l'amibe *Naegleria gruberi* ainsi que ceux d'autres espèces de *Chlamydiae* et de légionelles nous avons pu préciser qu'il s'agissait plus probablement d'un transfert d'un gène provenant d'une *Naegleria* vers une bactérie

intracellulaire d'amibes, suivi ensuite de transferts entre bactéries intracellulaires d'amibes (Fig. 14). De manière intrigante, un gène codant pour une sterol delta-24 reductase a aussi été détecté chez *Coxiella burnetii* ; ce gène n'est pas détecté chez les légionelles et les *Chlamydiae* mais son homologue le plus proche est là aussi présent chez *Naegleria gruberi* (38).

Figure 13 : Exemples d'échanges d'information génétique entre micro-organismes intra-amibiens (adapté de (92)).

① Entre les ancêtres des rickettsies et ceux des *Chlamydiae*, ② entre le symbionte d'amibes *Amoebophilus asiaticus* et les *Chlamydiae*, les rickettsies, les légionelles, *Francisella* et les mycobactéries, ③ entre le symbionte d'amibes *Amoebophilus asiaticus* et le virus d'amibes Mimivirus, ④ entre les légionelles et leur hôte amibien, ⑤ entre les légionelles et le virus d'amibes Mimivirus, ⑥ entre les virus NCLDV et leurs hôtes eucaryotes, ⑦ entre le virus d'amibes Mimivirus et son hôte amibien, ⑧ entre le virophage Sputnik et le virus d'amibes Mamavirus

* NCLDV : nucleocytoplasmic large DNA viruses

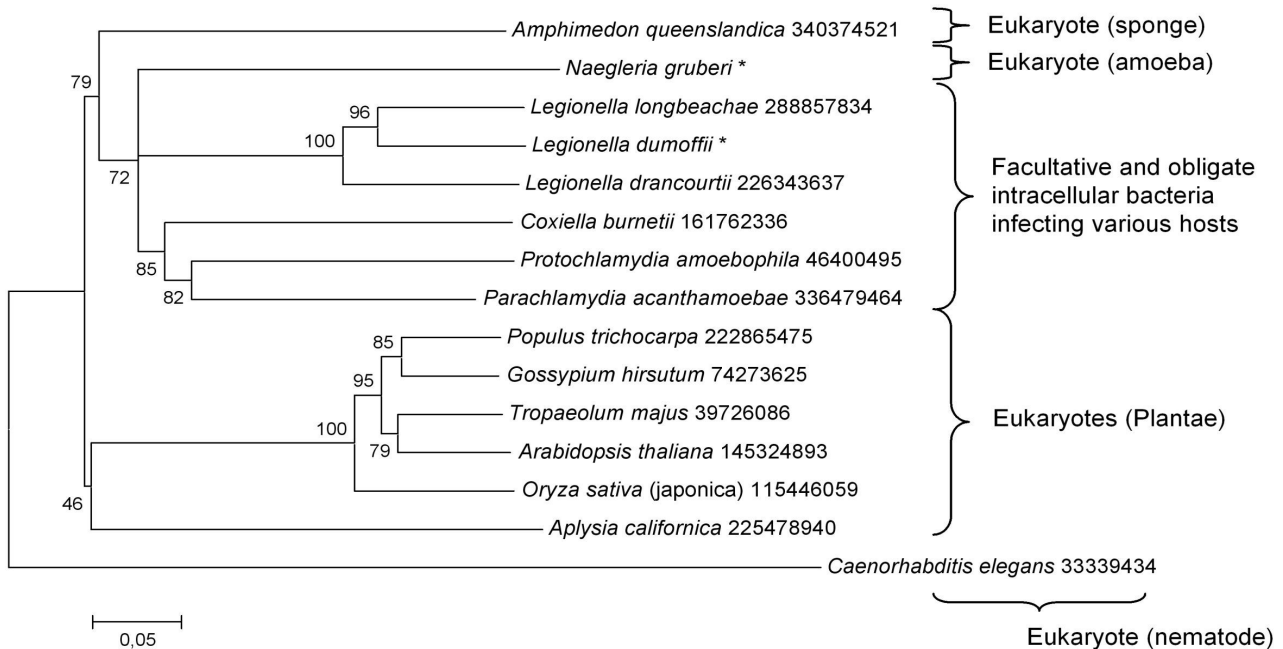
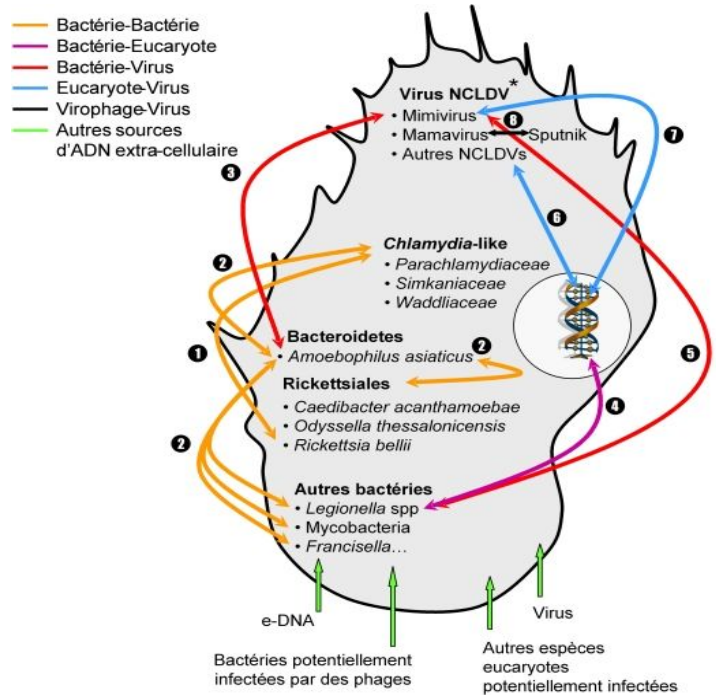


Figure 14 : Arbre phylogénétique mettant en évidence les relations phylogénétiques entre les gènes codant pour la sterol delta-7 reductase chez l'amibe *Naegleria gruberi* et chez les bactéries intracellulaires affiliées aux légionelles et aux *Chlamydiae* (alignement séquences acides aminés avec le logiciel Muscle, arbre construit avec PhyML).

4.2- Interactions des amibes avec de nouvelles espèces bactériennes apparentées aux *Chlamydia*

En plus des espèces « classiques » de *Chlamydiae* pathogènes pour l'homme et l'animal (*Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia felis*, *Chlamydia abortus*, *Chlamydia caviae*, *Chlamydia pecorum* et *Chlamydia muridarum*), de nombreuses espèces de *Chlamydiae* environnementales ont été décrites ces dernières années (Fig. 15). Ces espèces appartiennent à plusieurs familles : *Parachlamydiaceae*, *Simkaniaceae*, *Rhabdochlamydiaceae* et *Waddliaceae*. La plupart sont capables de croître dans les amibes libres de l'environnement, certaines dans les cellules eucaryotes mammifères (dont les macrophages). Certaines espèces peuvent aussi survivre dans les kystes amibiens. Du point de vue de la compréhension des mécanismes évolutifs ayant donné lieu à l'émergence des organismes eucaryotes, de nombreux gènes de plantes trouvent leur plus proches homologues chez ces nouvelles espèces de *Chlamydiae*, suggérant que des événements symbiotiques impliquant notamment des *Chlamydiae* ancestrales et des cellules eucaryotes primitives ont donné naissance aux premières cellules de plantes. Par ailleurs la plupart de ces nouvelles espèces intracellulaires obligatoires ont été associées à différentes pathologies infectieuses chez l'homme et l'animal (Table 4). Des études sérologiques et des études de détection par PCR ont permis de les associer à des bronchopathies et à des pneumonies d'étiologie inconnue chez l'homme, ainsi qu'à des avortements spontanés chez l'homme et chez l'animal (42, 55).

Espèce bactérienne	Maladie/condition	Preuve basée sur
Infections respiratoires basses		
<i>Parachlamydia acanthamoebae</i>	Pneumonie d'origine communautaire	Immunofluorescence, PCR & séquençage
	Pneumonie d'aspiration	Immunofluorescence, western blot
	Bronchite	PCR & séquençage
	Bronchiolite	PCR temps réel
<i>Simkania negevensis</i>	Bronchiolite	PCR, ELISA, culture
	Pneumonie chez les enfants	Immunofluorescence
	Pneumonie chez les adultes	ELISA
	Exacerbation de bronchopneumopathie obstructive chronique	ELISA
<i>Protochlamydia naegleriophila</i>	Pneumonie d'origine communautaire	Immunofluorescence directe, PCR temps réel spécifique, PCR & séquençage
<i>Protochlamydia amoebophila</i>	Pneumonie d'origine communautaire	PCR & séquençage
<i>Waddlia chondrophila</i>	Pneumonie d'origine communautaire	PCR & séquençage
<i>Rhabdochlamydia porcellionis</i>	Pneumonie d'origine communautaire	PCR & séquençage
Autres pathologies		
<i>Parachlamydia acanthamoebae</i>	Arteriosclérose	PCR & séquençage, sérologie
	Fausse couche	Immunofluorescence, western blot
	Sclérose multiple	PCR
<i>Waddlia chondrophila</i>	Fausse couche	Immunofluorescence, western blot

Table 4 : Pathologies associées aux nouvelles espèces bactériennes apparentées aux *Chlamydia*. Cette table est adaptée de la revue du Dr Greub publiée en 2009 (38).

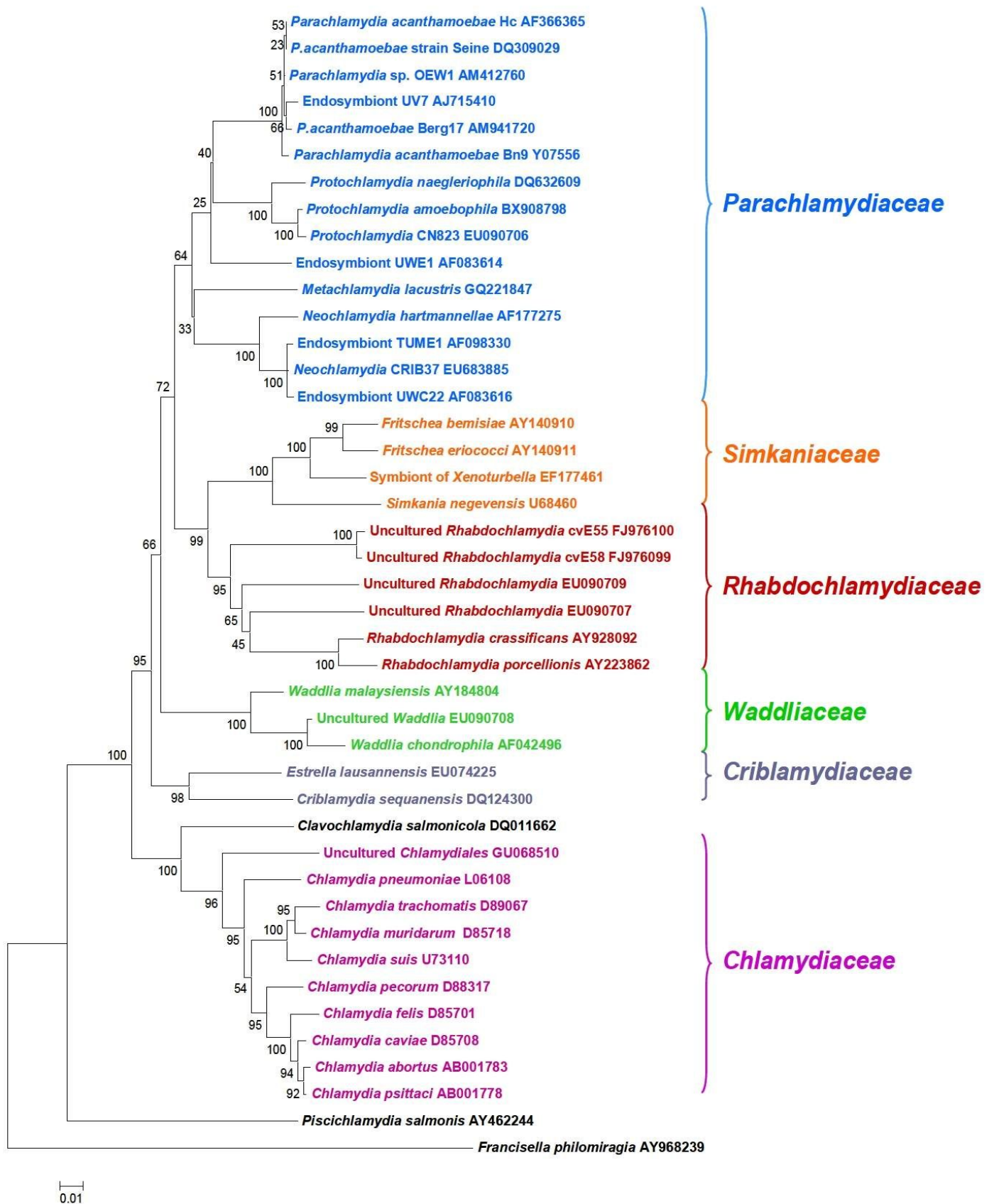


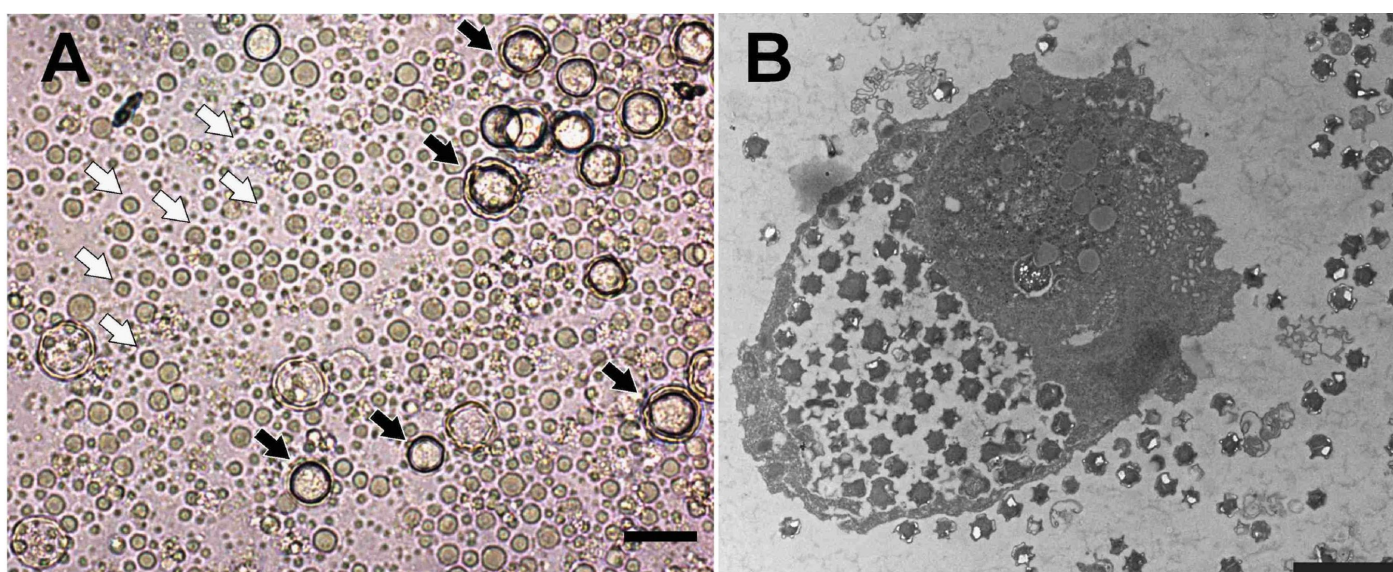
Figure 15 : Arbre phylogénétique des *Chlamydiales* basé sur la séquence codant pour l'ARN ribosomal 16S. Les alignements ont été réalisés avec le logiciel Muscle, l'arbre avec le logiciel PhyML (100 bootstraps).

Les travaux brièvement résumés ci-dessous sont de plusieurs natures : isolement et description de nouvelles espèces bactériennes apparentées aux *Chlamydia*, exploration de la pathogénicité potentielle de certaines de ces nouvelles espèces et enfin capacité de survie de ces nouvelles espèces dans l'environnement. Ces travaux contribuent tous à une meilleure compréhension de l'écologie et de l'importance en santé humaine de ces nouvelles espèces bactériennes.

4.2.1- Publication : Description d'une nouvelle espèce apparentée aux *Chlamydia* : *Criblamydia sequanensis*

Référence (91), [publication en annexe](#)

Lors de notre étude sur l'usine de potabilisation nous avons isolé et décrit la nouvelle espèce *Criblamydia sequanensis* à partir d'un échantillon d'eau de Seine co-cultivé avec *A. castellanii* ATCC 30010. Cette espèce est rapidement lytique pour les amibes infectées. Elle est capable d'infecter de nombreuses souches d'*Acanthamoeba* (Fig. 16B) mais nous n'avons pas pu mettre en évidence de croissance dans des amibes appartenant à d'autres genres amibiens (*Hartmannella*, *Naegleria*...) ou dans des cellules mammifères (56, 91). Elle ne survit pas dans les kystes d'*Acanthamoeba* car les amibes infectées perdent leur capacité d'enkystement (28). La confirmation qu'elle représente bien un nouveau genre (voire une nouvelle famille) de *Chlamydiae* a été apportée par l'amplification, le séquençage et l'analyse phylogénétique de plusieurs gènes. Nous avons mis au point et validé une sonde spécifique d'espèce ciblant l'ARNr 16S de *C. sequanensis* et l'avons utilisée pour détecter la bactérie dans les amibes. Cette nouvelle espèce présente une morphologie typique en étoile à la fin du cycle de répliation intra-amibienne (Fig.16A & 16D). Par ailleurs de nombreuses structures d'origine cellulaire remplies de bactéries sont présentes à la fin de ce cycle d'infection (Fig.16C), ce qui n'est généralement pas observé pour les autres *Chlamydiae* environnementales. L'équipe du Dr Greub a récemment décrit une espèce phylogénétiquement proche : *Estrella lausannensis*, qui présente des similitudes (morphologie en étoile) mais aussi des différences importantes (spectre d'hôte plus important) avec *C. sequanensis* (52, 56).



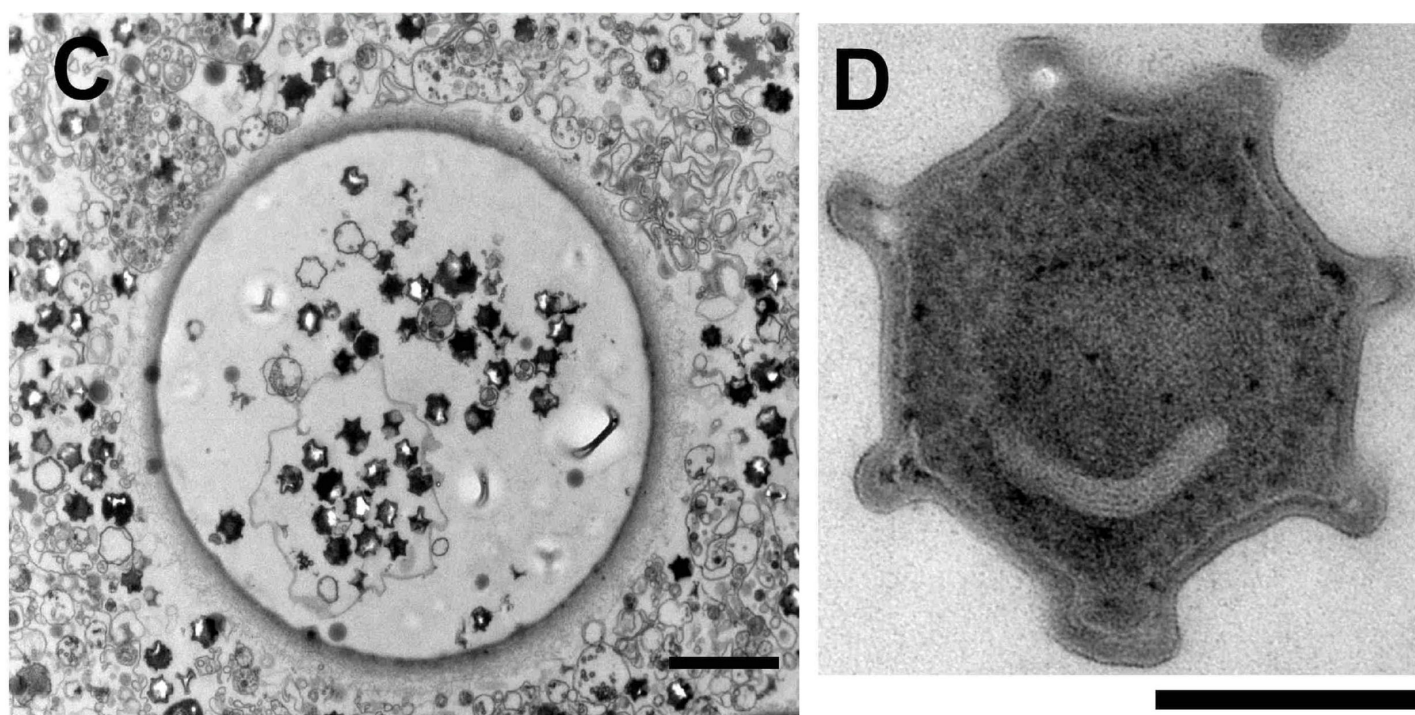


Figure 16 : Infection d'*Acanthamoeba castellanii* par *Criblamydia sequanensis*.

Page précédente : (A) Kystes amibiens non infectés (flèches noires) et structures remplies de bactéries (flèches blanches) observés à la fin du cycle d'infection ; (B) amibe infectée ;
 Ci-dessus : (C) zoom sur une structure remplie de bactérie observée en 3A ; (D) forme typique en étoile de la bactérie à la fin du cycle d'infection.

Barres : 20 µm (A), 2 µm (B&C) et 0,2 µm (D).

De manière intéressante, des études sérologiques réalisées chez des populations de patients souffrant de différents types d'infections respiratoires ont mis en évidence une association entre la pathologie asthmatique et une sérologie positive à *Criblamydia* (11).

4.2.2- Publication : Description d'une nouvelle espèce apparentée aux *Chlamydia* : *Rhabdochlamydia crassificans* (25)

Nous avons participé à la description de la nouvelle espèce apparentée aux *Chlamydia* : *Rhabdochlamydia crassificans* isolée chez la blatte (25). Des études ultérieures ont montré que des bactéries appartenant au genre *Rhabdochlamydia* pourraient être responsables d'infections respiratoires chez les enfants et de naissances prématurées (sérologies positives) (54). Par ailleurs des *Rhabdochlamydia* ont été détectées par PCR sur des échantillons cliniques de patients souffrant d'infection respiratoire d'étiologie inconnue (44, 66).

4.2.3- Publication : Implication de la nouvelle espèce apparentée aux *Chlamydia* : *Waddlia chondrophila* dans les avortements chez la femme

Référence (13), [publication en annexe](#)

L'espèce *Waddlia chondrophila* a été isolée pour la première fois en 1990 d'un avorton de veau et l'association avec des avortements chez le bétail a depuis été confirmée par plusieurs études (31, 32, 45,

73). Nous avons pour notre part participé en 2007 à une étude démontrant que les femmes ayant subi des avortements spontanés uniques ou à répétition présentaient de manière plus fréquente des sérologies positives à *Waddlia* que les femmes ayant suivi une grossesse normale : 31,9% de femmes séropositives dans le groupe ayant subi un avortement spontané unique, 33% dans le groupe ayant subi plusieurs avortements spontanés, et seulement 7,1% ($P < 0,001$) dans le groupe ayant suivi une grossesse normale (13). Il faut signaler que des études de sero-réactivité de différentes espèces de *Chlamydia* et *Chlamydia*-like n'ont pas permis de mettre en évidence de réaction croisée entre *W. chondrophila* et les autres espèces testées (20). Ces résultats de sérologie suggèrent donc une pathogénicité de l'espèce *W. chondrophila* pour l'homme (13). Cette étude a depuis été complétée par d'autres travaux menés par le D^r Baud qui semblent confirmer la pathogénicité vis-à-vis de l'homme (9, 10, 12, 40). Les mécanismes de cette pathogénicité restent à décrire mais la capacité importante de *W. chondrophila* à se multiplier dans de nombreux types cellulaires aussi bien amibiens que mammifères et à éventuellement persister sous forme de corps aberrants ouvrent des pistes d'exploration.

4.2.4- Publication : Capacité de survie dans l'environnement des nouvelles espèces bactériennes apparentées aux *Chlamydia*

Référence (28), **publication en annexe**

Malgré les soupçons de plus en plus importants concernant la pathogénicité des bactéries apparentées aux *Chlamydia* il n'existe que très peu d'information quant à la capacité de ces espèces à survivre dans l'environnement. Les quelques travaux publiés à ce sujet concernent essentiellement l'espèce *Simkania negevensis*, dont Kahane *et al* ont montré qu'elle pouvait survivre au moins 7 jours dans de l'eau distillée stérile à température ambiante (51). Des études récentes rapportent aussi que *Parachlamydia acanthamoebae* (souche Bn9) peut survivre quelques jours à l'état sec sur une surface (37), et que les corps élémentaires (extra-cellulaires) de *Protochlamydia amoebophila* présentent une activité métabolique détectable pendant plusieurs semaines (44). Inversement, quelques études rapportent une capacité très limitée de survie des bactéries du genre *Chlamydia* à l'état libre dans l'environnement : quelques heures seulement pour *Chlamydia pneumoniae* (101). Il est donc tentant de spéculer qu'une capacité de survie extra-cellulaire élevée caractérise les *Chlamydia*-like par rapport aux bactéries du genre *Chlamydia*. Dans cette étude nous avons exploré la capacité de *Waddlia chondrophila*, *Parachlamydia acanthamoebae* (souches Bn9 et Hall coccus), *Protochlamydia naegleriophila* et *Criblamydia sequanensis* à survivre :

- à l'état sec en présence ou non de souillures organiques,
- en suspension en milieu pauvre (eau du robinet stérilisée par autoclavage) ou en milieu riche (bouillon PYG).

Par ailleurs la capacité de ces espèces à se multiplier dans 11 souches d'*Acanthamoeba* a été explorée, ainsi que leur résistance à différents traitements de désinfection (expositions réalisées sur bactéries en suspension, pendant un temps de contact de 10 min). L'espèce *Chlamydia trachomatis* (souche L2/434/BU responsable de lymphogranulomatose vénérienne) a été utilisée comme contrôle dans tous ces tests.

Les résultats des tests de survie démontrent clairement une capacité plus importante de survie des *Chlamydia*-like dans l'environnement en comparaison de *C. trachomatis*. Alors que cette espèce est

généralement indétectable (par infection de cellules HEp-2) dès la fin de la première semaine d'incubation (Fig. 17), les *Chlamydia*-like survivent bien plus longtemps : 3 à 4 semaines à l'état sec en l'absence de souillures organiques, 3 à 7 semaines à l'état sec en présence de souillures organiques, de 6 à > 10 semaines en suspension dans de l'eau du robinet stérile et généralement > 10 semaines en milieu PYG (Fig. 17). Concernant les spectres d'hôte (Table 5) il est intéressant de noter que les deux souches de *P. acanthamoebae* ne présentent pas exactement le même spectre : la souche Bn9 n'est pas capable d'infecter les deux souches d'*Acanthamoeba lenticulata* tandis que la souche Hall coccus l'est. Par ailleurs de nombreuses « vésicules » (ou « pseudo-kystes »?) sont observés à la fin du cycle d'infection des amibes par *C. sequanensis*, mis à part lors de l'infection des deux souches d'*A. lenticulata* qui semble nettement moins efficace. Enfin *P. naegleriophila* infecte efficacement toutes les souches amibiennes tandis que *W. chondrophila* présente un spectre plus limité avec une infection réellement productive chez seulement deux souches d'amibes.

Host amoebae	<i>P. acanthamoebae</i> Bn9	<i>P. acanthamoebae</i> Hall's coccus	<i>Protochlamydia</i> <i>naegleriophila</i> KNIC	<i>Criblamydia</i> <i>sequanensis</i> CRIB 18	<i>W. chondrophila</i> ATCC VR-1740
<i>A. polyphaga</i> CCAP 1501/18	+++	+++	+++	+++ ^a	+
<i>A. castellanii</i> CCAP 1501/10	+++	+++	+++	+++ ^a	+
<i>A. castellanii</i> ATCC 30010	++	++	++	++ ^a	++
<i>A. castellanii</i> ATCC 30234	+++	+++	+++	++ ^a	-
<i>A. lenticulata</i> ATCC 30841	-	+++	+++	+	-
<i>Acanthamoeba</i> sp.1	+++	+++	+++	+++ ^a	+
<i>Acanthamoeba</i> sp.2	++	+++	+++	+++ ^a	-
<i>Acanthamoeba</i> sp.3	+++	+++	+++	+++ ^a	++
<i>Acanthamoeba</i> sp.4	+++	+++	+++	+++ ^a	+
<i>Acanthamoeba</i> sp.5	+++	+++	+++	+++ ^a	+
<i>Acanthamoeba</i> sp.6 (<i>A. lenticulata</i>)	-	++	++	+	-

Table 5 : Efficacité de l'infection de différentes souches d'*Acanthamoeba* par les *Chlamydia*-like.
a: nombreuses vésicules observées à la fin du cycle d'infection.

Products tested	<i>P. acanthamoebae</i> Bn9	<i>P. acanthamoebae</i> Hall's coccus	<i>Protochlamydia</i> <i>naegleriophila</i>	<i>Waddlia</i> <i>chondrophila</i>	<i>Criblamydia</i> <i>sequanensis</i>	<i>Chlamydia</i> <i>trachomatis</i>
Bleach 0.25%	>4.3	>4.7	>4.2	>4.3	>5.2	>4.4
Bleach 2.5%	>4.3	>4.7	>4.2	>4.3	>5.2	>4.4
Ethanol 70%	>4.3	4.6 ± 0.1	>4.2	>4.3	>5.2	>4.4
Glutaraldehyde 2%	>4.3	4.5 ± 0.1	>4.2	>4.3	>5.2	>4.4
Glutaraldehyde-based product	>4.3	>4.7	>4.2	>4.3	5.1 ± 0.4	>4.4
Hydrogen peroxide 7.5%	>4.3	3.5 ± 0.4	>4.2	>4.3	>5.2	>4.4
Hydrogen peroxide-based SporKlenz	>4.3	>4.7	>4.2	>4.3	>5.2	>4.4
Orthophthalaldehyde (OPA) 0.55%	>4.3	>4.7	>4.2	>4.3	>5.2	>4.4
OPA-based product	>4.3	>4.7	>4.2	>4.3	4.4 ± 0.2	>4.4
Peracetic Acid 0.2%	>4.3	4.4 ± 0.2	>4.2	>4.3	>5.2	>4.4
PAA-based STERIS-20	>4.3	>4.7	>4.2	>4.3	>5.2	>4.4
Control 55°C	0.3 ± 0.0	1.7 ± 0.1	0.5 ± 0.2	2.2 ± 0.1	3.7 ± 0.2	>4.4

Table 6 : Efficacité des traitements de désinfection sur les *Chlamydia*-like.

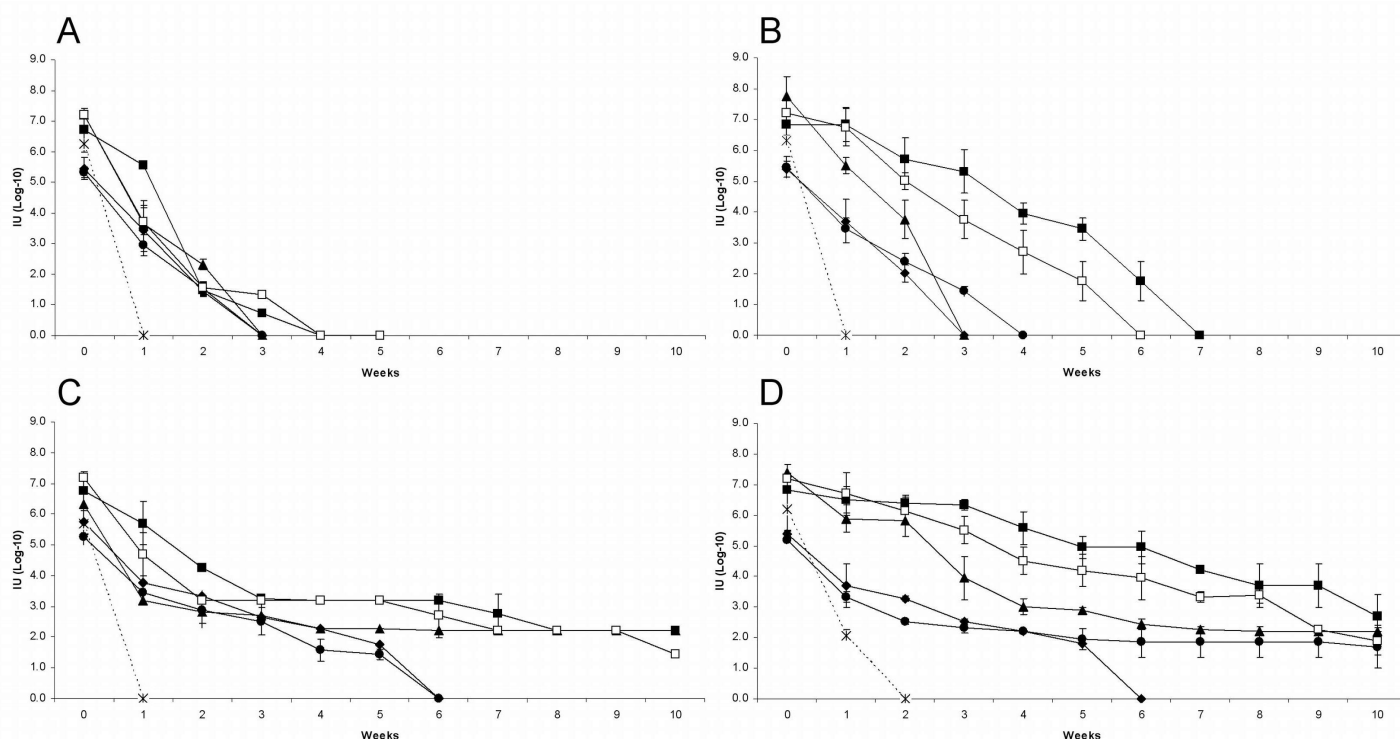


Figure 17 : Survie extra-cellulaire des *Chlamydia*-like et de *Chlamydia trachomatis*. *C. trachomatis* (ligne en pointillés), *P. acanthamoebae* souche Bn9 (carrés blancs), *P. acanthamoebae* souche Hall coccus (carrés noirs), *P. naegleriophila* (losanges noirs), *W. chondrophila* (triangles noirs) et *C. sequanensis* (ronds noirs) ont été séchés en microplaques 96 puits en l'absence de souillures organiques (A) ou en présence de sérum albumine bovine + sang (B), ou suspendus en eau du robinet stérile (C) ou en bouillon PYG (D).

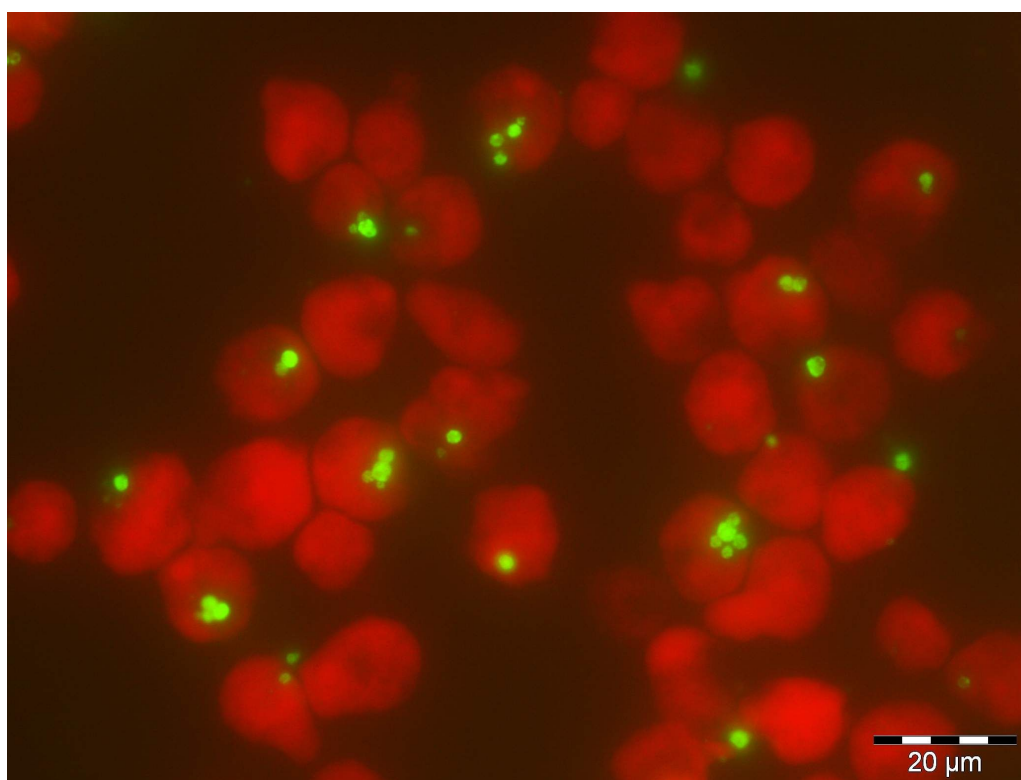


Figure 18 : Détection de *Chlamydia trachomatis* dans la souche d'*Acanthamoeba* sp2. La détection a été réalisée à l'aide du kit Bio-Rad Pathfinder (anticorps spécifiques) 7 jours après l'infection des amibes.

L'infection des souches d'amibes par *C. trachomatis* n'a jamais donné lieu à une prolifération bactérienne dans les amibes directement visible au microscope comme pour la plupart des *Chlamydia*-like. Par ailleurs l'utilisation de la PCR quantitative (50) n'a pas permis de mettre en évidence une augmentation du nombre de copies d'ADN de *C. trachomatis* lors de l'infection des amibes : ce nombre de copies restait généralement relativement constant entre le premier jour et le douzième jour de l'infection. En revanche l'utilisation du kit de détection *in situ* des *C. trachomatis* a permis de mettre en évidence la présence de ces bactéries dans les amibes infectées jusqu'à 7 jours après l'infection (Fig. 18). Ce résultat est intrigant et appelle des explorations complémentaires. Des expérimentations similaires avec *Chlamydia abortus* ont mis en évidence une disparition rapide des bactéries intra-amibiennes qui devenaient indétectables avec des anticorps spécifiques (104). En revanche l'étude de Essig *et al* semble démontrer une survie, voire une faible multiplication de *Chlamydia pneumoniae* dans les amibes (33). Nos résultats, combinés au fait que certains auteurs ont récemment rapportés l'identification de bactéries proches de *C. trachomatis* dans des amibes isolées de cornées infectées (48), peuvent laisser supposer que *C. trachomatis* est capable de survivre dans les amibes pendant une durée significative. Concernant enfin l'effet des traitements de désinfection sur les bactéries extracellulaires (Table 6), l'observation la plus notable est la résistance importante des *Chlamydia*-like à la chaleur en comparaison avec *C. trachomatis* : la réduction de titre observée après exposition à 55°C pendant 10 min est de l'ordre de 0,5 Log₁₀ pour *Pa. acanthamoebae* Bn9 et *Pr. naegleriophila*, de 1,5 à 2,0 Log₁₀ pour *W. chondrophila* et *P. acanthamoebae* Hall coccus, et de 3,5 Log₁₀ pour *C. sequanensis*. L'inactivation est complète pour *C. trachomatis*. Comme pour la résistance des kystes amibiens à la chaleur (cf paragraphe 3.2.3), cette apparente résistance des *Chlamydia*-like à la chaleur pose question car la chaleur est souvent utilisée pour contrôler les flores microbiennes dans les réseaux de distribution d'eau (63).

4.3- Interactions des amibes avec les mycobactéries

Le genre *Mycobacterium* comprend un grand nombre d'espèces pathogènes pour l'homme, dont les plus connues sont *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae* et *Mycobacterium ulcerans* responsables respectivement de la tuberculose, de la lèpre et de l'ulcère de Buruli. Par ailleurs les espèces regroupées sous l'appellation « mycobactéries non tuberculeuses » (NTM en anglais) représentent un groupe d'espèces diverses qui sont largement présentes dans l'environnement et fréquemment isolées des sols et des eaux (eaux de surface, eaux de réseaux). Ces espèces sont responsables d'un nombre croissant d'infections respiratoires, cutanées et des tissus mous (19, 30, 103). Les NTM appartenant au complexe *Mycobacterium avium*, ainsi que les espèces *M. abscessus*, *M. massiliense*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. kansasii* et *M. mucogenicum* sont les plus fréquemment isolées des patients. Les infections causées par ces espèces sont souvent considérées comme opportunistes mais la présence ubiquitaire de ces bactéries dans divers types d'eaux (y compris l'eau des réseaux hospitaliers) et la difficulté qu'il y a à traiter les infections qu'elles causent en font un problème majeur de santé publique. Les études rapportant la capacité des mycobactéries à survivre et / ou se multiplier dans les amibes libres de l'environnement sont de plus en plus nombreuses. Nous en avons fait une revue en 2007, démontrant clairement que la plupart des espèces de mycobactéries pathogènes, y compris *M. leprae*, sont capables de survivre voire de se multiplier dans les

trophozoites d'*Acanthamoeba*, et éventuellement de survivre dans les kystes (95) (**publication en annexe**). Les travaux d'Adekambi *et al.* (2006) rapportent notamment la capacité de 26 espèces différentes de mycobactéries à survivre dans les kystes d'*A. polyphaga*, étant ainsi protégées vis-à-vis de traitements de désinfection au chlore (1). Les auteurs suggèrent par conséquent qu'il devient nécessaire de tester l'efficacité contre ces kystes amibiens infectés des traitements biocides utilisés pour traiter les endoscopes. Par ailleurs, il semblerait que des mutations des gènes de porines conférant une résistance accrue de certaines souches de *M. chelonae* aux traitements de désinfection à base d'aldéhydes mais aussi à de nombreux traitements antibiotiques pourraient aussi favoriser la survie intra-cellulaire (y compris intra-amibienne) des ces souches de mycobactéries (76, 84). Enfin la multiplication intra-amibienne des mycobactéries semble favoriser l'expression de gènes de virulences qui sont les mêmes que ceux conférant une virulence accrue vis-à-vis de l'homme ou de l'animal (23, 29, 86). Un tableau relativement inquiétant semble donc émerger de ces différentes études : certains traitements de désinfection couramment utilisés (aldéhydes, mais aussi autres traitements?) pourraient sélectionner des souches de mycobactéries pathogènes présentant une résistance plus élevée aux antibiotiques et plus à même de survivre et de se multiplier dans les amibes, exacerbant ainsi l'expression de gènes de virulence favorisant l'infection de l'homme ou de l'animal. Cette description alarmiste est sans doute très simplifiée mais la plupart des études publiées récemment vont dans ce sens. Dans ce contexte, nous avons participé à plusieurs études portant sur les interactions amibes – mycobactéries.

4.3.1- Publication : Test de la virulence de différentes souches cliniques de *Mycobacterium kansasii* vis-à-vis d'*Acanthamoeba castellanii*

Référence (41), **publication en annexe**

L'espèce *Mycobacterium kansasii* est, avec *M. avium*, l'une des espèces de mycobactéries non tuberculeuses les plus fréquemment responsables d'infections chez l'Homme. Cette espèce est classée en plusieurs sous-types sur la base du gène *hsp65* : le sous-type 1 est considéré comme virulent car isolé chez des patients immunocompétents ou immunodéficients souffrant d'infections pulmonaires, le sous-type 2 est considéré comme opportuniste car principalement isolé de patients infectés par le VIH et souffrant d'immunodéficiences, le sous-type 3 est généralement considéré comme commensal car isolé de patients ne souffrant pas d'infection (85). La pathogénicité des autres sous-types (4 à 7) reste à déterminer. Dans ce contexte, nous avons tiré parti de la présence d'une large collection de souches de *M. kansasii* à l'hôpital de Lausanne afin de tester la virulence vis-à-vis des amibes de souches appartenant à ces différents sous-types. Des souches appartenant aux sous-types 1, 3 et 6 ont été utilisées pour infecter l'amibe *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010. Le suivi de l'infection a ensuite été réalisé en effectuant des colorations de Ziehl-Neelsen permettant de révéler la présence de mycobactéries dans les amibes. Le pourcentage d'amibes infectées ainsi que la progression du nombre de bactéries par amibe ont été relevés au fur-et-à-mesure de l'infection. Ces expériences relativement simples ont permis de mettre en évidence une plus grande virulence du sous-type 1, avec un nombre d'amibes infectées et un nombre de bactéries par amibes plus importants que pour les sous-types 3 et 6 (Fig.19). Seule une souche appartenant au sous-type 3 présentait un profil de virulence similaire à celui des souches du sous-type 1 ; or cette souche était la seule

souche considérée comme virulente parmi les souches du sous-type 3, car isolée à partir de prélèvements sanguins. Ces travaux semblent donc confirmer la pertinence du modèle amibien dans l'étude de la virulence des mycobactéries.

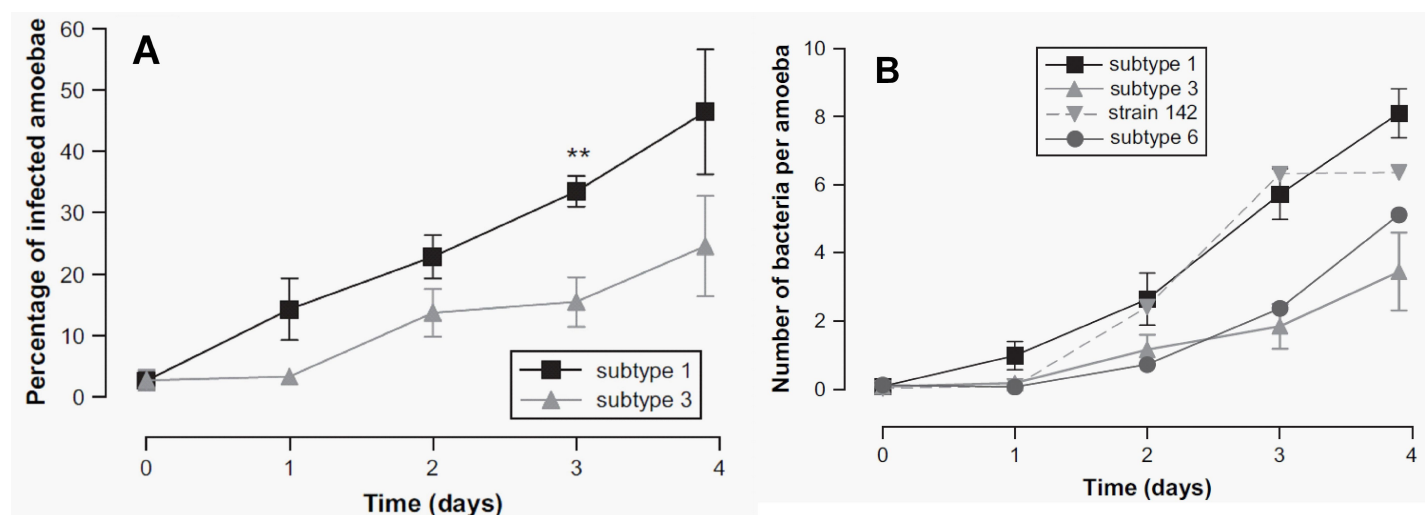


Figure 19 : Évolution du pourcentage d'amibes infectées (A) et du nombre de bactéries par amibe (B) en fonction des sous-types. La souche 142 est une souche de sous-type 3 considérée comme pathogène car isolée d'une hémoculture.

4.4- Interactions des amibes avec les virus NCLDV

Les virus « géants » capables d'infecter les amibes ont suscité l'intérêt de la communauté scientifique ces dernières années. La description du Mimivirus et de son génome par l'équipe du P^r Didier Raoult à Marseille a soulevé de nombreuses questions et donné lieu à des débats passionnés sur le rôle de ces nouveaux virus dans les échanges génétiques entre eucaryotes et bactéries (cf Fig.13), et sur leur place éventuelle dans l'arbre évolutif de la vie sur terre. En plus de ces questions évolutives il a été proposé que ces nouveaux virus puissent être responsables d'infection chez l'homme, avec la description d'un cas de séroconversion positive à Mimivirus lors de l'infection accidentelle d'un technicien de laboratoire (71). Quels que soient leur place réelle dans l'arbre évolutif et leur rôle en tant qu'agents infectieux ces virus constituent un sujet d'étude passionnant. En plus de leur taille et de celle de leur génome, proches de celles des plus petites bactéries, ces virus présentent de nombreuses particularités dont la présence de nombreux gènes d'origines eucaryote et bactérienne dans leurs génomes, donnant lieu à des activités métaboliques inédites chez des virus. Ils appartiennent au groupe des virus NCLDV (nucleocytoplasmic large DNA viruses) comprenant notamment les Phycodnavirus (virus infectant des micro-algues marines), les Iridovirus (dont plusieurs sont des pathogènes de poissons, d'amphibiens et de reptiles), les Asfarvirus (virus de la fièvre porcine africaine) et les Poxvirus (nombreux pathogènes humains et animaux) (Fig. 20). Ils sont supposés agir comme de véritables « taxis » permettant l'échange de gènes entre les amibes et les bactéries intracellulaires d'amibes (légiellles, *Chlamydia*-like...) et sont eux-mêmes potentiellement infectés par des « virophages » (Fig.13). Il faut noter que bien que décrit chez les amibes Mimivirus est affilié de façon

distante au groupe des Phycodnavirus. Par ailleurs deux nouveaux virus ont récemment été affiliés à Mimivirus : le *Cafeteria roenbergensis* virus (CroV) qui infecte un protiste microflagellé prédateur de bactéries, et le « Megavirus » qui a été isolé à partir d'échantillons marins par co-culture sur amibes (5, 36). La nouvelle famille « Megaviridae » est donc proposée, incluant Mimivirus et ces deux nouveaux virus (5). Plusieurs études métagénomiques effectuées sur milieu marin rapportent la présence de gènes affiliés à Mimivirus, suggérant que les membres de la nouvelle famille des « Megaviridae » sont présents de façon importante dans les océans (24, 61, 62). Par ailleurs plusieurs photos de microscopie électronique suggèrent que des virus relativement gros présentant une morphologie semblable à celle de nombreux NCLDV sont aussi présents chez de nombreux autres micro-organismes eucaryotes, dont des parasites comme les *Giardia* ou les *Blastocystis* (79-81).

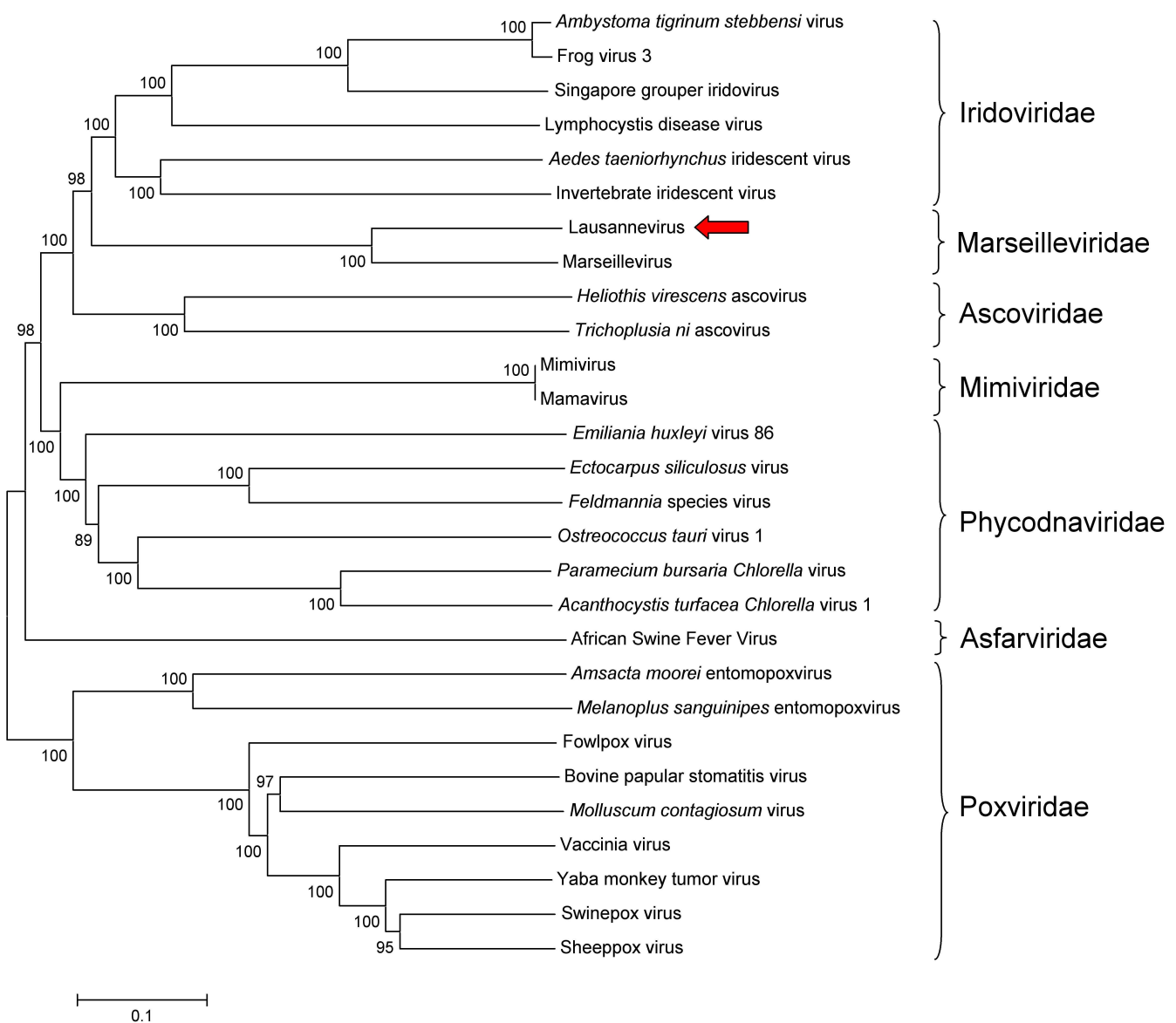


Figure 20 : Arbre phylogénétique de virus représentatifs du groupe des NCLDV (nucleocytoplasmic large DNA viruses). L'arbre a été construit à partir d'un alignement de concaténats de 5 core protéines du groupe 1 retrouvées chez une vaste majorité de NCLDV : ATPase A32, protéine majeure de capsid, hélicase D5, ADN-polymérase B et facteur de transcription A1L/MLTF2. Les virus récemment décrits : *Cafeteria roenbergensis* virus (CroV) et Megavirus ne sont pas représentés.

4.4.1- Publication : Lausannevirus, un nouveau virus d'amibes

Référence (89), **publication en annexe**

Dans ce contexte, nous avons séquencé et annoté le génome d'un virus isolé à partir d'une co-culture d'eau de Seine et que nous avons par la suite nommé Lausannevirus. Le virus a été détecté par hasard alors que nous réalisons des colorations de Gimenez pour détecter des légionelles infectant des amibes sur un échantillon de co-culture amibienne (cf § 3.1.1) (Fig.21). La présence d'un virus a par la suite été confirmée en réinfectant des amibes avec un surnageant filtré à 0,45 µm afin de se débarrasser des légionelles et en préparant les amibes ainsi infectées pour des observations en microscopie électronique à transmission (Fig. 22).

Figure 21 (ci-contre) : Observation de Lausannevirus en coloration de Gimenez.

Les légionelles co-infectant les amibes sont clairement visibles (flèches vertes) tandis que les virus apparaissent sous forme de petits points (flèches violettes). Barre : 10 µm

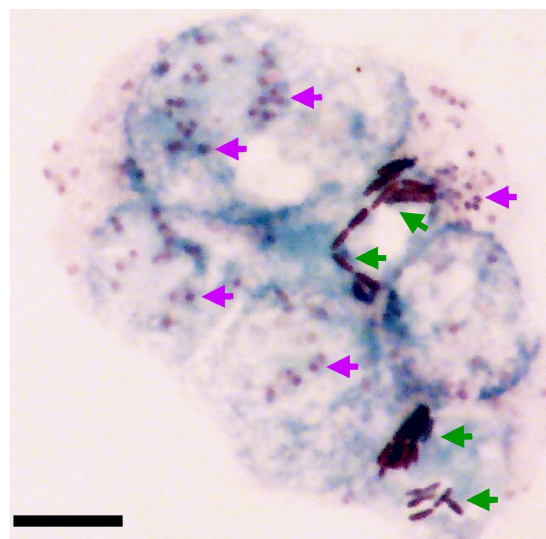
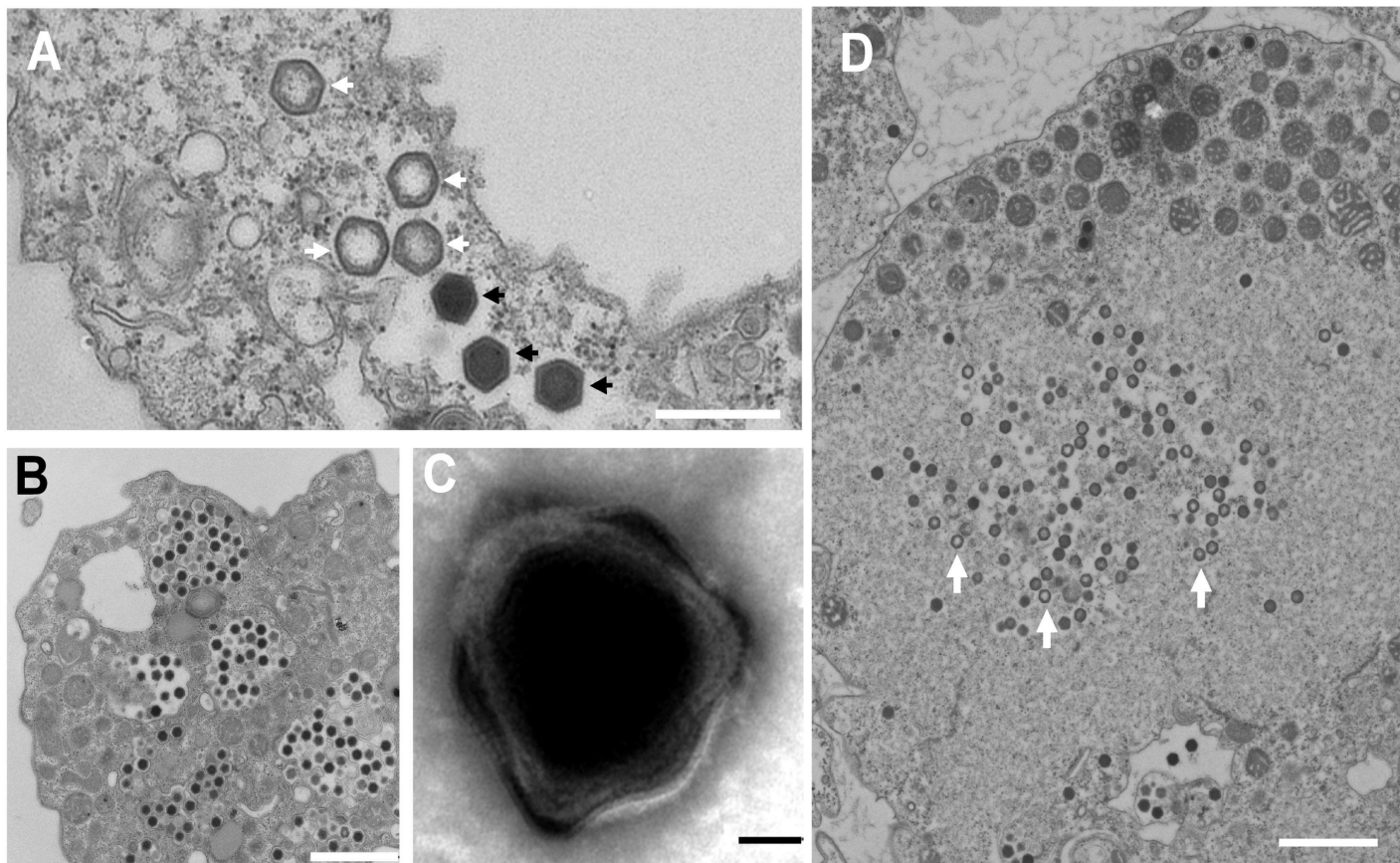


Figure 22 (ci-dessous) : Observation de Lausannevirus en microscopie électronique à transmission.

Des particules virales « pleines » ou « vides » (A, flèches noires et blanches, respectivement) peuvent être observées dans de nombreuses vacuoles réparties dans le cytoplasme des amibes infectées (B). L'observation en coloration négative révèle la présence de plusieurs couches délimitant un corps condensé (C). Les « usines à virus » déjà décrites pour d'autres virus (66) sont présentes, elles contiennent de nombreux virus en cours de formation (flèches blanches) et sont entourées de nombreuses mitochondries (D). Barres : 500 nm (A), 2 µm (B), 40 nm (C), 2 µm (D).



Le virus a un diamètre d'environ 200 nm. Les essais d'infection de divers types de cellules semblent montrer que ce nouveau virus est spécifique de certaines amibes du genre *Acanthamoeba* (groupe T4) et qu'il est apparemment incapable d'infecter des cultures de cellules mammifères. L'infection des amibes est fulgurante, avec un effet cytopathique survenant en quelques heures seulement et une lyse des cellules infectées survenant en moins de 24 h (Fig. 23).

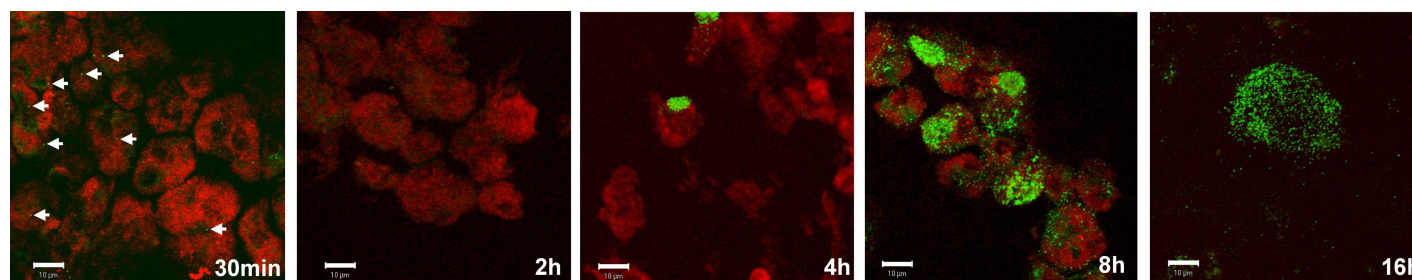


Figure 23 : Déroulement du cycle d'infection d'*Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010 par Lausannevirus. Le virus est révélé par des anticorps polyclonaux induits chez la souris, eux-mêmes marqués secondairement par des anticorps anti-souris couplés FITC. Les amibes sont colorées au bleu d'Evans. Lausannevirus n'est pas détecté durant la phase d'éclipse qui a lieu 2 heures après l'infection. La lyse des amibes intervient 16 à 24h après l'infection. Barre : 10 µm.

Le séquençage du génome (346 kb, GC% 42,9) a permis de détecter 450 gènes hypothétiques d'une taille moyenne de 716 bp, représentant 92,6% de la taille du génome et codant pour des protéines dont la taille varie de 44 à 1526 acides aminés. Les analyses phylogénétiques basées sur les « core proteins » du groupe 1 retrouvées chez la grande majorité des NCLDV montrent que Lausannevirus est phylogénétiquement proche de Marseillevirus décrit en 2010 par l'équipe de Didier Raoult (Fig. 20). Parmi les 450 protéines prédites chez Lausannevirus :

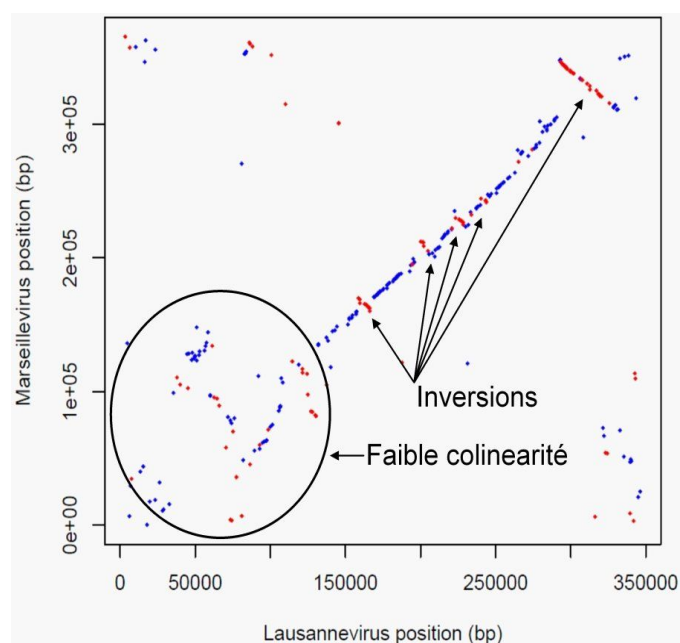
- 118 n'ont pas d'homologue dans les bases de données,
- 323 trouvent leur plus proche homologue chez Marseillevirus,
- 7 trouvent leur plus proche homologue ailleurs que chez Marseillevirus mais présentent cependant des homologues chez Marseillevirus,
- 2 n'ont pas d'homologue chez Marseillevirus.

De manière intrigante, alors que la majorité du génome de Lausannevirus est colinéaire de celle du génome de Marseillevirus avec seulement quelques zones inversées, les premières 150 kilobases du génome de Lausannevirus ne sont pas colinéaires (Fig. 24). La région non-colinéaire n'est pas particulièrement enrichie en protéines d'origine bactérienne, eucaryote ou phagique. Par ailleurs cinq régions inversées sont clairement mises en évidence dans la partie colinéaire du génome (Fig. 24).

Plusieurs familles de protéines ont été identifiées : famille de protéines contenant des motifs « MORN-repeats », endonucléases et sérine/thréonine protéines kinases. Douze autres familles moins importantes sont quasi-exclusivement constituées de protéines dont la fonction est inconnue, à l'exception des ubiquitines. La déoxyuridine triphosphate nucleotidohydrolase (dUTPase) est une « core » protéine du groupe 2 retrouvée chez la plupart des NCLDV (49). Son rôle est d'hydrolyser le dUTP, générant ainsi du

dUMP utile à la synthèse des nucléotides à base de thymidine tout en diminuant la concentration de dUTP qui pourrait être incorporé par erreur dans l'ADN viral. Par ailleurs la dUTPase a été associée à la capacité de certains virus NCLDV à se multiplier dans des cellules au repos (ne se multipliant pas) (21). Chez Lausannevirus la dUTPase est quasiment complète tandis que chez Marseillevirus elle est très tronquée et donc sûrement inactive. Les analyses phylogénétiques suggèrent que la dUTPase de Lausannevirus aurait pu être acquise à partir de bactéries endosymbiotiques d'amibes telles que *Ca Amoebophilus asiaticus*. Il reste à déterminer si ces différences dans les séquences des deux protéines résultent dans des différences de métabolisme et/ou de virulence entre les deux virus. Signalons enfin la présence de deux intéines chez les deux virus. Les intéines sont des éléments génétiques mobiles transcrits en même temps que la protéine hôte mais qui sont ensuite excisés. Les intéines situées dans les D6/D11-hélicases des deux virus sont très semblables, tandis que celles situées dans les ribonucléotides reductases sont très différentes. Ces différences peuvent éventuellement renseigner sur l'histoire évolutive de ces deux virus.

Figure 24 : Nuage de points construit à partir de l'emplacement dans le génome des protéines orthologues entre Lausannevirus et Marseillevirus. Les gènes présentant la même orientation sur le brin d'ADN sont indiqués en bleu, ceux encodés sur le brin complémentaire sont représentés en rouge. La première partie du génome des deux virus est faiblement co-linéaire tandis que la seconde partie est très largement co-linéaire, avec cependant 5 régions inversées (flèches).



Par ailleurs nous avons mis en évidence chez les deux virus 3 gènes codant pour des doublets d'histones, avec deux singlets présentant une homologie importante avec les histones H2A, un autre avec les H2B, un autre avec les H3 et enfin un dernier avec des histones d'Archaeobactéries (Fig. 25). La présence de ces doublets soulève de nouvelles questions car le codage de doublets d'histones par un même gène n'a jusqu'ici été mis en évidence que chez des Archaeobactéries. Par ailleurs certains auteurs proposent que des Archaeobactéries ancestrales (*Thaumarchaeota*, possédant aussi des gènes d'histones) pourraient avoir participé aux premiers événements symbiotiques ayant finalement donné naissance aux Eucaryotes. Comme dans le cas des *Chlamydia*-like, ces nouvelles données apportent donc des éléments qui peuvent contribuer à l'élaboration de scénarii visant à expliquer l'histoire évolutive des Eucaryotes.

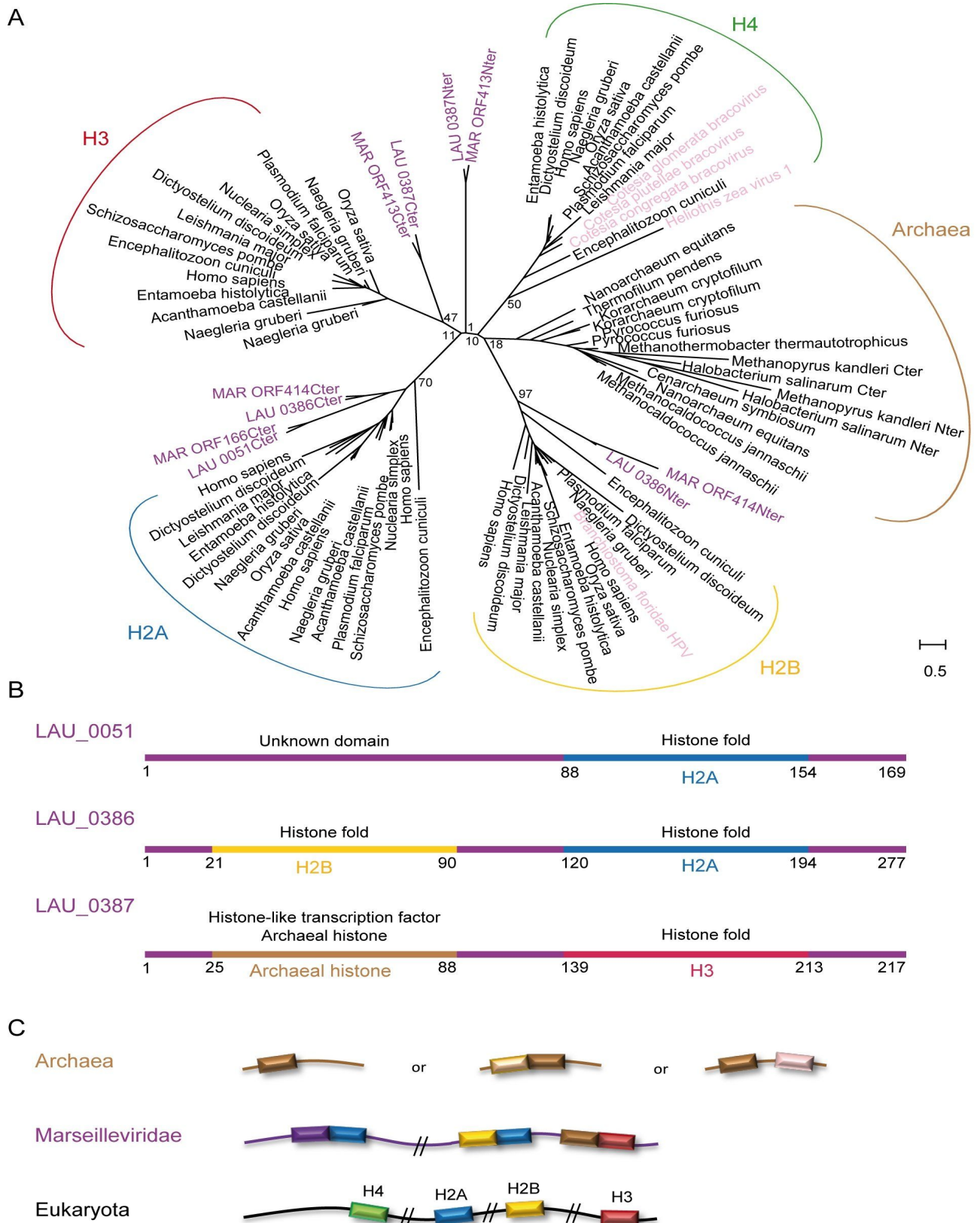


Figure 25 : Phylogénie et répartition des motifs d'histones trouvés chez Lausannevirus et Marseillevirus. Le gène LAU_0051 encode un domaine inconnu et un domaine présentant une homologie avec les histones H2A ; le gène LAU_0386 encode un domaine présentant une homologie avec les histones H2B et un domaine présentant une homologie avec les histones H2A ; le gène LAU_0387 encode un domaine présentant une homologie avec les histones archéobactériennes et un domaine présentant une homologie avec les histones H3. Cette répartition en doublets (même gène codant pour deux domaines histones différents) n'est retrouvée que chez certaines archéobactéries. L'arbre phylogénétique représente la position phylogénétique des différents domaines d'histones présents chez Lausannevirus et Marseillevirus.

Chapitre 5 : Perspectives

5.1- Synthèse de nos travaux

Ces travaux, ainsi que de nombreux autres travaux publiés par d'autres équipes sur des thématiques similaires, démontrent clairement que :

- Les amibes libres sont présentes dans la plupart des environnements hydriques naturels ou artificiels ;
- Certaines de ces amibes (genre *Acanthamoeba*) sont susceptibles de présenter des résistances très élevées à certaines catégories de traitements de désinfection. Cette résistance très élevée concerne les kystes amibiens la plupart du temps, mais les trophozoites peuvent aussi être très résistants vis-à-vis de certains traitements (glutaraldéhyde...) ;
- De nombreuses espèces bactériennes pathogènes connues sont capables de proliférer en présence et/ou à l'intérieur des trophozoites amibiens, et certaines survivent dans les kystes : légionelles, mais aussi mycobactéries dont l'importance en santé humaine et animale est en constante augmentation ;
- La virulence vis-à-vis des amibes est corrélée à la virulence vis-à-vis des hôtes supérieurs ;
- Les échanges génétiques entre micro-organismes intracellulaires et les cellules hôtes hébergeant ces micro-organismes sont fréquents ;
- De nombreuses espèces bactériennes pathogènes émergentes sont aussi capables de proliférer dans les amibes : c'est le cas des bactéries apparentées aux *Chlamydia*, pour lesquelles les preuves directes ou indirectes de pathogénicité vis-à-vis de l'Homme et/ou de l'animal sont de plus en plus nombreuses ;
- Certaines parmi ces espèces pathogènes émergentes présentent des capacités importantes de survie à l'état libre dans l'environnement ;
- Par ailleurs les amibes hébergent aussi de nouveaux types de virus qui sont eux aussi susceptibles d'être pathogènes et qui présentent des caractéristiques morphologiques et génétiques tout à fait remarquables.

5.2- Perspectives / développements envisagés

Comme nous l'avons vu ci-dessus les amibes (et plus largement les protozoaires) sont présents dans tous les écosystèmes naturels (sols, rivières...) mais aussi artificiels (réseaux d'eau, surfaces de travail, réfrigérateurs, élevages de volaille...). Ces eucaryotes unicellulaires présentent une résistance très importante à de nombreux traitements de décontamination utilisés couramment dans différentes activités, dont la production/distribution d'eau potable et l'industrie agro-alimentaire. Ils sont en interaction constante avec les biofilms et peuvent sélectionner, protéger et disséminer des micro-organismes pathogènes avérés ou émergents. Malgré ce contexte de risque élevé l'écologie des protozoaires dans les écosystèmes

associés à la production et à la distribution d'eau potable mais aussi au conditionnement, à la conservation et à la distribution des aliments est peu étudiée, et il n'existe que peu de travaux publiés dans la littérature.

Par conséquent, il nous paraît important d'étudier l'écologie des protozoaires dans les biofilms complexes mis en place et/ou impactés par les activités humaines. L'objectif est notamment d'éviter les conséquences néfastes d'une prolifération mal contrôlée des protozoaires dans ces écosystèmes : sélection de bactéries pathogènes intracellulaires au détriment de la flore saprophyte non pathogène, facilitation d'échanges de gènes de virulence et/ou de résistance entre bactéries intracellulaires pathogènes, prolifération de ces agents pathogènes dans l'écosystème, risque infectieux accru pour l'homme et les animaux et nécessité d'utiliser des concentrations importantes de biocides pour éradiquer les micro-organismes sélectionnés.

Notre projet de recherche à court / moyen terme comporte trois parties principales.

5.2.1- Protozoaires de l'environnement : interactions avec l'écosystème biofilm

Les travaux regroupés sous cette thématique ont pour objectif une meilleure compréhension des interactions entre différents protozoaires fréquemment rencontrés dans les environnements artificiels (eaux de surface et de réseaux, surfaces de travail des industries agro-alimentaires, aliments issus de l'agriculture...) et les biofilms présents dans ces écosystèmes.

- *Devenir des protozoaires dans les biofilms* : les espèces et les souches bactériennes présentes dans les biofilms ainsi que les différentes molécules produites par ces bactéries (exopolysaccharides, ADN, toxines...) jouent un rôle important dans l'implantation et la croissance des protozoaires, et notamment des amibes dans les biofilms (58). Actuellement, nous disposons d'une collection de plus de 40 souches d'amibes qui ont été isolées de différents environnements et que nous avons identifié par séquençage de fragments de l'ADNr 18S. De nombreuses données ont déjà été recueillies pour les souches appartenant au genre *Acanthamoeba* : résistance aux traitements de décontamination usuels, permissivité à l'infection par des bactéries pathogènes et des virus d'amibes... La collecte de ces données sera complétée pour des souches appartenant à d'autres espèces amibiennes : *Hartmannella vermiformis* et *Naegleria* spp, et éventuellement pour des souches de *Tetrahymena*. De nouvelles caractéristiques seront ensuite explorées pour toute la collection : mobilité et vitesse de prédation des trophozoites, hydrophobicité et adhésion des kystes à différents types de surfaces (acier inox, cuivre, verre...), tolérance des trophozoites et des kystes à certains stress (température, osmolarité, salinité...). Sur la base de ces résultats, nous sélectionnerons certaines souches de protozoaires et explorerons leur capacité à coloniser et à interagir avec différents types de biofilms modèles composés d'une ou plusieurs espèces bactériennes non pathogènes. Les biofilms complexes pourront être caractérisés par utilisation de sondes spécifiques de groupes bactériens couplées à la détection en microscopie confocale. L'objectif est ici de déterminer si certaines caractéristiques propres aux souches de protozoaires permettent une meilleure implantation dans certains types de biofilms, ceci afin de mieux comprendre les mécanismes de l'implantation des protozoaires dans

ces biofilms. Les biofilms seront formés en modes statique (en microplaque) et dynamique (« flow cells »), puis les protozoaires seront inoculés afin d'étudier plusieurs paramètres :

- localisation des protozoaires dans les différents types de biofilms,
- effet des protozoaires sur la croissance bactérienne et sur l'architecture des biofilms,
- devenir des protozoaires une fois que le biofilm a été entièrement « consommé »,
- détachement éventuel des trophozoites ou des kystes pour coloniser d'autres parties du biofilm,
- formation éventuelle d'un nouveau biofilm bactérien une fois que les protozoaires sont enkystés,
- formation éventuelle de nouveaux trophozoites par les kystes qui seraient restés en place, et si oui à quel stade de développement du nouveau biofilm a lieu ce désenkystement,
- consommation du biofilm nouvellement formé,
- influence de ces cycles de prédation amibienne sur l'architecture du biofilm et la virulence des souches bactériennes vis-à-vis des protozoaires.

• *Signaux de communication protozoaires-biofilms* : Un point important de cette partie du projet sera l'étude des signaux qui déclenchent la différenciation des trophozoites en kystes et inversement des kystes en trophozoites. Ces signaux sont pour le moment peu connus. Or cette différenciation représente un paramètre critique qui doit être mieux compris afin de permettre un meilleur contrôle des populations protozoaires et des bactéries pathogènes associées dans les biofilms. Nous avons observé que les kystes amibiens se différencient beaucoup plus rapidement et en plus grandes proportions en présence de bactéries vivantes qu'en présence des mêmes bactéries inactivées à la chaleur ou dans des milieux synthétiques (données non publiées). Nous souhaitons donc explorer si des molécules sécrétées par les bactéries favorisent le désenkystement. Nous produirons des kystes amibiens en utilisant différentes conditions expérimentales et nous observerons la vitesse de désenkystement sur géloseensemencées avec des mutants de souches de *P. aeruginosa* ou d'*E. coli* non pathogènes pour les amibes. Deux types d'approches pourront être envisagées pour l'utilisation de ces mutants. Nous formulons l'hypothèse que des molécules impliquées dans les mécanismes de « quorum sensing » bactérien sont impliquées. Dans un premier temps, des mutants dont les gènes codant pour les différentes protéines impliquées dans le quorum sensing auront été inactivés pourront donc être construits afin de vérifier si leur capacité à promouvoir le désenkystement est modifiée. Par ailleurs des molécules de quorum sensing purifiées sont disponibles dans le commerce (homosérine lactones notamment) ; leur effet sur les cinétiques d'enkystement et de désenkystement des protozoaires pourra donc être exploré. Dans un deuxième temps, et en fonction des résultats obtenus dans la première série d'expériences, nous pourrions produire des banques de mutants aléatoires et tester la capacité de ces mutants à promouvoir le désenkystement. L'électrophorèse bidimensionnelle couplée à des techniques de spectrométrie de masse permettant l'identification des protéines (MALDI-TOF MS) seront utilisées afin de déterminer l'identité des protéines dont l'expression diffère entre les mutants présentant une capacité plus ou moins importante à promouvoir le désenkystement.

5.2.2- Protozoaires de l'environnement : rôle dans la sélection et la dissémination de bactéries pathogènes

Dans cette partie, nous nous intéresserons de manière plus précise aux interactions entre protozoaires et bactéries pathogènes dans l'écosystème biofilm. Des modèles de laboratoire seront utilisés, et des outils permettant l'étude d'écosystèmes réels seront développés. L'objectif est de mieux comprendre le risque réel constitué par l'association protozoaires-bactéries pathogènes, ceci afin de permettre une meilleure gestion et une meilleure prévention de ce risque.

- *Impact des protozoaires sur l'implantation et la prolifération des bactéries pathogènes dans les biofilms* : Plusieurs espèces bactériennes pathogènes potentiellement rencontrées dans différents types de biofilms pourront être étudiées dans cette partie, notamment *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, différentes espèces de mycobactéries... (16). Nous disposons déjà d'une collection importante de souches pour plusieurs de ces espèces, et d'autres souches pourront être collectées en fonction des besoins. Pour chaque espèce bactérienne, la pathogénicité de différentes souches vis-à-vis de notre collection de protozoaires sera préalablement évaluée en utilisant des essais de croissance intra-protozoaire et d'inhibition de la croissance des protozoaires sur gélose (2, 35). Nous reprendrons ensuite les biofilms bactériens complexes déjà utilisés dans le point précédent et y ajouterons différentes proportions d'espèces bactériennes pathogènes marquées avec un gène codant pour une protéine fluorescente (GFP, mCherry...), ceci afin de suivre l'implantation de ces espèces dans le biofilm. De nombreuses souches fluorescentes de *Listeria*, de mycobactéries et de *Pseudomonas* sont déjà disponibles dans notre collection et d'autres pourront être acquises ou construites si besoin. Une fois l'écosystème équilibré, nous introduirons différents protozoaires et observerons l'éventuelle invasion de ces protozoaires par les bactéries pathogènes, ainsi que l'évolution des quantités et de la localisation des bactéries pathogènes dans les biofilms sous l'influence de la prédation par les protozoaires. Alternativement, des bactéries pathogènes issues d'une multiplication intra-protozoaire, ou même des protozoaires préalablement infectés par des bactéries pathogènes marquées pourront être introduits dans les biofilms afin d'observer l'implantation et l'évolution de ces bactéries dans l'écosystème, ceci en comparaison avec les mêmes bactéries issues d'une réplique sur gélose. Nous suspectons en effet que la croissance intra-protozoaire pourrait avoir un effet important sur l'implantation et la localisation des ces bactéries dans les biofilms car il a été démontré dans le cas des légionelles que leurs propriétés de surface (hydrophobicité...) et leur métabolisme sont largement modifiés suite à la croissance intracellulaire.

- *Analyse métagénomique de la flore eucaryote des biofilms associés à différents écosystèmes, et de la flore bactérienne associée à ces eucaryotes : notion de virulome des écosystèmes*. La connaissance de la flore microbienne eucaryote unicellulaire associée aux biofilms est encore très parcellaire. La présence de différentes espèces d'amibes libres phylogénétiquement éloignées (*Heterolobosea*, *Amoebozoa*...) est régulièrement rapportée, ainsi que la présence de différentes espèces de protozoaires ciliés (*Tetrahymena*...). Cependant, et par analogie avec ce qui a déjà été largement décrit pour les bactéries, il est très probable que les méthodes classiques d'isolement des protozoaires sur différents milieux de culture ne permettent de recouvrir qu'une partie minoritaire de cette flore. Il nous semble donc pertinent d'utiliser les méthodes récentes de métagénomique afin de permettre une approche plus exhaustive de la flore eucaryote

de différents écosystèmes : réseaux d'eau potable mais aussi surfaces de travail des ateliers dans l'industrie agro-alimentaire (industrie laitière et de fermentation notamment), eau de boisson des animaux dans les fermes d'élevage, surface des légumes verts issus de l'agriculture... En fonction des échantillons collectés (eau ou autres liquides, biofilms), nous procéderons à différentes étapes préliminaires de concentration des micro-organismes eucaryotes unicellulaires. Les méthodes utilisées devront être préalablement validées sur des biofilms modèles dopés avec différentes espèces de protozoaires. Des traitements enzymatiques (DNAse), chimiques (monoxyde d'azote) ou biologiques (phages) favorisant la dispersion des biofilms sans détruire les protozoaires pourront être explorés. Par la suite une première étape de concentration des micro-organismes eucaryotes unicellulaires pourra être réalisée à l'aide de différentes techniques : filtration à 5µm permettant d'évacuer une partie de la flore bactérienne, centrifugation à basse vitesse permettant de sédimenter les micro-organismes eucaryotes, séparation sur gradient Nycodenz ou Ludox (après calibration préalable avec des protozoaires de différentes tailles)... Enfin, la cytométrie couplée à un tri des cellules sur des critères de taille et de marquage fluorescent (ADN, paroi cellulaire) pourra éventuellement être utilisée sur les échantillons pré-concentrés afin d'apporter une étape supplémentaire de concentration et de purification (nous avons déjà utilisé ces techniques pour trier différentes sous-populations ambiennes). Différentes approches pourront ensuite être envisagées pour traiter les micro-organismes eucaryotes ainsi concentrés en métagénomique : utilisation d'amorces PCR universelles ciblant le gène codant pour l'ARNr 18S des eucaryotes, utilisation d'amorces PCR universelles ciblant le gène codant pour l'ARNr 16S des procaryotes, utilisation de techniques d'amplification non sélective amplifiant n'importe quel type d'ADN présent... Le but de ces expériences est de caractériser non seulement la flore protozoaire des écosystèmes étudiés, mais aussi la flore bactérienne éventuellement pathogène directement associée aux protozoaires et son « virulome » : gènes de virulence permettant la survie et la multiplication intracellulaire. Une fois validés, ces outils permettront d'étudier ces deux populations et le virulome associé dans des écosystèmes modèles ou réels soumis à différents régimes : composition physico-chimique variée (matière organique, minéraux, acidité...), traitements biocides chimiques ou physiques réguliers ou occasionnels, pollutions, changements de températures... L'objectif principal est une meilleure compréhension de l'influence de ces facteurs sur la prolifération des protozoaires et des bactéries pathogènes associées, et donc sur le virulome présent dans ces écosystèmes.

5.3.3- Protozoaires de l'environnement : amélioration des stratégies de contrôle

Dans cette troisième partie nous nous attacherons à mieux comprendre l'effet des traitements biocides sur les protozoaires associés aux biofilms, mais aussi sur les virus d'amibes qui sont des régulateurs importants des flores ambiennes. L'objectif est de déterminer quels sont les traitements biocides les plus pertinents pour contrôler la flore protozoaire sans pour autant éradiquer des éléments essentiels de régulation de cette flore.

- *Effet des traitements de désinfection sur la sélection des protozoaires et des bactéries pathogènes* : Quelques études rapportent l'effet global des traitements de désinfection sur protozoaires (amibes principalement) et les biofilms. Cependant ces études sont souvent limitées à des conditions expérimentales bien définies et d'importantes questions restent à explorer. Notamment, il semblerait que certains traitements

biocides pourraient sélectionner des espèces et/ou des souches bactériennes qui sont plus résistantes à ces traitements mais aussi plus à même de croître dans les protozoaires (amibes) et par voie de conséquence probablement plus pathogènes pour l'homme et les animaux. Cela pourrait être le cas par exemple pour les mycobactéries non tuberculeuses : des études récentes démontrent que des souches présentant des mutations des gènes codant pour les porines sont plus résistantes aux biocides à base d'aldéhydes, plus à même de survivre à la phagocytose et de se multiplier dans les amibes et dans les macrophages, et plus résistantes à différents traitements antibiotiques. Les amibes étant elles-mêmes très résistantes aux biocides à base d'aldéhydes, y compris sous leur forme trophozoite, l'utilisation de tels biocides peut théoriquement avoir pour conséquence une prolifération d'amibes et de mycobactéries pathogènes associées dans les réseaux. C'est un point extrêmement important car, comme nous l'avons déjà mentionné plus haut, les infections à mycobactéries non tuberculeuses sont en constante augmentation sans que l'on sache expliquer quelles modifications de l'environnement ont pu entraîner ce changement d'épidémiologie. Le même type de processus de sélection par les traitements biocides pourrait être à l'œuvre pour d'autres bactéries pathogènes. Dans ce contexte, nous souhaitons étudier l'évolution d'écosystèmes complexes sous l'effet de différents traitements biocides. La question est de savoir si certains traitements biocides peuvent promouvoir l'apparition de flores bactériennes pathogènes en sélectionnant des amibes (*Acanthamoeba*, *Hartmannella*) qui sont plus susceptibles à l'infection par des bactéries pathogènes, alors que d'autres amibes (*Williaertia*...) qui sont elles-mêmes capables de digérer les espèces bactériennes pathogènes sont inactivées par ces traitements biocides. Différentes espèces amibiennes dont le comportement vis-à-vis des bactéries pathogènes dans les biofilms aura déjà été exploré (cf ci-dessus) seront implantées dans des biofilms modèles dopés en bactéries pathogènes fluorescentes et l'écosystème sera soumis à différents types de traitements biocides. Nous utiliserons des techniques d'imagerie confocale ainsi que des quantifications classiques sur géloses afin d'observer si les proportions relatives d'amibes et d'espèces bactériennes pathogènes augmentent pendant le traitement et lors de la recroissance du biofilm après l'interruption du traitement.

- *Sensibilité de l'espèce Hartmannella vermiformis aux traitements biocides* : alors qu'un certain nombre d'études ont été publiées à propos de la sensibilité aux biocides des espèces amibiennes appartenant au genre *Acanthamoeba*, il n'existe que très peu de données concernant *H. vermiformis*. Seules quelques études rapportent une résistance très élevée des kystes d'*H. vermiformis* au chlore et à des températures élevées. Hors nous avons montré que cette espèce pourrait être sélectionnée par les traitements mis en œuvre lors de certains processus de potabilisation de l'eau, et plusieurs études confirment que cette espèce est largement répandue, voire même prédominante dans les réseaux de distribution d'eau. Elle pourrait donc être aussi largement présente dans tous les systèmes en contact direct ou indirect avec l'eau potable : canalisations, systèmes d'arrosage et d'irrigation, surfaces des ateliers, bassins d'élevage... Il a aussi été démontré qu'*H. vermiformis* pouvait servir de « Cheval de Troie » pour *L. pneumophila*, *P. aeruginosa*, *Francisella novicida*... L'étude de l'efficacité des biocides sur les trophozoites et les kystes d'*H. vermiformis* est donc importante afin de mieux comprendre la distribution de cette espèce dans les écosystèmes soumis à ces différents types de traitements biocides. Afin de réaliser cet objectif nous utiliserons des méthodes simples de mise en contact des kystes d'une dizaine de souches d'*H. vermiformis* différentes avec les produits à tester suivie d'une neutralisation et d'un dénombrement sur géloses

ensemencées avec *E. coli*. Cette méthode est décrite dans notre étude publiée en 2010 dans « Journal of Clinical Microbiology ». Les souches présentant des résistances élevées seront étudiées de manière plus fine : microscopie électronique, composition de la paroi des kystes ...

- *Importance des virus d'amibes dans la colonisation des biofilms par les amibes et impact des biocides sur ces virus* : De nouveaux virus infectant les amibes du genre *Acanthamoeba* ont récemment été décrits. L'infection des amibes susceptibles est très efficace, entraînant une inhibition de l'enkystement, un détachement des amibes infectées et une lyse complète en 12 à 16h. Il est donc tout à fait plausible que ces virus jouent un rôle primordial dans la régulation des flores amibiennes. A titre de comparaison, les populations de micro-algues marines (*Emiliana huxleyi*) qui sont capables de produire de vastes efflorescences alguales dans l'océan (blooms visibles depuis l'espace) sont régulées par des virus appartenant au même groupe que les virus d'amibes. L'étude des interactions amibes-virus est donc essentielle afin de permettre la compréhension de l'écosystème biofilm dans sa globalité, avec à la clé une meilleure gestion des risques infectieux liés à ces biofilms. Dans un premier temps, la capacité de survie extracellulaire des virus d'amibes sera étudiée. En effet il n'existe que très peu de données publiées sur ce sujet. Il a seulement été rapporté que l'un d'entre eux (Mimivirus) est capable de survivre en suspension en l'absence d'amibes pendant plusieurs mois et qu'il est significativement résistant à différents stress tels que la chaleur et la dessiccation (70). Nous étudierons la capacité de survie extracellulaire de plusieurs virus en suspension dans différents milieux mais aussi à l'état sec sur différentes surfaces et en présence de matière organique. L'effet des traitements biocides sur les virus d'amibes sera aussi étudié. Du fait de l'apparente incapacité des amibes infectées par les virus à s'enkyster, ces virus ne peuvent pas être protégés par les kystes amibiens. Les traitements biocides peuvent donc potentiellement avoir un impact important sur ces régulateurs des populations amibiennes. Nous étudierons l'effet de traitements de décontamination usuels sur ces virus, en utilisant les méthodologies classiques des tests de virucidie : mise en contact du virus avec le biocide, neutralisation et ensemencement des dilutions sériées sur un hôte cellulaire sensible à l'infection. Nous chercherons à déterminer quels sont les traitements biocides les plus efficaces pour contrôler la prolifération des amibes (trophozoites et kystes) tout en permettant la survie des virus qui pourront réinfecter les amibes afin d'éviter leur prolifération après l'arrêt du traitement biocide. L'écologie des virus dans les biofilms sera également abordée. Des techniques de spectroscopie à corrélation spatiale de fluorescence seront utilisées afin d'étudier si ces virus « géants » (250 à 500 nm de diamètre) peuvent diffuser et s'implanter dans les biofilms. La survie des virus dans différents types de biofilms sera également étudiée, ainsi que l'impact des virus sur la flore amibienne en relation avec ces écosystèmes complexes. Des biofilms comprenant plusieurs espèces bactériennes seront constitués, inoculés avec des virus d'amibes puis par la suite avec différentes espèces d'amibes. Nous suivrons l'évolution de la flore amibienne en utilisant des méthodes d'ensemencement sur gélose et/ou des méthodes d'hybridation des amibes avec des sondes spécifiques (sondes ciblant l'ARNr 18S par exemple). Enfin l'effet global des traitements biocides sur les virus, les biofilms et la flore amibienne associée sera étudié.

5.3- Collaborations en cours et envisagées

- L'équipe du Dr Romain Briandet (UMR763 INRA-AgroParisTech, Bioadhésion et Hygiène des Matériaux, Massy) fait partie du pôle « Risques » de l'Institut Micalis (MICrobiologie de l'ALimentation au service de la Santé humaine). Cette équipe a développé une expertise importante dans l'étude des biofilms bactériens en relation avec les activités industrielles agro-alimentaires, et dans l'étude de l'effet des traitements biocides sur ces biofilms. Nous avons déjà eu l'occasion de collaborer avec l'équipe du Dr Briandet dans le cadre d'un projet pôle de compétitivité, avec six publications communes à la clé. Les techniques utilisées dans la caractérisation des souches bactériennes ainsi que dans l'observation et l'analyse des biofilms en microscopie confocale seront très utiles à la mise en œuvre du projet.

- Les expériences de métagénomique en vue de caractériser le virulome intra-protozoaires des écosystèmes s'inscrivent dans le programme « Méta-omiques des écosystèmes microbiens » du département MICA de l'INRA. Ces analyses pourront être réalisées sur la Plateforme bioinformatique MIGALE du Centre INRA de Jouy. Nous avons aussi des collaborations de recherche en cours avec l'équipe du Dr Greub, située à l'hôpital de Lausanne (Suisse). Cette équipe est spécialisée dans l'étude des micro-organismes pathogènes émergents en santé humaine et animale, elle travaille notamment sur les nouvelles *Chlamydiae* et les nouveaux virus d'amibes. L'équipe du Dr Greub pourra être sollicitée pour l'étude de facteurs de virulence particuliers issus des virulomes caractérisés.

- L'étude des interactions protozoaires-mycobactéries suscite un vif intérêt aussi bien dans le domaine de la santé humaine que dans celui de la santé animale, il nous semble donc intéressant d'approfondir cette thématique notamment concernant l'espèce *M.avium* sbsp *paratuberculosis*. Nous collaborons actuellement avec l'équipe du Dr Mary Jackson, du collège de médecine vétérinaire et de sciences biomédicales de l'Université du Colorado, localisée à Fort Collins (États-Unis). Cette équipe s'intéresse aux mécanismes de virulence de certaines espèces de mycobactéries, mais aussi aux mécanismes de résistance aux biocides et à leur survie dans l'environnement. A ce titre le Dr Jackson est très intéressé par les relations mycobactéries-amibes et souhaite développer ce modèle d'étude de la virulence dans son laboratoire.

- Concernant l'étude des différences de sensibilité des souches de protozoaires aux biocides, nous envisageons éventuellement de collaborer avec le Pr Yann Héchard, du Laboratoire de Chimie et Microbiologie de l'Eau de l'Université de Poitiers (CNRS UMR 6008). Ce laboratoire utilise notamment des techniques de cytométrie en flux couplées à des marquages de viabilité, ainsi que des techniques d'analyse de la composition de la paroi des kystes.

Références bibliographiques

1. **Adekambi, T., S. Ben Salah, M. Khlif, D. Raoult, and M. Drancourt.** 2006. Survival of environmental mycobacteria in *Acanthamoeba polyphaga*. *Appl Environ Microbiol* **72**:5974-81.
2. **Adiba, S., C. Nizak, M. van Baalen, E. Denamur, and F. Depaulis.** 2010. From grazing resistance to pathogenesis: the coincidental evolution of virulence factors. *PLoS One* **5**:e11882.
3. **Aksozek, A., K. McClellan, K. Howard, J. Y. Niederkorn, and H. Alizadeh.** 2002. Resistance of *Acanthamoeba castellanii* cysts to physical, chemical, and radiological conditions. *J Parasitol* **88**:621-3.
4. **Anger, C., and J. M. Lally.** 2008. *Acanthamoeba*: a review of its potential to cause keratitis, current lens care solution disinfection standards and methodologies, and strategies to reduce patient risk. *Eye Contact Lens* **34**:247-53.
5. **Arslan, D., M. Legendre, V. Seltzer, C. Abergel, and J. M. Claverie.** 2011. Distant Mimivirus relative with a larger genome highlights the fundamental features of Megaviridae. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**:17486-91.
6. **Axelsson-Olsson, D., P. Ellstrom, J. Waldenstrom, P. D. Haemig, L. Brudin, and B. Olsen.** 2007. *Acanthamoeba-Campylobacter* coculture as a novel method for enrichment of *Campylobacter* species. *Appl Environ Microbiol* **73**:6864-9.
7. **Axelsson-Olsson, D., L. Svensson, J. Olofsson, P. Salomon, J. Waldenstrom, P. Ellstrom, and B. Olsen.** 2010. Increase in acid tolerance of *Campylobacter jejuni* through coinubation with amoebae. *Appl Environ Microbiol* **76**:4194-200.
8. **Bare, J., K. Sabbe, J. Van Wichelen, I. van Gremberghe, S. D'Hondt, and K. Houf.** 2009. Diversity and habitat specificity of free-living protozoa in commercial poultry houses. *Appl Environ Microbiol* **75**:1417-26.
9. **Baud, D., G. Goy, M. C. Osterheld, N. Borel, Y. Vial, A. Pospischil, and G. Greub.** 2011. *Waddlia chondrophila*: from bovine abortion to human miscarriage. *Clin Infect Dis* **52**:1469-71.
10. **Baud, D., and G. Greub.** 2011. Intracellular bacteria and adverse pregnancy outcomes. *Clin Microbiol Infect* **17**:1312-22.
11. **Baud, D., C. Kebbi, J. P. Külling, and G. Greub.** 2009. Seroprevalence of different *Chlamydia*-like organisms in an asymptomatic population. *Clinical Microbiology and Infection*:213-215.
12. **Baud, D., L. Regan, and G. Greub.** 2008. Emerging role of *Chlamydia* and *Chlamydia*-like organisms in adverse pregnancy outcomes. *Curr Opin Infect Dis* **21**:70-76.
13. **Baud, D., V. Thomas, A. Arafa, L. Regan, and G. Greub.** 2007. *Waddlia chondrophila*, a potential agent of human fetal death. *Emerg Infect Dis* **13**:1239-43.
14. **Beattie, T. K., D. V. Seal, A. Tomlinson, A. K. McFadyen, and A. M. Grimason.** 2003. Determination of amoebicidal activities of multipurpose contact lens solutions by using a most probable number enumeration technique. *J Clin Microbiol* **41**:2992-3000.
15. **Bowers, B., and E. D. Korn.** 1969. The fine structure of *Acanthamoeba castellanii* (Neff strain). II. Encystment. *J Cell Biol* **41**:786-805.
16. **Bridier, A., F. Dubois-Brissonnet, A. Boubetra, V. Thomas, and R. Briandet.** 2010. The biofilm architecture of sixty opportunistic pathogens deciphered using a high throughput CLSM method. *Journal of Microbiological Methods* **82**:64-70.
17. **Buck, S. L., R. A. Rosenthal, and B. A. Schlech.** 2000. Methods used to evaluate the effectiveness of contact lens care solutions and other compounds against *Acanthamoeba*: a review of the literature. *Clao J* **26**:72-84.
18. **Buse, H. Y., and N. J. Ashbolt.** 2012. Counting Legionella cells within single amoeba host cells. *Applied and Environmental Microbiology*.
19. **Cassidy, P. M., K. Hedberg, A. Saulson, E. McNelly, and K. L. Winthrop.** 2009. Nontuberculous mycobacterial disease prevalence and risk factors: a changing epidemiology. *Clinical Infectious Diseases* **49**:e124-9.
20. **Casson, N., J. M. Entenza, and G. Greub.** 2006. Serological cross-reactivity between different *Chlamydia*-like organisms. *J Clin Microbiol*.

21. **Chen, R., H. Wang, and L. M. Mansky.** 2002. Roles of uracil-DNA glycosylase and dUTPase in virus replication. *Journal of General Virology* **83**:2339-45.
22. **Cirillo, J. D., S. Falkow, and L. S. Tompkins.** 1994. Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion. *Infect Immun* **62**:3254-61.
23. **Cirillo, J. D., S. Falkow, L. S. Tompkins, and L. E. Bermudez.** 1997. Interaction of *Mycobacterium avium* with environmental amoebae enhances virulence. *Infect Immun* **65**:3759-3767.
24. **Claverie, J. M., R. Grzela, A. Lartigue, A. Bernadac, S. Nitsche, J. Vacelet, H. Ogata, and C. Abergel.** 2009. Mimivirus and Mimiviridae: giant viruses with an increasing number of potential hosts, including corals and sponges. *J Invertebr Pathol* **101**:172-80.
25. **Corsaro, D., V. Thomas, G. Goy, D. Venditti, R. Radek, and G. Greub.** 2007. '*Candidatus Rhabdochlamydia crassificans*', an intracellular bacterial pathogen of the cockroach *Blatta orientalis* (Insecta: *Blattodea*). *Syst Appl Microbiol* **30**:221-228.
26. **Coulon, C., A. Collignon, G. McDonnell, and V. Thomas.** 2010. Resistance of *Acanthamoeba* cysts to disinfection treatments used in health care settings. *Journal of Clinical Microbiology* **48**:2689-97.
27. **Coulon, C., N. Deschamps, T. Meylheuc, A. Collignon, G. McDonnell, and V. Thomas.** 2012. The effect of in vitro growth conditions on the resistance of *Acanthamoeba* cysts. *Journal of Eukaryotic Microbiology* - Accepted article.
28. **Coulon, C., M. Eterpi, G. Greub, A. Collignon, G. McDonnell, and V. Thomas.** 2012. Amoebal host-range, host-free survival and disinfection susceptibility of environmental *Chlamydiae* as compared to *Chlamydia trachomatis*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* - Accepted article - doi: 10.1111/j.1574-695X.2011.00919.x.
29. **Danelishvili, L., M. Wu, B. Stang, M. Harriff, S. Cirillo, J. Cirillo, R. Bildfell, B. Arbogast, and L. E. Bermudez.** 2007. Identification of *Mycobacterium avium* pathogenicity island important for macrophage and amoeba infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:11038-43.
30. **De Groote, M. A., and G. Huitt.** 2006. Infections due to rapidly growing mycobacteria. *Clin Infect Dis* **42**:1756-63.
31. **Dilbeck-Robertson, P., M. M. McAllister, D. Bradway, and J. F. Evermann.** 2003. Results of a new serologic test suggest an association of *Waddlia chondrophila* with bovine abortion. *J Vet Diagn Invest* **15**:568-9.
32. **Dilbeck, P. M., J. F. Evermann, T. B. Crawford, A. C. Ward, C. W. Leathers, C. J. Holland, C. A. Mebus, L. L. Logan, F. R. Rurangirwa, and T. C. McGuire.** 1990. Isolation of a previously undescribed rickettsia from an aborted bovine fetus. *J Clin Microbiol* **28**:814-6.
33. **Essig, A., M. Heinemann, U. Simnacher, and R. Marre.** 1997. Infection of *Acanthamoeba castellanii* by *Chlamydia pneumoniae*. *Appl Environ Microbiol* **63**:1396-9.
34. **Fallon, R. J., and T. J. Rowbotham.** 1990. Microbiological investigations into an outbreak of Pontiac fever due to *Legionella micdadei* associated with use of a whirlpool. *J Clin Pathol* **43**:479-83.
35. **Fenner, L., H. Richet, D. Raoult, L. Papazian, C. Martin, and B. La Scola.** 2006. Are clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* more virulent than hospital environmental isolates in amoebal co-culture test? *Crit Care Med* **34**:823-8.
36. **Fischer, M. G., M. J. Allen, W. H. Wilson, and C. A. Suttle.** 2010. Giant virus with a remarkable complement of genes infects marine zooplankton. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**:19508-13.
37. **Fukumoto, T., J. Matsuo, M. Hayashi, S. Oguri, S. Nakamura, Y. Mizutani, T. Yao, K. Akizawa, H. Suzuki, C. Shimizu, K. Matsuno, and H. Yamaguchi.** 2010. Impact of free-living amoebae on presence of *Parachlamydia acanthamoebae* in the hospital environment and its survival in vitro without requirement for amoebae. *Journal of Clinical Microbiology* **48**:3360-3365.
38. **Gilk, S. D., P. A. Beare, and R. A. Heinzen.** 2010. *Coxiella burnetii* Expresses a Functional {Delta}24 Sterol Reductase. *Journal of Bacteriology* **192**:6154-9.
39. **Gourabathini, P., M. T. Brandl, K. S. Redding, J. H. Gunderson, and S. G. Berk.** 2008. Interactions between food-borne pathogens and protozoa isolated from lettuce and spinach. *Appl Environ Microbiol* **74**:2518-25.
40. **Goy, G., A. Croxatto, and G. Greub.** 2008. *Waddlia chondrophila* enters and multiplies within human macrophages. *Microbes Infect* **10**:556-62.
41. **Goy, G., V. Thomas, K. Rimann, K. Jatou, G. Prod'hom, and G. Greub.** 2007. The Neff-strain of *Acanthamoeba castellanii*, a tool to test the virulence of *Mycobacterium kansasii*. *Research in Microbiology* **158**:393-397.
42. **Greub, G.** 2009. *Parachlamydia acanthamoebae*, an emerging agent of pneumonia. *Clin Microbiol Infect* **15**:18-28.

43. **Greub, G., and D. Raoult.** 2003. Biocides currently used for bronchoscope decontamination are poorly effective against free-living amoebae. *Infect Control Hosp Epidemiol* **24**:784-6.
44. **Haider, S.** 2009. Developmental cycle, transcriptome and metabolic features of the chlamydial symbiont *Protochlamydia amoebophila*. PhD Thesis. University of Wien, Wien, Austria.
45. **Henning, K., G. Schares, H. Granzow, U. Polster, M. Hartmann, H. Hotzel, K. Sachse, M. Peters, and M. Rauser.** 2002. *Neospora caninum* and *Waddlia chondrophila* strain 2032/99 in a septic stillborn calf. *Vet Microbiol* **85**:285-92.
46. **Hughes, R., W. Heaselgrave, and S. Kilvington.** 2003. *Acanthamoeba polyphaga* strain age and method of cyst production influence the observed efficacy of therapeutic agents and contact lens disinfectants. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:3080-4.
47. **Huws, S. A., A. J. McBain, and P. Gilbert.** 2005. Protozoan grazing and its impact upon population dynamics in biofilm communities. *J Appl Microbiol* **98**:238-44.
48. **Iovieno, A., D. R. Ledee, D. Miller, and E. C. Alfonso.** 2010. Detection of bacterial endosymbionts in clinical *Acanthamoeba* isolates. *Ophthalmology* **117**:445-52.
49. **Iyer, L. M., S. Balaji, E. V. Koonin, and L. Aravind.** 2006. Evolutionary genomics of nucleo-cytoplasmic large DNA viruses. *Virus Res* **117**:156-84.
50. **Jaton, K., J. Bille, and G. Greub.** 2006. A novel real-time PCR to detect *Chlamydia trachomatis* in first-void urine or genital swabs. *Journal of Medical Microbiology* **55**:1667-74.
51. **Kahane, S., N. Platzner, B. Dvoskin, A. Itzhaki, and M. G. Friedman.** 2004. Evidence for the presence of *Simkania negevensis* in drinking water and in reclaimed wastewater in Israel. *Appl Environ Microbiol* **70**:3346-51.
52. **Kebbi-Beghdadi, C., C. Batista, and G. Greub.** 2011. Permissivity of fish cell lines to three *Chlamydia*-related bacteria: *Waddlia chondrophila*, *Estrella lausannensis* and *Parachlamydia acanthamoebae*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* **63**:339-345.
53. **Koehsler, M., D. Leitsch, M. Duchene, M. Nagl, and J. Walochnik.** 2009. *Acanthamoeba castellanii*: growth on human cell layers reactivates attenuated properties after prolonged axenic culture. *FEMS Microbiol Lett* **299**:121-7.
54. **Koehsler, M., D. Leitsch, U. Furnkranz, M. Duchene, H. Aspöck, and J. Walochnik.** 2008. *Acanthamoeba* strains lose their abilities to encyst synchronously upon prolonged axenic culture. *Parasitol Res* **102**:1069-72.
55. **Lamoth, F., and G. Greub.** 2010. Amoebal pathogens as emerging causal agents of pneumonia. *FEMS Microbiology Reviews* **34**: 260-280.
56. **Lienard, J., A. Croxatto, G. Prod'hom, and G. Greub.** 2011. *Estrella lausannensis*, a new star in the Chlamydiales order. *Microbes and Infection* **13**:1232-41.
57. **Ludwig, I. H., D. M. Meisler, I. Rutherford, F. E. Bican, R. H. Langston, and G. S. Visvesvara.** 1986. Susceptibility of *Acanthamoeba* to soft contact lens disinfection systems. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **27**:626-8.
58. **Matz, C., A. M. Moreno, M. Alhede, M. Manefield, A. R. Hauser, M. Givskov, and S. Kjelleberg.** 2008. *Pseudomonas aeruginosa* uses type III secretion system to kill biofilm-associated amoebae. *Isme J* **2**:843-52.
59. **Moliner, C., P. E. Fournier, and D. Raoult.** 2010. Genome analysis of microorganisms living in amoebae reveals a melting pot of evolution. *FEMS Microbiology Reviews* **34**:281-294.
60. **Moliner, C., D. Raoult, and P. E. Fournier.** 2009. Evidence that the intra-amoebal *Legionella drancourtii* acquired a sterol reductase gene from eukaryotes. *BMC Res Notes* **2**:51.
61. **Monier, A., J. M. Claverie, and H. Ogata.** 2008. Taxonomic distribution of large DNA viruses in the sea. *Genome Biol* **9**:R106.
62. **Monier, A., J. B. Larsen, R. A. Sandaa, G. Bratbak, J. M. Claverie, and H. Ogata.** 2008. Marine mimivirus relatives are probably large algal viruses. *Virology* **5**:12.
63. **Mouchtouri, V., E. Velonakis, and C. Hadjichristodoulou.** 2007. Thermal disinfection of hotels, hospitals, and athletic venues hot water distribution systems contaminated by *Legionella* species. *Am J Infect Control* **35**:623-7.
64. **Mura, M., T. J. Bull, H. Evans, K. Sidi-Boumedine, L. McMinn, G. Rhodes, R. Pickup, and J. Hermon-Taylor.** 2006. Replication and long-term persistence of bovine and human strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* within *Acanthamoeba polyphaga*. *Appl Environ Microbiol* **72**:854-9.
65. **Neff, R. J., S. A. Ray, W. F. Benton, and M. Wilborn.** 1964. Induction of synchronous encystation (differentiation) in *Acanthamoeba* spp., p. 55-83. *In* D. M. Prescott (ed.), *Methods in Cell Physiology*, vol. 1. Academic Press, New York.

66. **Novoa, R. R., G. Calderita, R. Arranz, J. Fontana, H. Granzow, and C. Risco.** 2005. Virus factories: associations of cell organelles for viral replication and morphogenesis. *Biol Cell* **97**:147-72.
67. **Pagnier, I., M. Merchat, and B. La Scola.** 2009. Potentially pathogenic amoeba-associated microorganisms in cooling towers and their control. *Future Microbiol* **4**:615-29.
68. **Pumidonming, W., M. Koehsler, and J. Walochnik.** 2010. *Acanthamoeba* strains show reduced temperature tolerance after long-term axenic culture. *Parasitol Res* **106**:553-9.
69. **Pushkareva, V. I., and S. A. Ermolaeva.** 2010. *Listeria monocytogenes* virulence factor Listeriolysin O favors bacterial growth in co-culture with the ciliate *Tetrahymena pyriformis*, causes protozoan encystment and promotes bacterial survival inside cysts. *BMC Microbiol* **10**:26.
70. **Raoult, D., S. Audic, C. Robert, C. Abergel, P. Renesto, H. Ogata, B. La Scola, M. Suzan, and J. M. Claverie.** 2004. The 1.2-megabase genome sequence of Mimivirus. *Science* **306**:1344-50.
71. **Raoult, D., P. Renesto, and P. Brouqui.** 2006. Laboratory infection of a technician by mimivirus. *Ann Intern Med* **144**:702-3.
72. **Reh fuss, M. Y., C. T. Parker, and M. T. Brandl.** 2011. Salmonella transcriptional signature in *Tetrahymena* phagosomes and role of acid tolerance in passage through the protist. *Isme J* **5**:262-73.
73. **Rurangirwa, F. R., P. M. Dilbeck, T. B. Crawford, T. C. McGuire, and T. F. McElwain.** 1999. Analysis of the 16S rRNA gene of micro-organism WSU 86-1044 from an aborted bovine foetus reveals that it is a member of the order *Chlamydiales*: proposal of *Waddliaceae* fam. nov., *Waddlia chondrophila* gen. nov., sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **49 Pt 2**:577-81.
74. **Santos, L. C., M. S. Oliveira, R. D. Lobo, H. R. Higashino, S. F. Costa, I. M. van der Heijden, M. C. Giudice, A. R. Silva, and A. S. Levin.** 2009. *Acanthamoeba* spp. in urine of critically ill patients. *Emerg Infect Dis* **15**:1144-1146.
75. **Schmitz-Esser, S., P. Tischler, R. Arnold, J. Montanaro, M. Wagner, T. Rattei, and M. Horn.** 2010. The genome of the amoeba symbiont "*Candidatus* Amoebophilus asiaticus" reveals common mechanisms for host cell interaction among amoeba-associated bacteria. *Journal of Bacteriology* **192**:1045-57.
76. **Sharbati-Tehrani, S., J. Stephan, G. Holland, B. Appel, M. Niederweis, and A. Lewin.** 2005. Porins limit the intracellular persistence of *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology* **151**:2403-10.
77. **Snelling, W. J., J. P. McKenna, D. M. Lecky, and J. S. Dooley.** 2005. Survival of *Campylobacter jejuni* in waterborne protozoa. *Appl Environ Microbiol* **71**:5560-71.
78. **Snelling, W. J., N. J. Stern, C. J. Lowery, J. E. Moore, E. Gibbons, C. Baker, and J. S. Dooley.** 2008. Colonization of broilers by *Campylobacter jejuni* internalized within *Acanthamoeba castellanii*. *Arch Microbiol* **189**:175-9.
79. **Sogayar, M. I., and E. A. Gregorio.** 1986. Cytoplasmic inclusions in *Giardia*: an electron microscopy study. *Ann Trop Med Parasitol* **80**:49-52.
80. **Sogayar, M. I., and E. A. Gregório.** 1998. *Giardia agilis*: Ultrastructure of the Trophozoites in the Frog Intestine. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **93**:357-361.
81. **Stenzel, D. J., and P. F. Boreham.** 1997. Virus-like particles in *Blastocystis* sp. from simian faecal material. *International Journal for Parasitology* **27**:345-8.
82. **Stockman, L. J., C. J. Wright, G. S. Visvesvara, B. S. Fields, and M. J. Beach.** 2010. Prevalence of *Acanthamoeba* spp. and other free-living amoebae in household water, Ohio, USA-1990-1992. *Parasitology Research*.
83. **Storey, M. V., J. Winiecka-Krusnell, N. J. Ashbolt, and T. A. Stenstrom.** 2004. The efficacy of heat and chlorine treatment against thermotolerant *Acanthamoebae* and *Legionellae*. *Scand J Infect Dis* **36**:656-662.
84. **Svetlikova, Z., H. Skovierova, M. Niederweis, J. L. Gaillard, G. McDonnell, and M. Jackson.** 2009. The role of porins in the susceptibility of *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium chelonae* to aldehyde-based disinfectants and drugs. *Antimicrob Agents Chemother* **53**:4015-4018.
85. **Taillard, C., G. Greub, R. Weber, G. E. Pfyffer, T. Bodmer, S. Zimmerli, R. Frei, S. Bassetti, P. Rohner, J. C. Piffaretti, E. Bernasconi, J. Bille, A. Telenti, and G. Prod'hom.** 2003. Clinical implications of *Mycobacterium kansasii* species heterogeneity: Swiss National Survey. *J Clin Microbiol* **41**:1240-4.
86. **Tenant, R., and L. E. Bermudez.** 2006. *Mycobacterium avium* genes upregulated upon infection of *Acanthamoeba castellanii* demonstrate a common response to the intracellular environment. *Curr Microbiol* **52**:128-33.
87. **Thomas, V.** 2012. Ecology and diversity of amoebal symbionts and amoebal pathogens. In G. Greub (ed.), *Free-living amoebae: an evolutionary crib for emerging pathogens* - In Press.

88. **Thomas, V.** 2012. Sensitivity and resistance of protozoa to biocides. *In* A. Fraise, Lambert, PA and Maillard, J-Y (ed.), Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization - 5th edition - In Press.
89. **Thomas, V., C. Bertelli, F. Collyn, N. Casson, A. Telenti, A. Goesmann, A. Croxatto, and G. Greub.** 2011. Lausannevirus, a giant amoebal virus encoding histone doublets. *Environmental Microbiology* **13**:1454–1466.
90. **Thomas, V., T. Bouchez, V. Nicolas, S. Robert, J. F. Loret, and Y. Lévi.** 2004. Amoebae in domestic water systems: resistance to disinfection treatments and implication in *Legionella* persistence. *J Appl Microbiol* **97**:950-963.
91. **Thomas, V., N. Casson, and G. Greub.** 2006. *Criblamydia sequanensis*, a new intracellular *Chlamydiales* isolated from Seine river water using amoebal co-culture. *Environmental Microbiology* **8**:2125-2135.
92. **Thomas, V., and G. Greub.** 2010. Amoebae/amoebal symbionts genetic transfers: lessons from giant viruses neighbours. *Intervirology* **53**:254-267.
93. **Thomas, V., K. Herrera-Rimann, D. S. Blanc, and G. Greub.** 2006. Biodiversity of amoebae and amoebae-resisting bacteria in a hospital water network. *Applied and Environmental Microbiology* **72**:2428–2438.
94. **Thomas, V., J. F. Loret, M. Jousset, and G. Greub.** 2008. Biodiversity of amoebae and amoebae-resisting bacteria in a drinking water treatment plant. *Environ Microbiol* **10**:2728-2745.
95. **Thomas, V., and G. McDonnell.** 2007. Relationship between mycobacteria and amoebae: ecological and epidemiological concerns. *Lett Appl Microbiol* **45**:349-57.
96. **Thomas, V., G. McDonnell, S. P. Denyer, and J.-Y. Maillard.** 2010. Free-living amoebae and their intracellular pathogenic microorganisms: risks for water quality. *FEMS Microbiology Reviews* **34**:231-259.
97. **Turner, N. A., A. D. Russell, J. R. Furr, and D. Lloyd.** 2000. Emergence of resistance to biocides during differentiation of *Acanthamoeba castellanii*. *J Antimicrob Chemother* **46**:27-34.
98. **Vaerewijck, M. J., K. Sabbe, J. Bare, and K. Houf.** 2008. Microscopic and molecular studies of the diversity of free-living protozoa in meat-cutting plants. *Appl Environ Microbiol* **74**:5741-9.
99. **Vaerewijck, M. J., K. Sabbe, J. Bare, and K. Houf.** 2011. Occurrence and diversity of free-living protozoa on butterhead lettuce. *International Journal of Food Microbiology* **147**:105-11.
100. **Vaerewijck, M. J., K. Sabbe, J. Van Hende, J. Bare, and K. Houf.** 2010. Sampling strategy, occurrence and diversity of free-living protozoa in domestic refrigerators. *Journal of Applied Microbiology* **109**:1566-78.
101. **Verkooyen, R. P., S. Harreveld, S. Ahmad Mousavi Joulandan, R. J. Diepersloot, and H. A. Verbrugh.** 1995. Survival of *Chlamydia pneumoniae* following contact with various surfaces. *Clin Microbiol Infect* **1**:114-118.
102. **White, C. I., R. J. Birtles, P. Wigley, and P. H. Jones.** 2010. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in free-living amoebae isolated from fields not used for grazing. *Vet Rec* **166**:401-2.
103. **Winthrop, K. L., E. McNelley, B. Kendall, A. Marshall-Olson, C. Morris, M. Cassidy, A. Saulson, and K. Hedberg.** 2010. Pulmonary nontuberculous mycobacterial disease prevalence and clinical features: an emerging public health disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **182**:977-82.
104. **Wirz, M., A. Polkinghorne, C. Dumrese, U. Ziegler, G. Greub, A. Pospischil, and L. Vaughan.** 2008. Predator or prey? *Chlamydophila abortus* infections of a free-living amoebae, *Acanthamoeba castellanii* 9GU. *Microbes Infect* **10**:591-7.
105. **Zhang, L., G. Wang, H. Yu, J. Wang, S. Wang, Y. Jia, Y. Yu, and J. Xu.** 2011. First report of human infection by *Rhodoplanes* sp., *Alphaproteobacteria* in China. *Asian Pac J Trop Med* **4**:248-50.

Références fournies en annexe

1. Thomas, V., G. McDonnell, S. P. Denyer, and J.-Y. Maillard. 2010. Free-living amoebae and their intracellular pathogenic microorganisms: risks for water quality. *FEMS Microbiology Reviews* 34:231-259.
2. Thomas, V., J. F. Loret, M. Jousset, and G. Greub. 2008. Biodiversity of amoebae and amoebae-resisting bacteria in a drinking water treatment plant. *Environ Microbiol* 10:2728-2745.
3. Thomas, V., K. Herrera-Rimann, D. S. Blanc, and G. Greub. 2006. Biodiversity of amoebae and amoebae-resisting bacteria in a hospital water network. *Applied and Environmental Microbiology* 72:2428–2438.
4. Thomas, V., T. Bouchez, V. Nicolas, S. Robert, J. F. Loret, and Y. Lévi. 2004. Amoebae in domestic water systems: resistance to disinfection treatments and implication in *Legionella* persistence. *J Appl Microbiol* 97:950-963.
5. Coulon, C., A. Collignon, G. McDonnell, and V. Thomas. 2010. Resistance of *Acanthamoeba* cysts to disinfection treatments used in health care settings. *Journal of Clinical Microbiology* 48:2689-97.
6. Coulon, C., N. Deschamps, T. Meylheuc, A. Collignon, G. McDonnell, and V. Thomas. 2012. The effect of in vitro growth conditions on the resistance of *Acanthamoeba* cysts. *Journal of Eukaryotic Microbiology* – In Press.
7. Thomas, V., and G. Greub. 2010. Amoebae/amoebal symbionts genetic transfers: lessons from giant viruses neighbours. *Intervirology* 53:254-267.
8. Thomas, V., N. Casson, and G. Greub. 2006. *Criblamydia sequanensis*, a new intracellular Chlamydiales isolated from Seine river water using amoebal co-culture. *Environmental Microbiology* 8:2125-2135.
9. Baud, D., V. Thomas, A. Arafa, L. Regan, and G. Greub. 2007. *Waddlia chondrophila*, a potential agent of human fetal death. *Emerg Infect Dis* 13:1239-43.
10. Coulon, C., M. Eterpi, G. Greub, A. Collignon, G. McDonnell, and V. Thomas. 2012. Amoebal host-range, host-free survival and disinfection susceptibility of environmental Chlamydiae as compared to *Chlamydia trachomatis*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* – In Press - doi: 10.1111/j.1574-695X.2011.00919.x.
11. Thomas, V., and G. McDonnell. 2007. Relationship between mycobacteria and amoebae: ecological and epidemiological concerns. *Lett Appl Microbiol* 45:349-57.
12. Goy, G., V. Thomas, K. Rimann, K. Jatton, G. Prod'homme, and G. Greub. 2007. The Neff-strain of *Acanthamoeba castellanii*, a tool to test the virulence of *Mycobacterium kansasii*. *Research in Microbiology* 158:393-397.
13. Thomas, V., C. Bertelli, F. Collyn, N. Casson, A. Telenti, A. Goesmann, A. Croxatto, and G. Greub. 2011. Lausannevirus, a giant amoebal virus encoding histone doublets. *Environmental Microbiology* 13:1454–1466