

## Projets de recherche Afreth 2005/21

### Recherche de nouvelles espèces bactériennes et virales pathogènes des environnements hydriques de l'homme par co-culture d'amibes

---

#### Investigateur principal : Pr Bernard La Scola

Unité des Rickettsies, CNRS UMR 6020, Faculté de Médecine de Marseille

Courriel : [bernard.lascola@medecine.univ-mrs.fr](mailto:bernard.lascola@medecine.univ-mrs.fr)

Établissement de rattachement : Unité des Rickettsies, CNRS UMR 6020, IFR 48, Faculté de Médecine de Marseille. Chef de service : Pr Didier Raoul

## 1. Résumé

Après la découverte de la capacité de *L pneumophila* à proliférer dans les amibes, de nombreuses autres *Legionella* ainsi que d'autres genres bactériens et des virus associés aux amibes ont été isolés de l'eau. Il a ensuite été démontré pour certains d'entre eux, qu'ils ont la capacité d'entraîner des infections chez l'homme. Ces investigations ont porté essentiellement sur les réseaux d'eaux hospitaliers dans le but d'investiguer des cas de pneumonies nosocomiales. Toutefois, les eaux thermales ainsi que d'autres environnements hydriques auprès desquels l'homme est en contact, n'ont pas été étudiés à la recherche de ces bactéries. Or, les *Legionella*, mais aussi d'autres genres bactériens comme *Balneatrix alpica*, ont été responsables d'infections parfois épidémiques en milieu thermal. Nous proposons de faire une étude exhaustive des agents associés aux amibes dans les réseaux d'eau, notamment thermaux, afin de rechercher des pathogènes humains potentiels selon la procédure que nous avons déjà utilisée dans les hôpitaux. La recherche de ces agents permettra de reconnaître des pathogènes humains autres que *L pneumophila* dont il faudra éventuellement contrôler la prolifération afin de garantir une eau sans risque microbiologique. La recherche des pathogènes se fera par co-culture avec des amibes du genre *Acanthamoeba*. L'identification des pathogènes isolés sera réalisée par séquençage du gène de l'ARN 16S ribosomique. Les souches isolées qui sont de nouvelles espèces seront déposées dans des collections internationales.

## 2. Présentation du projet

### 2.1. Justification

Après la découverte de la capacité de *L pneumophila* à proliférer dans les amibes, de nombreuses autres *Legionella* ainsi que d'autres genres bactériens et des virus associés aux amibes ont été isolés de l'eau. Il a ensuite été démontré, pour certains d'entre eux, qu'ils ont la capacité d'entraîner des infections chez l'homme. Ces investigations ont

porté essentiellement sur les réseaux d'eaux hospitaliers dans le but d'investiguer des cas de pneumonies nosocomiales. Toutefois, les eaux thermales ainsi que d'autres environnements hydriques auprès desquels l'homme est en contact n'ont pas été étudiés à la recherche de ces bactéries. Or, les *Legionella* mais aussi d'autres genres bactériens comme *Balneatrix alpica* ont été responsables d'infections parfois épidémiques en milieu thermal. Nous proposons de faire une étude exhaustive des agents associés aux amibes dans les réseaux d'eau, entre autres thermaux, afin de rechercher des pathogènes humains potentiels selon la procédure que nous avons déjà utilisé dans les hôpitaux. La recherche de ces agents permettra de reconnaître des pathogènes humains autres que *L pneumophila* dont il faudra éventuellement contrôler la prolifération afin de garantir une eau sans risque microbiologique. La recherche des pathogènes se fera par co-culture avec des amibes du genre *Acanthamoeba*. L'identification des pathogènes isolés sera réalisée par séquençage du gène de l'ARN 16S ribosomique. Les souches isolées qui sont de nouvelles espèces seront déposées dans des collections internationales.

## 2.2 Objectif principal

L'objectif général de ce projet est de faire l'inventaire des espèces pathogènes amibes et donc pathogènes humains potentiels dans l'environnement et d'y isoler de nouvelles espèces pour les caractériser. Notre objectif est de cibler toutes les sources potentielles d'exposition de l'homme et notamment les rivières et cours d'eau, les fontaines, les égouts, les boues d'épuration et industrielles, les tours aéro-réfrigérantes, les réservoirs de production d'eau municipale, les eaux thermales, l'eau de forage de nappes phréatiques ainsi que les puits à usage privé. Afin d'avoir un panel large de type de prélèvements, 500 seront réalisés.

## 2.3 Originalité du projet

L'originalité du projet réside d'une part dans la technique d'isolement et d'autre part dans la diversité des environnements investigués. La technique utilisée est une co-culture avec des amibes de l'espèce *A polyphaga*. Nous avons déjà dans notre laboratoire utilisé cette technique pour la recherche de pathogènes d'amibes uniquement dans les eaux des services hospitaliers, notamment dans les unités de soin intensif. Les seuls travaux existants menés par simple détection moléculaire dans les milieux que nous allons tester démontrent la présence de nombreuses nouvelles espèces dont des espèces inconnues de *Legionella*.

## 2.4 Méthodologie

Les prélèvements d'eau seront réalisés par un thésard recruté pour les besoins de cette étude. Ils comporteront des prélèvements de rivières et cours d'eau, les fontaines, les égouts, les boues d'épuration et industrielles, les tours aéro-réfrigérantes, les réservoirs de production d'eau municipale, l'eau de forage de nappes phréatiques ainsi que les puits à usage privé. La technique utilisée pour isoler les bactéries intracellulaires d'amibes repose sur l'utilisation de microplaques à cupules à fond plat de 1 cm<sup>2</sup> contenant une monocouche d'amibe de l'espèce *A polyphaga*. Un premier screening consistera, sur des

prélèvements forcément polymicrobiens, à cloner les différentes souches par sous-cultures successives, autant par repiquage sur des géloses BCYE que sur des cultures d'amibes fraîches.

Nous proposons d'utiliser un outil d'identification moléculaire des bactéries isolées. Un premier screening d'identification par amplification et séquençage d'un fragment du gène de l'ARN 16S ribosomique sera réalisé. L'analyse ultérieure se fera par amplification et séquençage de gènes plus polymorphiques. Les séquences obtenues seront ensuite comparées à celles actuellement disponibles dans GenBank en utilisant le programme Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Les nouvelles espèces seront caractérisées puis déposées dans des collections officielles de micro-organismes (CIP, Institut Pasteur, CCUG, Université de Göteborg). Les bactéries ainsi isolées pourront être utilisées comme antigènes dans des études séro-épidémiologiques réalisées en micro-immunofluorescence et testées contre des sérums de patients présentant des pneumonies et des contrôles représentés par des patients infectés par d'autres bactéries ou présentant d'autres syndromes cliniques ainsi que des séries de sérums provenant de donneurs de sang sains. Dans l'objectif de réalisation de ces études, notre laboratoire possède déjà une collection de plusieurs centaines de sérums.

## **2.5 Résultats attendus**

Le premier intérêt du sujet est de déterminer la diversité des espèces de pathogènes d'amibes présentes dans l'environnement humain. Le second intérêt est de permettre l'isolement et la caractérisation de nouvelles espèces de pathogènes d'amibes, notamment intracellulaires, avec pour corollaire la possibilité ultérieure à court terme de réalisation d'études séro-épidémiologiques et à plus long terme, l'intégration de ces espèces dans les panels d'antigènes pour la sérologie à visée diagnostique et éventuellement la détection de leurs antigènes dans les urines. Par rapport aux études antérieures réalisées sur l'eau des réseaux hospitaliers, il est possible de tabler sur la découverte d'une vingtaine de nouvelles espèces.

## **3. État de la question et justification de l'étude**

### **3.1. L'eau comme réservoir de pathogènes**

L'évidence de l'existence de nouveaux pathogènes humains potentiels vient essentiellement des avancées obtenues dans la connaissance des infections nosocomiales. Les réservoirs des pathogènes responsables d'infections nosocomiales peuvent être scindés en réservoirs animés et inanimés. Les réservoirs animés, qui sont les mieux connus, sont représentés par les patients (flore cutanée et digestive) et par le personnel soignant (flore cutanée essentiellement). Les réservoirs inanimés, moins bien connus, comprennent l'eau, l'air et les surfaces. Il n'existe actuellement aucune étude démontrant le rôle des surfaces comme réservoir d'infections nosocomiales et il est admis qu'un simple nettoyage à l'aide de détergent est suffisant dans un but évident de propreté [Vesley D, Environmental service, p 818-823, 1996. In Mayhall CG, Hospital epidemiology and

infection control. Williams and Wilkins, Baltimore]. Le rôle de l'air comme réservoir est aussi discuté. S'il est démontré qu'une filtration efficace réduit la quantité de microorganismes véhiculés par l'air, son rôle dans la prévention des infections nosocomiales n'est pas démontré [Vesley D, Environmental service, p 818-823, 1996. In Mayhall CG, Hospital epidemiology and infection control. Williams and Wilkins, Baltimore]. En revanche, de nombreuses études rapportent des cas d'infections nosocomiales liées à des pathogènes de l'eau. C'est notamment le cas des systèmes de respirateurs en réanimation [Reinarz JA, J Clin Invest 1965;44:831-839] ou des canaux d'endoscopes [Earnshaw JJ, J Hosp Infect 1985;6:95-97]. D'autres réservoirs hydriques ont été identifiés comme des robinets ou des poires de douches dans des cas d'infections nosocomiales à *Pseudomonas aeruginosa* ou à *Legionella pneumophila* [Wilson MG, JAMA 1961;1765:1146-1148. Bollin GE, Appl Environ Microbiol 1985;50:1128-1131. Dennis PJ, J Hyg 1984;93:349-353]. Les réservoirs d'eau, chaude notamment, peuvent aussi jouer un rôle de réservoir pour des pathogènes nosocomiaux tels que des entérobactéries ou des *Pseudomonaceae* [Griehle HG, J Infect Dis 1974;130:602-607]. Les piscines d'hydrothérapie et de rééducation en centre spécialisés permettent aussi la croissance de nombreux pathogènes nosocomiaux et ont été aussi impliqués dans la transmission, là aussi, d'entérobactéries, de *Pseudomonaceae*, de *Legionella* spp, ou de bactéries plus rarement isolées comme *Balneothrix alpica* [McGuckin MB, Arch Phys Med Reab 1981;62:283-287. Mayhall CG, J Infect Dis 1979;139:166-171. Dauga C, Res Microbiol 1993;144:35-46]. Enfin, l'exemple récent de l'émergence de *Mycobacterium xenopi* comme responsable de spondylodiscites nosocomiales [Ziza JM, Rev Med Int 1997;18:845-848] démontre que le rôle de l'eau en tant que réservoir de pathogènes nosocomiaux ne se limite pas aux seules bactéries à gram négatif. Les moyens de lutte contre ces pathogènes repose sur la désinfection de l'eau par chloration ou par choc thermique. Ces mesures, généralement efficaces à court terme, permettent rarement une éradication définitive des bactéries comme cela est bien démontré dans le cas de *Legionella pneumophila* [Centers for Disease Control and Prevention, JAMA 1997;277:1927-1928. Stout JE, JAMA 1997;278:1404-1405]. Ces échecs de désinfections sont actuellement attribués aux rôles des protozoaires libres de l'eau, amibes notamment, qui jouent un rôle de réservoir pour ces bactéries [Rowbotham TJ, J Clin Pathol 1980;33:1179-1183. Abu Kwaik Y, Appl Environ Microbiol 1998;64:3127-3133].

### 3.2. Amibes libres

Le rôle de prédateur des protozoaires pour les bactéries dans l'environnement est connu depuis de nombreuses années. Néanmoins, toutes les bactéries ne peuvent pas être utilisées comme nourriture par les protozoaires, soient qu'elles ne sont pas phagocytées, soient qu'elles survivent à la phagocytose. Cette possibilité de survie dans les protozoaires a été poussée à l'extrême par certaines bactéries qui sont devenues d'authentiques endosymbiontes incapables de se multiplier dans le milieu extérieur [Fritsche TR, J Clin Microbiol 1993;31:1122-1126. Hall J, J Parasitol 1985;71:89-95. Preer JR, Bacteriol Rev 1974;38:113-163]. Les bactéries intracellulaires de protozoaires, d'amibes

libres notamment, ont commencé à susciter l'intérêt des microbiologistes cliniques quand T Rowbotham a démontré que *Legionella pneumophila* était capable d'infecter et de se multiplier dans certaines espèces d'amibes libres [Rowbotham TJ, J Clin Pathol 1980;33:1179-1183]. Certaines bactéries capables de se multiplier ou de survivre dans des amibes sont des pathogènes connus retrouvés dans des situations cliniques définies, comme c'est le cas, par exemple, des légionelles *Burkholderia pickettii*, des mycobactéries atypiques ou des entérobactéries. À l'opposé, certaines bactéries intracellulaires d'amibes sont de découverte récente et leur pouvoir pathogène est inconnu ou supposé de façon récente. Néanmoins, ces bactéries par leur capacité à se multiplier au sein des cellules et à gagner les macrophages alvéolaires par l'intermédiaire d'inhalation d'aérosols, sont des bactéries candidates pour la responsabilité de pneumonies, nosocomiales notamment. Il convient de se souvenir que de nombreuses légionelles isolées initialement dans l'environnement ont été par la suite isolées dans des cas d'infection chez l'homme. Par ailleurs, malgré l'existence de quelques données sur la séquence nucléotidique de certaines des amibes libres présentes dans l'eau [De Jonckheere JF, Acta Protozool 1997;36:273-278. Stothard DR, J Eur Microbiol 1998;45:45-54], leur identification ne repose actuellement que sur des caractères phénotypiques essentiellement morphologiques [Page FC, Freshwater Biological association, The Ferry House, Amblside, Cumbria, 1976]. L'étude des séquences de l'ARN 18S ribosomique des souches actuellement étudiées démontrent les limites de l'identification phénotypique. Il convient d'étudier des systèmes de désinfection de l'eau permettant la lyse des amibes végétatives et enkystées afin de permettre la destruction des pathogènes qu'elles pourraient héberger. Enfin, certaines amibes ont été isolées à partir de prélèvement de muqueuses chez l'homme sans que l'on en connaisse le rôle en pathologie humaine [Rivera F, Environ Res 1984;33:428-440]. De façon intéressante, certaines des amibes isolées chez l'homme étaient porteuses de bactéries intracellulaires du genre *Parachlamydia* [Michel RB, Eur J Parasitol 1994;30:104-110].

### 3.3. Bactéries intracellulaires d'amibes

#### 3.3.1. Bactéries à pouvoir pathogène bien connu

Les bactéries du genre *Legionella* sont des bacilles à gram négatif appartenant au groupe ( des protéobactéries. Bien que près d'une quarantaine d'espèces de *Legionella* aient été identifiées à ce jour [Ratcliff RM, J Clin Microbiol 1998;36:1560-1567] dont environ la moitié a été retrouvée en situation pathogène chez l'homme, *L pneumophila* est l'agent principal de la légionellose [Stout JE, N Engl J Med 1997;337:682-687]. *L pneumophila* peut infecter et se multiplier dans les amibes du genre *Acanthamoeba*, *Echinamoeba*, *Hartmanella*, *Naegleria*, *Vahlkampfia*, ainsi que dans des protozoaires ciliés du genre *Tetrahymena* [Fields BS, Trends Microbiol 1996;286-290]. Les autres espèces de légionelles ont des spécificités d'hôte plus marquées. La faible spécificité d'hôte de *L pneumophila* pourrait rendre compte de sa plus grande fréquence dans les infections humaines. Toutefois, il est possible que la sur-représentation de *L pneumophila* soit en partie liée au fait que c'est l'espèce de *Legionella* la plus facile à isoler. Par l'utilisation

de co-cultures d'amibes, nous avons récemment isolé chez un patient qui présentait une pneumopathie une *Legionella anisa* [La Scola B, J Clin Microbiol 2006, In Press]. Cette bactérie n'a été isolée que par co-culture avec des amibes, la culture sur gélose étant restée négative. Cet isolat n'est que le 4ème isolat humain à ce jour. Cette interaction entre protozoaires et *Legionella* joue un rôle important dans leur survie dans l'environnement. Les stratégies actuelles d'éradication de *Legionella* dans les réseaux d'eau sont actuellement basées sur l'utilisation de choc thermique, de biocides ou de rayons UV. Les *Legionella* ayant poussé à l'intérieur d'amibes sont spontanément plus résistantes à des conditions d'environnement défavorables, y compris des biocides [Barker JM, Appl Environ Microbiol 1992;58:2420-2425]. Les amibes infectées peuvent relarguer des vésicules contenant des *legionella* qui les protègent des biocides [Berk SG, Appl Environ Microbiol 1998;64:279-286]. Enfin, les kystes d'amibes, dans lesquels *Legionella* peut persister, sont résistants à la dessiccation, aux biocides et à des hautes températures [De Jonckheere JF, Appl Environ Microbiol 1976;31:294-297. Rohr US, Appl Environ Microbiol 1998;64:1822-1824]. Dans le futur, il est probable que les tentatives d'éradication des *Legionella* des réseaux d'eau devra passer par une éradication des amibes. Il a été proposé que les particules infectantes pour la légionellose soient les amibes infectées [Rowbotham TJ, J Clin Pathol 1980;33:1179-1183]. En effet, elles jouent un rôle d'amplification dans l'environnement comme le prouvent les isolements simultanés d'amibes et de légionelles dans les sources d'infection [Fields BS, J Protozool 1990;37:581-583]. Après s'être multipliées dans des amibes, les *Legionella* sont plus infectantes comme cela a été démontré sur des cultures cellulaires ou dans des modèles animaux [Cirillo JD, Infect Immun 1994;62:3254-3261. Brieland JK, Infect Immun 1997;65:4892-4896]. Toutefois, il est probable que bon nombre de nouvelles espèces de *Legionella*, dont des pathogènes pour l'homme, restent à découvrir. Un nombre croissant d'espèces de *Legionella* est actuellement décrit avec maintenant 50 espèces et plus de 70 sérotypes différents [Fields BS, Clin Microbiol Rev 2002;15:506-526]. Notamment, de nouvelles espèces intracellulaires strictes ou excessivement fastidieuses ont été isolées puis décrites après isolement en co-culture d'amibes [Adeleke AA, Int J Syst Evol Microbiol 2001;51:1151-1160; La Scola B, Int J Syst Evol Microbiol 2004 :54 :699-704]. Il faut se souvenir que de nombreuses espèces de *Legionella* ont d'abord été isolées de l'environnement avant d'être décrites ultérieurement comme des pathogènes humains. C'est notamment le cas de *L. lytica*, une LLLAP, qui a été isolée ultérieurement dans l'expectoration d'un patient souffrant de légionellose. Des études séro-épidémiologiques ont démontré le rôle probable de certaines de ces espèces comme agents de pneumonies communautaires [Benson RF, 95th ASM General Meeting, Washington DC, USA, 21-25 May 1995, Abstract C-200, p. 35; Marrie TJ, Emerg Infect Dis 2001;7:1026-1029]. Par ailleurs et de façon prévisible, un très grand nombre de phylotypes inconnus de *Legionella* ont été détectées par des techniques de biologie moléculaire à partir de divers prélèvements aquatiques [Calvo-Bado LA, Appl Environ Microbiol 2002;69:533-541]. Malheureusement, les études basées sur la détection moléculaire, bien que beaucoup moins consommatrices de temps et d'argent, ne permettent

pas une étude et une caractérisation des espèces détectées. Notamment, seuls la culture et l'isolement des *Legionella* autorisent la possibilité de développer des tests diagnostiques basés sur les antigènes (sérologie et détection d'antigènes urinaires) ou d'étudier l'épidémiologie de la légionellose. Avec le développement des techniques de diagnostic de la légionellose sans culture presque tous basés sur la détection de *L pneumophila* séro-groupe 1, on note depuis quelques années un appauvrissement de la connaissance sur les épidémies ou les cas liés à d'autres espèces ou sérotypes [Benin AL, Clin Infect Dis 2002;1039-104]. Or le développement de tests basés sur la détection de plusieurs antigènes urinaires représente une voie importante à développer dans le futur [Murdoch DR, Clin Infect Dis 2003;36:64-69].

*Burkholderia pickettii* est un bacille à gram négatif appartenant au groupe ( des protéobactéries. C'est un pathogène opportuniste usuellement isolé de l'environnement ou de prélèvements cliniques. Au cours d'une recherche systématique d'amibes libres dans une unité de physiothérapie, une souche de *B pickettii* a été isolée au sein d'amibes du genre *Acanthamoeba* [Michel R, Zbl Bakt 1997;285:541-557]. La bactérie phagocytée par les amibes se multiplie rapidement à l'intérieur de plusieurs vacuoles distinctes et entraîne la lyse des amibes au bout d'une semaine. Comme pour *L pneumophila*, la multiplication des bactéries dans les amibes et la lyse de ces dernières est température dépendante. En effet, à 10°C, les amibes phagocytent et digèrent *B pickettii*, la lyse des amibes ne survenant qu'à des températures entre 20°C et 30°C. *Burkholderia cepacia* est un bacille à gram négatif appartenant au groupe ( des protéobactéries. C'est un pathogène opportuniste usuellement isolé de l'environnement ou de prélèvements cliniques, essentiellement dans les produits d'expectoration de patients mucoviscidoseux. Il a été démontré que cette bactérie était capable de survivre et de se multiplier à l'intérieur d'amibes de l'espèce *Acanthamoeba polyphaga* [Landers P, Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2000;19:121-123]. Récemment, des auteurs ont démontré que *Burkholderia pseudomallei*, l'agent de la melioidose, qui est une maladie responsable d'infections sévères aiguës et chroniques sévissant en Australie et dans le Sud-Est asiatique, était, elle aussi, capable de survivre à l'intérieur d'amibes du genre *Acanthamoeba* [Ingliš TJJ, Infect Immun 2000;68 :1681-1686].

*Aeromonas salmonicida* est un bacille à Gram négatif appartenant au groupe des protéobactéries. C'est un pathogène des poissons. Il est capable de se multiplier dans un protozoaire de l'espèce *Tetrahymena pyriformis* au sein de vacuoles, cette localisation le protégeant de la chloration [King CH, FEMS Microbiol Let 1988;51:95-100]. Le rôle des protozoaires dans la survie et la multiplication des espèces d'*Aeromonas* pathogènes pour l'homme n'a à ce jour pas été étudiée ; on sait néanmoins actuellement que l'eau est le réservoir des infections nosocomiales dues à ces bactéries.

Par co-culture d'entérobactéries avec des protozoaires des espèces *Tetrahymena pyriformis* et *Acanthamoeba castellanii*, il a été démontré que la phagocytose par ces protozoaires protégeait de taux de chlore 50 fois supérieurs aux doses léthales pour les bactéries [King CH, Appl Environ Microbiol 1988;54:3023-3033]. Cette protection a été démontrée pour les espèces : *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter*

*cloacae*, *Pantheoia agglomerans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Yersinia enterocolitica*. Ce rôle de protection dans les réseaux d'eaux, hospitaliers notamment, est actuellement inconnu.

Les bactéries de l'espèce *Mycobacterium avium* sont des pathogènes opportunistes vivant naturellement dans l'environnement. Il a été démontré que *M avium* était capable de bénéficier d'une co-culture avec les amibes de l'espèce *Acanthamoeba polyphaga* [Steinert MK, Appl Environ Microbiol 1998;64:2256-2261]. Bien que des bactéries viables soient détectées dans les vacuoles de phagocytose des amibes, il semble que la croissance de cette mycobactérie se fasse aux dépens de métabolites sécrétés par les amibes comme le démontrent les études de croissance en chambres paraboliques. Quand les amibes s'enkystent, *M avium* survit à l'intérieur des kystes, intégrée au sein de la paroi externe. Les amibes peuvent donc servir de réservoir à ces bactéries quand les conditions dans l'environnement sont défavorables. Il a par ailleurs été démontré qu'une co-culture préalable de *M avium* avec des amibes de l'espèce *Acanthamoeba castellanii* activait leur virulence pour des cultures de macrophages humains et pour des souris par comparaison à des cultures sur milieu axénique [Cirillo JD, Infect Immun 1997;65:3759-3767].

### 3.3.2. Bactéries à pouvoir pathogène inconnu ou de découverte récente

Deux souches d'amibes libres du genre *Acanthamoeba* ont été isolées de muqueuses nasales de sujets sains en 1994 [Michel RB, Eur J Parasitol 1994;30:104-110]. Ces souches avaient la particularité de porter des microorganismes incapables de se multiplier sur milieu axénique ou dans d'autres protozoaires que ceux du genre *Acanthamoeba*. L'amplification et le séquençage du gène de l'ARN 16S ribosomique de ces souches a permis de démontrer, en particulier par notre équipe, qu'elles sont phylogénétiquement proches des bactéries du genre *Chlamydia* [Amann RN, Appl Environ Microbiol 1997;63:115-121. Birtles RJ, Lancet 1997;349:925-926] et d'un contaminant de cultures cellulaires provisoirement dénommée bactérie « Z » [Kahane SE, FEMS Microbiol Let 1995;126:203-208]. En condition de culture favorable, la multiplication des amibes est suffisante pour obtenir un ratio hôte-parasite stable. En revanche, dès que le taux de croissance des amibes diminue, en modifiant le milieu de culture par exemple, la multiplication des bactéries entraîne la lyse des amibes. Le pouvoir pathogène de cette bactérie est actuellement encore imparfaitement connu, bien que des études sérologiques préliminaires semblent démontrer son rôle dans des cas de pneumonies communautaires et nosocomiales [Benson RF, 95th ASM General Meeting, Washington DC, USA, 21-25 May 1995, Abstract C-200, p. 35 ; Greub G, Ann New York Acad Sci 2003;990:311-319].

*Odyssella thessalonicense* est un bacille à Gram négatif, décrite récemment par notre équipe, appartenant au groupe ( des protéobactéries [Birtles TJ, Int J Syst Bacteriol 2000;50:63-72]. Elle a été isolée en Grèce à partir de prélèvements provenant de fluides de climatiseurs. C'est une bactérie intracellulaire stricte qui peut être cultivée in vitro sur des amibes libres du genre *Acanthamoeba*. Comme les légionelles, à des températures



proches de 37°C, elle détruit rapidement sa cellule hôte alors qu'à 30°C elle se montre beaucoup moins virulente.

Les bactéries du genre *Afipia* et *Bosea* sont des bacilles à Gram négatif très proches phylogénétiquement appartenant au groupe ( des protéobactéries. Le genre *Afipia* comporte actuellement les espèces *A felis*, *A clevelandensis*, *A broomae*, *A massiliensis*, *A birgiae* ainsi que 3 génoespèces actuellement non nommées [Brenner DJ, J Clin Microbiol 1991;29:2450-2460 ; La Scola B, Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2002, 52:1773-1782]. Le genre *Bosea* comprend lui les espèces *B thiooxidans*, *B minatitlanensis*, *B eneae*, *B vestrisii* et *B massiliensis* [La Scola B, Int J Syst Evol Microbiol 2003;53:15-20]. *A felis* a été décrite à l'origine comme étant l'agent de la maladie des griffes du chat [English LT, JAMA 1988;259:1347-1352]. Des études ultérieures ont permis par la suite de démontrer que *Bartonella henselae* était l'agent le plus souvent, sinon le seul, responsable de cette affection [Jerris RC, Ann Rev Microbiol 1996;707-725]. L'étude en co-culture d'une souche d'*A felis* avec des amibes de l'espèce *Acanthamoeba polyphaga* nous ont permis de démontrer que cette bactérie est capable de se multiplier à l'intérieur des amibes [La Scola B, Lancet 1999;353:1330]. Par ailleurs, l'enkystement des amibes infectées permet de protéger ces bactéries de l'effet de la chloration. Aux vues de ces résultats, des cultures d'amibes libres ont été utilisées pour tenter l'isolement de ces bactéries à partir de prélèvements d'eaux. Ces cultures ont permis d'isoler diverses espèces d'*Afipia* actuellement non décrites dans la littérature, notamment *A felis* ainsi que ne nombreuses autres espèces de protéobactéries non connues à ce jour [La Scola, FEMS Microbiol Ecol 2000;34:129-137]. Cette bactérie étant une bactérie de l'environnement, il est probable que l'isolement dans des cas de maladies des griffes du chat résulte d'une contamination des cultures. La capacité d'*A felis* à survivre dans l'eau et à se multiplier dans les cellules [Birkness KA, Infect Immun 1992;60:2281-2287], comme *L pneumophila*, en font un candidat comme responsable de pneumopathies nosocomiales. Parmi les *Afipia* isolées à ce jour, une souche d'*Afipia broomae* ainsi qu'*Afipia* génoespèces 1 et *Afipia* génoespèces 2 ont été isolées de prélèvements bronchiques. Par ailleurs, la seule souche d'*Afipia clevelandensis* isolée à ce jour l'a été d'un prélèvement d'une ostéite nosocomiale. Dans des études séro-épidémiologiques récentes, nous avons pu démontrer que les patients ayant des anticorps contre ce pathogène étaient souvent des infections nosocomiales, notamment des pneumonies [Drancourt M, Clin Diag Lab Immunol 1997;4:748-752 ; La Scola B, Infect Control Hosp Epidemiol. 2002;23:462-465]. Enfin, une étude a démontré l'implication de *Bosea massiliensis* comme agent de pneumonies sévères en réanimation [La Scola B, Emerg Infect Dis 2003;9:815-821].

### 3.4. Les environnements à risque

À ce jour, la plupart des investigations menées à la recherche de *Legionella* dans l'environnement ont été ciblées sur les systèmes de tours aéro-réfrigérantes et sur les systèmes de distribution d'eau potable en terminal. À l'opposé, très peu de travaux ont porté sur l'étude d'autres sources d'eau comme les puits, les systèmes de forage, les cours d'eau ou les boues industrielles ou de stations d'épuration au contact de l'homme. Pourtant,

ces milieux sont à risque potentiel comme le démontre le premier rapport très récent en France d'une épidémie de légionellose associée à la contamination d'eau de forage [Charron M, Bulletin Epidemiologique Hebdomadaire 2005;14:53-54]. Ce travail démontre que les sources d'eau au contact de l'homme sont susceptibles de contenir des légionelles et qu'il y a un besoin urgent d'en faire l'inventaire afin de prévenir les risques de légionellose communautaire dont on ne connaît la plupart du temps pas l'origine.

De même, tous les travaux recherchant l'implication des nouveaux agents pathogènes d'amibes n'ont porté que sur les eaux de réseaux hospitaliers [La Scola B, FEMS Microbiol Ecol 2000;34:129-137; La Scola B, Infect Control Hosp Epidemiol 2002;23:462-465 ; La Scola B, Emerg Infect Dis 2003;9:815-821].

#### **4. Objectifs de l'étude**

*L'objectif général* de ce projet est de faire l'inventaire des espèces pathogènes amibes et donc pathogènes humains potentiels dans l'environnement et d'y isoler de nouvelles espèces pour les caractériser. Il convient de remarquer que si l'on connaît bien actuellement les contaminations liées à la prise de douche ou à la génération d'aérosols chez les patients hospitalisés ou les cas liés à des systèmes de climatisation qu'ils soient industriels, hospitaliers, dans des camping ou privés, la description d'épidémie de type *Legionella* d'origine vraisemblablement industrielle ou de la survenue de cas sporadiques inexplicables, a posé la question d'autres sources de contamination comme les boues industrielles. Notre objectif est de cibler toutes les sources potentielles d'exposition de l'homme et notamment les rivières et cours d'eau, les fontaines, les égouts, les boues d'épuration et industrielles, les tours aéro-réfrigérantes, les réservoirs de production d'eau municipale, les eaux thermales, l'eau de forage de nappes phréatiques ainsi que les puits à usage privé. Afin d'avoir un panel large de type de prélèvements, 500 seront réalisés. La recherche dans le cadre du thermalisme inclura 6 eaux utilisées pour inhalation, 4 eaux utilisées pour douches et 10 boues naturelles. La recherche des pathogènes d'amibes détectés dans l'environnement sera aussi effectuée dans les selles des travailleurs au contact des ces eaux (essentiellement égoutiers, ouvriers des stations d'épuration ou de traitement de boues industrielles) afin de rechercher leur éventuelle contamination.

*Les objectifs spécifiques* du projet sont :

- l'isolement de bactéries pathogènes d'amibes à partir de prélèvements d'environnement par co-culture avec des amibes,
- l'identification moléculaire des espèces isolées,
- relation représentation des espèces avec le type d'environnement,
- caractérisation et description officielle des nouvelles espèces isolées,
- étude de leur pouvoir pathogène potentiel par étude séro-épidémiologique sur des collections de sérums de patients présentant des pneumopathies communautaires.

L'originalité du projet réside d'une part dans la technique d'isolement et d'autre part dans la diversité des environnements investigués. La technique utilisée est une co-

culture avec des amibes de l'espèce *A polyphaga*. À l'exception des travaux réalisés par T Rowbotham qui ont permis, entre autres, l'isolement de l'ensemble des espèces de *Legionella*-like amoebal pathogens (LLAPs), de *Parachlamydia sp* et *Acanthamoeba polyphaga mimivirus*, il n'a jamais été réalisé d'étude exhaustive de l'environnement humain par cette technique de culture. Par ailleurs, les travaux antérieurs réalisés par T. Rowbotham n'ont en pratique porté que sur des tours aérorefrigérantes. Nous avons dans notre laboratoire utilisé cette technique pour la recherche de pathogènes d'amibes uniquement dans les eaux des services hospitaliers, notamment dans les unités de soins intensifs. Ainsi, aucune recherche systématique utilisant cette méthodologie n'a été menée dans l'environnement hydrique de l'homme. Les seuls travaux existants menés par simple détection moléculaire dans le même type de milieu démontrent la présence de nombreuses nouvelles espèces dont des espèces inconnues de *Legionella*.

## 5. Intérêt du sujet et résultats attendus

Le premier intérêt du sujet est de déterminer la diversité des espèces de pathogènes d'amibes présentes dans l'environnement humain. Le second intérêt est de permettre l'isolement et la caractérisation de nouvelles espèces de pathogènes d'amibes, notamment intracellulaires, avec pour corollaire la possibilité ultérieure à court terme de réalisation d'études séro-épidémiologiques et à plus long terme, l'intégration de ces espèces dans les panels d'antigènes pour la sérologie à visée diagnostique et éventuellement la détection de leurs antigènes dans les urines. La connaissance de toutes les espèces environnementales au contact de l'homme est un préalable nécessaire à la prise de mesures de précaution contre le risque sanitaire lié aux bactéries associées aux amibes non encore caractérisées. Cet aspect du travail doit permettre de mettre en évidence les environnements à risque et notamment d'identifier s'il existe des environnements à risque qui sont méconnus afin d'aider les autorités sanitaires à choisir les environnements hydriques qu'il convient de surveiller en complément de ceux qui le sont déjà actuellement. En conclusion, à la fin de ce travail, on aura une connaissance de l'épidémiologie des espèces de bactéries pathogènes d'amibes et pathogènes pour l'homme présentes dans l'environnement de l'homme et ce par une technique de culture beaucoup plus sensible que les techniques de cultures axéniques utilisées jusqu'à ce jour. Un certain nombre de nouvelles espèces ou nouveaux sérotypes d'espèces connues devrait être découvert à cette occasion.

## 6. Méthodologie et déroulement de l'étude

### 6.1. Prélèvements d'environnement.

Les prélèvements d'eau seront réalisés par un thésard recruté pour les besoins de cette étude. Ils comporteront des prélèvements de rivières et cours d'eau, les fontaines, les égouts, les boues d'épuration et industrielles, les tours aéro-refrigérantes, les réservoirs de production d'eau municipale, l'eau de forage de nappes phréatiques ainsi que les puits à usage privé. Les prélèvements seront réalisés sur des flacons de 1 ml pour l'eau. Les

liquides seront ensuite filtrés sur membrane 0.2 µm puis les filtres seront repris dans 1 ml de PAS. Pour les prélèvements semi-solides de type boues ou selles de travailleurs exposés, les prélèvements seront réalisés dans des tubes plastiques de 50 ml. Ces boues seront ensuite reprises dans 500 ml d'eau, décantées par centrifugation et le surnageant sera ensuite traité comme les prélèvements liquides. Les robinets des fontaines seront écouvillonnés et les écouvillons seront déchargés dans 1 ml de tampon PAS (Page's Amoebal Saline).

## **6.2. Isolement des pathogènes d'amibes.**

La technique utilisée pour isoler les bactéries intracellulaires d'amibes s'inspire des travaux de Rowbotham que nous avons modifiée en une technique en microplaque. L'isolement repose sur l'utilisation de microplaques à cupules à fond plat de 1 cm<sup>2</sup> contenant une monocouche d'amibe de l'espèce *A polyphaga* additionné de 1 ml de tampon PAS. Les cupules sont ensuiteensemencées avec le prélèvement puis centrifugées afin de faciliter la pénétration des bactéries dans les amibes. Les ensemencements sont réalisés en parallèle dans du tampon additionné d'antibiotiques (Colimycine-Vancomycine) dans le but de limiter la croissance des bactéries contaminantes incapables de se multiplier à l'intérieur des amibes. Les cupules sont ensuite observées tous les trois jours jusqu'à J12 afin de rechercher un effet cytopathogène. À J6 un repiquage à l'aveugle est réalisé sur des amibes saines. Sur toutes les cupules, 200 µl sont prélevés à J6 et J12 pour réaliser des cyto-centrifugations qui seront colorées par coloration de Gimenez. Les cupules où un effet cytopathogène est observé et/ou des bactéries intracellulaires sont détectées. Un premier screening consistera, sur des prélèvements forcément polymicrobiens, à cloner les différentes souches par sous-cultures successives, autant par repiquage sur des géloses BCYE que sur des cultures d'amibes fraîches. La sous-culture est en effet indispensable afin d'établir les souches de pathogènes d'amibes, notamment les virus et le LLAP à croissance intra-amibienne stricte. À la fin de la procédure de ré-isolement, leur capacité à se multiplier dans les amibes sera vérifiée. Les souches pures ainsi obtenues seront multipliées afin d'obtenir assez de matériel pour les identifier par technique moléculaire.

## **6.3. Identification moléculaire des espèces isolées par amplification et séquençage.**

Nous proposons d'utiliser un outil d'identification moléculaire des bactéries isolées. Un premier screening d'identification par amplification et séquençage d'un fragment du gène de l'ARN 16S ribosomique sera réalisé. Les souches identifiées comme appartenant au genre *Legionella* seront ensuite identifiées par amplification et séquençage du gène *mip*, celles du groupe Borea-Afipia par amplification et séquençage du gène *rpoB*. L'extraction de l'ADN sera réalisée par simple lyse thermique par ébullition pendant 15 minutes à partir des souches cultivées en gélose ou sur amibes. Les séquences seront ensuite comparées à celles actuellement disponibles dans GenBank en utilisant le programme Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

#### **6.4. Caractérisation des nouvelles espèces.**

La caractérisation des nouvelles espèces reprendra la méthodologie déjà utilisée pour la description des LLAP [Adeleke AA, 2001 ; La Scola B, 2004] ou d'autres pathogènes intracellulaires d'amibes [La Scola B, Int J Syst Evol Microbiol 2002; 52:1773-1782 ; La Scola B, Int J Syst Evol Microbiol 2003;53:15-20]. Cette analyse comprend la détermination des séquences des gènes 16S rRNA, d'autres gènes plus polymorphiques à définir en fonction des espèces, d'une analyse des caractères culturels, notamment de la température de croissance ainsi que les analyses immunologiques à l'aide de collections d'antisérums spécifiques et d'étude du contenu protéique. Les nouvelles espèces seront déposées dans des collections officielles de micro-organismes (CIP, Institut Pasteur, CCUG, Université de Göteborg).

#### **6.5. Étude du pouvoir pathogène chez l'homme**

Les bactéries isolées seront utilisées comme antigènes dans des études séro-épidémiologiques réalisées en micro-immunofluorescence et testées. Ces antigènes seront testés contre des sérums de patients présentant des pneumonies et des contrôles représentés par des patients infectés par d'autres bactéries ou présentant d'autres syndromes cliniques ainsi que des séries de sérums provenant de donneurs de sang sains. Dans l'objectif de réalisation de ces études, notre laboratoire possède déjà une collection de plusieurs centaines de sérums.

#### **6.6 Calendrier prévisionnel**

### **7. Compétences scientifiques de l'équipe**

L'équipe impliquée dans ce projet a une grande expérience dans les divers domaines nécessaires à la mise en œuvre du projet. L'équipe est une des rares équipes européennes à avoir développé l'isolement de micro-organismes par co-culture avec des amibes, aussi bien de prélèvements d'environnement que de prélèvements cliniques. L'équipe a aussi une grande expérience de l'identification moléculaire des bactéries par amplification et séquençage de gènes. Pour finir, l'équipe a caractérisé et décrit officiellement par le passé de nombreuses espèces bactériennes.

### **8. Justification des moyens demandés**

- 1) Un thésard sera en charge de l'ensemble du travail technique de ce projet. Le coût en salaire de ce thésard est de 31 k€ par an, soit 93 k€ pour 3 ans.
- 2) Le matériel pour l'isolement des bactéries comprend les petits matériels plastiques, les filtres, les fabrications des milieux de culture pour les bactéries et les amibes demandés sont évalués à 3 k€. Le laboratoire mettra à disposition un poste de culture microbiologique, 1 centrifugeuse à plaques, 2 étuves (1 pour les bactéries, 1 pour les co-cultures), les matériels pour la coloration et un microscope.
- 3) Les réactifs pour la réalisation d'identifications moléculaires et de caractérisation des bactéries demandés sont évalués à 4.5 k€. Le laboratoire mettra à disposition un poste de

biologie moléculaire complet comprenant un thermocycleur, une centrifugeuse pour purification des produits d'amplification, un séquenceur automatique et les logiciels d'analyse.

4) Les déplacements nécessaires à l'échantillonnage des prélèvements d'environnement demandés sont évalués à 3 k€ et le micro-ordinateur servant au recueil et à l'analyse des données à 3 k€.

5) Les frais de gestion prélevés par l'Université/Protisvalor sont de 12% du financement demandé, soit 12.78 k€

Au total, le budget prévisionnel de l'étude de 3 ans s'élève à 119.28 K€ dont 12.32 (10,3%) sont demandés à l'Afreth.

**Tableau I - Calendrier des interventions**

N°	Tâche	Année 1	Année 2	Année 3
<b>Prélèvements</b>				
1	Prélèvements proprement dits	○○○○	○○○	
2	Traitement des prélèvements	○○○○	○○○○	
<b>Isolement</b>				
1	Inoculation des microplaques	○○○○	○○○	
2	Sous-cultures	○○○○	○○○○	
3	Clonage et multiplication	○○	○○○○	
<b>Identification moléculaire</b>				
1	Screening par séquençage partiel du gène de l'ARN 16S ribosomique	○○	○○○○	○○
	Identification par séquençage de gènes variables (mip, rpoB partiel,...)	○○	○○○○	○○
<b>Caractérisation</b>				
	Séquençage 16S rRNA et rpoB complet			○○○○
	Caractères cultureux			○○○○
	Tests immunologiques			○○○○
	Dépôts des souches dans les collections			○○○○