Institutional Repository - Research Portal
Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche
researchportal.unamur.be
University of Namur

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Études biochimiques préalables à la caractérisation de quatre enzymes chez Naegleria lovaniensis Stevens, De Jonckheere et Willaert, 1980

Janssens de Bisthoven, Paul

Award date:
1989

Awarding institution:
Universite de Namur

Link to publication

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

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

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

Download date: 02. May. 2026

1989

FACULTÉS UNIVERSITAIRES N.D.DE LA PAIX
NAMUR
FACULTÉ DES SCIENCES

Etudes biochimiques préalables à la caractérisation de quatre enzymes chez *Naegleria lovaniensis* Stevens, De Jonckheere et Willaert,1980.

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Licencié en Sciences biologiques
par

Paul Janssens de Bisthoven

~~1987-1988~~ 1988-1

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
Faculté des Sciences
rue de Bruxelles 61, B-5000 NAMUR
Tél. 081/22 90 61 - Télex 59222 facnam-b - Téléfax 081/23 03 91

Etudes biochimiques préalables à la caractérisation de quatre enzymes chez *Naegleria lovaniensis* Stevens, De Jonckheere et Willaert,1980.

Janssens de Bisthoven Paul

Résumé.

Par ce travail, nous avons voulu contribuer à la caractérisation de l'amibe libre *Naegleria lovaniensis* Stevens, De Jonckheere et Willaert,1980. Un point primordial a été de disposer de cultures axéniques. Après avoir recherché une méthode d'homogénéisation permettant l'obtention de résultats fiables et utiles à des études ultérieures de fractionnement subcellulaire, nous avons étudié, pour la phosphatase acide, l'α-D-glucosidase, l'aspartate aminotransférase et la 5'-nucléotidase, la valeur des activités spécifiques, leur variation en fonction du pH, et leur distribution dans les fractions obtenues par centrifugation différentielle.L'homogénéisation par ultrasonication nous a fourni les meilleurs résultats.Il apparaît que le pH optimal des quatre enzymes, contrairement à leur activité spécifique, est comparable aux résultats obtenus chez l'amibe pathogène *N. fowleri* .L'étude de l'association de ces enzymes avec des compartiments subcellulaires appelle des recherches complémentaires.

Abstract.

By this paper we mean to contribute to the characterisation of the free-living amoeba *Naegleria lovaniensis* Stevens, De Jonckheere et Willaert,1980. A prime necessity was to dispose of axenic cultures. After the investigation of a homogenization technique giving reliable results utilisable in further experiments of cell fractionation, we have measured the value of specific activities, their variation with the pH, and their distribution within the fractions obtained by differential centrifugation, for acid phosphatase, α-D-glucosidase, aspartate aminotransferase and 5'-nucleotidase. The ultrasonication give us the best results of homogenization. Contrary of their specific activities, the pH optimum for these enzymes can be compared with the values obtained for the pathogenic *N. fowleri* . The study of the particule association and subcellular localization of these four enzymes calls for fuller experiments.

Mémoire de Licence en Sciences biologiques
année académique 1987-1988

Laboratoire de Parasitologie
Promoteur: Dr J.M. JADIN

Au terme de ce mémoire, je souhaite adresser mes sincères remerciements

au Docteur J.M. JADIN, qui m'a encadré et judicieusement guidé lors de la réalisation de ce travail dont il est le promoteur;

au Docteur Sc. J.F. DE JONCKHEERE, qui m'a aimablement fourni les amibes dont il entretient la culture à l'Institut d'Hygiène et d'Epidémiologie de l'Etat (Bruxelles);

au R. Père P. DEVOS, au Professeur E.FEYTMANS et au Dr Sc. E. DEPIERREUX, aux Professeurs R. WATTIAUX et A. DEPELCHIN qui ont mis leurs laboratoires à ma disposition;

au Professeur R. LELOUP pour son accueil dans son laboratoire interfacultaire de Microscopie Electronique, à Madame C. CHAPEAU-DEVIGNON et à Monsieur Y. HOUBION pour leur disponibilité et leurs conseils;

à Monsieur J. COLLET qui m'a offert ses précieuses compétences;

à Mademoiselle M.C. WILEM et à Monsieur E. PIROTTE pour la sympathie qu'ils ont mise dans leur aide;

à mon père et à l'ensemble de ma famille pour leur appui et leur engagement durant ces quatre années d'études.

TABLE DES MATIERES.

Chapitre I. **INTRODUCTION.** 1

I.1. Généralités sur les amibes du genre *Naegleria*. 1

1.1. Historique. 1

1.2. Situation taxonomique. 1

1.3. Répartition infragénérique. 3

1.4. Pouvoir pathogène. 4
a-Historique. 4
b-la Méningo-Encéphalite Amibienne Primitive (MEAP). 6
c-La transmission de virus et de bactéries. 7

1.5. Dispersion. 7

1.6. Chimiothérapie. 8

1.7. Prophylaxie. 9
a-naturelle. 9
b-artificielle 9

I.2. Méthodes d'identification des espèces. 10

2.1. Etudes écologiques et comportementales. 10
a-tolérance de température. 10
b-croissance en milieu axénique. 10
c-vitesse de migration. 11
d- comportement phagocytaire. 11

2.2. Etudes morphologiques. 11
a-au microscope électronique à transmission (TEM) 12
b-au microscope électronique à balayage (SEM) 12

2.3. Etudes immunologiques. 13

2.4. Etudes biochimiques. 13
a-focalisation isoélectrique (IEF) des protéines totales. 13
b-focalisation isoélectrique des isoenzymes. 14

2.5. Autres études. 14
a-agglutination par la concanavaline A. 14
b-effet cytopathogène. 15
c-test de virulence sur les souris. 15

I.3. Présentation de *Naegleria lovaniensis*. 15

3.1. Découverte d'une nouvelle espèce. 15

3.2. Description. 16
a-forme amibienne. 16
b-forme flagellée. 17
c-forme kystique. 17

3.2. Intérêt. 17

I.4. Fractionnement de composants subcellulaires. 18

4.1. Homogénéisation. 18

4.2. Fractionnement proprement dit. 19

4.3. Repérage des particules. 20

Chapitre II. MATERIEL ET METHODES. 22

II.1. Souche étudiée. 22

II.2. Culture *in vitro*. 22

2.1. Milieu de culture. 22

2.2. Mode de croissance. 23

2.3. Entretien. 24

2.4. Problèmes liés à la contamination. 24

II.3. Homogénéisation. 25

3.1. Problèmes posés. 25

3.2. Relevé des principales méthodes. 25
a-forces de cisaillement. 25
b-autres forces de rupture. 26

3.3. Méthodes testées. 28

3.4. Appréciation de l'homogénéisation. 29
a-en microscopie optique. 29
b-par analyses biochimiques. 30

II.4. Etudes biochimiques. 31

4.1. Schéma de centrifugation. 31

4.2. Relevé des méthodes employées pour les dosages. 31

4.3. Recherche du pH d'activité enzymatique maximale. 33

4.4. Calculs et présentation des résultats. 34

Chapitre III. RESULTATS. 35

III.1. Homogénéisation. 35

1.1. Examens en microscopie optique des homogénats. 35

1.2. Test de l'état biochimique des organites-témoins libérés. 37

III.2. Fractionnement subcellulaire. 39

2.1. Distribution des protéines. 39

2.2. Effet de la concentration en protons sur l'activité des enzymes. 40

2.3. Activités spécifiques des enzymes dosés. 41

2.4. Distribution des enzymes dosés et récupérations. 42

2.5. Représentation de la purification enzymatique. 43

Chapitre IV. DISCUSSION. 44

IV.1. A propos de l'homogénéisation. 44

1.1. Choix de la technique utilisée. 44

1.2. Effets prévisibles de l'homogénéisation sur la qualité du fractionnement. 45

IV.2. A propos du fractionnement et des études biochimiques. 46

2.1. Conditions de fractionnement. 46

2.2. Activités spécifiques des enzymes dosés. 46

2.3. Variation des activités enzymatiques en fonction du pH. 48

2.4. Distribution des enzymes de *N. lovaniensis* après centrifugation différentielle. 48

Chapitre V. CONCLUSION. 51

BIBLIOGRAPHIE. 52

Chapitre I. INTRODUCTION.

I.1. Généralités sur les amibes du genre *Naegleria*.

1.1. Historique.

La première observation au microscope d'amibes libres fut faite en 1755 par von ROSENHOF. Depuis lors, une quantité considérable de travaux y a été consacrée. DUJARDIN (1841) fut le premier à décrire une amibe libre sous le nom d'*Amoeba limax* . SCHARDINGER isola en 1899, chez un patient dysentérique, une amibe aérobie qu'il appella *Amoeba gruberi*, posant ainsi l'hypothèse de la pathogénicité des amibes libres. Le rôle de ces amibes dans les dysenteries fut encore suspecté à la suite de leur découverte chez des malades en Indochine et aux Philippines [LESAGE,1905; MUSGRAVE & CLEGG,1907; WALKER,1908; NOC,1909]. Finalement la théorie de SCHAUDINN (1903) sera reconnue, lui qui maintenait que seule l'amibe parasite *Entamoeba histolytica* , identifiée en 1875 déjà par LOESCH à Léningrad, est responsable des infections dysentériques intestinales. Mais l'idée de pathogénicité des amibes libres va demeurer, jusqu'à être confirmée par les travaux de JAHNES et FULLMER (1957) et CULBERTSON et collaborateurs (1959) sur le genre *Acanthamoeba* , ainsi que ceux de FOWLER et CARTER (1965) sur le genre *Naegleria* , tous deux ayant été identifiés chez des patients atteints de méningo-encéphalite. Sans doute est-ce cette idée de pathogénicité qui fut à la base des nombreuses tentatives de détermination et de classification des amibes libres.

1.2. Situation taxonomique.

Les zoologistes ont nommés "amibes" un ensemble systématique hétérogène, où ils ont relégués la plupart des Protistes à mouvements amiboïdes. A la différence des Zooflagellés dont l'organe locomoteur est constitué par un ou plusieurs flagelles, les Rhizopoda jouissent de la possibilité de modifier leur paroi cellulaire pour en faire un pseudopode, lequel joue le rôle d'organe locomoteur ou préhenseur.

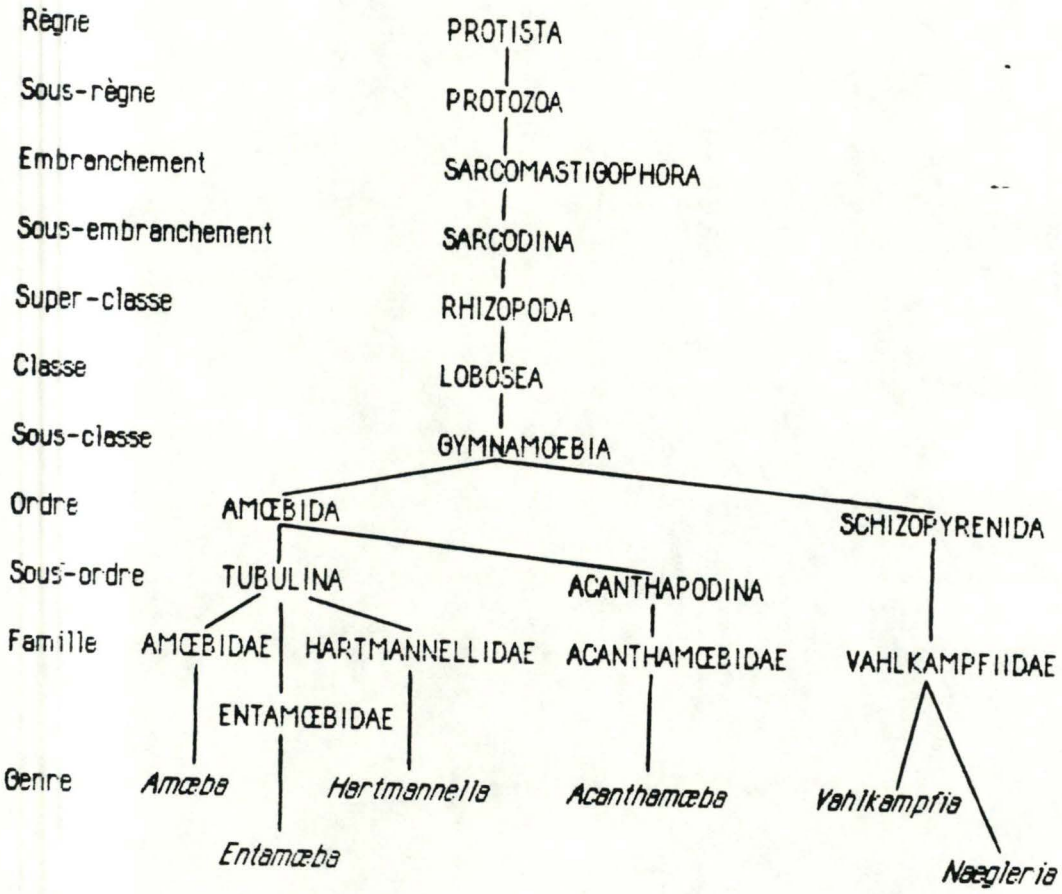


Fig.I.1. Classification de PAGE (1967 remaniée en 1976). Appartenances systématiques et apparentements taxonomiques des amibes auxquelles il est fait allusion dans ce travail.

L'unité systématique Rhizopoda (fig.I.1) répond bien plus à un ensemble de formes aux affinités douteuses, créé pour des besoins de systématique, qu'à un groupe naturel issu d'une lignée évolutive.

C'est le cas, par exemple, de cette amibe décrite en 1899 par SCHARDINGER, sous le nom d'*Amoeba gruberi* , qui présente non seulement une forme amibienne et une forme kystique, mais aussi une forme flagellée. ALEXEIEFF (1912) jugea cette capacité de transition amibe-kyste-forme flagellée (fig.I.3.) suffisamment caractéristique pour justifier la création d'un nouveau genre, c'est ainsi que *Amoeba gruberi* devint *Naegleria gruberi* , du nom de NÄGLER qui, en 1909, fut le premier à décrire la division promitotique de son noyau avec formation typique de corps interzonaux (fig.I.4.). Les amibes du genre *Naegleria* ont donc ainsi été rangées dans les protozoaires rhizopodes de la famille des Valhkampfiidae caractérisée par ce mode de division .

Le stade flagellé, qui peut être induit au laboratoire en plaçant les amibes dans l'eau distillée ou dans une solution saline de PAGE [FULTON,1970; PAGE,1976], ainsi que la promitose caractéristique sont deux critères encore généralement employés pour distinguer le genre *Naegleria* des autres genres d'amibes libres. Un autre critère est la forme des kystes: ils sont sphériques et à paroi lisse chez *Naegleria* . Il y a encore une dizaine d'années, la présence de pores dans la paroi du kyste était considérée comme caractéristique du genre *Naegleria* [PUSSARD & PONS,1979]. Depuis la récente description du genre *Willaertia* , qui en possède aussi, les pores dans le kyste ne peuvent plus être une exclusivité de *Naegleria* [DE JONCKHEERE et coll.,1984]. Toutefois, leur nombre et leurs dimensions internes et externes varient significativement entre les espèces et peuvent dès lors être utilisés comme un critère d'identification, ainsi que l'ont montré J.M. JADIN et coll. en 1974. Les études en microscopie optique des trophozoïtes et de la forme de leurs pseudopodes ne sont plus considérées comme suffisantes pour établir une classification crédible.

Plus récemment, des tentatives ont été faites pour essayer de reconstituer une taxonomie en se basant sur la composition protéinique, le contenu enzymatique, le dosage de l'ADN et de l'ARN [ADAM & BLEWETT,1974], l'immunologie [WILLAERT,1975] ou la biochimie [DE JONCKHEERE,1985]. Une étude approfondie des aspects morphologiques, biologiques, écologiques, parasitologiques, immunologiques et biochimiques est nécessaire pour distinguer aisément et convenablement les amibes, ainsi que pour lever les ambiguïtés d'une taxonomie encore incertaine.

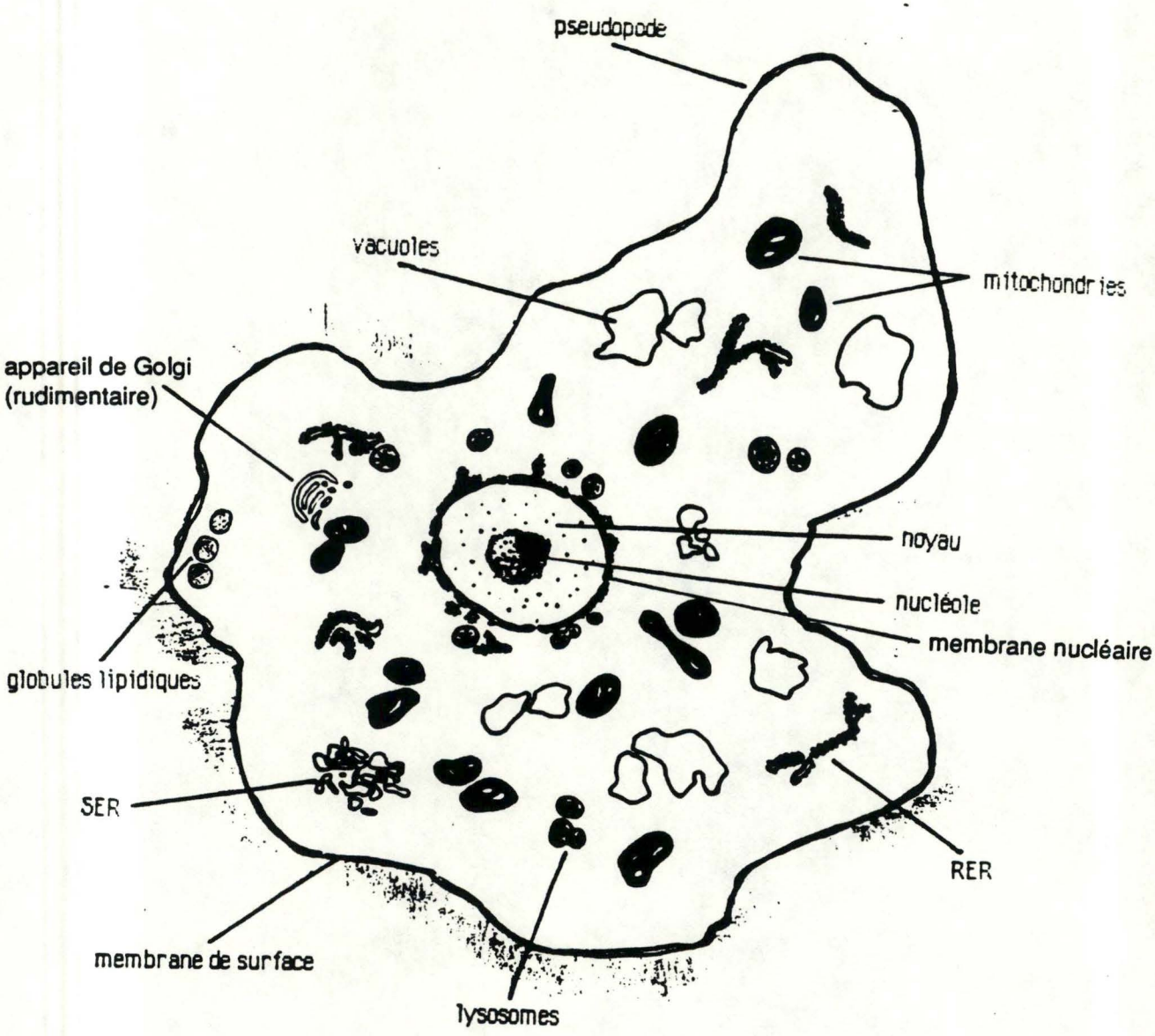


Fig.I.2. Représentation schématique d'un trophozoïte de *Naegleria* d'après RONDANELLI et coll. (1987).

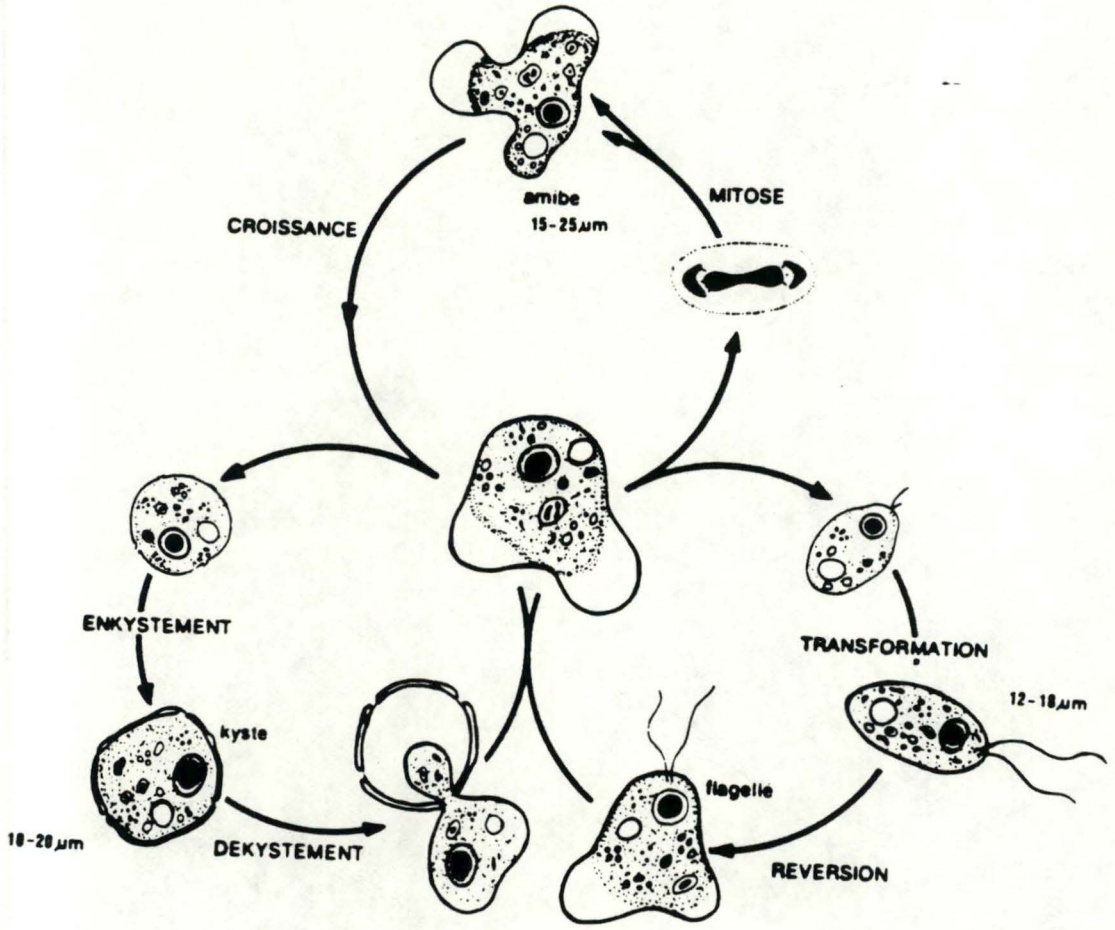


Fig.I.3. Représentation schématique du cycle de *Naegleria* d'après FULTON (1970), RONDANELLI et SCAGLIA (1987).

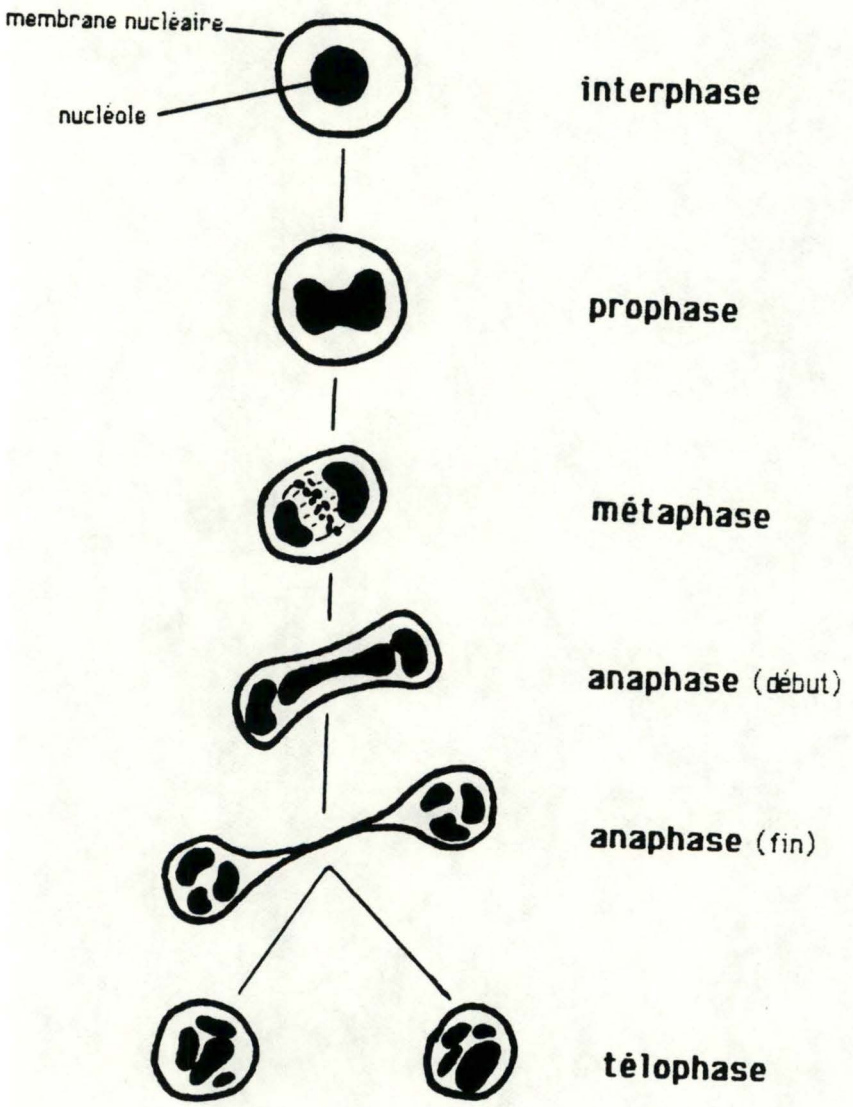


Fig.I.4. Schéma de la division nucléaire de type promitotique chez *Naegleria* d'après RONDANELLI et SCAGLIA (1987).

1.3. Répartition infragénérique.

Le genre *Naegleria* rassemble actuellement cinq espèces dont une comprend deux sous-espèces. Deux espèces sont pathogènes. Il faut parvenir à les distinguer rapidement et sans équivoque en vue, d'une part, d'établir un diagnostic précoce et précis dans les cas de méningo-encéphalite et, d'autre part, de rechercher, dans un souci de prophylaxie, la présence d'espèces virulentes dans des milieux où il peut être habituel de trouver des espèces voisines mais inoffensives.

La répartition s'établit comme suit:

a- *Naegleria gruberi* Schardinger,1899.

Jusqu'en 1970, toute amibe possédant les propriétés caractéristiques du genre était classée dans cette espèce. Ces propriétés sont :

-trophozoïtes de 20-25 µm, avec un nucléole central dans le noyau (fig.I.2.);
-stade flagellé temporaire avec un nombre moyen de 2 flagelles, cette capacité de transformation confèrerait au genre *Naegleria* un avantage sur les autres amibes dans la recolonisation d'habitats et, partant, dans la compétition précédant toujours la colonisation de niches écologiques nouvellement rendues disponibles [GRIFFIN,1983];
-kystes lisses et arrondis à double paroi avec un nombre variable de pores à travers lesquels l'amibe peut se désenkyster (fig.I.3.).
-promitose durant laquelle sont maintenus la membrane nucléaire et le nucléole (fig.I.4.);

L'hétérogénéité rencontrée au sein de cette espèce, tant au niveau du nombre de pores dans la paroi du kyste qu'au niveau de la composition biochimique, est telle qu'aujourd'hui certains chercheurs tendent à considérer *N. gruberi* comme un groupe plutôt que comme une espèce bien définie [DE JONCKHEERE,1987].

b- *N. fowleri* Carter,1970.

Cette amibe semblable à *N. gruberi* fut isolée à partir du liquide céphalo-rachidien de patients atteints de méningo-encéphalite, d'abord en Australie

[CARTER,1970] puis en Tchécoslovaquie, aux USA, en Grande-Bretagne et, en Belgique, dans une piscine à Anvers [JADIN et coll.,1971]. Toutes ces premières découvertes ont été faites suite à des décès d'adolescents. C'est d'abord sa pathogénicité qui la distingua de la première espèce. Depuis sa description, les différences entre *N. fowleri* et *N. gruberi* ont été confirmées tant par des études biochimiques [DE JONCKHEERE,1982; DAGGETT & NERAD,1983] que par des analyses immunologiques [WILLAERT;1976; WILLAERT et coll.,1977].

c- *N. jadini* Willaert et Le Ray,1973.

Par la morphologie des kystes, cette amibe ressemble à *N. fowleri* , mais n'est ni pathogène ni capable de se développer à 37°C. L'indépendance génétique de cette espèce fut démontrée par immunoélectrophorèse. La première souche -la seule actuellement- fut isolée à partir d'une piscine privée à Anvers.

d- *N. lovaniensis* Stevens, De Jonckheere et Willaert,1980.

C'est l'espèce étudiée dans le cadre de ce travail. Elle sera décrite par ailleurs.

e- *N. australiensis* De Jonckheere,1981.

C'est la seconde espèce pathogène, isolée de l'environnement en Australie, différant de *N. fowleri* par plusieurs aspects. D'autres souches de cette même espèce ont depuis lors été identifiées en France, Allemagne, Italie et Inde [DE JONCKHEERE et coll.,1984]. Des analyses biochimiques ont permis d'en distinguer deux sous-espèces: *N. australiensis australiensis* et *N. australiensis italica* .

1.4. Pouvoir pathogène.

a- Historique.

Déjà au début du siècle, depuis la première observation de SCHARDINGER en

1899, plusieurs auteurs ont pu constater la présence de ces amibes libres chez des malades. WELLS (1911) parvient à isoler ces amibes à partir des poussières de l'air, mais celles-là ne sont pas pathogènes. Il déclare dès lors que ce sont, dans les travaux précédents, des contaminants apparus par manque de précautions dans les prélèvements de selles. Mais ensuite, CHATTON et LALUNG-BONNAIRE (1912), HOGUE (1915) et PINTO (1922) affirment avoir isolé dans des conditions stériles à partir d'abcès du foie, des amibes généralement considérées comme étant des *Valhkampfia* .

Finalement, JAHNES et FULLMER (1957), et CULBERTSON et coll. (1959) démontrent la pathogénicité d'une amibe que SINGH et DAS (1970) décriront comme *Hartmannella* (*Acanthamoeba*) *culbertsoni* , par inoculation à des singes et des souris, ce qui provoque la mort de ces animaux par méningo-encéphalite.

Quant au caractère pathogène des amibes du genre *Naegleria* , il ne sera démontré qu'en 1968, lorsque CARTER, en Australie, va isoler pour la première fois, d'un liquide céphalo-rachidien (LCR) chez un malade souffrant d'une méningo-encéphalite, une amibe ressemblant à *N. gruberi* , qu'il appelle *N. fowleri* . A la même époque, des amibes présentant les mêmes propriétés sont découvertes lors d'observations de cas de méningo-encéphalite amibienne en Tchécoslovaquie [CERVA et coll.,1969], en Nouvelle-Zélande [MANDAL et coll.,1970], en Grande-Bretagne [APLEY et coll.,1970], et en Belgique [JADIN et coll.,1971]. Depuis lors, des cas de méningo-encéphalites dues à *Naegleria fowleri* ont été recensés dans tous les continents. Ces cas ont généralement été diagnostiqués par isolement *in vitro* de l'amibe responsable. On a pu également établir la reconnaissance rétrospective de cas plus anciens, par la mise en évidence d'amibes dans des préparations histologiques du cerveau des patients décédés antérieurement de méningo-encéphalite. Cette mise évidence se fait par immunofluorescence indirecte [WILLAERT,1976]. Ceci montre combien il est important de diagnostiquer avec une extrême précision tous les cas de méningo-encéphalite. En effet, si l'origine amibienne de cette maladie est établie, l'anamnèse du patient pourra souvent orienter la prophylaxie adéquate de ce pathogène mortel.

La découverte par DE JONCKHEERE (1981) de *N. australiensis* révéla l'existence d'une espèce hautement virulente pour la souris, mais aucun cas de méningo-encéphalite humaine due à *N. australiensis* n'a encore pu être mis en évidence à ce jour. Ceci serait notamment dû au fait que très peu d'amibes de cette espèce se retrouvent dans le cerveau -du moins c'est ce qui apparaît dans le cerveau des souris infestées expérimentalement- rendant plus malaisée la détection de ces amibes [DE JONCKHEERE,1987].

b- La méningo-encéphalite amibienne primitive (MEAP).

Naegleria fowleri est responsable, chez l'homme, de la Méningo-Encéphalite Amibienne Primitive (MEAP), contractée, dans la majorité des cas, par des nageurs qui ont fréquenté des piscines chauffées ou des eaux de surface. Il s'agit d'une maladie aiguë, au cours de laquelle la mort survient quelques jours après l'apparition soudaine des premiers symptômes. Ceux-ci sont comparables à ceux d'une encéphalite bactérienne ou virale: céphalées, fièvre de 38.2° à plus de 40°C, anomalies de l'état mental, raideurs de la nuque (signe de Kernig). Ils sont suivis du coma et de la mort par arrêt cardiorespiratoire. Les premiers symptômes s'expriment après une période d'incubation de deux à trois jours durant laquelle l'agent pathogène pénètre dans l'organisme.

Cette amibe *N. fowleri* a de très grandes chances de se développer dans des organismes "préparés", c'est-à-dire chez des sujets atteints de rhinopharyngite dont les muqueuses protectrices sont partiellement détruites suite à une infection et à une post-infection bactérienne. Les amibes pénètrent dans la cavité nasale par inhalation ou aspiration d'eau ou de poussières contenant les trophozoïtes ou les kystes. Après avoir traversé la lame criblée de l'ethmoïde, elles parviennent au cerveau par le nerf olfactif. Douées de pouvoir cytopathogène, elles entraînent la nécrose hémorragique du tissu cérébral . La présence d'amibes en dehors du cerveau semble secondaire avec cependant la possibilité de myocardite, d'œdème pulmonaire, de pleurésie aiguë et de foyers de broncho-pneumonie [MARTINEZ,1987].

La reconnaissance des amibes virulentes, établissant le diagnostic de MEAP, est réalisée par leur isolement à partir du LCR du patient et leur mise en culture dans un milieu approprié. La pathogénicité de la souche prélevée est testée par inoculation intracérébrale ou instillation nasale à des souris. Des méthodes biochimiques et immunologiques d'identification tendent à rendre désormais inutile la pratique de ce test [DE JONCKHEERE,1982].

La pathogénicité de ces amibes est encore mal expliquée, elle semble liée à plusieurs facteurs, dont leur faculté de pouvoir pénétrer activement dans le corps de l'hôte et la formation de kystes qui permet leur dissémination et leur survie lorsque les conditions environnementales leur sont défavorables. La fréquence de ces amibes laisse penser qu'elles ne sont pas pathogènes d'emblée: leur virulence s'exalterait lorsque les souches passent d'un individu à l'autre, ou bien elles deviendraient pathogènes au contact de détritus animaux ou humains, ou alors elles ne se développeraient que chez de rares sujets possédant une configuration particulière de l'ethmoïde [JADIN,1973].

c- La transmission de virus et de bactéries.

A côté de leur propre pouvoir pathogène, ces amibes montrent un comportement phagocytaire très prononcé. Certains microbes, les Mycobactéries sp., résistent à la digestion lysosomale intracellulaire. Les nombreuses vacuoles visibles chez les amibes libres sont souvent remplies de bactéries. Lorsque l'amibe s'enkyste, les bactéries qu'elle a phagocytées y trouvent un excellent moyen de dissémination. Ces amibes peuvent être des vecteurs de *Mycobacterium leprae* , comme l'ont montré des examens de muqueuse nasale de lépreux [JADIN,1975; JADIN & WILLAERT,1977].

Il faut ajouter à cela les travaux de SCHUSTER (1969) sur *N. gruberi* qui montrent que les amibes constituent aussi un terrain favorable à la multiplication et au transport des virus.

1.5. Dispersion.

Les *Naegleria* sont largement représentées dans la nature: dans l'eau, dans l'air et dans le sol humide. Elles sont de plus cosmopolites. On ne les retrouve pas dans l'eau de mer ou lorsque le taux de NaCl dépasse 5 pour mille. Ce sont les grandes réserves d'eau douce qui leur présentent les meilleures conditions de vie pourlesquelles interviennent de nombreux facteurs tels que richesse en matières organiques, température, flore bactérienne. Ces conditions sont souvent rassemblées dans les piscines, les eaux de surface, les puits, les aquariums et l'eau de distribution.

Les amibes sont généralement désintégrées par le Chlore, mais seulement s'il est actif (acide hypochloreux). Un pH inadéquat ou la persistance dans l'eau de Fer et de Manganèse rendent le chlore inactif vis-à-vis des amibes. Des amibes sont souvent contenues dans -et protégées par- des concrétions calcaires et des agglomérats gélatineux sur les parois des piscines [JADIN,1973]. Par agglomérats gélatineux on entend un ensemble de résidus biologiques d'origines diverses colonisé par des bactéries présentes dans l'eau.

L'origine des cas de MEAP recensés à ce jour, est hydrique dans la majorité des cas: piscines chauffées en Europe, eaux de surface aux USA, eaux de pipe-line en Australie; la contamination par kystes aériens est établie en Afrique [JADIN,1980].

La présence de *Naegleria* sp. a en outre été mise en évidence dans les selles humaines ainsi que dans l'intestin de divers animaux aquatiques tels les canards, rats

musqués, amphibiens et poissons qui participent ainsi à la dissémination des amibes tout en établissant un cycle dont l'homme est un des chaînons [JADIN et coll,1973].

1.6. Chimiothérapie.

Plus de 120 cas de MEAP ont été recensés à ce jour. On ne dénombre que 2 survivants à cette maladie [THONG & FERRANTE,1987]. C'est dire la difficulté rencontrée lors de la mise au point d'un traitement efficace.

De nombreux travaux de chimiothérapie expérimentale ont mené à la reconnaissance de l'effet de l'amphotéricine B, antibiotique amoebicide puissant, tant *in vitro* -modifications ultrastructurales marquées et arrêt de la croissance [SCHUSTER & RECHTHAND,1975]- qu'*in vivo* chez la souris [THONG,1979].

Chez l'homme, une chimiothérapie adéquate a permis de sauver deux jeunes patients d'une MEAP contractée lors de sports nautiques. Tous deux guérirent par un traitement à l'amphotéricine B (AmB) par voie intraveineuse et intracérébrale qui ne leur laissa aucune séquelle [SEIDEL et coll.,1977]. Cependant STEVENS et coll. (1981) rapportèrent 2 cas de patients décédés de MEAP malgré un traitement à l'AmB seul ou associé au miconazole, injecté par voie intraveineuse, intracérébrale et intraventriculaire.

On peut dénombrer au moins cinq causes possibles d'échec du traitement de MEAP:

-le délai entre le diagnostic et la chimiothérapie;

-les différences de résistance aux agents antimicrobiens selon les souches d'amibes en présence;

-la difficulté d'assurer l'introduction et le maintien de hautes concentrations d'agents antimicrobiens dans le tissu cérébral;

-la destruction massive de *N. fowleri* par l'AmB, qui provoquerait dès lors le largage de produits toxiques exacerbant la pathologie [THONG et FERRANTE,1987];

-les complications de la MEAP en oedème cérébral et augmentation de la pression interne [STEVENS et coll.,1981].

Des recherches sont en cours en vue d'élaborer une stratégie thérapeutique basée sur une combinaison d'agents antimicrobiens, une voie d'administration adéquate, un monitoring intensif, l'utilisation d'anticorps contre les toxines larguées lors de la lyse des amibes et celle d'anticorps antiamibiens.

1.7. Prophylaxie.

a- naturelle.

Du fait du rôle que peuvent jouer les amibes libres du genre *Naegleria* dans la dissémination de virus et de bactéries, il semble nécessaire d'étendre la prophylaxie de l'agent étiologique de la MEAP à celle des autres amibes.

Une manière, sans doute irréalisable, de lutter contre la prolifération des amibes thermophiles serait de maintenir en-dessous de 25°C les eaux avec lesquelles l'homme pourrait entrer en contact. WELLINGS et coll.(1979) ont montré que les kystes de *Naegleria* ne survivent pas à une fluctuation de température entre 22° et 4°C. La survie de *N. fowleri* diminue fortement aux plus basses températures .

Une élévation du taux en NaCl au-delà de 0,75 %, ainsi que les pH extrêmes ou une concentration en ions Ca^{2+} supérieure à 50 mM sont inhibiteurs ou même létaux pour *N. gruberi* , plus encore pour *N. fowleri* [BROWN & CURSONS,1987].

b-artificielle.

L'acide hypochloreux HClO, la chlorine Cl_2 et l'ozone 0_3 montrent une bonne efficacité contre les amibes libres, mais ces désinfectants présentent le désavantage de réagir avec les protéines pour former un complexe inactif. Des alternatives ont dès lors été étudiées, comme le Baquacil, composé chimique amoebicide stable [DAWSON et coll.,1984].

La découverte de *Naegleria* thermophiles dans des bassins hospitaliers traités aux rayons ultraviolets démontre l'inefficacité de ceux-ci [DE JONCKHEERE,1982].

Dans les piscines, les réservoirs et les châteaux d'eaux, il est nécessaire d'accorder une surveillance étroite, de brosser les parois régulièrement, et d'utiliser un système de filtrage sans défauts [JADIN,1974].

Planche 1. Forme amibienne de *Naegleria* sp. photographiée au microscope à contraste de phase muni d'un flash électronique. Elle offre à considérer un noyau entouré d'une zone réfringente (espace périnucléaire) très nette. Cette amibe est en mouvement, comme l'indique la présence du large pseudopode qu'elle développe en direction sud-ouest (x2500)[cliché de JADIN J.M.].

Planche 2. Amas de formes kystiques de *Naegleria* sp. mélangées à quelques amibes dont une émet un pseudopode en direction est. Microphotographie en contraste de phase (x1000)[cliché de JADIN J.M.].

Planche 3. Forme flagellée de *Naegleria* sp. photographiée au microscope à contraste de phase équipé d'un flash électronique (x2500)[id.].

Planche 4. Coloration à l'hématoxyline ferrique de formes amibiennes de *Naegleria* sp. Quatre de ces amibes ont un noyau en interphase, tandis que la cinquième présente un noyau en anaphase: la bande de matériel chromatique se divise en deux et chaque moitié se dirige vers son pôle; à ce stade, le matériel chromatique se trouve en contact avec les "masses polaires", une certaine substance granulaire appelée "corps interzonal" est observable à mi-chemin entre les deux "masses polaires" (x2000)[id.].

I.2. Méthodes d'identification des espèces.

2.1. Etudes écologiques et comportementales.

a- tolérance de température.

GRIFFIN remarqua en 1972 une différence dans la tolérance de température entre les amibes libres pathogènes et non pathogènes. Il montra que *N. fowleri* croît encore à 45°C tandis que *N. gruberi* ne se développe pas à cette température. Ce critère ouvrit de nouvelles perspectives pour l'isolement de *N. fowleri* à partir de l'environnement: les prélèvements échantillonnés dans des tubes de milieu de culture incubés à 44-45°C permettent l'obtention d'une culture de *N. fowleri* exclusivement. *N. australiensis* ne pousse pas à 45°C mais le fait à 40°C, elle profite par conséquent de ce critère de sélection. Les espèces non pathogènes, hormis *N. lovaniensis* qui fait exception à cette règle, se cultivent à 25°C, quoique quelques souches de *N. gruberi* supportent une incubation à 30-35°C et que *N. jadini* peut se développer encore à 37°C pendant une courte période [DE JONCKHEERE,1985].

b- croissance en milieu axénique.

Les amibes libres se nourrissent essentiellement de bactéries. Les techniques habituelles d'isolement et de culture nécessitent donc l'emploi d'un support (agar) pourvu d'une couche de bactéries tuées à la chaleur: 70°C pendant 20 minutes (le plus souvent *Escherichia coli* ou *Aerobacter aerogenes*) [CULBERTSON et coll.,1959]. Cet usage interdit ou perturbe les analyses biochimiques qui souffrent des contaminants forcément apportés par le caractère monoxénique de ce type de culture. Il a été démontré [WILLAERT,1971] que *N. fowleri* se développe très facilement dans un milieu de culture sans bactérie ou axénique (un milieu est dit axénique lorsqu'il ne contient pas d'autres organismes en présence de celui qui est étudié). Ce milieu est à base de sérum, caséine, glucose et extraits de levures. Cela permit non seulement l'approfondissement de son étude biochimique mais offrit aussi un autre critère de discrimination [DE JONCKHEERE,1977]. La seconde espèce pathogène *N. australiensis* ainsi que les espèces non pathogènes, exceptée *N. lovaniensis*, se développent nettement moins bien ou pas du

tout dans un tel milieu. *N. lovaniensis* par contre s'y adapte avec une aisance très comparable à celle de *N. fowleri* .

c- vitesse de migration.

Les différentes souches d'amibes sont déposées sur un support recouvert d'une couche de bactéries. L'étude de leurs limites de migration à différentes températures à travers la couche bactérienne, apparaissant en lignes assez nettes, donne une information sur les souches étudiées et oriente leur identification. D'une manière générale, les *Naegleria* non pathogènes ont une vitesse de migration très sensiblement supérieure à *N. fowleri* à 25°C (de 3 à 13 mm/jour pour 1 à 2 mm/jour). Aux températures plus élevées, *N. lovaniensis* garde son avantage sur *N. fowleri* : 12 pour 7 mm/jour à 37°C; 18 pour 13 mm/jour à 43°C [GRIFFIN,1983]. Le fait que *N. lovaniensis* se développe plus vite que *N. fowleri* expliquerait le nombre élevé d'isolats de *N. lovaniensis* : il a en effet été trouvé lors d'une étude quantitative en différents endroits, que la pathogène *N. fowleri* ne représente seulement qu'une fraction (1/10 à 1/25) de la thermophile *N. lovaniensis* présente en un endroit particulier [DE JONCKHEERE,1978].

d- comportement phagocytaire.

La différence dans le comportement phagocytaire vis-à-vis des levures permet de distinguer *N. fowleri* de *N. gruberi* [THONG et coll.,1978]. Il faut cependant tester cette méthode sur *N. lovaniensis* avant de tirer une conclusion sur son utilité dans la discrimination dans l'environnement de l'espèce pathogène. En effet, tout porte à penser que *N. lovaniensis* pourrait présenter un comportement comparable à celui de *N. fowleri* . De plus, des observations de phagocytose de globules rouges du sang de poulet, de lapin, de chèvre et d'homme par *N. gruberi* autant que par *N. lovaniensis* semblent imposer certaines nuances à un tel critère [ALONSO & ZUBIAUR,1985].

2.2. Etudes morphologiques.

L'étude en microscopie optique de la morphologie des amibes ne permet pas

l'identification des espèces. Celle-ci recourt à des investigations plus poussées, telles la microscopie électronique conventionnelle et la microscopie électronique à balayage.

a- au microscope électronique à transmission (TEM).

N. fowleri diffère de *N. gruberi* par un plus grand nombre de mitochondries en forme d'haltère et par la constante association de citernes de réticulum endoplasmique rugueux (RER) avec des goutelettes lipidiques et des mitochondries.

La forme flagellée de *N. fowleri* est précédée par un aspect de cigare allongé, tandis que *N. gruberi* prend une forme plus arrondie.

Les kystes de *N. fowleri* ne montrent ni collet périostiolaire visible, ni protrusion muqueuse à partir des pores.

Les globules lipidiques des trophozoïtes de *N. jadini* montrent un arrangement typique en forme de couronne autour du noyau, généralement non associé aux éléments du RER. C'est apparemment le seul marqueur ultrastructural particulier de *N. jadini* qui peut orienter le chercheur vers sa distinction vis-à-vis des autres espèces [RONDANELLI et coll.,1987].

N. lovaniensis semble posséder des caractères structuraux stables, tels une double citerne périnucléaire et des vésicules développées par bourgeonnement de l'enveloppe nucléaire et à destination du RER [STEVENS et coll.,1980].

b- au microscope électronique à balayage (SEM).

Les trophozoïtes de *N. fowleri* diffèrent de ceux de *N. gruberi* par la présence de nombreux pseudopodes plus gros. Mais la principale différence observable par cette technique reste la structure des kystes et la dimension de leurs pores. La surface des kystes est rugueuse chez *N. gruberi* , lisse chez les autres espèces. Chez toutes, les kystes sont sans replis mais pourvus de pores. Une étude approfondie de ceux-ci a permis de caractériser les différentes espèces par le nombre de pores (7,2 en moyenne chez *N. gruberi* ; 1,6 chez *N. fowleri*) et leur structure (dimensions de l'orifice, dimensions de l'espace périostiolaire) [JADIN J.M. et coll.,1974].

2.3. Etudes immunologiques.

L'homogénéité antigénique d'une espèce, ainsi que l'indépendance génétique de plusieurs espèces au sein du genre *Naegleria* , peuvent s'établir par analyses immunologiques. C'est ce qu'ont démontré les travaux de WILLAERT en 1976. L'identification rapide de plusieurs espèces peut se faire par immunofluorescence indirecte. Cependant, même si les différences antigéniques demeurent généralement exploitées en vue de l'identification spécifique, la description de *N. lovaniensis* , intimement liée à *N. fowleri* , a diminué l'efficacité de la méthode d'immunofluorescence, impliquant ainsi l'utilisation des techniques, plus sophistiquées, d'immunoélectrophorèse.

2.4. Etudes biochimiques.

a- focalisation isoélectrique (IEF) des protéines totales.

Les protéines intracellulaires sont séparées selon leur point isoélectrique (PI) -pH auquel elles sont électriquement neutres- par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide ou d'agarose où un gradient stable de pH a été établi. Après coloration du gel, de nombreuses bandes apparaissent, permettant une visualisation du profil de distribution totale des protéines.

C'est ainsi que PERNIN et coll. (1983) ont pu analyser la composition protéinique des extraits cellulaires de *Naegleria* : les différentes souches étudiées de *N. fowleri* montrent un profil semblable, tandis que *N. lovaniensis* lui apparaît, ici aussi, très proche puisque le gradient de pH utilisé sur le gel doit être limité aux pH 4-6 afin de discerner des différences significatives entre les deux espèces, alors qu'un gradient de pH 3,5-9,5 suffit à distinguer les autres espèces.

Les différences observées sont tant quantitatives (intensité de coloration) que qualitatives (présence ou absence de bandes). Cette méthode présente l'avantage de donner une identification dans un bref intervalle de temps (moins de 24 h après l'axénisation de la souche).

b- focalisation isoélectrique des isoenzymes.

Le principe de cette IEF est le même. Dans ce cas-ci, cependant, au lieu de visualiser la distribution totale des protéines, on immerge le gel dans une mixture révélant seulement les bandes à activité enzymatique particulière. Le nombre de bandes étant ici nettement moins élevé, la comparaison des similitudes ou des différences entre souches et entre espèces en devient plus aisée. Les enzymes sont visualisés par utilisation d'une séquence réactionnelle catalysée par l'enzyme lui-même, qui aboutit à la formation d'un produit facilement détectable.

Cette technique dite des zymogrames est à la fois un processus de détection et d'amplification, puisqu'elle permet de révéler des enzymes qui peuvent ne se trouver qu'à l'état de traces. Elle permet de comparer les isoenzymes de différentes origines, c'est-à-dire les multiples formes moléculaires d'une protéine (naturellement présentes dans un organisme ou chez différents membres de la même espèce) possédant la même activité enzymatique.

DE JONCKHEERE (1982) appliqua cette technique à l'identification des différentes *Naegleria* sp. Par après, il a été montré que la détermination, par cette technique, des activités spécifiques de la phosphatase acide (PA) et de la leucine aminopeptidase (LAP) pouvait être utilisée comme une méthode rapide d'identification de *N. fowleri* , cette espèce montrant une activité spécifique en PA plus élevée et une activité spécifique en LAP moins élevée que les autres espèces [DE JONCKHEERE & DIERICKX,1982].

2.5. Autres études.

a- agglutination par la concanavaline A.

La concanavaline A (ConA) est une lectine possédant la propriété d'entraîner l'agglutination de certaines espèces d'amibes. En culture axénique, le test d'agglutination par ConA se révèle être une très bonne méthode d'identification de *N. fowleri* puisque contrairement à *N. gruberi* , *N. lovaniensis* et *N. australiensis australiensis* , cette espèce pathogène y est insensible [STEVENS & STEIN,1977; STEVENS et coll.,1980].

b- effet cytopathogène.

Lors d'isolements d'amibes libres, leur pathogénicité est d'abord testée sur des cultures de fibroblastes. *N. jadini* et la plupart des souches de *N. gruberi* étudiées n'ont pas d'effet cytopathogène (CPE). Les autres espèces peuvent détruire une monocouche de cellules après un temps variable selon la virulence de l'espèce en question [DE JONCKHEERE,1980].

c- test de virulence sur les souris.

Il s'agit ici de provoquer une MEAP expérimentale chez les souris, attestant ainsi de la virulence de l'espèce étudiée: quelques gouttes d'une culture d'amibes sont instillées ou inoculées à la souris par voie nasale ou intracérébrale. Après deux ou trois jours, une espèce pathogène tue la souris en y détruisant le tissu cérébral.

N. fowleri et *N. australiensis* sont les deux seules espèces présentant une telle pathogénicité. Au sein de l'espèce *N. australiensis* , on peut observer une virulence plus accusée de la sous-espèce *N.a. italica* par rapport à *N.a. australiensis* .

Les techniques citées plus haut (IEF), qui peuvent apporter une identification aussi précise et plus rapide ont été proposées comme alternative à cette expérimentation sur l'animal [DE JONCKHEERE,1982], malheureusement leur coût parvient mal à rivaliser avec sa simplicité.

I.3. Présentation de *Naegleria lovaniensis* .

3.1. Découverte d'une nouvelle espèce.

Lors des tentatives d'isolement de *N. fowleri* à partir des eaux de piscine et de circuits industriels de refroidissement, il fut remarqué que la majorité des *Naegleria* cultivables à 44-45°C n'étaient pas les amibes pathogènes recherchées. Bien qu'elles réagissaient séropositivement avec l'antisérum dirigé contre *N. fowleri* , elles ne montraient aucune pathogénicité pour la souris. Elles furent dès lors considérées comme étant des variants de *N. fowleri* , qu'un contact avec des détritus organiques ou d'autres

opportunités pourraient rendre virulents [DE JONCKHEERE & van de VOORDE,1977]. Cependant, des études plus approfondies ont révélé qu'il s'agissait d'organismes suffisamment différents pour constituer une espèce propre. Cette nouvelle espèce, thermophile et non pathogène, fut décrite pour la première fois à l'université de Leuven en 1980. Depuis lors, différentes souches de *N. lovaniensis* ont été isolées dans le monde présentant, toutes, les mêmes caractéristiques et une structure antigénique identique quelle que soit leur origine. Des différences au sein de l'espèce peuvent être toutefois détectées dans les distributions de protéines totales, alors que parmi les différents isolats de *N. fowleri* , celles-ci sont minimes [DE JONCKHEERE,1987].

3.2. Description.

La morphologie de *N. lovaniensis* est très comparable à celle des autres *Naegleria*.

a- forme amibienne.

L'endoplasme se distingue nettement de l'ectoplasme. L'organisme se déplace en formant de larges pseudopodes hyalins, mais de fréquentes formations de petits pseudopodes diversément orientés semblent ne pas intervenir dans la locomotion. Les dimensions des trophozoïtes varient de 10 à 30 µm. Le noyau est proéminent et contient un nucléole central bien évident. Les autres organites visibles en microscopie électronique sont les mitochondries, fréquemment observées sous forme d'haltère avec crêtes tubulaires, les lysosomes, des vacuoles pulsatiles, des vacuoles d'endocytose et des globules lipidiques entourées par des citernes de RER. On y observe parfois des inclusions virales intracytoplasmiques. Ni dyctiosomes développés ni peroxysomes n'ont été mis en evidence chez les amibes du genre *Naegleria* [RONDANELLI et coll.,1987].

Une particularité importante différencie les trophozoïtes de *N. lovaniensis* de ceux de *N. fowleri* : la membrane nucléaire présente des boursouflures ceintes d'une couche dense ou de quelques couches de RER. Ces boursouflures se développent en vésicules et contiennent du matériel nucléaire [STEVENS et coll.,1980]. Notons que des souches ne montrant pas cette différence ultrastructurale peuvent toutefois dévoiler le pattern isoenzymatique de *N. lovaniensis* et réagir avec l'antisérum dirigé contre cette espèce [DE JONCKHEERE,1982].

b- forme flagellée.

Durant leur transformation en flagellés, les *Naegleria* subissent trois changements morphologiques fondamentaux: la forme amibienne s'allonge et devient forme flagellée ; les grands organites préexistants, à savoir noyaux et vacuoles pulsatiles, prennent une localisation déterminée; de nouveaux organites apparaissent pour constituer l'appareil flagellaire (flagelles, blépharoblastes) [WILLAERT,1976].

c- forme kystique.

Les kystes, généralement uninucléés, ont un diamètre de 14 µm en moyenne. Leur paroi, très réfringente en contraste de phase, est lisse avec des pores bien visibles (1 à 4), à travers lesquels l'amibe se désenkyste par invagination. Le noyau et son nucléole sont bien visibles, entourés par les organites intracytoplasmiques.

3.2. Intérêt.

Il a déjà été fait allusion aux nombreuses similitudes liant *N. lovaniensis* à *N. fowleri* : thermophilie, réaction positive en immunofluorescence indirecte avec l'antisérum *N. fowleri* au même titre que *N. fowleri* lui-même, capacité de croissance en milieu axénique.

La distinction des deux espèces ne put se faire que par des techniques sensibles telles que IEF, immunodiffusion, immunoélectrophorèse. Les isoenzymes de la propionyl estérase et de l'aspartate aminotransférase peuvent différencier *N. lovaniensis* de *N. fowleri* [DE JONCKHEERE,1987; KILVINGTON et coll.,1984].

Les deux espèces ont des comportements alimentaires semblables [NERAD et coll.,1983].

Tout ceci tend à montrer que *N. lovaniensis* occupe la même niche écologique que *N. fowleri* . Ceci justifie le principal intérêt de l'étude de *N. lovaniensis* qui devient par conséquent, un indicateur biologique de la présence de conditions environnementales idéales pour le développement de *N. fowleri* . L'analyse de circuits industriels de refroidissement en divers endroits ont souvent révélé la seule présence de *N. lovaniensis* [DE JONCKHEERE,1977; DE JONCKHEERE & van de VOORDE,1977; PERNIN et

coll.,1983]. Dans de pareils cas, l'absence de *N. fowleri* ne peut être affirmée quand on sait que lors de l'isolement des amibes, *N. lovaniensis* se développe plus rapidement et peut remporter la compétition qui l'oppose à *N. fowleri* [DE JONCKHEERE,1987]. *N. lovaniensis* a, de même, été identifiée notamment dans deux bassins d'hydrothérapie "désinfectés" aux rayons U.V. en Belgique [DE JONCKHEERE,1982] ainsi que dans de nombreux aquariums [DE JONCKHEERE,1979].

Une connaissance approfondie de ses caractères biologiques, morphologiques, antigéniques ou biochimiques est nécessaire afin de permettre une éventuelle identification, rapidement et avec précision, dans un milieu qu'on peut dès lors suspecter d'être ou de devenir un réservoir de *N. fowleri* .

L'absence de pouvoir pathogène de *N. lovaniensis* facilite grandement son utilisation en laboratoire.

I.4. Fractionnement de composants subcellulaires.

Le fractionnement est une technique destructive de caractérisation des cellules par séparation de leurs principaux constituants. Le fractionnement cellulaire proprement dit est précédé d'une étape d'homogénéisation.

4.1. Homogénéisation.

L'objectif de l'homogénéisation est de transformer une culture de cellules ou un tissu en une suspension homogène de leurs composants libérés après la rupture de la paroi cellulaire. Il existe plusieurs types de procédures menant à la rupture des cellules. Un relevé des principales méthodes disponibles sera exposé dans un chapitre ultérieur. Quel que soit le type de procédure utilisé, un milieu de tonicité, de force ionique, de protections et de pH appropriés doit être choisi en vue de préserver les propriétés biochimiques et morphologiques des organites.

La principale difficulté rencontrée lors de l'homogénéisation est en effet la recherche d'un bon compromis entre, d'une part, la rupture du plus grand nombre de cellules et la libération dans le milieu de leurs constituants et, d'autre part, la lyse du

plus petit nombre d'organites et l'inactivation dans le milieu de leurs composants biochimiques.

4.2. Fractionnement proprement dit.

Deux approches sont possibles, préparative ou analytique; l'exploitation de l'une ou de l'autre est déterminée par la finalité que l'on veut donner à l'expérience. Dans le but de caractériser la globalité des composants cellulaires et d'en mesurer quantitativement l'importance relative c'est, ici, l'approche analytique qui sera utilisée.

La centrifugation est une méthode de choix pour l'isolement des organites subcellulaires et le fractionnement d'un homogénat cellulaire en ses différents composants. Les différentes fractions obtenues sont soumises à des analyses biochimiques en vue d'en apprécier l'importance quantitative.

Principe de la centrifugation différentielle.

Cette technique de fractionnement se base sur les différences de coefficients de sédimentation des particules engendrées par leurs différences de taille et de densité.

La vitesse d'une particule soumise à un champ centrifuge dépend de son coefficient de sédimentation par la relation de Svedberg:

$$v = dx/dt = S.\omega^2.x$$

dans le cas d'une particule sphérique où v: vitesse de la particule ($cm.sec^{-1}$)
x: distance par rapport à l'axe de rotation (cm)
t: temps de centrifugation (sec)
S: coeff. de sédimentation ($Sved.=10^{-13}sec$)
ω: vitesse angulaire ($rad.sec^{-1}$)

S étant défini comme égalant:

$$S = 2.\, r^2.\, (\rho_p - \rho_m)/9.\eta$$

où r: rayon de la particule (cm)
ρ_p: densité de la particule ($gr.cm^{-3}$)
ρ_m: densité du milieu ($gr.cm^{-3}$)
η: viscosité du milieu (poises)

Dans cette équation, deux paramètres r et ρ_p caractérisent la particule, tandis que ρ_m et η caractérisent le milieu. Le milieu utilisé étant homogène, on considère que ni r ni ρ_p ne se modifient durant la centrifugation.

La vitesse étant proportionnelle au carré du rayon particulaire, c'est la taille des organites qui aura la plus grande influence, la densité intervenant d'une manière plus discrète, principalement lorsque deux organites différents mais de même diamètre doivent être séparés.

En pratique, la vitesse de rotation d'un rotor de centrifugation est généralement donnée en nombre de tours par minute (rpm). Cette valeur se détermine par la relation: $\omega = 2\ \pi.rpm/60$. La force de centrifugation peut aussi s'exprimer par l'accélération subie dans le champ gravifique: $g = \omega^2 x/981$.

La vitesse de rotation et le temps de centrifugation peuvent trouver un ajustement dont dépend l'obtention d'une sédimentation totale en un type défini de particules.

4.3. Repérage des particules.

L'identification et l'appréciation quantitative des particules sédimentées sont impossibles en microscopie optique et irréalisables en microscopie électronique. Il faut recourir à des méthodes biochimiques analytiques par utilisation de marqueurs enzymatiques de particules. Ces méthodes se basent sur le postulat d'homogénéité biochimique des structures subcellulaires proposé par de DUVE (1971) selon lequel, si un enzyme est présent dans une structure, sa concentration est identique dans chaque structure de même type dans la population considérée. Ceci permet l'extrapolation des résultats des mesures enzymatiques aux organites eux-mêmes. Ces méthodes se basent aussi sur la localisation unique d'un enzyme, second point du postulat à remplir pour que soient fondées de telles considérations.

Choix des enzymes dosés.

Le choix des enzymes dosés a été établi parmi ceux dont des études comparatives d'IEF de protéines totales ou d'isoenzymes chez les *Naegleria* sp. [DE JONCKHEERE, 1982; PERNIN et coll.,1983], des études de la distribution subcellulaire d'hydrolases chez *N. fowleri* [LOWREY & McLAUGHLIN,1985], et des caractérisations d'hydrolases acides chez *N. fowleri* [OLOMU et coll.,1986] ont pu révéler la présence significative.

Le but des dosages réalisés étant de caractériser le fractionnement de

N. lovaniensis , nous avons choisi quatre des enzymes les plus susceptibles de présenter une association avec les principaux organites présents chez ces amibes:

-la phosphatase acide. L'association de cet enzyme avec les vacuoles lysosomales apparaît très nettement chez *N. fowleri* . Certains travaux y ont montré une activité spécifique supérieure à celle des espèces non pathogènes [LOWREY & McLAUGHLIN,1985].

-l'aspartate aminotransférase, qui se retrouve associée aux gros granules, les mitochondries [id.].

-la 5'-nucléotidase, qui apparaît très nettement associée à la membrane plasmique chez *N. fowleri* [id.].

-l'α-D-glucosidase, dont une distribution bimodale a été remarquée chez *N. fowleri* , la majorité de l'activité étant repérable dans les fractions enrichies en membranes plasmiques tandis qu'un peu d'activité semble associée aux lysosomes. Cette constatation est cependant assortie de réserves par les auteurs eux-mêmes [id.], l'acidité nécessaire au développement maximal de l'activité de cette hydrolase (pH 5,5) attribuant à l'α-D-glucosidase une localisation véritablement lysosomale. Leurs résultats, qui laissent remarquer par ailleurs une altération généralisée des organites provoquée par une homogénéisation trop forte, appellent des recherches supplémentaires.

Divers travaux sont arrivés à la conclusion que ni l'appareil de Golgi -sinon très rudimentaire- ni les peroxysomes ne pouvaient être décelés chez les *Naegleria* [RONDANELLI et coll.,1987], nous n'en avons pas réalisé le dosage. Il aurait été intéressant de doser un enzyme marqueur du reticulum endoplasmique, comme la glucose-6-phosphatase, ainsi qu'un enzyme marqueur du cytosol, comme la leucine aminopeptidase que DE JONCKHEERE et DIERICKX (1982) proposèrent pour identifier *N. fowleri* .

Chapitre II. MATERIEL ET METHODES.

II.1. Souche étudiée.

La souche (5M11[50]42) de *Naegleria* utilisée dans ce travail provient du Mexique, elle fut isolée par le Dr Sc. MARTINEZ (Mexico). Elle a pu être apparentée, par IEF de ses composants biochimiques, au type belge de *N. lovaniensis* (Aq/9/1/45D) isolée à partir d'un aquarium à Leuven. D'un point de vue immunologique, ce type occupe une position intermédiaire entre *Naegleria fowleri* et *Naegleria gruberi* . Il se développe axéniquement sur milieu SCGYEM, et aucune pathogénicité sur animaux de laboratoire n'a pu lui être atttribuée. Sa température maximale de croissance est de 45°C et il s'agglutine par réaction avec la Con A. Sa cytopathogénicité pour les cellules en cultures a pu être mise en évidence.

Les protozoaires *Naegleria lovaniensis* nous ont été fournis par le Dr Sc. J.F. DE JONCKHEERE, de l'Institut d'Hygiène et d'Epidémiologie de l'Etat à Bruxelles.

II.2. Culture *in vitro*.

L'analyse biochimique d'un fractionnement cellulaire requiert une quantité importante de cellules. Il s'agit donc de veiller à fournir aux amibes un environnement optimalisant leur capacité de développement et de croissance en laboratoire.

Les cultures sont maintenues à l'étuve (39 à 42°C).

2.1. Milieu de culture (SCGYEM).

Le développement de *N. lovaniensis* ne nécessitant pas la présence de bactéries dans le milieu, nous avons choisi le milieu axénique de CERVA (1969) modifié par

WILLAERT (1971), dénommé SCGYEM.

Formule du SCGYEM (Serum-Casein-Glucose-Yeast Extract-Medium).

pour 1 litre: -solution 1: caséine purifiée.....10 g
Na_2HPO_4.....1,325 g
H_2O distillée.....800 ml

-solution 2: glucose.....2,5 g
KH_2PO_4.....0,8 g
H_2O dist.....8O ml

- les solutions 1 et 2 sont mises à autoclaver à 120°C pendant 20 minutes.

-solution 3: extraits de levures.....5 g
streptomycine sulfate.....200 mg
pénicilline.....200.10^3 U.I.
H_2O dist.....20 ml

- la solution 3 est stérilisée par filtration (0,2 µ -Sartorius).

-solution 4: sérum de veau foetal stérile (inactivé).....100 ml

- les quatre solutions sont mélangées et le milieu est ensuite réparti dans des tubes stériles par quantités de 3 ml, ou dans des flacons de Roux stériles par quantités de 50 ml.

2.2. Mode de croissance.

Le développement d'une culture de *Naegleria*, *in vitro* , maintenue à 37°C sans agitation, peut être décomposé schématiquement en quatre phases (fig.II.1.):

1- phase de latence
2- phase de multiplication exponentielle
3- phase stationnaire
4- phase de lyse

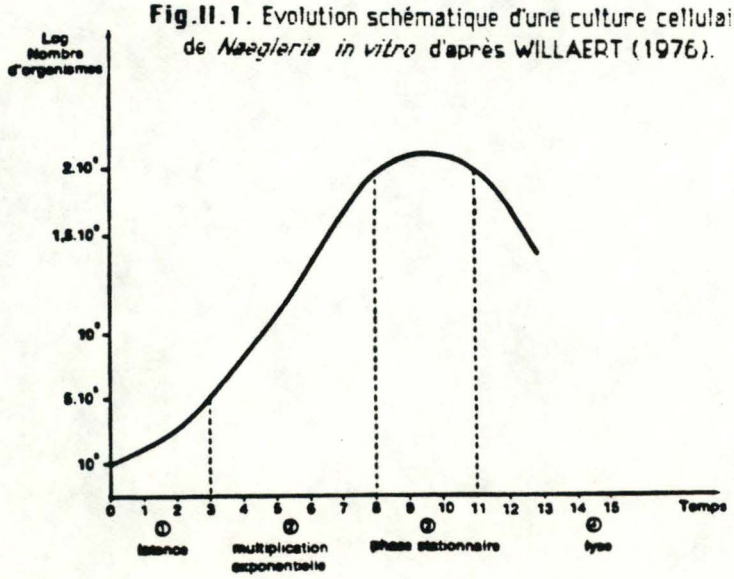


Fig.II.1. Evolution schématique d'une culture cellulaire de *Naegleria in vitro* d'après WILLAERT (1976).

La croissance des amibes en culture est surveillée quotidiennement au microscope optique afin d'apprécier la netteté des limites des différentes phases. En vue d'obtenir un bon rendement en cellules, le repiquage d'entretien doit s'effectuer en fin de phase 2 et le volume de l'inoculum s'évaluer de manière à ramener la population au début de phase 2 dans le milieu neuf.

Le fractionnement et l'analyse biochimique des amibes sont réalisés assez tôt durant la phase 3 soit après 8 à 9 jours; c'est en effet à ce moment que la culture contient le nombre maximum d'amibes (généralement >2,5 . 10^6 amibes/ml).

2.3. Entretien.

Le repiquage des souches s'effectue en inoculant 0,5 ml environ de la culture prélevé au fond du tube avec une pipette Pasteur et transféré dans 3 ml de milieu neuf. Cette opération se réalise tous les 5 à 7 jours, en prenant toutes les précautions d'une manipulation stérile. Les tubes employés sont d'une capacité de 12 ml en polystyrène munis de bouchons à vis.

L'obtention d'une culture massive est permis par inoculation du contenu d'un tube d'une culture de 7 jours environ dans chaque flacon de Roux de 250 ml contenant 50 ml de milieu. Dans ces flacons, le milieu est étalé en une couche mince, ce qui assure une oxygénation optimale.

Chacune des opérations d'entretien est toujours précédée par le contrôle de la pureté de la culture en microscopie à contraste de phase d'une goutte de cette culture. Toute culture présentant une contamination par levures, champignons ou bactéries a été jugée inutilisable pour la réalisation d'analyses biochimiques.

2.4. Problèmes liés à la contamination.

Les éventuels contaminants risquant d'interférer de manière importante dans les différents résultats d'analyses biochimiques de fractionnements, il est impératif de travailler sur une culture vierge de toute contamination. Pour y arriver, toutes les opérations s'effectuent sous la hotte à l'aide d'instruments préalablement stérilisés.

II.3. Homogénéisation.

3.1. Problèmes posés.

Des précédentes tentatives de fractionnement subcellulaire de *Naegleria gruberi* et *fowleri* ont montré que ces amibes sont remarquablement résistantes à la rupture [WEIK & JOHN,1979]. Ceci nécessita le recours à des méthodes d'homogénéisation tant drastiques que sophistiquées, amenant la conséquence d'un dommage relativement important aux organites, mis en évidence par une grande activité soluble d'enzymes qui y sont associés *in vivo* . Les analyses de la biochimie ou de l'immunologie totales utilisent des méthodes d'homogénéisation qui ne nous intéressent pas ici, du fait de l'éclatement généralisé de tous les organites.

3.2. Relevé des principales méthodes.

Dans la majorité des homogénéiseurs dont un aperçu est donné ici [WATTIAUX, 1970; de DUVE,1971], la rupture des cellules est produite par des forces de cisaillement. Ce n'est que dans le cas d'inefficacité de tels homogénéiseurs que l'on se tournera vers d'autres méthodes.

a-Forces de cisaillement.

La plus simple procédure consiste à broyer les tissus dans un mortier contenant du sable ou d'autres cristaux abrasifs (carbonate de silice, sels d'alumine,...). Le mortier est alors éliminé de l'homogénat par centrifugation. Cette méthode s'utilise pour rompre beaucoup de microorganismes tels les trypanosomes.

Dans d'autres méthodes, convenant mieux aux tissus animaux, les fragments de tissu sont engagés de force à travers un étroit espace annulaire. Le Potter appartient à ce type d'homogénéiseur coaxial dans lequel les cellules sont soumises à un va-et-vient simultanément vertical et circulaire, le piston voyageant dans le tube subissant lui-même, souvent, une rotation manuelle ou entraînée par un moteur. La distance séparant les parois du tube et du piston détermine une sélection de taille, puisque les

forces de rupture ne s'établissent que lorsqu'il y a contact de la cellule avec ces parois: cette sélection s'opère de telle manière que les organites soient épargnés.

L'homogénéiseur de Dounce suit le même principe que le Potter, mais le piston est sphérique de sorte que le contact, tangentiel, est plus limité. Les structures cellulaires et subcellulaires sont donc beaucoup moins fréquemment soumises à l'action du piston. La structure même du piston, selon qu'il est lisse ou finement dentelé, en verre ou en plastique, influence l'intensité des forces de cisaillement exercées. Ces techniques ne s'appliquent que rarement à des cellules isolées comme tous les organismes unicellulaires, ou à des tissus fibreux.

Des appareils techniquement plus sophistiqués permettent un contrôle précis de l'espace séparant les parois du tube et du piston. C'est le cas notamment de l'appareil Chaikoff et de la "French Press". La "X-Press" est une presse hydraulique composée de deux cylindres séparés par un disque perforé d'un pertuis de 2 mm de diamètre. Le contenu congelé de cellules à homogénéiser est soumis à une pression pouvant voisiner les 13 tonnes/cm^2. Un brusque changement dans la structure des cristaux de glace désintègre les cellules après la chute brutale de la pression. L'éclatement cellulaire est généralisé à tous les organites subcellulaires.

Dans les homogénéiseurs à couteaux de type ultraturrax, la rupture des cellules est amenée par la rotation à grande vitesse de couteaux métalliques. Ces appareils sont généralement équipés d'un rhéostat contrôlant la vitesse du moteur. On ne peut ici limiter l'ampleur de la destruction des membranes à celles de surface, tous les organites étant soumis à la même puissance de rupture leur amenant de sévères altérations.

Diverses variations sont permises sur l'emploi des seringues dans l'homogénéisation. Lorsqu'elle associe à la seringue une aiguille de fin diamètre, cette technique suffit à rompre par frottement la membrane plasmique des macrophages. Une bille d'acier coincée à l'extrêmité d'une seringue fait éclater les lymphocytes forcés de la contourner.

b-Autres forces de rupture.

Il existe plusieurs autres moyens de rupture de cellules, auxquels on peut avoir recours lorsque les méthodes par force de cisaillements s'avèrent inefficaces. Le risque est ici plus grand d'altérer la morphologie ou la biochimie des structures subcellulaires.

Un traitement hypotonique des cellules entraîne leur éclatement, les forces osmotiques résultant de la différence de tonicité établissant un flux du milieu vers la

cellule: celle-ci gonfle puis éclate lorque la résistance de sa paroi est dépassée. Mais à ce moment les granules intracellulaires sont exposés à leur tour à la force de rupture.

Le processus de cavitation se sert du principe de désolubilisation de gaz (N_2) provoquée par une diminution locale de la pression, entraînant à l'intérieur des cellules la formation de petites bulles dont l'accumulation finit par provoquer la rupture de la membrane. Cette technique demande un appareillage important.

Les vibrations caractérisant les ultrasons, par leur action mécanique sur les éléments de la phase liquide intracellulaire, provoquent également un phénomène de cavitation qui peut aboutir à la lyse cellulaire. Mais on observe, chez certains types de cellules en tous cas (e.g. les lymphocytes) des altérations, notamment au niveau de l'activité enzymatique intracellulaire, engendrées par l'action physico-chimique de dépolymérisation et de fragmentation des grosses molécules sous l'effet des ultrasons.

La méthode de congélations-décongélations successives se base sur une désorganisation des membranes pour entraîner leur rupture. C'est une technique fréquemment utilisée pour l'analyse de la composition totale des cellules mais qui ne permet pas de bons fractionnements, puisqu'elle entraîne une altération importante des organites subcellulaires.

L'homogénéisation requiert à la fois une désintégration importante des cellules et une préservation des organites subcellulaires. Remplir cette double exigence ne peut souvent se faire qu'après avoir procédé à un certain nombre d'essais expérimentaux d'homogénéisation pour un tissu ou un type de cellules déterminé.

Le choix du milieu doit tenir compte de l'influence que peuvent avoir ses propriétés sur le rendement et l'efficacité de la technique utilisée:

-le pH de l'homogénat peut varier peu après la rupture cellulaire, l'utilisation d'un milieu tamponné au pH 7 est donc indiqué dans certains cas pour éviter les processus d'autolyse lors d'une baisse trop importante de pH;

-la tonicité du milieu est importante, du fait que des particules telles que mitochondries et lysosomes montrent un comportement osmotique;

-la force ionique l'est de même, puisqu'une agglutination de particules est souvent observée lorsque le milieu est riche en électrolytes;

-la protection que peut offrir le milieu par l'addition de substances spécifiques devient nécessaire lorsqu'on tient à préserver une activité enzymatique ou une structure particulièrement labile.

De nombreux milieux d'homogénéisation ont été décrits, mais le plus recommandé reste le saccharose (sucrose) isotonique 0,25 M [WATTIAUX,1987]. C'est celui que nous avons utilisé dans ce travail.

3.3. Méthodes testées.

En fonction de la disponibilité des différentes techniques ainsi que de la finalité recherchée dans le cadre de ce travail, nous avons sélectionné cinq méthodes dont nous avons expérimenté l'efficacité sur les amibes *Naegleria* . Ces cinq méthodes sont: les homogénéiseurs Dounce et Potter, le frottement d'une aiguille fine et d'une aiguille contenant des débris de verre, et l'ultrasonication.

a- homogénéiseur mécanique de type Dounce.

L'instrument utilisé est d'une capacité totale de 7 ml muni d'un piston en verre actionné manuellement. La quantité à homogénéiser est répartie par volumes de 3 ml subissant chacun une vingtaine de passages du piston.

b- homogénéiseur mécanique de type Potter.

Nous avons choisi un modèle d'une capacité totale de 6 ml muni d'un piston en plastique actionné manuellement. La quantité à homogénéiser est répartie par volumes de 3 ml subissant 5 passages du piston.

Ces deux homogénéisations s'effectuent en maintenant les instruments dans un bac de glace.

c- aiguille fine.

Une seringue de 5 ml est associée à une aiguille de type LUER 26G x 1/2" (0,45 x 12). La quantité à homogénéiser est répartie par volumes de 3 ml subissant 7 à 10 passages à l'intérieur de l'aiguille.

d- aiguille et débris de verre.

L'extrêmité antérieure d'une aiguille de type LUER 23G x 1" (0,6 x 25) est obstruée presque totalement par une accumulation de débris de verre (débris concassés de pipettes Pasteur) et associée à une seringue de 5 ml contenant 3 ml de matière à homogénéiser.

e- ultrasonication.

Nous avons réalisé l'ultrasonication à 6 combinaisons différentes de temps et de puissance, à l'aide d'un VIRSONIC CELL DISRUPTER-150:

U1: 30 sec. à la position 30 (notée 30°)
U2: 30 sec. - 45°
U3: 2x30 sec.- 50°
U4: 3x10 sec.- 50°
U5: 60 sec.- 45°
U6: 15 sec.-60°

Du fait de l'échauffement provoqué par ce type d'homogénéisation, tous les tests ont été réalisés en maintenant les échantillons à homogénéiser (3 ml) dans la glace afin de limiter au maximum l'importance de l'inactivation des composants biochimiques.

En vue d'augmenter le rendement de cette homogénéisation lors des différents essais de fractionnement subcellulaires, le premier lavage du culot de la fraction N était précédé par un retour à l'ultrasonication du culot resuspendu par aliquots de 3 ml (60" à 45°), afin de diminuer la proportion d'amibes entières dans la fraction N.

Tous les essais d'homogénéisation ont été réalisés après centrifugation du milieu de culture à 3000 rpm (rotor HS-4) pendant 10 min. Un échantillon du surnageant (milieu de sécrétion) est prélevé en vue de fournir un contrôle à l'appréciation biochimique de l'homogénéisation tandis que le culot (amibes entières) est resuspendu dans du saccharose 0,25M (volume variable selon le volume de milieu centrifugé) puis réparti par aliquots de 3 ml.

3.4. Appréciation de l'homogénéisation.

a- en microscopie optique.

La qualité de l'éclatement cellulaire a été contrôlée pour chaque test par les

examens pratiqués en microscopie optique (100x,400x ou, en contraste de phase, 1000x). Ceux-ci permettent également d'apprécier la proportion d'amibes que l'homogénéisation a laissées intactes. Ils ne donnent évidemment aucune information sur l'état des structures subcellulaires.

b- par analyses biochimiques.

L'analyse de la biochimie donne sans doute la meilleure information sur l'état des granules par comparaison des activités enzymatiques libre et totale. Les 3 ml de chaque aliquot homogénéisé sont centrifugés à 1230 *g* pendant 10 minutes dans une centrifugeuse réfrigérée (SORVALL RC-5B). L'activité enzymatique libre -ou libérée par la méthode d'homogénéisation- se mesure sur un échantillon prélevé du surnageant, et est comparée à l'activité enzymatique totale du surnageant mesurée après addition de 0,1% Triton-X-100 lors du dosage. Ce détergent rompt toutes les membranes ce qui libère la totalité de l'enzyme contenu dans la cellule et dans les organites subcellulaires. La différence, pour chaque méthode, des activités totale et libre nous permet de mesurer l'activité latente d'un enzyme associé à un type d'organites. Cette valeur représente la quantité d'organites libérés qui n'ont pas été lésés par l'homogénéisation. La confrontation du pourcentage de libération des organites et du pourcentage de lyse de ces organites libérés permet de trouver le meilleur compromis entre ces deux résultats de l'homogénéisation. Le pourcentage de libération se calcule en faisant le rapport entre l'activité spécifique totale des débris (surnageant + Triton) et l'activité totale des amibes non homogénéisées (contrôle + Triton); le pourcentage de lyse se calcule en faisant le rapport entre l'activité spécifique libre des débris et l'activité spécifique totale de ces mêmes débris.

L'analyse biochimique donne en outre une information sur les éventuelles pertes d'activité enzymatique par inactivations qu'ont subies les composants biochimiques lors de l'homogénéisation.

Nous avons choisi, comme témoin de la qualité de l'homogénéisation, le dosage d'un enzyme associé aux lysosomes, la phosphatase acide. Les raisons de ce choix sont que cet enzyme possède, chez *N. fowleri* en tout cas, la valeur de latence la plus élevée ainsi qu'une grande activité spécifique [LOWREY & McLAUGHLIN,1985]. Ce dosage a été réalisé essentiellement selon les méthodes publiées [PETERS et coll.,1972], en utilisant le méthylumbelliférylphosphate comme substrat. La méthode étant identique à celle employée lors du fractionnemnt, elle sera décrite ci-après.

II.4. Etudes biochimiques.

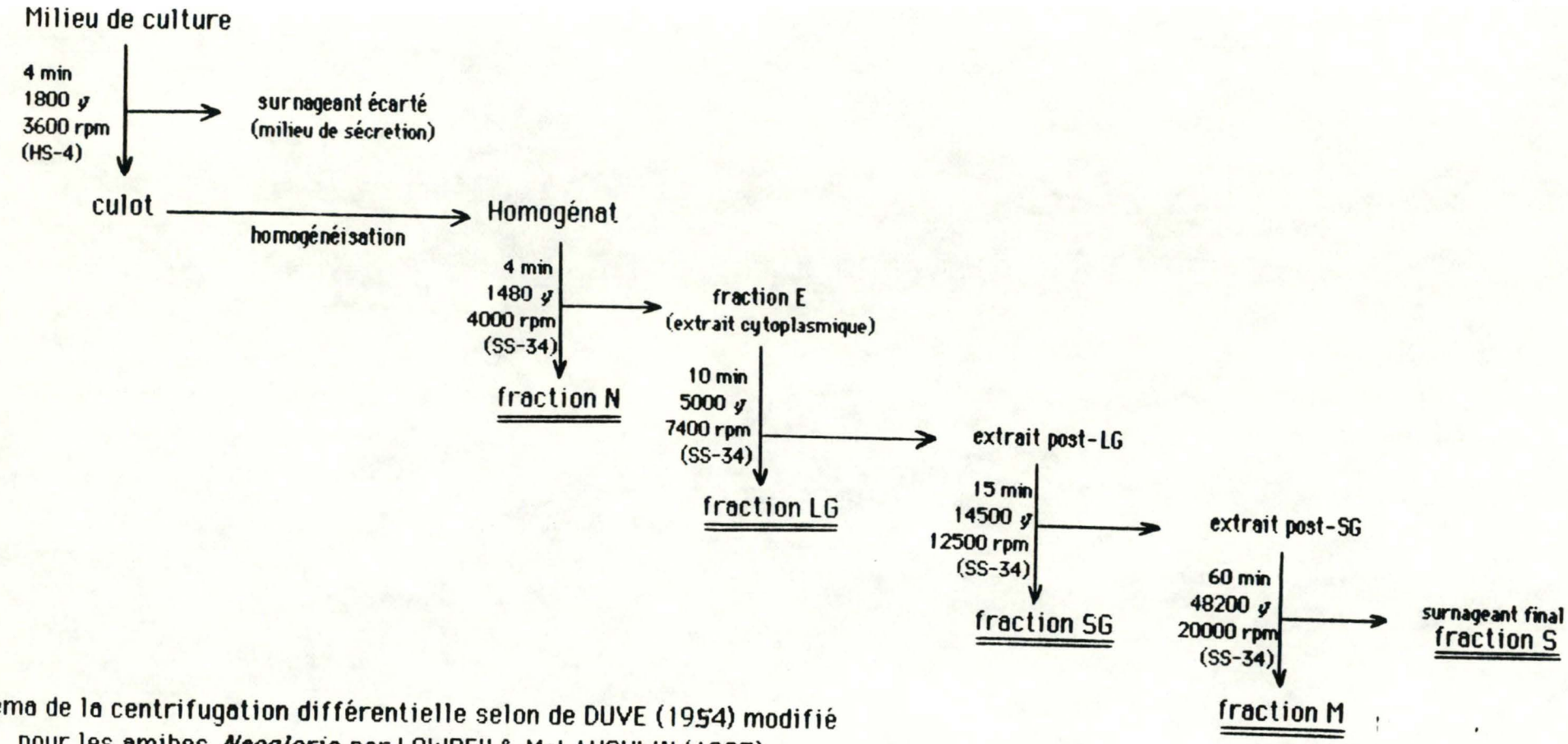
4.1. Schéma de centrifugation.

La centrifugation différentielle est réalisée à l'aide d'une centrifugeuse SORVALL RC-5B réfrigérée à 0°C, selon le schéma suivant [LOWREY & McLAUGHLIN,1985]:

Les amibes en culture sont centrifugées à 1800 *g* pendant 4 min. (rotor HS-4) et lavées deux fois avec 0,25M sucrose, puis resuspendues dans 20 ml de 0,25M sucrose. Les homogénats de *N. lovaniensis* sont préparés par ultrasonication à 45° pendant 1 min. Cet homogénat est ensuite centrifugé à 1480 *g* pendant 4 min.(rotor SS-34). Le culot obtenu est resuspendu dans 0,25M sucrose et subit une seconde exposition aux ultrasons. Il est ensuite lavé une fois avec 0,25M sucrose, il contient les cellules entières, noyaux et gros débris cellulaires (fraction N). A partir de l'extrait cytoplasmique résultant (combinaison des surnageants, fraction E), une fraction à gros granules (LG) est sédimentée à 5000 *g* pendant 10 min. Le surnageant résultant est centrifugé à 14500 *g* pendant 15 min. puis à 48200 *g* pendant 1 h, isolant ainsi respectivement les fractions à petits granules (SG) et microsomale (M). Les fractions LG et SG sont lavées une fois dans 0,25M sucrose. Les volumes de chaque fraction sont mesurés, dont la dernière (fraction S) contenant les éléments non sédimentables. Les culots des fractions N, LG, SG et M sont resuspendus dans 0,25M sucrose (2 à 5 ml) avec un homogénéiseur Dounce en verre (piston lâche).

4.2. Relevé des méthodes employées pour les dosages.

Les dosages de la phosphatase acide, de l'aspartate aminotransférase, de l'α-D-glucosidase et de la 5'-nucléotidase sont réalisés essentiellement selon les méthodes publiées. Les conditions de dosage sont optimalisées au regard du pH, de la concentration en substrat, du temps d'incubation, de concentration en protéines et de la présence d'effecteurs. Ces conditions sont reprises dans le tableau II-1.



chéma de la centrifugation différentielle selon de DUVE (1954) modifié pour les amibes *Naegleria* par LOWREY & McLAUGHLIN (1985).

Tableau II-1. Conditions des dosages enzymatiques réalisés lors des fractionnements.

Enzyme	t°	tps (incubation)	Substrat(s)	Concentration finale dans la mixture	[tampon] et pH	Additions
Phosphatase acide	37°C	14 min	MeUmb-P	10,0 mM	Acétate 0,1M pH 5,0	0,1% Triton X100
Aspartate aminotransférase	25°C	5 min	ac. L-aspartique ac. α-cétoglutarique	5,0 mM 6,6 mM	Phosphate 0,05 M pH 7,2	0,24 mM NADH 0,1% Triton X100
α-D-glucosidase	37°C	60 min	MeUmb-α-D-Glcp	0,5 mM	Acétate 0,1M pH 5,5	0,1% Triton X100 10 mM DTT
5'-nucléotidase	37°C	60 min	5'-AMP	1,0 mM	Tris-Ac 0,05 M pH 9,0	0,1% Triton X100 0,1 M KCl 0,1 M $MgCl_2$ 0,15 M tartrate Na^+,K^+

Abréviations : MeUmb-P : methylumbellifery l-phosphate ; DTT : dithiothreitol ;
MeUmb-α-D-Glcp : methylumbellifery l-α-D-glucopyranoside ; Ac : Acétate

a- Phosphatase acide.

L'activité de la phosphatase acide est mesurée au fluorimètre par la libération de 4-méthylumbelliférone, composé fluorescent sous la lumière U.V., à partir du 4-méthylumbelliférylphosphate. Les dérivés de 4-méthylumbelliférone ne sont pas fluorescents. La longueur d'onde de la lumière excitatrice est fixée à 366 nm, la lumière émise est mesurée à une longueur d'onde de 460 nm [PETERS et coll.,1972], à l'aide d'un fluorophotomètre AMINCO.

b- Aspartate aminotransférase.

Cet enzyme en présence d'acide α-cétoglutarique transforme l'acide L-aspartique en pyruvate par oxydation de NADH. La quantité de pyruvate produit dans la réaction est mesurée par la disparition, à une longueur d'onde de 340 nm, du NADH [LOWREY & McLAUGHLIN,1985] à l'aide d'un spectrophotomètre KONTRON de type UVIKON-820.

c- α-D-glucosidase.

Elle hydrolyse les liaisons α-1,4-glycosidiques d'oligosaccharides en libérant du glucose. A partir du 4-méthylumbelliféryl-α-D-glucopyranoside, cet enzyme libère le 4-méthylumbelliférone mesuré de la même manière que pour la phosphatase acide [PETERS et coll.,1972].

d- 5'-nucléotidase.

L'activité de la 5'-nucléotidase se mesure par la libération de phosphate inorganique à partir de l'adénosine-5'-monophosphate. La zone de pH où l'activité de cet enzyme est la plus élevée (pH 9.0 chez *N. fowleri*) ainsi que la présence de 150 mM Na^+,K^+,tartrate limite la contribution de l'activité d'autres phosphatases non-spécifiques [LOWREY & McLAUGHLIN,1985]. Le phosphate inorganique libéré se mesure, selon la méthode classique, à 650 nm (photomètre GILFORD 300N) par l'intensité de coloration de l'acide molybdeux en présence d'acide aminonaphtosulfonique [WATTIAUX,1987].

e- Protéines.

Le dosage des protéines dans chaque fraction permet d'apprécier la purification d'un enzyme considéré dans cette fraction. Il est réalisé par la mesure de la fluorescence émise par le produit de réaction des protéines avec la fluorescamine, après dissolution des membranes cellulaires sous l'effet de l'acide désoxycholique. La lecture se fait au fluorophotomètre à 460 nm, sous une excitation de 405 nm de longueur d'onde [PETERS et coll.,1972].

4.3. Recherche du pH d'activité enzymatique maximale.

Les enzymes dosés ont été choisis en référence à des études biochimiques de *Naegleria fowleri* , *N. gruberi* , ou *N. australiensis* . Nous avons donc été amenés à rechercher, pour chaque enzyme dosé chez *N. lovaniensis* , le pH lui permettant de développer son activité maximale, celui-ci étant soupçonné de varier significativement à un niveau spécifique.

Pour ce faire, l'activité des enzymes est mesurée dans un homogénat d'amibes obtenu comme précédemment, sous les conditions de dosage standard mais en utilisant dans la mixture d'incubation des solutions tampons différentes.

Enzyme	échelle de pH	tampons
phosphatase acide	3,6 à 7,0	acétate 0,1M (pH 3,6 à 5,8) phosphate 0,1M (pH 6,0 à 7,0)
α-D-glucosidase	3,6 à 7,0	acétate 0,1M (pH 3,6 à 5,8) phosphate 0,1M (pH 6,0 à 7,0)
aspartate amino-transférase	6,0 à 8,0	phosphate 0,05M
5'-nucléotidase	8,0 à 9,5	phosphate 0,05M (pH 8,0) Tris-Ac 0,05M (pH 8,5 à 9,5)

L'activité mesurée est rapportée à l'activité maximale, et les différents pourcentages de l'activité maximale sont portés en graphiques.

4.4. Calculs et présentation des résultats.

Calculs.

Nous avons calculé pour chaque enzyme l'activité (milliunités par mg de protéines ou nanomoles par minute et par mg de protéines dans la fraction) pour chaque fraction. La somme des valeurs trouvées pour les cinq fractions N+LG+SG+M+S rapportée à l'activité de l'homogénat E+N permet de calculer la récupération. Une récupération proche des 100% est une mesure de fiabilité du profil de distribution obtenu. Une valeur qui en est éloignée trahit une mauvaise conservation de l'activité enzymatique ou une perte de matériel lors du fractionnement. Pour chaque fraction, nous avons également calculé les pourcentages corrigés d'activité, c'est-à-dire le rapport de l'activité dans la fraction sur la somme des valeurs d'activité obtenues pour les cinq fractions. Ceci nous permet de mieux juger de la distribution intracellulaire de l'enzyme considéré.

Représentation graphique en histogrammes.

Une autre manière d'exprimer la répartition enzymatique dans un fractionnement par centrifugation différentielle consiste à représenter en histogrammes la valeur des activités observées dans chaque fraction en fonction de la purification de l'enzyme. Cette purification se mesure par le rapport de la proportion d'enzyme dans une fraction et la proportion de protéines dans cette fraction.

En abscisse sont cumulés les pourcentages de protéines des fractions rangées dans l'ordre N, LG, SG, M, S (Σ=100%).

En ordonnée s'élève l'activité spécifique relative (ASR):

$$ASR = \frac{\%\text{ activité de la fraction par rapport à H (E+N)}}{\%\text{ de protéines de la fraction par rapport à H (E+N)}}$$

L'ASR est représentative du degré de purification de l'enzyme dans la fraction considérée, puisqu'elle équivaut au rapport de l'activité spécifique de l'enzyme dans la fraction sur l'activité spécifique du même enzyme dans l'homogénat. Une valeur de l'ASR supérieure à l'unité montre que l'enzyme, et donc le compartiment intracellulaire auquel il sert de référence, sont plus purifiés que dans l'homogénat.

Dans cette représentation en histogramme, chaque rectangle schématise une des cinq fractions obtenues par centrifugation différentielle. Sa hauteur est proportionnelle à la purification de l'enzyme, tandis que sa surface l'est à la quantité d'enzyme récoltée par le fractionnement.

Chapitre III. RESULTATS.

III.1. Homogénéisation.

Par plusieurs expériences, nous avons testé différentes méthodes d'homogénéisation parmi celles qui nous semblaient les plus adéquates sans nécessiter d'appareillage important. Une méthode rapide et facile à mettre en oeuvre permettra par la suite la réalisation d'études plus approfondies de la biochimie de *N. lovaniensis* . La recherche de cette méthode nous a menés à des résultats que nous avons appréciés en microscopie optique et par dosages biochimiques.

Nous avons tout d'abord comparé l'effet du Potter et de l'aiguille fine. Les résultats obtenus, tant au niveau de la morphologie des cellules qu'à celui de la biochimie des organites témoins (les lysosomes), nous ont amenés à expérimenter une méthode plus drastique pour les amibes que l'aiguille fine et une méthode moins destructrice pour leurs organites que le Potter. Nous avons comparé ces différents résultats à ceux que l'ultrasonication pouvait nous fournir.

1.1. Examens en microscopie optique des homogénats.

L'appréciation globale de l'état des amibes après homogénéisation a été donnée par l'examen de la morphologie générale des amibes dans les homogénats; cette appréciation est reprise dans le tableau III-1.

Les méthodes par aiguille fine, Dounce, ultrasonications U1 et U2 nous sont apparues sans effet: dans l'homogénat observé, la majorité des amibes se trouvent à l'état intact; leur membrane de surface semble n'avoir subi aucune détérioration, et même si toutes les amibes ont pris une forme sphérique sans plus émettre de pseudopodes, leur état vital n'apparaît pas affecté.

Les amibes homogénéisées par Potter et ultrasonications U3-U4 apparaissent en proportion comparable à celle des amibes laissées intactes; chez celles-là, la membrane

de surface n'est plus visible, les granules intracellulaires sont maintenus regroupés autour du noyau dans la phase liquide cytosolique, ou même disséminés dans l'homogénat.

L'éclatement des amibes est nettement plus prononcé par l'aiguille obstruée de débris et les ultrasonications U5-U6. Les amibes sans membrane de surface et au contenu dispersé prédominent sur les cellules intactes.

Ces cnsidérations nous permettent d'établir une sélection supplémentaire sur la base de laquelle sont testés les effets des méthodes au Potter, à l'aiguille obstruée et aux ultrasonications U3-U4-U5-U6 sur la biochimie des particules libérées par homogénéisation.

Tableau III-1.

Méthode testée	Appréciation de l'homogénéisation
Potter	50 % d'éclatement*
aiguille fine	sans effet apparent
aiguille obstruée	75 % d'éclatement
Dounce	sans effet apparent
ultrasonication 1**	sans effet apparent
U2	sans effet apparent
U3	50 % d'éclatement
U4	50 % d'éclatement
U5	éclatement généralisé
U6	éclatement généralisé

*les proportions sont approximatives

**ultrasonications: U1: 30 sec-position 30 (notée 30°)
U2: 30 sec- 45°
U3: 2 x 30 sec- 50°
U4: 3 x 10 sec- 50°
U5: 60 sec- 45°
U6: 15 sec- 60°

1.2. Test de l'état biochimique des organites-témoins libérés.

La manière la plus appropriée d'apprécier l'état biochimique des particules libérées est sans doute de choisir un type de particules pour témoin et d'en réaliser le dosage avant et après homogénéisation. Nous avons choisi de doser la phosphatase acide associée aux lysosomes car, chez *N. fowleri* en tout cas, cet enzyme possède à la fois l'activité spécifique et la valeur de latence les plus élevées. Nos expériences de fractionnement nous montreront que la 5'-nucléotidase possède une activité plus élevée, mais l'association de cet enzyme à la membrane plasmique rend plus complexe l'interprétation des résultats que nous aurait fournis son dosage dans le cadre de cette expérience-ci, et qui ne nous auraient pas donné d'information sur l'état des membranes des particules.

Les valeurs des activités libres, totales et latentes de la phosphatase acide obtenues pour chaque méthode sont reprises dans le tableau III-2. Ces valeurs sont issues du dosage des surnageants, c'est-à-dire des débris cellulaires résultant de l'homogénéisation, ce sont des valeurs moyennes pour deux expériences à raison de deux dosages par expérience. Nous y avons ajouté les valeurs de l'activité dosable dans le milieu de culture après extraction des amibes (milieu de sécrétion).

Tableau III-2.

	Activités (mu/mg)		
Méthode testée	libre*	totale**	latente***
Potter	41,12	44,36	3,24
aiguille obstruée	42,61	71,40	28,79
U3	11,20	37,10	25,90
U4	20,30	35,35	15,05
U5	1,14	71,49	70,35
U6	41,39	71,31	29,92
amibes non homogénéisées	49,35	71,75	22,40
milieu vierge		0,52	
milieu de sécrétion		47,86 - 0,52= 47,34	

*sans Triton-X-100; **avec 0,2% Triton-X-100; ***différence (totale-libre)

Sur base de ces résultats, nous avons recherché des valeurs qui seraient représentatives de la proportion d'organites libérés par homogénéisation et de la proportion d'organites lésés lors de cette homogénéisation. Nous avons ainsi été amenés à calculer le pourcentage de libération des organites (activité totale dans les débris cellulaires par rapport à l'activité totale des amibes intactes) et le pourcentage de lyse des organites (activité libre dans les débris par rapport à l'activité totale dans les débris). Ces pourcentages sont repris dans le tableau III-3, ils expriment plus clairement la résultante de la double conséquence de toute homogénéisation.

Tableau III-3.

Méthode testée	libération (%)	lyse (%)
Potter	61,8	92,7
aiguille obstruée	99,5	59,7
U3	51,7	30,2
U4	49,3	57,4
U5	99,6	1,6
U6	99,4	58,0

Le meilleur compromis apparaît donc manifestement obtenu par la méthode d'ultrasonication U5 (60 sec ; 45°): 1,6% de lyse des organites pour 99,6% de libération des organites. Un calcul simple nous permet de mesurer la valeur maximale de l'inactivation que la méthode employée a entraînée, soit la différence, par rapport à l'activité maximale (amibes intactes + Triton), entre cette activité maximale et l'activité totale mesurée pour U5: s'il y a eu inactivation, elle n'excède pas:

$$(1- 71,49 / 71,75) \times 100 = 0,4\ \%.$$

Sur base de nos résultats, nous avons réalisé tous nos essais de fractionnement de *Naegleria lovaniensis* en considérant comme acquise l'efficacité de l'homogénéisation par une telle ultrasonication. Une erreur dans cette appréciation à ce niveau sera, par ailleurs et si elle existe, mise en évidence au niveau des résultats des fractionnements effectués, notamment par une activité soluble anormalement élevée des enzymes contenus à l'intérieur des structures subcellulaires.

III.2. Fractionnement subcellulaire.

Dans nos expériences,nous avons travaillé à partir d'homogénats de *Naegleria lovaniensis* obtenus après extraction de 7 à 8 flacons de culture, soit d'environ 1.10^9 amibes. Ces homogénats ont été fragmentés par centrifugation différentielle en cinq fractions: nucléaire (N), à granules de coefficient de sédimentation élevé (LG), à granules de coefficient de sédimentation plus faible (SG), microsomale (M) et non-sédimentable (S).

Nous avons été amenés à doser l'activité de quatre enzymes: la phosphatase acide, l'aspartate aminotransférase, l'α-D-glucosidase et la 5'-nucléotidase.

2.1. Distribution des protéines.

Le dosage des protéines a été réalisé selon la méthode de fluorimétrie par réaction avec la fluorescamine, en utilisant la sérum albumine bovine comme étalon. Les résultats consécutifs à quatre expériences de fractionnement ont mené à la détermination des valeurs moyennes de la distribution des protéines qui servent de référence aux calculs du pourcentage moyen de protéines dans la fraction. Ils sont présentés dans le tableau III-4.

La distribution des protéines, exprimée en pourcentage de la somme des valeurs trouvées dans chaque fraction, est comparable pour les quatre fractionnements. Pour les trois premières expériences, la fraction SG contient la moindre proportion de protéines et, pour toutes, la plus grande proportion de protéines est très nettement rassemblée dans la fraction S: 39 % minimum. Les fractions N et LG contiennent des proportions voisines de protéines.

Les valeurs moyennes peuvent donc être fixées à 17,6 % pour la fraction N; à 17,4 % pour la fraction LG; à 9,5 % pour la fraction SG; à 10,2 % pour la fraction M et le reste, 45,3 % pour la fraction S.

Tableau III-4.

n° exp.	vol.du milieu homogénéisé	distribution des protéines(%) N	LG	SG	M	S	Récupération (%)
1	400 ml	17,4	23,4	8,9	10,2	40,1	83,0
2	400 ml	16,1	12,5	8,7	14,5	48,2	97,4
3	350 ml	16,5	13,2	7,4	9,0	53,9	95,3
4	350 ml	20,4	20,4	12,9	7,2	39,1	103,0

2.2. Effet de la concentration en protons sur l'activité des enzymes.

Comme il est montré par la figure III-1 et le tableau III-5, les maxima d'activité des quatre enzymes dosés dans l'homogénat de *Naegleria lovaniensis* ont pu être enregistrés à pH 5,8 pour l'α-D-glucosidase, à pH 5,1 pour la phosphatase acide, à pH 7,2 pour l'aspartate aminotransférase, et à pH 8,9 pour la 5'-nucléotidase.

Pour les deux premiers, la sensible baisse d'activité aux pH 3,6 et 7,0 a rendu inutile l'investigation de l'activité à des pH plus éloignés; pour l'aspartate aminotransférase, l'inactivation de l'enzyme se marque nettement aux pH 6,0 et 8,0; pour la 5'-nucléotidase, l'évolution de la courbe de l'activité en fonction du pH met en évidence une zone favorable limitée aux pH 8,0 et 9,5.

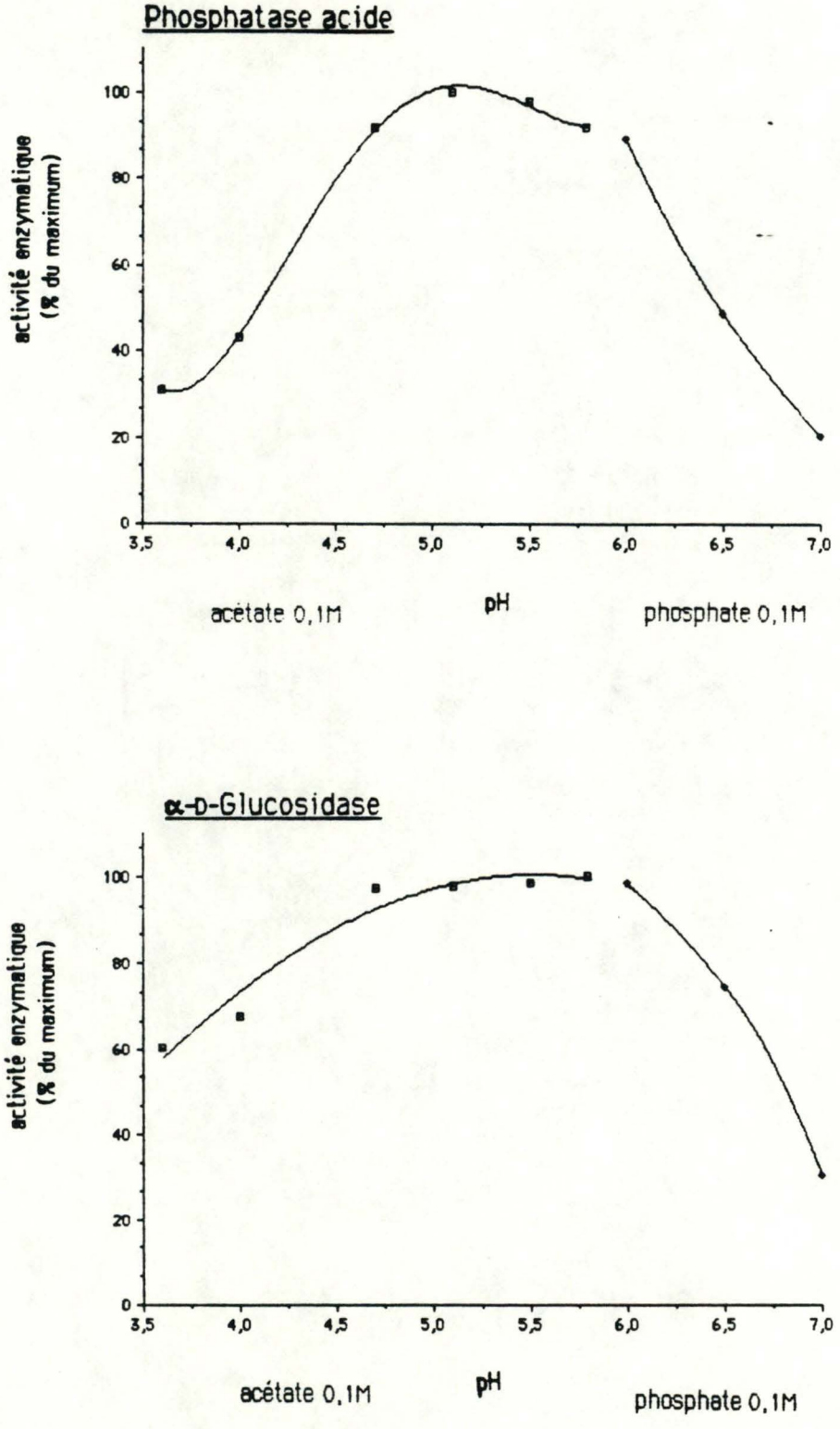


Fig. III.1.a. Effet de la concentration en protons sur l'activité des enzymes de *Naegleria lovaniensis* . L'activité enzymatique, exprimée en pourcentage de l'activité maximale mesurée, a été dosée selon les conditions standard mais à différents pH.

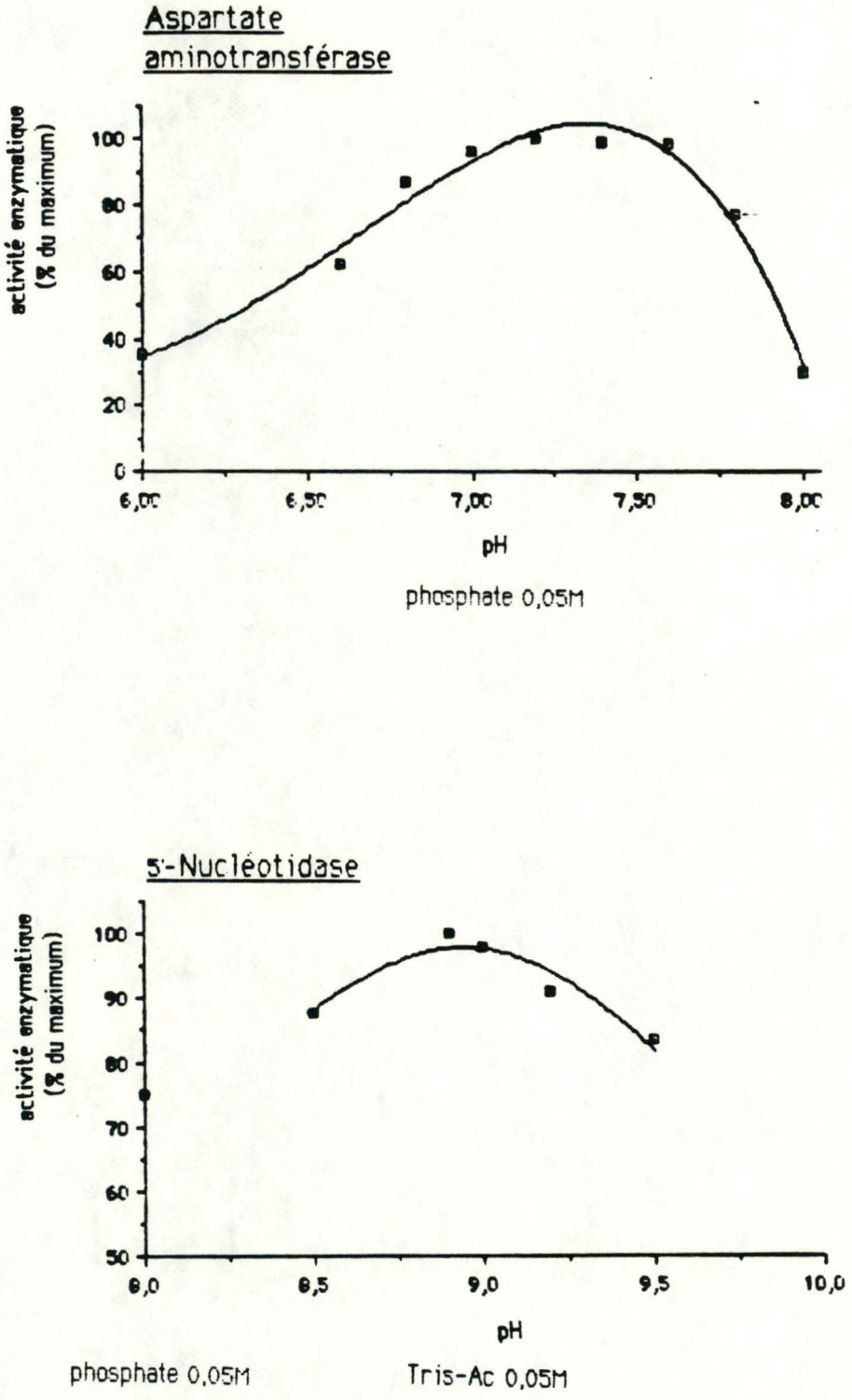


Fig. III.1.b. Effet de la concentration en protons sur l'activité des enzymes de *Naegleria lovaniensis* . L'activité enzymatique, exprimée en pourcentage de l'activité maximale mesurée, a été dosée selon les conditions standard mais à différents pH.

Tableau III-5.

	activité mesurée (% de l'activité maximale)		
pH	phosphatase acide	α-D-glucosidase	
3,6	31,2	60,4	
4,0	43,2	67,9	
4,7	91,8	97,1	
5,1	100	97,8	
5,5	97,6	98,4	
5,8	91,8	100	
6,0	89,0	98,3	
6,5	48,5	74,5	
7,0	20,2	30,2	
pH	AAT*	5'-nucléotidase	pH
6,0	35,2	75,2	8,0
6,6	62,4	87,5	8,5
6,8	87,2	100	8,9
7,0	96,6	97,8	9,0
7,2	100	91,0	9,2
7,4	98,7	83,2	9,5
7,6	98,2		
7,8	77,1		
8,0	29,9		

*AAT: aspartate aminotransférase

2.3. Activités spécifiques des enzymes dosés.

Les résultats relatifs aux mesures effectuées dans l'homogénat des amibes (fractions E+N) sont repris dans le tableau III-6. Ces valeurs sont issues des fractionnements de *Naegleria lovaniensis* extraits de quatre lots de 8 flacons de culture chacun.

L'activité spécifique de l'homogénat, exprimée en milliunités par milligramme de protéines, représente le rapport de la somme des activités totales des fractions E et N sur la quantité totale de protéines dans ces deux fractions.

Tableau III-6.

Enzyme dosé	Activité spécifique (E+N) ($mu.mg^{-1}$ ou $nmol.min^{-1}.mg^{-1}$)	pH
Phosphatase acide	92,35	5,1
Aspartate aminotransférase	55,11	7,2
α-D-glucosidase	5,92	5,8
5'-nucléotidase	94,76	8,9

2.4. Distribution des enzymes dosés et récupérations.

Nous avons pu isoler par centrifugation différentielle cinq fractions enrichies en granules d'un type déterminé. Le dosage des enzymes marqueurs des différents compartiments cellulaires nous permet d'en apprécier la distribution.

Toutes les valeurs relatives aux quatre séries de dosages sont rassemblées dans le tableau III-7. Elles concernent les activités spécifiques de chaque enzyme dans chaque fraction, la distribution des enzymes, et leurs activités spécifiques relatives. Les activités spécifiques sont exprimées en milliunités par milligramme de protéines ou nanomoles par minute et par milligramme de protéines; la distribution des enzymes est exprimée en pourcentage d'activité dans la fraction par rapport à l'activité spécifique dosée dans l'homogénat; l'activité spécifique relative est le rapport entre le pourcentage de l'activité totale dans la fraction et le pourcentage de la quantité de protéines récoltées dans cette fraction.

Tableau 3-7. Distribution des enzymes et récupérations.

Enzyme dosé	Mesure effectuée	Distribution N	LG	SG	M	S	Récupération (%)
Phosphatase acide	activité spécifique (mu/mg)	14,48	14,59	26,70	25,02	4,36	
	pourcentage d'activité	17,0	17,1	31,4	29,4	5,1	92,2
	Activité Spécifique Relative	0,97	0,98	3,30	2,88	0,11	
Aspartate aminotransférase	activité spécifique (mu/mg)	9,38	29,08	12,46	7,13	2,23	
	pourcentage d'activité	15,6	48,2	20,7	11,8	3,7	109,0
	A.S.R.	0,89	2,77	2,18	1,16	0,08	
α-D-glucosidase	activité spécifique (mu/mg)	0,29	1,34	3,23	2,87	0,28	
	pourcentage d'activité	3,7	16,7	40,3	35,8	3,6	135,5
	A.S.R.	0,21	0,96	4,24	3,51	0,08	
5'-nucléotidase	activité spécifique (mu/mg)	14,81	13,71	25,13	33,81	4,46	
	pourcentage d'activité	16,1	14,9	27,3	36,8	4,9	97,0
	A.S.R.	0,91	0,86	2,87	3,61	0,11	

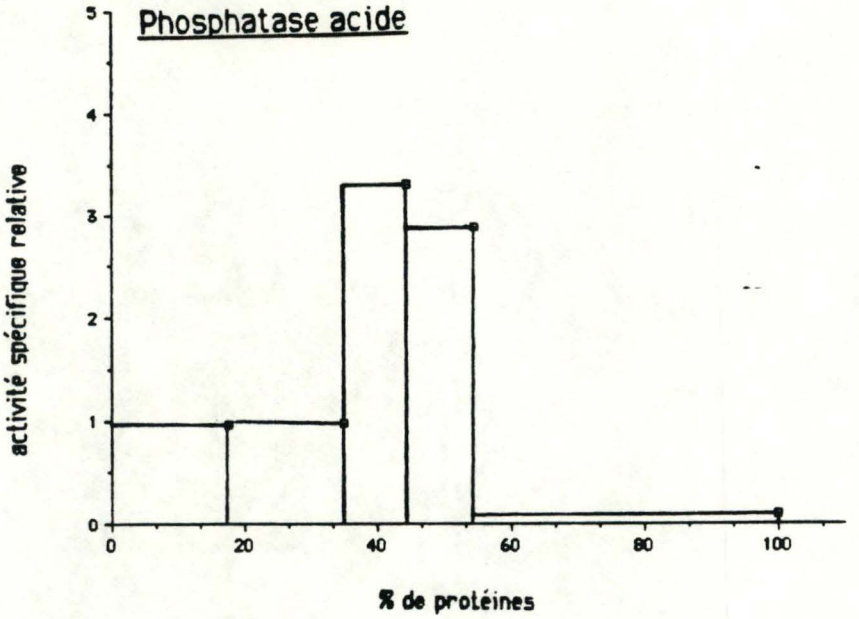
2.5. Représentation de la purification enzymatique.

La distribution enzymatique dans les différentes fractions des homogénats de *Naegleria lovaniensis* est représentée en histogrammes à la figure III.2. Dans de telles figures, l'activité spécifique relative d'un enzyme pour chaque fraction est exprimée en fonction des pourcentages de protéines de chaque fraction cumulés de gauche à droite. La vitesse de centrifugation augmente de gauche à droite le long de l'abscisse. Les valeurs des activités spécifiques relatives mettent ainsi en évidence la purification obtenue pour les enzymes dans les différentes fractions et, par conséquent, celle des organites ou des compartiments subcellulaires auxquels ils servent de référence.

La phosphatase acide apparaît ainsi localisée essentiellement dans les fractions SG et M, avec des pourcentages d'activités de 30 % environ. La fraction non sédimentable présente encore 5 % d'activité. Sa purification est importante dans la fraction SG, un peu moins dans la fraction M. Dans les fractions N et LG, sa purification est sensiblement identique à celle que l'on peut trouver dans l'homogénat.

L'aspartate aminotransférase se retrouve principalement dans la fraction à gros granules (48%), même si les fractions M et surtout SG en présentent une purification non négligeable. L'α-D-glucosidase montre une forte purification dans la fraction SG, où on peut doser plus de 40 % d'activité. Le pourcentage d'activité que l'on retrouve dans la fraction M (36%) y est très comparable. Pour ces deux enzymes, la fraction non sédimentable ne présente que 3 à 4 % d'activité.

La 5'-nucléotidase se retrouve principalement dans la fraction microsomale, quoique l'activité mesurée dans la fraction SG (27%) est non négligeable. De nouveau ici, la fraction non sédimentable présente encore 5 % d'activité.



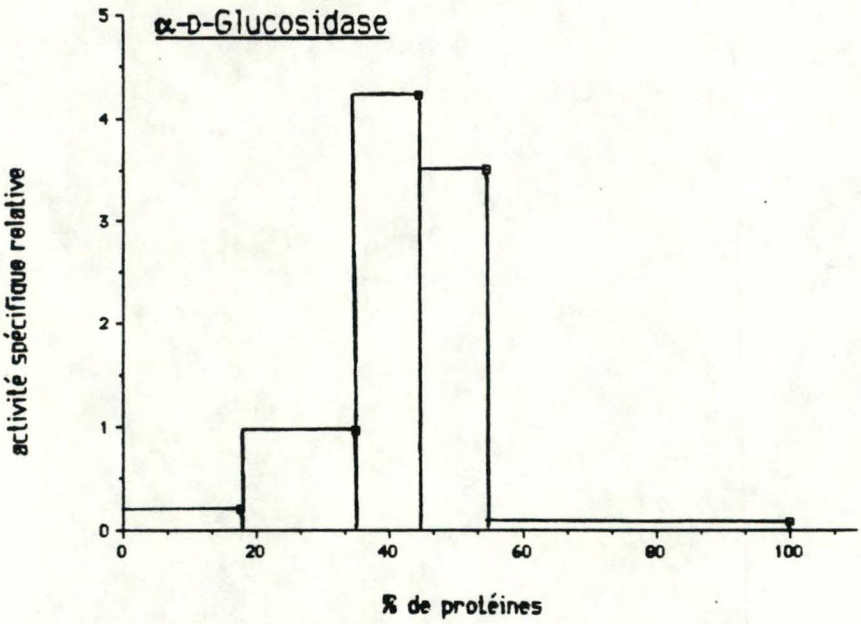
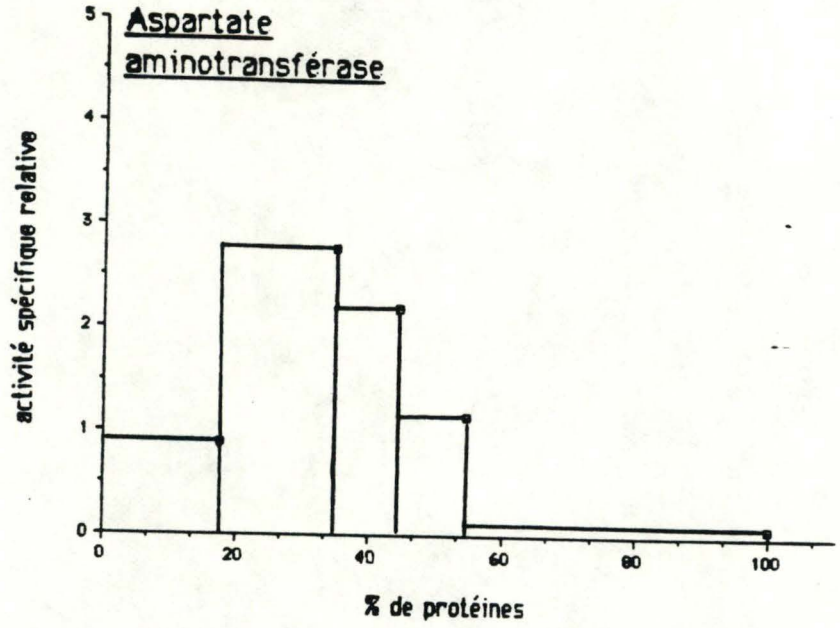


Fig. III.2.a. Fractionnement d'homogénats de *Naegleria lovaniensis* par centrifugation différentielle; distribution des enzymes. L'obtention et la centrifugation des homogénats sont décrites dans Matériel et Méthodes. Les vitesses de centrifugation augmentent de gauche à droite sur l'abscisse et séparent, dans cet ordre, les fractions nucléaire (N), à gros granules (LG), à petits granules (SG), microsomale (M) et non sédimentable (S). Les résultats représentent l'activité spécifique relative de chaque fraction, exprimée en fonction des pourcentages cumulés de protéines.

moyenne de cinq expériences



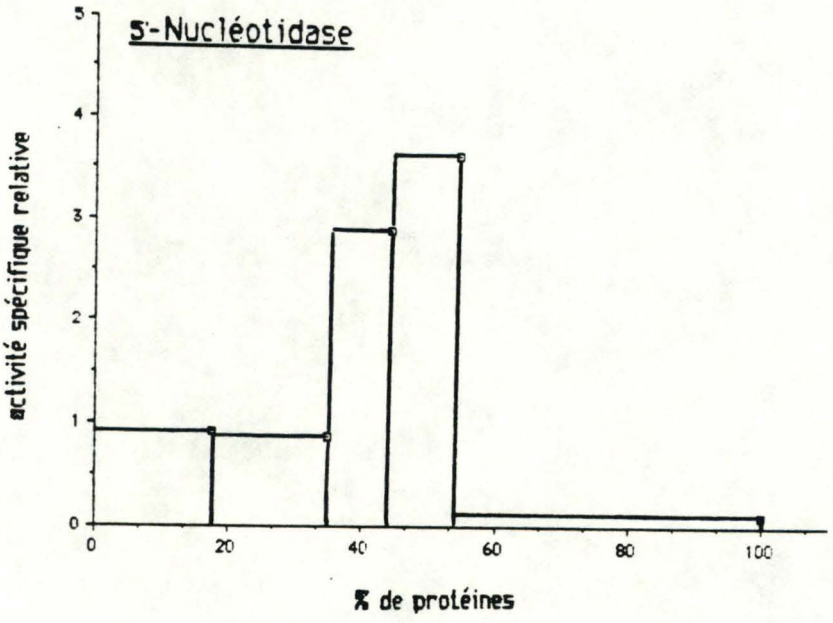


Fig. III.2.b. Fractionnement d'homogénats de *Naegleria lovaniensis* par centrifugation différentielle; distribution des enzymes. L'obtention et la centrifugation des homogénats sont décrites dans Matériel et Méthodes. Les vitesses de centrifugation augmentent de gauche à droite sur l'abscisse et séparent, dans cet ordre, les fractions nucléaire (N), à gros granules (LG), à petits granules (SG), microsomale (M) et non sédimentable (S). Les résultats représentent l'activité spécifique relative de chaque fraction, exprimée en fonction des pourcentages cumulés de protéines.
moyenne de cinq expériences

Chapitre IV. DISCUSSION.

IV.1. A propos de l'homogénéisation.

1.1. Choix de la technique utilisée.

Du fait, sans doute, de l'extrême élasticité de la surface des trophozoïtes amibiens, et de la souplesse qu'ils montrent dans l'adaptation de leurs formes en fonction des contraintes spatiales auxquelles elles sont soumises lors des tentatives d'homogénéisation par des moyens mécaniques, nous avons été confrontés, lors de la réalisation de ce travail, à la difficulté de provoquer la rupture contrôlée des cellules amibiennes.

Cette remarquable résistance à la rupture, que plusieurs auteurs ont déjà observée lors de travaux antérieurs sur *Naegleria* [WEIK & JOHN, 1979; LOWREY & McLAUGHLIN, 1985], ne peut que rendre plus délicate encore l'homogénéisation qui est dans le fractionnement cellulaire, cette étape où un compromis doit être trouvé entre la proportion de cellules rompues et la bonne conservation des organites.

Nous avons pu montrer expérimentalement que l'ultrasonication offrait de meilleures approches de ce compromis que les techniques d'homogénéisation par forces de cisaillement. Ces approches se sont révélées suffisantes dans le cadre de notre travail pour justifier son utilisation dans les tentatives ultérieures de fractionnement sans passer par l'expérimentation d'autres techniques d'homogénéisation plus sophistiquées ou tout simplement non disponibles au moment de la réalisation de ce travail.

L'analyse biochimique de l'homogénéisation nous a montré que l'utilisation d'une aiguille obstruée par des débris de verre amenait la libération en masse des organites (99,5%) mais provoquait en même temps une lyse trop importante de ceux-ci; cette technique n'a donc pas été retenue. Il est à noter que la poursuite de son utilisation nous aurait contraints à divers aménagements, ne serait-ce que pour empêcher le passage à travers l'aiguille de la poudre de verre, obstacle à la réalisation des coupes examinables en microscopie électronique.

1.2. Effets prévisibles de l'homogénéisation sur la qualité du fractionnement.

Toutefois, même si cette technique d'homogénéisation nous est apparue suffisamment bien appropriée, elle définit par elle-même un des paramètres les plus importants pour expliquer les variations observées plus loin dans la distribution des protéines et des activités enzymatiques. Une homogénéisation dont la reproductibilité de l'intensité ne peut être contrôlée de manière parfaite peut entraîner une légère variation dans les résultats auxquels elle permet d'aboutir. En effet, si l'homogénéisation est plus intense, la proportion des organites lésés ou rompus, la libération et, dans ce cas d'ultrasonication, l'altération biochimique de leur contenu enzymatique sont plus importantes. Par conséquent, les enzymes libérés vont être dosés dans la fraction soluble après centrifugation différentielle de l'homogénat, ou s'adsorber non spécifiquement sur des structures membranaires. Les organites altérés ou en débris vont sédimenter, avec une partie de leurs enzymes, dans les fractions contenant les granules à plus faible coefficient de sédimentation (r^2 et ρ_p diminuent). La distribution des protéines et des activités enzymatiques va donc être déplacée vers le surnageant final (fraction non sédimentable) et les fractions microsomale et à petits granules (shift à droite). Au contraire, dans le cas d'une homogénéisation moins intense, le déplacement va se faire au profit de la fraction nucléaire (shift à gauche), puisque les organites vont être entraînés par les cellules entières ou partiellement rompues; mais dans ce cas, les organites libérés conservent des propriétés morphologiques et biochimiques proches de leur état *in vivo* .

Afin de limiter au maximum ces variations, nous nous sommes efforcés d'effectuer l'ultrasonication dans les conditions les plus identiques possibles (volume de la matière à homogénéiser, milieu à 0°C,...).

IV.2. A propos du fractionnement et des études biochimiques.

2.1. Conditions de fractionnement.

La dilution de l'homogénat d'amibes au départ du fractionnement est également un paramètre important intervenant dans la quantité totale de protéines et leur distribution. En vue d'obtenir une bonne purification des différentes fractions, il est nécessaire de porter l'homogénat à un volume suffisant pour diluer plus fortement les contaminants (débris de cellules lysées, dépôts de caséine,...) qui seront donc en moindre proportion dans les fractions ne correspondant pas à leur coefficient de sédimentation. Cette dilution doit cependant être limitée afin de ne pas diluer excessivement des enzymes à faible activité chez *Naegleria lovaniensis* et de pouvoir en réaliser le dosage. Elle doit, de plus, être adaptée au volume du milieu de culture utilisé (7 ou 8 flacons) et à l'état de la culture au moment de la manipulation (culture moyenne ou abondante).

Une variation dans la distribution des enzymes peut être le résultat aussi des problèmes liés à la décantation des différentes fractions. La décantation d'une fraction n'est jamais effectuée dans des limites absolues et définies: à chaque prélèvement des surnageants des fractions, de faibles quantités de matériel sédimenté sont prélevées également et viennent contaminer les fractions suivantes. Ces problèmes de contamination sont exacerbés par le fait que les culots obtenus sont peu volumineux et peu compacts.

2.2. Activités spécifiques des enzymes dosés.

La 5'-nucléotidase et la phosphatase acide montrent, chez *Naegleria lovaniensis*, une activité spécifique élevée. On connaît cependant une activité de phosphatase acide plus élevée encore chez *N. fowleri* [LOWREY & McLAUGHLIN,1985]; rappelons que la détermination de cet enzyme, avec celle de la leucine aminopeptidase, a été proposée comme méthode d'identification de cette espèce [DE JONCKHEERE & DIERICKX,1982]. Ceci a été mis en relation avec la pathogénicité de l'espèce, et est sans doute le reflet d'une abondance de la population lysosomale dans ces organismes virulents. Les hydrolases acides, c'est donc le cas aussi de l'α-D-glucosidase, peuvent être impliquées

dans la digestion de bactéries Gram-négatives (la proie naturelle supposée de *Naegleria* sp. [LOWREY & McLAUGHLIN,1985]) et contribuent peut-être à l'initialisation du processus d'invasion de la muqueuse nasale chez les individus infectés.

Le fait que nous n'ayons pu doser, chez *N. lovaniensis* , une activité spécifique de phosphatase acide supérieure à 92,35 mu/mg ne peut qu'appuyer cette hypothèse du lien avec la virulence puisqu'aucune pathogénicité n'a pu être décelée chez cette espèce. Cette valeur doit être comparée à celle obtenue chez les espèces pathogènes (116,4 mu/mg chez *N. fowleri*). Il ne s'agit pas, ici, d'expliquer la virulence d'un organisme par l'importance de l'activité d'un de ses enzymes mais, bien sûr, d'apporter une caractérisation supplémentaire d'une espèce pathogène en vue d'une identification plus complète.

La nucléotidase a une activité spécifique légèrement supérieure (94,76 mu/mg); chez *N. fowleri* , une activité de 109,0 mu/mg peut être mesurée. Bien que la 5'-nucléotidase est un marqueur bien établi de la membrane de surface des cellules de mammifères, elle n'a pas toujours été considérée ainsi dans les études portant sur des protozoaires. Chez les amibes parasites *Entamoeba invadens* et *E. hystolytica* , on ne peut déceler que très faiblement une 5'-nucléotidase associée à la membrane de surface [McLAUGHLIN & ALEY,1985] tandis que chez les amibes libres Acanthamoebidae, comme chez *N. fowleri* , une telle activité a été démontrée avec plus d'assurance [WEIK & JOHN,1979]. Les flagellés de l'ordre des Kinetoplastida sembleraient plutôt posséder une inhabituelle 3'-mononucléotidase stimulée par ions Ca^{2+} sur les membranes de surface [GOTTLEB & DWYER,1981]. Ce dernier enzyme n'a pu être détecté chez *N. fowleri* .

La glucosidase a une activité très faible par rapport aux autres enzymes dosés. Nous pouvons penser que le taux d'hydrolyse de cet enzyme est beaucoup moindre que pour les enzymes intervenant de manière plus importante dans la digestion (phosphatase acide) et dans la transformation de la 5'-AMP (5'-nucléotidase). Son activité est aussi plus faible que celle de l'aspartate aminotransférase qui joue un rôle important dans la biotransformation mitochondriale d'aminoacides. Chez le flagellé *Trypanosoma brucei* , la glucosidase semble être impliquée dans le renouvellement des glycoprotéines de surface, ce qui en ferait un marqueur de la membrane de surface [STEIGER et coll., 1980].

2.3. Variation des activités enzymatiques en fonction du pH.

Indépendamment des résultats de la centrifugation différentielle et des dosages du contenu biochimique des fractions qui en découlent, nous pouvons observer que les maxima d'activité des quatre enzymes dosés dans l'homogénat chez *Naegleria lovaniensis* répartissent, par eux-mêmes, ces enzymes dans trois types d'environnement subcellulaire: un compartiment acide pour la glucosidase et la phosphatase acide, un compartiment proche de la neutralité pour l'aspartate aminotransférase, et un microenvironnement basique pour la nucléotidase. Ces données sont en accord avec la répartition de ces enzymes observée chez *N. fowleri* (cf. introduction).

Une seconde observation porte sur la petitesse d'écart entre les résultats obtenus ici et ceux obtenus pour *N. fowleri* [OLOMU et coll.,1986; LOWREY & McLAUGHLIN,1985]. Les pH d'activité maximale présentent un écart d'un dixième d'unité seulement pour la phosphatase acide et la nucléotidase, de deux dixièmes pour l'aspartate aminotransférase et de trois dixièmes pour la glucosidase. Ces écarts se maintiennent tous dans la zone d'activité élevée; ils ne justifient donc pas l'annulation des expérimentations effectuées antérieurement aux pH de références, même s'il faut garder à l'esprit leur existence lors de l'interprétation des résultats des différents dosages du fractionnement. Les dosages effectués sur l'homogénat (mesure des activités spécifiques) ont été réalisés en tenant compte des résultats obtenus ici.

2.4. Distribution des enzymes de *N.lovaniensis* après centrifugation différentielle.

Les études antérieures de la biochimie de *Naegleria* sp. se sont concentrées sur l'établissement de comparaisons entre la pathogène *N. fowleri* et les isolats non pathogènes ou à faible virulence, au regard du niveau des activités de la leucine aminopeptidase et de la phosphatase acide après homogénéisation complète des cellules [DE JONCKHEERE & DIERICKX,1982], des profils enzymatiques [PERNIN et coll.,1983] ou des propriétés des organites impliqués dans le métabolisme respiratoire [WEIK & JOHN,1979]. Le présent travail est plutôt une contribution à la caractérisation d'une seule espèce dont l'intérêt s'est justifié plus avant.

Les granules subcellulaires de *N. lovaniensis* qui présentent une activité de phosphatase acide peuvent être assimilés aux lysosomes que l'on retrouve dans les autres

organismes. La latence structurelle de cet enzyme, comme son pH d'activité maximale et son association avec les granules de faible coefficient de sédimentation laissent suggérer qu'il s'agit d'un enzyme lysosomal chez *N. lovaniensis* . Ceci vaut aussi pour une part en tout cas de la glucosidase.

Les fractionnements de LOWREY et McLAUGHLIN (1985) laissent penser que la glucosidase pourrait avoir une distribution bimodale, une importante purification étant aussi observée dans la fraction microsomale. Il apparaît ainsi qu'en plus de l'activité typiquement lysosomale de cette hydrolase, une part de son activité serait associée à la membrane de surface. Cependant, comme nous l'avons vu, l'acidité de son pH optimal la destine à occuper, dans la cellule, une localisation lysosomale. Par conséquent, nous devons revenir ici à la possibilité d'avoir produit un dommage aux lysosomes durant le processus d'homogénéisation, entraînant la contamination de la fraction microsomale par des fragments lysosomiaux. Outre ce phénomène de fragmentation, nous pouvons penser que cet enzyme montre, comme la phosphatase acide d'ailleurs, une propension à présenter un phénomène d'adsorption non spécifique de l'enzyme libéré par la technique d'homogénéisation. Par ailleurs, la purification de la glucosidase dans la fraction N est tout-à-fait négligeable, surtout si on la compare à la purification de la phosphatase acide dans cette même fraction. Cette constatation ne nous semble cependant pas suffisante pour attribuer à la glucosidase une origine subcellulaire différente de celle de la phosphatase acide. L'explication de cette différence que la figure III.2.a. nous permet d'observer peut se trouver plus simplement dans un phénomène d'adsorption ou de fragmentation réalisées plus naturellement par la glucosidase que par la phosphatase. L'étude du pH optimal ne permet pas de remarquer une bimodalité dans l'activité de la glucosidase dont le maximum se mesure dans une acidité très vraisemblablement lysosomale. Des expérimentations supplémentaires sont nécessaires pour déterminer avec certitude la véritable localisation de cette hydrolase.

La nucléotidase apparaît plus vraisemblablement associée à la membrane plasmique de l'amibe. Sa caractérisation chez *N. fowleri* [LOWREY & McLAUGHLIN, 1985] a montré qu'elle se distinguait de l'activité des phosphatases non-spécifiques par une faible valeur de Km (0,18 mM) pour son substrat 5'AMP comme par sa forte dépendance des ions magnésium. C'est pour prévenir la contribution de toute activité phosphatasique non-spécifique dans les résultats que du Na,K,tartrate est inclus dans la mixture d'incubation. Cet enzyme montre son plus important enrichissement dans la fraction microsomale. Des expérimentations supplémentaires permettraient, ici , de démontrer autrement sa localisation *in vivo* .

L'aspartate aminotransférase présente une très nette association particulaire. Contrairement aux trois autres enzymes dont les plus grands enrichissements se mesurent dans les fractions obtenues à grande vitesse de longue centrifugation, cet enzyme est le seul à présenter une activité spécifique relative élevée dans la fraction à gros granules.

Suite à l'examen des histogrammes, il nous faut revenir à la possibilité, évoquée plus haut, de l'existence d'un phénomène de "shift à droite", même si ce phénomène semble s'être exprimé modérément, ou en conjugaison avec un phénomène de fragmentation ou d'adsorption. La phosphatase acide, l'aspartate aminotransférase et, dans une moindre mesure, l'α-D-glucosidase apparaissent comme des enzymes dont la distribution est perturbée par un déplacement, vers les fractions de faibles et très faibles coefficients de sédimentation, des activités que nous avons pu doser.

Chapitre V. CONCLUSION.

Afin de contribuer à la caractérisation de *Naegleria lovaniensis* , indicateur biologique probable de l'agent de la MEAP, nous avons étudié, par la technique du fractionnement subcellulaire, quelques aspects de la biochimie de cette amibe. Nous avons tenté d'amener, par des moyens simples, une homogénéisation contrôlée de cellules amibiennes en culture dans du milieu axénique. Par la suite, nous avons mesuré la valeur des activités spécifiques de quatre enzymes, leur variation en fonction de la concentration en protons dans le milieu d'incubation, et leur distribution dans les fractions obtenues par centrifugation différentielle d'un homogénat d'amibes.

Il apparaît que l'ultrasonication des cellules effectuée dans des conditions définies, produit une homogénéisation d'une qualité appréciable dans le cadre de la finalité accordée à ce travail. Les dosages enzymatiques subséquents nous permettent d'évaluer l'importance de certaines voies métaboliques faisant intervenir les enzymes considérés (phosphatase acide, aspartate aminotransférase, α-D-glucosidase, 5'-nucléotidase). Des différences significatives se remarquent à ce niveau entre l'espèce étudiée et l'amibe pathogène *N. fowleri* . L'étude du pH optimal de ces quatre enzymes confirme pourtant la proximité de ces deux espèces puisque les différences qu'on peut y observer sont faibles en elles-mêmes, et deviennent négligeables si on les attribue à l'imperfection de la reproductibilité de dosages d'un expérimentateur à l'autre.

Le fractionnement nous permet de tracer le profil de distribution des quatre enzymes, et d'estimer leur association à des organites ou des compartimemnts intracellulaires. La phosphatase acide apparaît associée aux lysosomes, comme l'aspartate aminotransférase l'est aux mitochondries. Des études biochimiques complémentaires sont nécessaires, telles le suivi de la fluorescence des membranes de surface des cellules exposées à la fluorescamine et son éventuelle corrélation avec l'activité de la 5'-nucléotidase, ou l'étude physiologique des organites après fractionnement par centrifugation isopycnique dont les résultats pourraient préciser l'appartenance subcellulaire de l'α-D-glucosidase considérée ici, et dans l'attente d'expérimentations réfutantes, comme hydrolase lysosomale.

BIBLIOGRAPHIE.

- **ADAM K.** et **BLEWETT D.A.** (1974): Studies on the DNA of *Acanthamoeba*.
Ann. Soc. belge Méd. trop. **54**: 387-393.

-**ALEXEIEFF A.** (1912): Sur les caractères cytologiques et la systématique des amibes du groupe limax (*Naegleria* nov. gen. et *Hartmannia* nov. gen.) et des amibes parasites des vertebrates (*Protamoeba* , nov. gen.)
Bull. Soc. Zool. (France) **37**: 55-74.

-**ALONSO P.** et **ZUBIAUR E.** (1985): Phagocytic activity of three *Naegleria* strains in the presence of erythrocytes of various types.
J. Protozool. **32**: 661-664.

-**APLEY J., CLARKE S.K.P., ROONE A.P., SANDRYS S.A., SAYGI G., SILK B.** et **WARHURST D.O.** (1970): Primary amoebic meningoencephalitis in Britain.
Brit. Med. J. **1**: 596-599.

-**BROWN T.J.** et **CURSONS R.T.M.** (1987): Prophylaxis. *in* Amphizoïc amoebae; human pathology.
Piccin (Padova) chap. **10**: 217-236.

-**CARTER R.F.** (1968): Primary amoebic meningoencephalitis: clinical, pathological and epidemiological features of six fatal cases.
J. Path. Bact. **96**: 1-25.

-**CARTER R.F.** (1970): Description of a *Naegleria* sp. isolated from two cases of primary amoebic meningoencephalitis and the experimental pathological changes induced by it.
J. Path. **100**: 217-244.

-**CERVA L.** (1969): Amoebic meningoencephalitis: axenic cultures of *Naegleria* .
Science **163**: 576.

-**CERVA L., FERDINANDOVA M., NOVAK K.,PTACKOVA V., SCHROTTENBAUM M.** et **ZIMAK V.** (1969): Meningoencephalitis durch amoebida Naegleriidae. Einer weiteren Fall in der Tschechoslowakei. Isolierung des Erregers.
Munch. Med. Wschr. **111**: 2090-2094.

-**CHATTON E. et LALUNG-BONNAIRE** (1912): *Amoeba limax* (*Vahlkampfia* n. gen.) dans l'intestin humain.
Bull. Soc. Path. Exot. **5**: 135-143.

-**CULBERTSON C.G., SMITH J.W., COKEN H.K. et MINNER J.R.** (1959) Experimental infection of mice and monkeys by *Acanthamoeba* .
Am. J. Path. **35**: 185-197.

-**DAGGETT P.M. et NERAD T.A.** (1983): The biochemical identification of Vahlkampfiid amoebae.
J. Protozool. **30**: 126-128.

-**DAWSON M.W., BROWN T.J., BIDDICK C.J. et TILL D.G.** (1984): The effect of Baquacil on pathogenic free-living amoebae (PFLA).
N. Z. J. Mar. Freshwat. Res. **18**: 53-56.

-**de DUVE C.**(1954): The use of differential centrifugation in the study of tissue enzymes.
Internat. Rev. Cytol. **3**: 225.

-**de DUVE C.**(1971): Tissue fractionation.
J. Cell. Biol. **50**: 20D-55D.

-**DE JONCKHEERE J.F.** (1977): Use of an axenic medium for differentiation between pathogenic and nonpathogenic *Naegleria fowleri* isolates.
Appl. Environ. Microbiol. **33**: 751-757.

-**DE JONCKHEERE J.F.** (1978): Quantitative study of *Naegleria fowleri* in surface water .
Protistologica **14**: 475-481.

-**DE JONCKHEERE J.F.** (1979): Occurence of *Naegleria* and *Acanthamoeba* in aquaria.
Appl. Environ. Microbiol. **38**: 590-593.

-**DE JONCKHEERE J.F.** (1980): Growth carateristics, cytopathic effect in cell culture, and virulence in mice of 36 type strains belonging to 19 different *Acanthamoeba* spp.
Appl. Environ. Microbiol. **39**: 681-685.

-**DE JONCKHEERE J.F.** (1981): *Naegleria australiensis* sp. nov., another pathogenic *Naegleria* from water.
Protistologica **12**: 423-429.

-**DE JONCKHEERE J.F.** (1982): Hospital hydrotherapy pools treated with ultraviolet light: bad bacteriological quality and presence of thermophilic *Naegleria* .
J. Hyg. **88**: 205-209.

-**DE JONCKHEERE J.F.** (1982): Isoenzyme patterns of pathogenic and non-pathogenic *Naegleria* spp. using agarose isoelectric focusing.
Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur) **133a**: 319-342.

-**DE JONCKHEERE J.F.** (1985): Biochemical techniques for the diagnosis of primary amoebic meningoencephalitis.
V Coloquio interno de investigacion E.N.E.P.I. :157-205.

-**DE JONCKHEERE J.F.** (1987): Taxonomy. *in* Amphizoïc amoebae; human pathology.
Piccin (Padova) chap.**2**: 25-48.

-**DE JONCKHEERE J.F.** et **van de VOORDE H.** (1977): The distribution of *Naegleria fowleri* in man-made thermal waters.
Am. J. Trop. Med. Hyg. **28**:10-15.

-**DE JONCKHEERE J.F.** et **van de VOORDE H.** (1977): Comparative study of six strains of *Naegleria* with special reference to non-pathogenic variants of *Naegleria fowleri* .
J. Protozool. **24**: 304-309.

-**DE JONCKHEERE J.F.** et **DIERICKX P.** (1982): Determination of acid phosphatase and leucine amino peptidase activity as an identification method for pathogenic *Naegleria fowleri* .
Trans. Soc. Trop. Med. Hyg. **76**: 773-775.

-**DE JONCKHEERE J.F., PERNIN P., SCAGLIA M.** et **MICHEL R.** (1984): A comparative study of 14 strains of *Naegleria australiensis* demonstrates the existence of a highly pathogenic sub-species: *N. australiensis italica* n. ssp.
J. Protozool. **31**: 324-331.

-**DE JONCKHEERE J.F., DIVE D.G., PUSSARD M.,** et **VICKERMAN K.** (1984) *Willaertia magna* gen. nov., sp. nov.,(Vahlkampfiidae), a thermophilic amoeba found in different habitats.
Protistologica **20**: 5-13.

-**DUJARDIN F.** (1841): Histoire naturelle des zoophytes infusoires.
Libr. Encycl. de Roret (Paris).

-**FOWLER M.** et **CARTER R.F.** (1965): Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* sp.
Brit. Med. J. **2**: 740-742.

-**FULTON C.** (1970): Amoebo-flagellates as research partners: the laboratory biology of *Naegleria* and *Tetramitus* .
Meth. Cell. Physiol. **4**: 341-376.

-**GOTTLEB M.** et **DWYER D.** (1981): Phosphomonoesterase activities at the surface membrane of *Leishmania donovani* promastigotes. *in* The biochemistry of parasites.
Slutzky, Pergamon Press (Oxford): 10-28.

-**GRIFFIN J.L.** (1972): Temperature tolerance of pathogenic and non pathogenic free-living amoebas.
Science **178**: 869-870.

-**GRIFFIN J.L.** (1983): The pathogenic Amoeboflagellate *Naegleria fowleri* : environmental isolations, competitors, ecologic interactions, and the flagellate-empty habitat hypothesis.
J. Protozool. **30**: 403-409.

-**HOGUE M.** (1915): Studies in the life history of an amoeba of the limax group, *Vahlkampfia calkinsi* .
Arch. Protistenk. **35**: 154-163.

-**JADIN J.B.** (1973): Hypothèses au sujet de l'adaptation des amibes du groupe Limax à l'homme et aux animaux.
Ann. Parasit. (Paris) **48**: 199-204.

-**JADIN J.B.** (1974): Les amibes dans les eaux.
Path. Biol. **22**: 81-87.

-**JADIN J.B.** (1975): Amibes "limax", vecteurs possibles des mycobactéries et de *Mycobacterium leprae* .
Acta leprologica **59-60**: 57-66.

-**JADIN J.B.** (1980): Les aspects épidémiologiques et cliniques des amibes libres.
Conf. 19^{e} Réunion Protist. franc. (Séville)

-**JADIN J.B., HERMANNE J., ROBYN G., WILLAERT E., VAN MAERCKE Y.** et **STEVENS W.** (1971): Trois cas de méningo-encéphalite amibienne primitive observés à Anvers (Belgique).
Ann. Soc. belge Méd. trop. **51**: 255-266.

-**JADIN J.B., HERMANNE J.** et **WILLAERT E.** (1973): Présence d'amibes "limax' dans l'intestin de l'homme et des animaux.
Acad. Royale des Sc. d'Outre-Mer **3**: 520-526.

-**JADIN J.B.** et **WILLAERT E.** (1977): *Mastigamoeba* et amibes libres à partir du mucus nasal de lépreux.
Acta leprologica (nouv. sér.): 66-67.

-**JADIN J.M., ESCHBACH H.L., VERHEYEN F.** et **WILLAERT E.** (1974): Etudes comparatives des kystes de *Naegleria* et d'*Acanthamoeba* .
Ann. Soc. belge Méd. trop. **54**: 259-264.

-**JAHNES W., FULLMER H.** et **LI C.** (1957): Free-living amoebae as contaminants in monkey kidney tissue culture.
Proc. Soc. Expt. biol. Med. **96**: 484-488.

-**KILVINGTON S., MANN P.** et **WARHURST D.** (1984): Differentiation between *Naegleria fowleri* and *Naegleria lovaniensis* using isoenzyme electrophoresis of aspartate aminotransferase.
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. **78**: 562-563.

-**LESAGE A.** (1905): Culture de l'amibe de la dysenterie des pays chauds.
Ann. Inst. Pasteur **19**: 9-16.

-**LOWREY D.M.** et **McLAUGHLIN J.** (1985): Subcellular distribution of hydrolases in *Naegleria fowleri* .
J. Protozool. **32**: 616-621.

-**McLAUGHLIN J.** et **ALEY S.** (1985): The biochemistry and functional morphology of the *Entamoeba* .
J. Protozool. **32**: 221-240.

-**MANDALL B.N., GUDEX D.J., FITCHETT M.R.** (1970): Acute meningoencephalitis due to amoeba of the order Myxomycetale (slime mould).
New Zeal. Med. J. **71**: 16-23.

-**MARTINEZ A.J.** (1987): Pathogenesis of free-living amebic infections, *in* Amphizoïc amoebae; human pathology.
Piccin (Padova) chap.**6**: 149-160.

-**MUSGRAVE W.E.** et **CLEGG M.T.** (1907): The cultivation and pathogenesis of amoebae.
Philippines J. of Science: **1**.

-**NÄGLER K.** (1909): Entwicklungsgeschichliche studien über Amöbien.
Arch. Protistenk. **15**: 1-53.

-**NERAD T.A., VISVESVARA G.** et **DAGGETT P.M.** (1983): Chemically defined media for the cultivation of *Naegleria* : pathogenic and high temperature tolerant species.
J. Protozool. **30**: 383-387.

-**NOC F.** (1909): Recherches sur la dysenterie amibienne en Cochinchine.
Ann. Inst. Pasteur **23**: 177-204.

-**OLOMU N., MARTINEZ A.J., LAMARCO K.L., NERAD T.A., SAHA A.K., DAS S.** et **GLEW R.H.** (1986): Demonstration of various hydrolases and preliminary characterization of acid phosphatase in *Naegleria fowleri* .
J. Protozool. **33**: 317-321.

-**PAGE F.C.** (1976): An illustrated key to freshwater and soil amoebae.
Freshwater biol. ass. Scient. publication **34**: 1-155.

-**PERNIN P., BOUIKHSAIN I., DE JONCKHERRE J.F.** et **PETAVY A.F.** (1983) Comparative protein patterns of three thermophilic nonpathogenic *Naegleria* isolates and two *Naegleria fowleri* strains by isoelectric focusing.
Int. J. Parasitology **13**: 113-118.

-**PETERS T.J., MULLER M.** et **de DUVE C.** (1972): Lysosomes of the arterial wall; Isolation and subcellular fractionation of cells from normal rabbit aorta.
J. Exp. Med. **136**: 117-139.

-**PINTO C.** (1922): Sobre una Amoeba do genero *Vahlkampfia* encontrada no homen.
Mem. Inst. Oswaldo Cruz **15**: 122-126.

-**PUSSARD M.** et **PONS R.** (1979): Etude des pores kystiques de *Naegleria* (Vahlkampfiidae, Amoebida).
Protistologica **15**: 163-175.

-**RONDANELLI E.G.** et **SCAGLIA M.** (1987): Pathogenic amphizoic amoebae (*Naegleria fowleri* -*Acanthamoeba* spp.) morphology and cytology. *in* Amphizoic amoebae; human pathology.
Piccin (Padova) chap.**5**: 126-148.

-**RONDANELLI E.G., CAROSI G., LANZARINI P.** et **FILICE G.** (1987): Ultrastructure of *Acanthamoeba - Naegleria* free-living amoebae. *in* Amphizoïc amoebae; human pathology.
Piccin (Padova) chap.**4**: 87-125.

-**SCHARDINGER F.** (1899): Entwicklungskreis einer *Amoeba lobosa* (Gymnamoeba): *Amoeba gruberi* .
Sitzb. Kaiserl. Akad. Wiss. (Wien) **108**: 713-734.

-**SCHUSTER F.L.** (1969): Intranuclear virus-like bodies in the amoebo-flagellate *Naegleria gruberi* .
J. Protozool. **16**: 724-727.

-**SCHUSTER F.L.** et **RECHTHAND E.** (1975): *In vitro* effects of amphotericin B on growth and ultrastructure of the amoeboflagellates *Naegleria gruberi* and *Naegleria fowleri* .
Antimicrob. Agents Chemother. **8**: 591-605.

-**SEIDEL J.S., MARMATZ P., VISVESVARA G.S., COHEN A., EDWARD J.** et **TURNER J.** (1977): Successful treatment of primary amebic meningoencephalitis.
N. Engl. J. Med. **306**: 346-348.

-**SINGH B.N.** et **DAS S.R.** (1970): Studies on pathogenic and nonpathogenic small free-living amoebae and the bearing of nuclear division on the classification of the order amoebida.
Phil. Trans. Roy. Soc. Dond. **250**: 435-476.

-**STEIGER R., OPPERDOES F.** et **BONTEMPS J.** (1980): Subcellular fractionation of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms with special reference to hydrolases.
Eur. J. Biochem. **105**: 163-175.

-**STEVENS A.R.** et **STEIN S.** (1977): Analysis of pathogenic and nonpathogenic *Acanthamoeba* and *Naegleria* for lectin induced agglutination.
J. Parasitology **63**: 151-152.

-**STEVENS A.R., DE JONCKHEERE J.F.** et **WILLAERT E.** (1980): *Naegleria lovaniensis* new species: isolation and identification of six thermophilic strains of a new species found in association with *Naegleria fowleri* .
Int. J. Parasitology **10**: 51-64.

-**STEVENS A.R., SHULMAN S.T., LANSEN T.A., CICHON M.J.** et **WILLAERT E.** (1981): Primary amoebic meningoencephalitis: a report of two cases and antibiotic and immunologic studies.
J. Infect. Dis. **143**: 193-199.

-**THONG Y.H.** (1979): Delayed treatment of experimental amoebic meningoencephalitis with amphotericin B and tetracycline.
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. **73**: 336-337.

-**THONG Y.H., FERRANTE A.** et **SCHEPHERD C.** (1978): Phagocytic behaviour towards baker's yeast distinguishes pathogenic from non pathogenic *Naegleria* .
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. **72**: 207-209.

-**THONG Y.H.** et **FERRANTE A.** (1987): Experimental pharmacology. *in* Amphizoïc amoebae; human pathology.
Piccin (Padova) chap **12**: 251-272.

-**von SCHAUDINN F.** (1903): Untersuchungen über die Fortpflanzung der Rhizopoden.
Arb. Kais. Gesundheitsamte **19**: 547-576.

-**WALKER E.** (1908): The parasitic amoebae of the intestinal tract of man and other animals.
J. Med. Res. **17**: 379-459.

-**WATTIAUX R.** (1970): Centrifugation of subcellular components. *in* Fundamentals of biochemical pharmacology.
Bacq, Pergamon Press (Oxford) chap.**8**: 87-96.

-**WATTIAUX R.** (1987): Biochimie des structures subcellulaires.
Cours 2e lic. Sc. biol. (FNDP).

-**WEIK R.R.** et **JOHN D.T.** (1979): Preparation and properties of mitochondria from *Naegleria gruberi* .
J. Protozool. **26**: 311-318.

-**WELLINGS F.M., AMUSO P.T., LEWIS A.L., FARMELO M.J., MOODY D.J.S. OSIKOWICZ C.L.** (1979): Pathogenic *Naegleria* : distribution in nature.
USEPA Report 1-79-018: 1-79.

-**WELLS R.** (1911): Aereal contamination as a fallacy in the study of amoebic infections by cultural methods.
Parasitology **4**: 206.

-**WILLAERT E.** (1971): Isolement et culture in vitro des amibes du genre *Naegleria* . Ann. Soc. belge Méd. trop. **51**: 701-708.

-**WILLAERT E.** (1975): Recherches immunotaxonomiques comparées sur les amibes du groupe "Limax". Acad. R. Sc. Outre-Mer, Mém. Classe Sc. nat. Méd.

-**WILLAERT E.** (1976): Etudes immunotaxonomiques des genres *Naegleria* et *Acanthamoeba* (Protozoa: Amoebida). Acta Zoologica et Pathologica Antverpiensia **65**: 1-239.

-**WILLAERT E., DE JONCKHEERE J.F.** et **OKTEM N.** (1977): Immunoelectrophoretic study of an environmental, pathogenic *Naegleria fowleri* , isolated in Belgium. Am. J. Parasitology **63**: 389-390.