

anses

agence nationale de sécurité sanitaire  
alimentation, environnement, travail



# Évaluation des risques liés à la présence d'amibes *Naegleria fowleri* dans les eaux de baignade

Avis de l'Anses  
Rapport d'expertise collective

Novembre 2013

Édition scientifique





**anses**

agence nationale de sécurité sanitaire  
alimentation, environnement, travail



# Évaluation des risques liés à la présence d'amibes *Naegleria fowleri* dans les eaux de baignade

Avis de l'Anses

Rapport d'expertise collective

Novembre 2013

Édition scientifique



Le directeur général

Maisons-Alfort, le 28 novembre 2013

## **AVIS**

### **de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail**

relatif à  
**« Analyse des risques sanitaires liés à la présence d'amibes *Naegleria fowleri* dans  
les eaux de baignade »**

---

*L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.*

*L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.*

*Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.*

*Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L.1313-1 du code de la santé publique).*

*Ses avis sont rendus publics.*

---

L'Anses a été saisie le 20 juillet 2011 par la Direction générale de la santé de la réalisation de l'expertise suivante : Analyse des risques sanitaires liés à la présence d'amibes *Naegleria fowleri* dans les eaux de baignade.

#### **1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE**

Les infections dues aux amibes libres de l'espèce *Naegleria fowleri* (*N. fowleri*) sont susceptibles de conduire au développement d'une méningo-encéphalite amibienne primitive (MEAP) dont l'évolution est fulminante et le plus souvent mortelle. Ces amibes sont détectées dans les eaux douces dont la température dépasse 25°C. La contamination se fait par exposition de la muqueuse nasale à de l'eau contenant des *Naegleria fowleri* par inondation des fosses nasales, généralement à l'occasion d'une baignade.

En avril 2008, un garçon de 9 ans est décédé en Guadeloupe des suites d'une méningite foudroyante. Les recherches microbiologiques sur le liquide céphalo-rachidien ont mis en évidence la présence de *N. fowleri* dans le prélèvement et confirmé le diagnostic de MEAP. L'enfant avait, dans les jours qui ont précédé le début des signes de la maladie, pratiqué une activité de baignade avec plongeurs dans un bassin d'eau douce renouvelée en continu et alimenté par une résurgence géothermale de température proche de 31°C. Des prélèvements réalisés dans ce bassin depuis 2010 ont permis de détecter régulièrement de faibles concentrations (2 à 22 amibes /L) de l'espèce pathogène *Naegleria fowleri*.

Les eaux de refroidissement industrielles sont susceptibles d'être également à l'origine d'une multiplication de ce type d'amibes libres. C'est pourquoi, en France, suite à la constatation de la présence de *Naegleria fowleri* dans certains circuits de refroidissement de centrales nucléaires de production d'électricité (CNPE), le Conseil supérieur d'hygiène publique de France (CSHPF) avait fixé le 4 mai 2004, un seuil de 100 *N. fowleri* par litre à respecter en rivière en aval des centrales.

Dans ce contexte, et après échange avec la Direction générale de la santé, l'Agence a été saisie afin de :

- déterminer les facteurs susceptibles de favoriser le développement de *Naegleria fowleri* dans les eaux de sites de baignade ;
- analyser l'état de l'art en termes de prélèvements ;
- indiquer si les conclusions issues des travaux d'expertise peuvent être applicables aux baignades artificielles.

Au cours de l'expertise, les experts n'ont pas examiné la pertinence sanitaire de la valeur de 100 *N.f./L* recommandée par le CSHPF à respecter en rivière en aval des centrales.

## **2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE**

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ».

L'expertise relève du domaine de compétences du Comité d'experts spécialisé (CES) « Eaux ». L'Agence a confié l'expertise au groupe de travail « amibes et baignades ». Les travaux ont été présentés aux membres du CES tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques. Ils ont été adoptés par le CES « Eaux » réuni le 2 octobre 2013.

## **3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU CES « EAUX »**

De nombreuses études relatives à la présence de *N. fowleri* dans les eaux de baignades, ont été menées depuis 1960. Ces études, principalement qualitatives ont été entreprises dans les différentes parties du globe où les cas de MEAP ont été signalés. *N. fowleri* a été détectée dans les eaux douces, principalement pendant la saison chaude dans l'ensemble des types de baignade :

- baignade aménagée en eau libre ;
- baignade aménagée en eau libre dont l'eau peut être réchauffée par des eaux de refroidissement industrielles ;
- piscines privées ou publiques ;
- bains thérapeutiques et bains à remous ;
- sites naturels de baignade alimentés par des eaux d'origine géothermale.

Quelques études quantitatives ont permis d'estimer la concentration de *N. fowleri* à des valeurs variant entre 2 et 200 amibes par litre, selon les cas et les protocoles de comptage.

Bien que nécessaire, la température élevée de l'eau n'apparaît pas comme le seul facteur influant sur la prolifération de *N. fowleri* dans les eaux :

- des milieux riches en matières organiques comme les marais, les eaux stagnantes ou polluées, les systèmes de refroidissement de centrales de production d'électricité, les eaux de piscines mal traitées peuvent contribuer à la présence de cette amibe ;
- de faibles populations de prédateurs ou de compétiteurs peuvent également favoriser sa multiplication.

Au vu des études épidémiologiques répertoriées dans le rapport d'expertise, il apparaît que les individus de sexe masculin enfant ou jeune adulte représentent la population la plus exposée au risque d'infection à *N. fowleri*. Cette tranche de population pratiquerait plus fréquemment des activités aquatiques entraînant l'immersion de la tête favorisant la pénétration d'eau dans les cavités nasales. Une fois dans les voies nasales du baigneur, *N. fowleri* traverse la muqueuse puis se déplace le long du nerf olfactif jusqu'au cerveau entraînant des lésions et une inflammation.

Ces études ne permettent cependant pas d'établir de façon robuste de relation entre l'exposition aux amibes libres de l'espèce *N. fowleri* et un éventuel risque pour la santé car pour la plupart des cas de MEAP cités, la concentration en *N. fowleri* au moment de l'exposition est inconnue. Par ailleurs, la dose infectieuse n'est pas disponible. Par conséquent, le risque sanitaire lié à la présence de ces amibes dans les sites de baignade n'a pu être quantifié.

Cependant, compte tenu du très faible nombre de cas connus de MEAP dus à *N. fowleri* en France (1 cas) et dans le monde (310 cas) et des modalités spécifiques d'exposition (baignade en eau chaude, exposition de la muqueuse nasale à de l'eau contenant des *Naegleria fowleri* par inondation des fosses nasales), les membres du CES « Eaux » estiment que le risque pour la santé publique est faible par rapport à d'autres maladies infectieuses liées à la baignade<sup>1 2</sup> malgré le taux de létalité de l'infection à *N. fowleri* important (>95%).

Le CES « Eaux » souhaite par ailleurs attirer l'attention sur les difficultés liées au prélèvement et à l'analyse de ces amibes. Le CES « Eaux » rappelle, qu'en l'état actuel des connaissances, les échantillons doivent être analysés dans un délai le plus court possible après le prélèvement. Plusieurs techniques de dénombrement et d'identification de *N. fowleri* sont actuellement disponibles mais elles nécessitent des développements supplémentaires et des optimisations, notamment les méthodes moléculaires, pour être normalisées.

Même si le CES « Eaux » estime que le risque de contracter une MEAP suite à une baignade ou à la pratique d'activités aquatiques est faible, il ne peut être exclu. Des recommandations dans le but de limiter l'exposition des baigneurs ont été établies en fonction du type de baignade.

---

<sup>1</sup> Afsset (2009). Risques sanitaires liés aux baignades artificielles.

<sup>2</sup> Anses (2010). Note relative aux choix de la valeur limite de *Pseudomonas aeruginosa* dans les baignades artificielles

**Cas des sites de baignades au sens de la directive européenne 2006/7/CE concernant la gestion de la qualité des eaux de baignade**

Le dispositif réglementaire actuel issu de la directive européenne 2006/7/CE prévoit l'établissement d'un profil permettant d'identifier les sources de pollution susceptibles d'avoir un impact sur la qualité des eaux de baignades et d'affecter la santé des baigneurs. **Les experts recommandent que lors de l'actualisation de ces profils, les risques sanitaires liés à *N. fowleri* soient pris en compte quand les usages en amont ou la nature du plan d'eau sont susceptibles d'être à l'origine d'une température élevée de l'eau.**

**Cas des piscines**

L'étude de l'efficacité des traitements biocides sur l'élimination de *N. fowleri* dans l'eau montre que **le respect des conditions de mise en œuvre des traitements de désinfection actuellement autorisés en France pour l'eau alimentant les piscines publiques est suffisant pour empêcher le risque de contamination de l'eau par cette amibe.**

**Cas des baignades artificielles**

Dans son avis du 17 juillet 2009 relatif à l'évaluation des risques sanitaires liés aux baignades artificielles, l'Agence a recommandé des prescriptions techniques minimales à respecter pour l'exploitation d'une baignade artificielle.

Le respect de ces recommandations notamment en termes de maîtrise de la température de l'eau, de renouvellement de l'eau, de gestion hydraulique de la zone de baignade ainsi que de celles relatives au contrôle de la fréquentation maximale instantanée et de la fréquentation journalière apparaissent suffisants pour la gestion du risque sanitaire lié à *N. fowleri*.

Les experts souhaitent souligner l'importance du respect de ces recommandations dans les baignades artificielles existantes et que ne soient pas créées de nouvelles baignades artificielles avec un renouvellement de l'eau insuffisant et une configuration qui pourrait entraîner une température de l'eau élevée. *De facto* de telles baignades ne répondraient pas à la définition de baignades artificielles proposée par l'Agence et la baignade ne saurait être recommandée dans de tels sites.

**Cas des sites naturels d'eaux chaudes**

Les experts ont porté une attention particulière au cas spécifique des sites de baignades alimentés par des eaux chaudes d'origine géothermale en site naturel (résurgence, cascade, bassins naturels) ou en sites plus ou moins aménagés artificiellement aux abords des résurgences. Ces sites ne correspondent pas au cadre réglementaire relatif aux baignades. De fait, et au-delà du risque lié à la possible présence de *N. fowleri* dans ces sites, de telles baignades ne devraient pas être autorisées.

Néanmoins, s'il paraît difficile d'interdire leur usage notamment au vu de leur forte fréquentation, les experts proposent au minimum la mise en place d'un affichage. Il informera que les dispositions de prévention des risques sanitaires liés à la baignade préconisées par les pouvoirs publics ne peuvent y être appliquées, notamment en terme de température de l'eau ou/et de traitement de l'eau et/ou de fréquentation. Par conséquent toute pratique de baignade conduisant à ingérer l'eau de ces sites, à la mettre au contact d'une muqueuse (bouche, œil, nez) ou d'une plaie est déconseillée.

Par ailleurs, l'expertise ayant révélé une connaissance insuffisante de ce type de baignade, les membres du **CES « Eaux » proposent qu'un recensement soit réalisé sur l'ensemble du territoire français (métropole et outre-mer) et qu'un profil de baignade y soit établi afin que des mesures de gestion adaptées puissent y être**

**appliquées. Les experts demandent en outre que l'Agence soit saisie sur ce type de baignade particulière afin qu'une analyse de l'ensemble des dangers soit réalisée.**

En conclusion, le CES « Eaux » signale que la seule mesure efficace de prévention d'une infection à *Naegleria fowleri* est d'éviter d'y être exposé et donc de s'abstenir de pratiquer les activités de baignade dans des eaux douces chaudes ou réchauffées.

Cependant, quel que soit le type de baignade, des actions de prévention peuvent néanmoins être mises en place sur l'ensemble des sites où des activités aquatiques sont pratiquées en complément des recommandations pré-citées :

- aménager les abords de la baignade afin de limiter l'introduction de sédiments et/ou de pouvoir faire respecter les règles élémentaires d'hygiène (installation de pédiluve, de douches, etc.) ;
- procéder à un entretien régulier de la zone de baignade en particulier dans le cas de bassin, effectuer un nettoyage en l'absence de baigneurs et évacuer tous les sédiments ;
- lors de la baignade :
  - ne pas plonger ou sauter dans les sources d'eau chaude non traitées (eau de surface, eau souterraine, eau minérale naturelle) ;
  - éviter de mettre la tête sous l'eau / garder la tête hors de l'eau ;
  - utiliser dans la mesure du possible un pince nez ;
  - éviter de creuser, ou de remuer les sédiments en pratiquant les activités liées à l'eau.

En outre, le CES « Eaux » :

1. souligne l'importance de mettre en place, particulièrement dans les régions concernées par les cas cliniques déjà rapportés, une recherche systématique du diagnostic de MEAP dans les méningites purulentes dont le diagnostic étiologique n'a pas été établi après réalisation des explorations habituelles (cultures et/ou PCR dans le liquide céphalo-rachidien à la recherche de bactéries pyogènes) ;
2. recommande la sensibilisation des professionnels intervenant régulièrement sur les sites de baignades aux mesures de prévention telles que le port d'éléments de protection élémentaires.

Le CES « Eaux » propose également des mesures afin d'améliorer les connaissances qui permettront notamment de poursuivre l'évaluation des risques sanitaires :

1. harmoniser les méthodes de prélèvements et d'analyses de *Naegleria fowleri* dans les eaux ;
2. effectuer une campagne de mesures sur des sites contrastés permettant d'établir le niveau de contamination au niveau national ainsi que l'influence des caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques de l'eau sur la présence de cette amibe ;
3. accroître les connaissances sur :
  - a. le comportement de *N. fowleri* dans le milieu naturel ;
  - b. la prévalence du portage naso-pharyngé asymptomatique de *N. fowleri* et la séoprévalence de *N. fowleri* en Guadeloupe chez des baigneurs

exposés dans les sites naturels comme celui de Dolé puis de l'étendre à d'autres sites;

4. développer la recherche sur les protocoles thérapeutiques.

#### **4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE**

L'Agence attire l'attention sur la complexité de la recherche de *Naegleria fowleri* dans le milieu aquatique. Elle rappelle la nécessité d'optimiser les méthodes de détection et souligne l'importance d'harmoniser les méthodes de prélèvements, d'identification et de quantification de cette amibe.

Cependant, l'Agence rappelle que le respect des conditions de mise en œuvre des traitements de désinfection actuellement autorisés en France pour l'eau alimentant les piscines publiques est suffisant pour empêcher le risque de contamination de l'eau par cette amibe.

Par conséquent, l'Agence adopte la conclusion et les recommandations du comité d'experts spécialisé « Eaux ».

**Le directeur général**

Marc Mortureux

**MOTS-CLES**

*Naegleria fowleri*, baignades, méningo-encéphalite amibienne primitive, risques pour la santé.



---

***Analyse des risques sanitaires liés à la présence  
d'amibes Naegleria fowleri dans les eaux de baignade***

---

Saisine : 2011-SA-0190

**RAPPORT  
d'expertise collective**

CES « Eaux »

Octobre 2013

## Mots-clés

---

*Naegleria fowleri*, baignades, méningo-encéphalite amibienne primitive, risques pour la santé

## Présentation des intervenants

### ANSES

---

#### Coordination scientifique

Mlle Carole CATASTINI – Direction de l'évaluation des risques – Unité d'évaluation des risques liés à l'eau.

M. Rémi POIRIER – Direction de l'évaluation des risques – Unité d'évaluation des risques liés à l'eau.

#### Contribution scientifique

Mme Pascale PANETIER – Chef de l'unité d'évaluation des risques liés à l'eau.

#### Secrétariat administratif :

Marie-Christine Lecareux – Anses.

### GROUPE DE TRAVAIL

---

#### Président

M. TRACOL Raphaël (Président) – Ingénieur du génie sanitaire. Département Santé Environnement. Risques sanitaires des eaux de baignade. Agence régionale de santé (ARS) de Basse Normandie.

#### Membres

M. FAUCHER Jean-François - Médecin infectiologue. Habilité à diriger des recherches au sein de l'UMR 216 (santé de la mère et de l'enfant en milieu tropical). Université Paris Descartes - Praticien hospitalier dans le service des maladies infectieuses et tropicales du CHU de Besançon.

M. GERLOTTÉ Jérôme – Professeur de biologie cellulaire, associé à l'Institut Pasteur de Guadeloupe - Unité Environnement-Santé. Département de Biologie. Université Antilles-Guyane.

Mme GUILLEN-AGHION Nancy – Docteur d'état es-Sciences Naturelles, Directrice de recherche au CNRS. Institut Pasteur Paris. Spécialiste des amibes pathogènes pour l'Homme.

M. HÉCHARD Yann – Professeur à l'Université de Poitiers, Laboratoire Écologie et Biologie des Interactions, UMR CNRS 7267, Équipe Microbiologie de l'Eau. Interactions bactéries-amibes.

Mme HERBELIN Pascaline – Ingénieur-Chercheur, Laboratoire National d'Hydraulique et d'Environnement, Direction Recherche et Développement, EDF. Microbiologie de l'environnement.

M. PÉLANDAKIS Michel – Maître de conférences à l'Université de Lyon 1 ; Faculté de Pharmacie. UMR CNRS 5240. Étude des amibes de l'environnement.

M. THOMAS Vincent – Pharmacien, Docteur es sciences, spécialiste des amibes - Directeur de projet. Société Enterome.

## AUDITION DE PERSONNALITES EXTERIEURES

---

### **Agence régionale de santé**

ARS Poitou Charentes : M. J. ROBERT.

ARS Guadeloupe : Mmes M.J. FARO, V. FRANCONNY, N. LEFTAH-MARIE, et MM J. GUSTAVE et H. JEAN-PIERRE.

### **Sociétés :**

CAPSIS : M G. CHAPERON.

EDF : Mme E. PRINGUEZ, MM P.A. CABANES et P. RUFENACH.

### **Personnalité compétente :**

Mme F. MARCIANO – CABRAL : professeur de microbiologie et d'immunologie à l'université Virginia Commonwealth, États-Unis.

D'autres personnalités compétentes ont été sollicitées mais n'ont pas souhaité participer aux travaux d'expertise.

## SOMMAIRE

<b>Présentation des intervenants</b> .....	3
Liste des figures .....	7
Liste des tableaux .....	7
Sigles et abréviations .....	8
Glossaire .....	9
Introduction .....	10
Objet de la saisine .....	10
Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation .....	11
1 Caractéristiques générales de <i>Naegleria fowleri</i> .....	12
1.1 Le cycle de vie de <i>Naegleria fowleri</i> .....	12
1.2 Le génome de <i>Naegleria</i> .....	13
1.3 Diversité génétique des <i>Naegleria fowleri</i> et distribution géographique .....	14
2 Écologie de <i>Naegleria fowleri</i> .....	14
2.1 Influence de la température .....	15
2.1.1 Tolérance de <i>Naegleria fowleri</i> à la température ( <i>in vitro</i> ) .....	15
2.1.2 Caractère saisonnier de <i>Naegleria fowleri</i> .....	15
2.1.3 Rôle de la température .....	16
2.2 Influence des autres paramètres physico-chimiques .....	17
2.2.1 pH .....	17
2.2.2 Oxygène dissous .....	17
2.2.3 Salinité et conductivité .....	18
2.2.4 Hygrométrie .....	18
2.2.5 Métaux .....	18
2.2.6 Matières organiques et matières en suspension .....	19
2.3 Influence des paramètres biologiques .....	19
2.3.1 Ressource nutritive bactérienne .....	19
2.3.2 Interaction de <i>N. fowleri</i> avec les bactéries .....	20
2.3.3 Relation de <i>Naegleria fowleri</i> avec d'autres populations amibiennes .....	21
2.3.4 Association avec les biofilms .....	24
2.4 Efficacité des traitements biocides sur <i>Naegleria fowleri</i> .....	24
2.4.1 Chlore .....	25
2.4.2 Dioxyde de chlore .....	29
2.4.3 Dérivés halogénés .....	29
2.4.4 Ozone .....	29
2.4.5 Autres traitements de désinfection chimique .....	30
2.4.6 Les rayonnements ultraviolets .....	30
3 La pathologie : méningo-encéphalite amibienne primitive .....	30
3.1 Épidémiologie .....	31
3.2 Physiopathologie de l'infection .....	32
3.3 Mécanismes d'inflammation et réponse immunitaire .....	35
3.4 Clinique .....	36
3.5 Diagnostic .....	37
3.6 Thérapie .....	37
3.7 Pronostic .....	38
4 Identification et dénombrement de <i>Naegleria fowleri</i> .....	38
4.1 Méthodes de prélèvements .....	38
4.2 Méthodes culturales .....	39
4.2.1 Milieux de culture .....	39
4.2.2 Ensemencement des échantillons .....	39
4.2.3 Température et durée d'incubation, examen microscopique des cultures .....	40
4.2.4 Essais de flagellation .....	41
4.2.5 Identification de l'espèce pathogène .....	41

4.2.6	Dénombrement amibien .....	41
4.3	Méthodes immunologiques .....	42
4.3.1	Test d'immunoabsorption enzymatique (ELISA).....	42
4.3.2	Essai d'immunofluorescence couplé à la cytométrie en phase solide.....	42
4.4	Méthodes biochimiques .....	43
4.5	Méthodes moléculaires .....	43
4.5.1	Méthode par réaction en chaîne par polymérase conventionnelle .....	43
4.5.2	PCR quantitative .....	44
5	Exposition par la baignade.....	45
5.1	Typologies des baignades .....	46
5.2	Réglementation française .....	47
5.3	Exposition à <i>Naegleria fowleri</i> lors des activités de baignade .....	48
5.3.1	Baignades en eau libre.....	48
5.3.2	Piscines.....	50
5.3.3	Baignades artificielles.....	52
5.3.4	Baignades alimentées par des eaux de refroidissement industrielles .....	52
5.3.5	Autres points d'eau .....	54
6	Caractérisation du risque .....	56
7	Modalités de gestion du risque .....	57
8	Conclusions et recommandations .....	58
8.1	Conclusions .....	58
8.2	Recommandations.....	59
8.3	Proposition d'amélioration des connaissances.....	62
	Références bibliographiques .....	64
	Annexes .....	88
	Annexe 1 : Courrier de la saisine.....	88
	Annexe 2 : Requêtes formulées pendant les recherches bibliographiques .....	90
	Annexe 3 : Description de cas de MEAP dans le monde .....	91

## LISTE DES FIGURES

---

Figure 1 : Les trois formes de <i>Naegleria fowleri</i> dans le milieu hydrique : le kyste, le trophozoïte et la forme flagellée .....	12
Figure 2 : Répartition mondiale des cas de MEAP dues à <i>Naegleria fowleri</i> .....	31
Figure 3 : Répartition des cas rapportés de MEAP en fonction de l'âge .....	32
Figure 4 : <i>Naegleria fowleri</i> : pathogénèse et cycle de vie .....	33
Figure 5 : Typologie des baignades.....	47

## LISTE DES TABLEAUX

---

Tableau I : Les différents génotypes de <i>Naegleria fowleri</i> et leur distribution géographique .	14
Tableau II: Efficacité de différents désinfectants sur les kystes de <i>N. fowleri</i> et <i>Naegleria</i> spp (adapté de Loret et Greub, 2010). .....	28
Tableau III : Textes règlementaires relatifs aux baignades et aux piscines collectives en vigueur en France .....	48
Tableau IV : Concentrations moyennes de <i>Naegleria fowleri</i> mesurées en amont et en aval de la CNPE de Civaux (Source ARS de Poitou Charente).....	54

## Sigles et abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

Anses : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

ARNr : Acide ribonucléique ribosomique

ARS : Agence régionale de santé

ATP : Adénosine triphosphatase

ATPase : Enzymes qui hydrolysent ou synthétisent l'adénosine-triphosphate (ATP)

BRGM : Bureau de recherches géologiques et minières

CAME : Électrophorèse sur membrane d'acétate de cellulose

CDC : Centers for disease control and prevention

CNPE : Centrale nucléaire de production électrique

CSHPF : Conseil supérieur d'hygiène publique de France

CSP : Code de la santé publique

DGS : Direction générale de la santé

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DREAL : Direction régionale de l'environnement, de l'aménagement et du logement

EDCH : Eau destinée à la consommation humaine

EDF : Électricité de France

ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay

EMN : Eau minérale naturelle

ERS : Évaluation des risques sanitaires

FLA : Free leaving amoeba. Amibe libre

GPI : Isomérase phosphate glucose.

IEF : Isoenzyme electrophoretic focusing

ITS : Internal transcribed spacers

LCR : Liquide céphalo-rachidien

LD : Limite de détection

MEAP : Méningo-encéphalite amibienne primitive

NNA-E : Gélose non nutritives recouverte d'une couche de bactéries *Escherichia coli*

NO : Oxyde nitrique

OMS : Organisation mondiale de la santé

PCR : Polymerase chain reaction

q-PCR : Quantitative polymerase chain reaction

Nested-PCR : Nested polymerase chain reaction

RAPD : ADN polymorphe amplifié au hasard / Random Amplified Polymorphic DNA

RFLP : Polymorphisme de longueur des fragments de restriction / Restriction Fragment Length Polymorphism

Sise - Baignade : Système d'information en santé-environnement - Baignades

Sise -Eaux : Système d'information en santé-environnement - Eaux

TAR : Tour aéro-réfrigérante

UE : Union européenne

UFC : Unité formant colonie

## Glossaire

**Atténuation** : Absorption et dispersion de la lumière en présence de particules dans l'eau.

**Axénique** : Une culture axénique qualifie une culture d'un organisme dans un milieu dépourvu de tout autre organisme (dans un milieu stérile), par opposition à une culture xénique en présence de bactéries.

**Intrathécale** : L'injection intrathécale désigne en général une injection sous l'arachnoïde.

**ITS** : Région de l'ADN ribosomique comprenant les deux espaceurs internes transcrits et le gène de l'ARNr 5,8S.

**Lentique** : Un biotope et les êtres vivants propres aux écosystèmes d'eaux calmes à renouvellement lent (lacs, marécages, étangs, mares, *etc.*).

**Lotique** : Biotope des eaux courantes.

**Pathogénèse** : Ensemble des processus responsables du déclenchement et du développement d'une maladie donnée.

## Introduction

Les amibes libres du genre *Naegleria* sont connues depuis plus d'un siècle. Il est reconnu depuis 50 ans que l'espèce *Naegleria fowleri* (*N. fowleri*) est responsable d'infections mortelles pour l'Homme (Fowler, 1965 ; De Jonckheere, 2011a ; De Jonckheere, 2012). Les trophozoïtes de cette amibe ont été identifiés en Australie par Fowler dans les bulbes olfactifs et les lobes frontaux d'un jeune patient qui venait de mourir de méningo-encéphalite amibienne primitive (MEAP) (Fowler, 1965 ; Cooter, 2002).

Le risque sanitaire lié à *N. fowleri* dans le contexte des baignades, a été historiquement posé en France en aval de plusieurs centrales nucléaires de production d'électricité (CNPE) à la fin des années 1990 suite à la mise en évidence de ces amibes dans les circuits de refroidissement après le remplacement, dans certaines centrales, des condenseurs en laiton par des condenseurs en acier inoxydable. Ces amibes libres, dont le développement peut être favorisé en cas d'échauffement de l'eau, ont fait l'objet d'une attention particulière de la part d'électricité de France (EDF) qui a proposé une évaluation des risques, conduisant le Conseil supérieur d'hygiène publique de France (CSHPF) à proposer une valeur limite de 100 Nf/L sur la base d'un risque acceptable de  $7,24 \cdot 10^{-6}$  à ne pas dépasser en aval des CNPE (CSHPF, 1996 ; Cabanes, 2001).

En avril 2008, en Guadeloupe, un enfant est décédé d'une méningite foudroyante à la suite d'une baignade. Les analyses réalisées par biologie moléculaire ont mis en évidence la présence de *N. fowleri* dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) de la victime et confirmé le diagnostic de MEAP. Il s'agit du premier décès lié à une MEAP en France. Dans les jours précédant le début des signes, l'enfant avait pratiqué la baignade dans le bassin de Dolé (commune de Gourbeyre), une retenue d'eau douce renouvelée en continu par une source d'eau chaude dont la température naturelle est de 31°C. Les prélèvements effectués à l'époque dans le bassin de Dolé ont permis d'isoler quelques souches de *Naegleria* spp. non pathogènes (*N. lovaniensis*, *N. australiensis*), mais pas l'espèce *N. fowleri*.

Entre le 1<sup>er</sup> septembre 2008 et le 17 septembre 2009, des campagnes d'analyses ont permis de mettre en évidence la présence de *N. fowleri* sur le site de Dolé. Selon la Direction générale de la santé (DGS), ces résultats suggèrent que l'infection de l'enfant aurait pu se produire au cours de sa baignade dans ce site. Depuis janvier 2011, les bains chauds les plus fréquentés de Guadeloupe sont surveillés mensuellement par l'Agence régionale de santé (ARS) de Guadeloupe et l'Institut Pasteur Guadeloupe, et révèlent pratiquement tous la présence de *N. fowleri* en faible quantité (2 à 22 amibes / L).

## Objet de la saisine

Le ministère en charge de la santé a saisi l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) le 20 juillet 2011 afin d'évaluer les risques sanitaires liés à la présence d'amibes *N. fowleri* dans les eaux de baignade.

La lettre de saisine (annexe 1) demande à l'Agence :

- d'analyser la valeur de 100 N.f./L recommandée par le CSHPF pour encadrer règlementairement la pratique de la baignade ou des activités nautiques ;
- de déterminer les facteurs susceptibles de favoriser le développement de *N. fowleri* dans les eaux de sites de baignade ;
- d'analyser l'état de l'art en termes de prélèvements ;
- de proposer des mesures de maîtrise du risque sanitaire pour l'Homme vis-à-vis de *N. fowleri* dans le cadre des activités de baignade ;

- de proposer des mesures correctives le cas échéant ;
- d'indiquer si les conclusions issues des travaux d'expertise peuvent être applicables aux baignades artificielles.

Compte tenu de la diversité des baignades pouvant être concernées par la problématique des *N. fowleri* ainsi que le manque de données actuellement disponibles, et en accord avec la DGS, l'Agence a proposé de réduire le nombre de questions auxquelles elle pouvait répondre. Ce présent rapport porte sur :

- l'écologie de *N. fowleri* ;
- les facteurs susceptibles de favoriser son développement dans les eaux de sites de baignade ;
- l'état de l'art en termes de prélèvements.

L'Agence propose des recommandations pour l'ensemble des types de baignade y compris les baignades artificielles.

## **Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation**

Un groupe de travail (GT) intitulé « Amibes et baignades » associé au Comité d'experts spécialisé (CES) « Eaux » a été installé le 20 juin 2012. Les résultats des travaux d'expertise du GT ont été soumis régulièrement au CES « Eaux ». Le présent rapport tient compte des contributions apportées par les membres du CES lors de ces consultations.

Ces travaux sont ainsi issus d'un collectif d'experts aux compétences complémentaires. L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50 -110 « Qualité en expertise – prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ». Pour mener à bien ses travaux, le GT s'est appuyé sur une revue bibliographique internationale réalisée à partir des sites « Pubmed », « Sciencedirect » et « Scopus » entre juin 2012 et avril 2013. Ces recherches documentaires ont été complétées par l'audition d'industriels et des membres de plusieurs ARS.

Ce rapport a été présenté à deux reprises au CES « Eaux » qui l'a adopté le 2 octobre 2013.

# 1 Caractéristiques générales de *Naegleria fowleri*

Les eucaryotes unicellulaires se déplaçant à l'aide de pseudopodes sont regroupés sous le terme d'amibes. Ce terme générique associe des micro-organismes eucaryotes phylogénétiquement très distants, puisque les amibes se positionnent dans trois des six super-groupes du monde des eucaryotes (Keeling *et al.*, 2005). Ainsi, *Naegleria* appartient au super-groupe des *Excavata* dont font partie les trypanosomes et les euglènes (Adl *et al.*, 2005).

Les amibes flagellées du genre *Naegleria* incluent une seule espèce pathogène pour l'Homme, *N. fowleri*, et deux espèces pathogènes pour les souris, *Naegleria italica* et *Naegleria australiensis* (Robinson *et al.*, 2006 ; Robinson, 2004 ; De Jonckheere, 2002 ).

*N. fowleri* est un eucaryote unicellulaire aérobie, opportuniste et pathogène chez l'Homme et l'animal (Schuster, 2002 ; Karanis, 2006 ; Visvesvara, 2010). C'est une amibe libre flagellée appartenant au second rang des *Vahlkampfiidae* (Adl *et al.*, 2005).

Contrairement à l'amibe *Entamoeba histolytica* parasite strict de l'intestin humain, *N. fowleri* est une amibe dite « libre » et amphizoïque, car elle est capable de mener une vie autonome dans l'environnement et sous forme parasite dans le système nerveux d'un hôte (Page, 1974 ; Schuster et Visvesvara, 2004). Comme de nombreuses amibes libres, *N. fowleri* est présente dans les sols humides et dans l'eau ; sa distribution géographique est mondiale.

## 1.1 Le cycle de vie de *Naegleria fowleri*

*N. fowleri* se présente sous trois formes dans le milieu hydrique : la forme végétative ou trophozoïte (8 à 30 µm), la forme flagellée (7 à 18 µm) et la forme kystique (8 à 20 µm), forme de résistance et de dissémination.

Les trophozoïtes sont capables de se nourrir et de se multiplier. Ils se déplacent grâce à leurs pseudopodes et ont tendance à adhérer à différents supports. Ils participent ainsi à la constitution des biofilms dont ils se nourrissent. Les trophozoïtes se transforment en kyste lorsque l'environnement devient défavorable par manque de nourriture, dessiccation, changements de température ou de pH, ou encore par surpopulation. *N. fowleri* et toutes les espèces du genre présentent la particularité de se transformer en forme flagellée lorsque les conditions ioniques sont modifiées. Le passage à la forme flagellée se produit alors en quelques heures et peut être déclenchée expérimentalement en mettant des trophozoïtes en suspension dans un milieu hypotonique (eau distillée) à 37°C. La forme flagellée est transitoire et réversible et ne se produit qu'à partir de la forme trophozoïte (Fulton, 1970 et 1977).

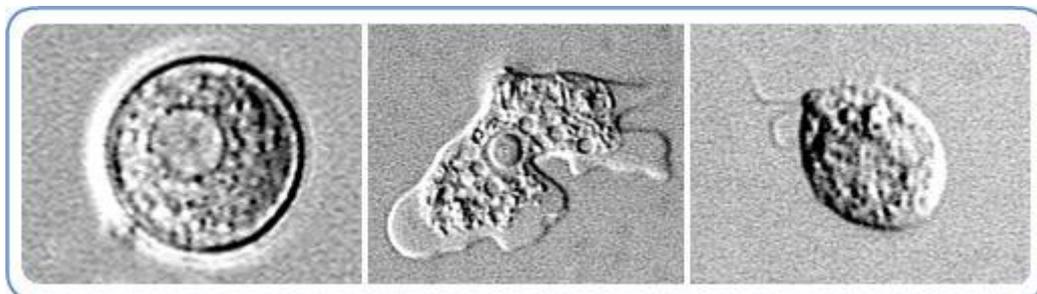


Figure 1 : Les trois formes de *Naegleria fowleri* dans le milieu hydrique : le kyste, le trophozoïte et la forme flagellée

Source CDC<sup>1</sup>

<sup>1</sup> <http://www.cdc.gov/parasites/naegleria/>

L'ubiquité de nombreux hétérozygotes obtenus par analyse biochimique (Robinson *et al.*, 1992) et l'existence de génotypes identiques à vaste répartition géographique font penser à un mode de reproduction clonal chez *Naegleria*. Pourtant, quelques données semblent suggérer que des recombinaisons génétiques aient pu se produire. Chez *Naegleria lovaniensis*, espèce la plus proche de *N. fowleri* en termes de phylogénie, la variation observée pour certains de leurs profils enzymatiques ne peut s'expliquer que par échange génétique (Cariou et Pernin, 1987). Par ailleurs, il a été montré que l'ensemble des gènes spécifiques de la méiose était déjà présent à un stade très précoce de l'évolution des eucaryotes et que ces gènes spécifiques sont présents chez *Naegleria* (Ramesh *et al.*, 2005 ; Fritz *et al.*, 2010). Bien que le mode clonal soit le mode de reproduction le plus fréquent, il est possible que la reproduction sexuée ait pu se produire ou puisse se produire de manière occasionnelle.

La division cellulaire chez les amibes a longtemps constitué un élément important d'identification par l'observation de caractères mitotiques très variés. Chez *N. fowleri* comme chez de nombreuses amibes de cette famille, la division cellulaire se caractérise par une promitose ou cryptomitose. La promitose se déroule selon les quatre stades majeurs d'une mitose classique et aboutit à deux cellules filles. Cependant, ce type de division se caractérise par la persistance d'une membrane nucléaire durant la division, par une absence de centrioles, par la présence de deux masses polaires émanant du nucléole, et par l'apparition d'un corps intermédiaire au cours de l'anaphase. Des mouvements amiboïdes se maintiennent lors de la division (Fulton et Dingle, 1971 ; Fulton, 1977 ; Gonzalez-Robles, 2010).

## 1.2 Le génome de *Naegleria*

Le génome de *Naegleria*, mieux connu depuis le séquençage de celui de *Naegleria gruberi* (Fritz-layin, 2010), comporte de l'ADN nucléaire linéaire porté par des chromosomes, un ADN circulaire extrachromosomique de 14 kb appelé ADN plasmidique et un ADN mitochondrial circulaire d'environ 50 kb (Clark et Cross, 1987). Le nombre de chromosomes reste difficile à définir. L'analyse récente du génome de *N. gruberi* ainsi que les travaux réalisés par la technique d'électrophorèse en champ pulsé montre au moins 12 chromosomes qui totalisent plus de 40 Mb (Clark et Cross, 1987 ; Clark *et al.*, 1990 ; Fritz-layin, 2010). L'ADN plasmidique extrachromosomique est capable d'autoréplication et porte les gènes ribosomiques, la petite sous-unité (ADNr18S) et la grande (ADNr28S), ainsi que l'ADNr5,8S. Ce type d'ADN plasmidique nucléolaire a été observé chez *Entamoeba histolytica* et chez *Giardia lamblia*, protistes bien distants phylogénétiquement de *Naegleria*. L'ADN plasmidique est estimé à 4000 copies par cellule représentant une part importante de l'ADN total (environ 17 %) (Clark et Cross, 1987). L'ADN mitochondrial a une longueur de 50 kb et représente environ 15 % de l'ADN total de *Naegleria* (Clark et Cross, 1987).

La séquence complète du génome révèle que la souche de référence de *N. gruberi* (souche NEG) est diploïde, mais il est à noter que d'autres souches examinées, dont la souche NEG-M dérivée de la souche NEG, sont tétraploïdes. Aucune souche examinée n'est haploïde. Pour les autres *Naegleria*, on doit se reporter aux différents travaux d'analyses enzymatiques qui suggèrent que les espèces analysées sont plutôt diploïdes (Adams *et al.* 1989 ; Cariou et Pernin 1987 ; Robinson, 1992).

Bien que ces travaux portent des arguments indirects fondés sur une analyse protéique dont les gènes ne sont pas identifiés, la diploïdie reste certainement l'hypothèse la plus probable pour *N. fowleri*. Toutefois, l'existence d'un état tétraploïde chez *N. gruberi* montre que la duplication du génome est possible chez ces amibes.

### 1.3 Diversité génétique des *Naegleria fowleri* et distribution géographique

Les analyses moléculaires ont révélé une variabilité intra-spécifique inattendue chez *N. fowleri*. Les analyses fondées sur le polymorphisme génétique selon la longueur des fragments de restriction (RFLP) ont mis en évidence deux génotypes prédominants dans les isolats : un génotype prévalant principalement dans les isolats obtenus en Europe et aux États-Unis, le second dans ceux obtenus en Australie (De Jonckheere, 1987 et 1988). L'utilisation d'autres marqueurs moléculaires fondés sur l'analyse RAPD (ADN polymorphe amplifié au hasard) et l'analyse ITS (internal transcribed spacers) confirme ces résultats en révélant des génotypes supplémentaires (Jonckheere, 1998 ; Pélandakis et al., 1997 ; 1998 ; 2000). De Jonckheere (2011) a recensé huit génotypes à partir des différentes études réalisées (De Jonckheere, 1998 ; Pélandakis et al., 2000 ; Zhou et al., 2003 ; Tiewcharoen et al., 2007) (Tableau I).

Ces génotypes ne sont pas nécessairement associés à l'origine géographique des souches (Pélandakis et al., 1998). A titre d'exemple, un même génotype apparaît à la fois sur le continent asiatique, le continent américain et le continent européen (génotype 2).

Enfin, la plupart des génotypes répertoriés (1, 2, 3 et 5) proviennent de souches isolées à partir de cas cliniques. Ces génotypes sont aussi issus de l'environnement. Il est probable que tous les génotypes de *N. fowleri* soient pathogènes mais aucune étude ne vient en établir la preuve. De plus, aucune étude n'a mis en évidence différents degrés de virulence entre les différents génotypes.

Tableau I : Les différents génotypes de *Naegleria fowleri* et leur distribution géographique

Génotype	distribution	référence
1	USA (Californie)	a
2	Europe, Asie, USA	b,c
3	Europe, Asie, USA	b,c,d
4	France	c
5	Océanie,	b,c
5	Europe, Japon	c
6/7/8	France	b,c

(a) Zhou et al. 2003 ; (b) De Jonckheere 1998 ; (c) Pélandakis et al. 2000 ; (d) Tiewcharoen et al. 2007. Les génotypes 2, 3 et 5 correspondent également aux variants moléculaires « Widespread, Euro-Américains, et Océaniens » décrits dans la littérature.

## 2 Écologie de *Naegleria fowleri*

Ce pathogène thermophile est isolé des sols, et de différents environnements aquatiques souvent chauffés naturellement ou artificiellement. Différentes études ont été menées pour rechercher les relations qui pouvaient exister entre le développement de *N. fowleri* et des caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques de l'eau. La température est présentée comme un paramètre ayant un rôle déterminant dans l'occurrence de *N. fowleri* dans les milieux hydriques ; toutefois, d'autres paramètres sont également évoqués.

## 2.1 Influence de la température

### 2.1.1 Tolérance de *Naegleria fowleri* à la température (*in vitro*)

La gamme de tolérance thermique de *N. fowleri* se situe entre 18 et 45°C, avec un optimum de 42°C (Robinson, 1996).

Entre 51 et 65°C, les trophozoïtes de *N. fowleri* survivent respectivement entre 45 min et moins de 30 secondes. Les kystes survivent respectivement à ces mêmes températures entre 145 et 3 minutes (Chang, 1978).

Pour des températures de 4 à 5°C, la survie des kystes de *N. fowleri* varie entre deux et douze mois (Chang, 1978 ; Carter, 1970 ; Biddick *et al.*, 1984 ; Warhurst, 1980 ; Gupta, 1999).

Les trophozoïtes de *N. fowleri* dégènèrent en quelques heures à des températures inférieures à 10°C et en quelques minutes à des températures inférieures à 0°C (Chang, 1978). Pour les kystes, alors que pour des températures inférieures à -10°C, Chang (1978) indique une survie de 1,5 h à -10°C et 1 h à -30°C, Biddick *et al.* (1984), Gupta *et al.* (1999) et Carter (1970) indiquent une survie entre 1 à 4 mois à -10°C et -15°C. La meilleure survie des kystes à basse température par rapport aux trophozoïtes s'expliquerait par leur capacité à mieux préserver leur intégrité cytoplasmique après cristallisation de l'eau (Chang, 1978).

***N. fowleri* est une amibe libre thermophile dont la gamme de tolérance thermique est de 18 à 45°C. Toutefois, ces études de laboratoire indiquent qu'elle peut survivre en dehors de cette plage de température, principalement sous forme kystique.**

### 2.1.2 Caractère saisonnier de *Naegleria fowleri*

Wellings *et al.* (1977) ont recherché *N. fowleri* dans des lacs d'eau douce de l'Orlando (États-Unis), aussi bien dans l'eau (à 1,5 m du littoral et de 1 à 1,5 m de profondeur) que dans les sédiments (de moins de 30 cm à plus de 2,4 m). Dans l'eau, *N. fowleri* a été isolée plus fréquemment entre juin et octobre, alors que les températures étaient les plus élevées (> 25°C). De même, De Jonckheere *et al.* (1977) détectent *N. fowleri* plus fréquemment en été qu'en hiver, dans l'eau et les sédiments d'effluents chauffés artificiellement (centrales électriques, usines métallurgiques et chimiques). John *et al.* (1995a) ont également identifié la présence de *N. fowleri*, principalement en été, à l'occasion de prélèvements mensuels d'eau pendant un an dans des bassins naturellement échauffés en Oklahoma (États-Unis) et dont la température de l'eau était comprise entre 27 et 32°C. Lares-Villa *et al.* (2010) ont détecté *N. fowleri* dans deux zones aquatiques récréatives au Mexique entre août et octobre, alors que la température de l'eau était comprise entre 25 et 35°C (prélèvements mensuels pendant un an).

Kyle et Noblet (1985) rapportent que des concentrations significatives d'amibes libres ont été mesurées fin mai et en juillet dans deux lacs de Caroline du Sud (États-Unis) dans des couches de la colonne d'eau de 1,2 à 3,6 m de profondeur, où des phénomènes de décomposition de matières organiques et de minéralisation se sont produits consécutivement au bloom algal printanier. *Hartmanella* et *Naegleria* spp, dont *N. fowleri*, y ont été majoritairement détectées.

Cerva *et al.* (1982) ont recherché, en ex-Tchécoslovaquie, *N. fowleri* dans des échantillons d'eaux de refroidissement chauffées par des centrales électriques ainsi que dans le rejet en aval. *Naegleria* spp et *N. fowleri* sont majoritairement détectées en été et en automne. De même, Sykora *et al.* (1983) ont recherché la présence de *N. fowleri* dans les eaux réceptrices d'effluents échauffés rejetés par des centrales électriques en Pennsylvanie (États-Unis). La distribution des *Naegleria* spp thermophiles est saisonnière, avec une détection majoritaire en été et en début d'automne.

Toutefois, Wellings *et al.* (1977) indiquent également que *N. fowleri* a été isolé quasiment toute l'année dans les sédiments, même au contact d'une eau en moyenne à 12°C en février et à 8,5 m de profondeur. De même, De Jonckheere *et al.* (1977) rapportent la détection de *N. fowleri* dans un prélèvement de sédiments de lacs alors que la température de l'eau n'était que de 10°C (décembre). John *et al.* (1995a) ont détecté *N. fowleri* après grattage de surface au bord de l'eau alors que la température de l'eau était de 12°C. La survie hivernale de *N. fowleri* dans les sédiments est probablement favorisée par sa capacité d'enkystement.

**La distribution de *N. fowleri* apparaît être saisonnière avec une détection dans l'eau majoritairement en été et en début d'automne.**

### 2.1.3 Rôle de la température

*N. fowleri* peut être isolée dans des milieux aquatiques naturellement ou artificiellement chauffés très variés tels que des lacs, des rivières, des mares, des étangs ou des sources d'eau chaude.

Sykora *et al.* (1983) ont établi une corrélation significative entre la température et la détection de *N. fowleri* dans les eaux réceptrices d'effluents échauffés rejetés par des centrales de production d'électricité en Pennsylvanie, avec une gamme de températures optimales pour isoler *N. fowleri* entre 27 et 35°C. Toutefois, la relation entre les températures élevées et l'occurrence de *Naegleria* spp thermophiles n'est pas bien définie. En effet, *N. fowleri* a été détectée dans des eaux de lacs dont la température était plus faible (16,5 à 19°C, Kyle et Noblet, 1985). En 2007, trois campagnes de prélèvements d'eau (à 1 m sous la surface) et de sédiments ont été menées durant l'été dans le lac Anna (Virginie, États-Unis) partiellement échauffé par les effluents d'une centrale électrique (Marciano Cabral *et al.*, 2007 ; Jamerson *et al.*, 2009). Les températures de l'eau prélevée dans la partie non échauffée du lac variaient entre 27,8 et 30,2°C et dans la partie échauffée entre 27,2 à 36,4°C. Sept des treize échantillons prélevés en zone non échauffée étaient positifs en *N. fowleri* (53,8%) contre dix sur seize en zone échauffée (62,5%). *N. fowleri* a donc été détectée dans les zones artificiellement échauffées ou non du lac. Alors que les températures étaient comprises entre 27 et 36°C, *N. fowleri* n'a pas été systématiquement détectée. La température n'apparaît donc pas comme le seul facteur indicateur sur la présence de *N. fowleri*. Behets *et al.* (2007a) ont quantifié, entre 2004 et 2005, les amibes libres thermophiles (44°C), *Naegleria* spp et *N. fowleri* dans des eaux de refroidissement industriels. Sur les 123 échantillons, uniquement les deux dont les températures étaient inférieures à 20°C étaient exempts d'amibes libres. Une corrélation linéaire positive est mise en évidence entre les concentrations en amibes thermophiles, *Naegleria* spp et *N. fowleri*, et la température (gamme de 17,3 et 35,2°C). Deux études de dénombrement de *N. fowleri* ont été menées dans des bains d'eaux naturellement chauffées de Guadeloupe (Moussa *et al.*, 2013 ; Gustave *et al.*, 2010). L'étude menée entre septembre 2008 et septembre 2009 montre qu'en fonction des bains échantillonnés, 14 à 40 % des échantillons ont été positifs en *N. fowleri* avec des concentrations atteignant 5 Nf/L (par filtration puis culture à 43°C), pour des températures de l'eau fluctuant entre 29 et 38,2°C (Gustave *et al.*, 2010). De juin 2011 à juillet 2012, des concentrations en *N. fowleri* jusqu'à 22 Nf/L (par filtration puis culture à 44°C) ont été dénombrées dans ces mêmes bains (7 à 71 % des échantillons positifs en fonction des bains), pour des températures variant de 26,9°C à 34,9°C.

Huizinga *et al.* (1990) ont étudié l'impact de l'échauffement d'un lac recevant les eaux de refroidissement d'une nouvelle centrale électrique (Lac Clinton, Illinois, États-Unis) sur *Naegleria* spp et *N. fowleri* (culture à 45°C). *N. fowleri* est fréquemment détectée dans sept des neuf stations échauffées du lac entre 1987 et 1988, période correspondant au début de l'échauffement artificiel du lac. La majorité des *N. fowleri* a été détectée dans des eaux dont la température était supérieure à 25°C. Toutefois, alors que des conditions météorologiques très chaudes en 1987 et 1988 ont conduit à des températures de l'eau supérieures à 30°C dans la zone non échauffée du lac, *N. fowleri* n'a pas été détectée, alors qu'elle l'avait été en

1986, avant le début des rejets, et en 1989. Il existe par conséquent d'autres conditions pour la sélection de l'amibe libre pathogène, selon l'auteur, elles pourraient dépendre d'une température maximale atteinte et de la durée d'exposition à cette température.

Des études antérieures (Delattre et Oger, 1981 ; Cerva *et al.*, 1982 ; Kasprzak *et al.*, 1982 ; Sykora *et al.*, 1983) renforcent cette hypothèse. Delattre et Oger (1981) ont recherché la présence d'amibes libres thermophiles (culture à 45°C), de *Naegleria* spp et de *N. fowleri* dans des échantillons d'eau sur des sites chauffés (de 17 à 30°C) par des rejets industriels (industries métallurgiques, papeteries, industries chimiques, centrales électriques, etc.) en France et en Belgique. Parmi les 204 échantillons, 101 amibes thermophiles ont été détectées dont 40 *Naegleria* spp et 13 *N. fowleri*. Cette étude montre que l'échauffement de l'eau semble favorable à la détection de *N. fowleri*, mais qu'il existe *a contrario* des eaux échauffées exemptes de *N. fowleri*. De plus, bien qu'il ait pu être supposé qu'une variation de la température ait davantage d'influence qu'un seuil de température, ces observations ne sont pas systématiques. L'hypothèse formulée est que la présence de *N. fowleri* dépendrait d'une mise en contact avec une surface chaude (environ 45°C), telle que des condenseurs de vapeurs (Kasprzak, 1982). Pour Cerva *et al.* (1982), sous un climat tempéré, cette température serait de 30°C d'après les études menées jusqu'alors sur des rejets d'eau chauffée (piscine, eau réceptrice d'effluents industriellement chauffés). Sykora *et al.* (1983) indiquent qu'il est également possible que *N. fowleri* se développe dans les eaux de refroidissement où la température est élevée, et survive à des changements d'environnement.

**L'association entre la détection de *N. fowleri* et l'échauffement naturel ou artificiel d'un milieu aquatique apparaît positive. La présence de *N. fowleri* semble plus fréquente pour des températures supérieures à 25-27°C. Toutefois, bien que nécessaire, la température n'est pas un facteur suffisant à sa détection car des eaux présentant des températures élevées ne sont pas systématiquement colonisées par *N. fowleri*.**

## 2.2 Influence des autres paramètres physico-chimiques

### 2.2.1 pH

Carter *et al.* (1970) ont montré que les trophozoïtes de *N. fowleri* supportent des pH de 4,6 à 9,5 et les kystes, des pH de 2 à 10. Par ailleurs, Sykora *et al.* (1983) ont étudié en laboratoire l'effet d'un contact de 2 à 24 h avec une eau dont le pH varie de 2 à 10 sur des kystes de *N. fowleri* à la température de 37°C. Alors que les kystes survivent à des pH compris entre 2 et 8,15, cette survie est affectée pour des pH supérieurs à 8,7 et aucune survie n'est observée au pH de 10.

De même, Tiewcharoen *et al.* (2001) ont montré *in situ* que sur une gamme de pH de 4 à 14, une tolérance de *N. fowleri* était observée pour des pH compris entre 5 et 12. Kyle *et al.* (1985) décrivent également une tolérance de *N. fowleri* à une large gamme de pH lors d'une étude *in situ* dans deux lacs américains. Jamerson *et al.* (2009) indiquent qu'aucune relation n'a été mise en évidence entre le pH et *N. fowleri* dans de telles eaux.

**Il a été montré que *N. fowleri* peut supporter une large gamme de pH (2-12).**

### 2.2.2 Oxygène dissous

Les différentes informations recueillies, parfois contradictoires, suggèrent que *N. fowleri* tolère une large gamme de concentrations en oxygène dissous dans l'eau. Cerva *et al.* (1978) ont constaté que *Naegleria* spp n'exigeait pas des concentrations importantes en oxygène dissous et que *N. fowleri* était l'amibe la moins aérobique du genre. De même, Kyle *et al.* (1985) ont détecté *N. fowleri* dans des couches particulières en suspension dans un lac

en condition d'anoxie. Toutefois, Cerva *et al.* (1983) ont détecté *N. fowleri* dans des effluents de circuits de refroidissement avec des concentrations en oxygène dissous supérieures à 7,4 mg/L. Et Weik et John (1977) ont montré que *N. fowleri* ne se développait pas en atmosphère anaérobie.

Aucune relation n'a été mise en évidence entre l'oxygène dissous et *N. fowleri* dans les eaux d'un lac américain (Jamerson, 2009) et dans des eaux échauffées par des rejets industriels (Delattre et Oger, 1981).

**L'influence de l'oxygène dissous sur la présence de *N. fowleri* dans l'eau des sites de baignade n'a pas été validée par l'ensemble de la communauté scientifique.**

### 2.2.3 Salinité et conductivité

La tolérance au chlorure de sodium (NaCl) de *N. fowleri* est relativement faible. Selon Carter *et al.* (1970) des concentrations en NaCl telles que rencontrées dans les eaux de mer (35 g/L soit 3,5%) empêchent la multiplication de *Naegleria* spp. Griffin (1983) a montré par des tests *in vitro* la tolérance de *N. fowleri* à des teneurs de 0,5% et 1% de NaCl. Tiewcharoen *et al.* (2001) ont constaté *in vitro* un abattement partiel des trophozoïtes de *N. fowleri* à partir d'une concentration en NaCl de 1% et un abattement total au-delà de 3%.

Cerva *et al.* (1983) notent l'absence de détection de *N. fowleri* pour des conductivités supérieures à 614  $\mu\text{S}/\text{cm}$  dans des eaux de refroidissement industrielles. De même, Behets *et al.* (2007) ont montré que des conductivités supérieures à 2000  $\mu\text{S}/\text{cm}$  étaient défavorables à *Naegleria* spp dans des eaux de refroidissement industrielles.

Néanmoins, des cas de MEAP ont pu être détectés en Australie (Carter, 1968) chez des sujets qui avaient fréquenté des piscines alimentées en eau de mer.

**L'eau de mer ne permet pas la multiplication de *N. fowleri*.**

### 2.2.4 Hygrométrie

Des essais menés en laboratoire montrent que la dessiccation (26°C, humidité relative 22 %) est instantanément létale pour les trophozoïtes, et après 5 minutes pour les kystes. L'effet létal de la dessiccation est attribué à la perte de l'eau cytoplasmique conduisant à la dénaturation des protéines. La survie un peu plus longue des kystes peut probablement être expliquée par une résistance plus longue à cette perte d'eau grâce à la paroi kystique comparativement à la membrane cytoplasmique des trophozoïtes (Chang, 1978).

***N. fowleri* est sensible à la dessiccation.**

### 2.2.5 Métaux

Différentes études *in vitro* et *in situ* indiquent que le fer est nécessaire à la croissance de *N. fowleri* (Newsome et Wilhelm, 1981 et 1983).

Des chélateurs de fer (deferrioxamine B et acide rhodotorulique) d'origine microbienne (bactéries, levures, champignons, algues) ont un effet inhibiteur sur *N. fowleri in vitro* (Newsome et Wilhelm, 1983). Cette étude indique également que *N. fowleri* est rarement retrouvée pour des concentrations en fer inférieure à 0,5 mg/L.

L'étude de Kyle *et al.* (1985) montre que *N. fowleri* a été détectée dans une couche détritique de la colonne d'eau où du fer exogène était disponible. En revanche, Brown *et al.* (1983) rapportent que l'absence de croissance d'amibes libres pathogènes dans des eaux provenant de source d'eau chaude pourrait être due à des concentrations importantes en fer de 2,6 mg/L.

Cassells *et al.* (1995) ont montré en laboratoire l'absence d'inactivation significative de *N. fowleri* au contact de cuivre et d'argent à des ratios de 400 : 40 et 800 : 80 µg/L, même après 72 heures de contact.

**In vitro, la présence de fer semble favoriser la croissance de *N. fowleri*.**

## 2.2.6 Matières organiques et matières en suspension

Rodriguez-Zaragoza (1994) souligne l'importance, dans l'eau, de l'attachement des amibes libres à un support pour se nourrir et se développer. Il indique également que les eaux avec des quantités importantes de matières organiques permettent l'augmentation de la population bactérienne qui sert de ressource nutritive aux amibes libres et aux protozoaires de façon générale.

Une étude menée dans deux lacs de Caroline du Sud (États-Unis) a montré la présence d'amibes libres dont *N. fowleri* préférentiellement dans une couche particulière de la colonne d'eau riche en matières organiques en décomposition (Kyle et Noblet, 1985 et 1987). *A contrario*, Maclean *et al.* (2004) indiquent que la détection du pathogène est plus fréquente dans un étang recevant des eaux de ruissellement moins riches en matières organiques. De même, pour John *et al.* (1995), il semblerait que *N. fowleri* soit davantage isolée dans des eaux peu chargées en matières organiques.

Plusieurs auteurs rapportent une possible relation entre des événements pluvieux et la détection de *N. fowleri* dans les eaux de surface (John *et al.*, 1995 ; Brown *et al.*, 1983 ; Kyle *et al.*, 1985), soit par apport du pathogène à la suite du lessivage des sols, soit par l'agitation de l'eau conduisant à la remise en suspension de sédiments. En effet, Kyle et Noblet (1985) indiquent qu'en hiver, la distribution verticale des amibes libres dans la colonne d'eau de deux lacs de Caroline du Sud (États-Unis) est sporadique et non corrélée aux paramètres physico-chimiques, avec une détection d'amibes libres majoritairement en surface où une remise en suspension d'argiles s'est produite consécutivement au lessivage des sols après de fortes pluies.

**La matière organique présente dans les matières en suspension, les biofilms ou les sédiments favoriserait la présence de *N. fowleri* qui a besoin d'un support pour se nourrir et se développer.**

## 2.3 Influence des paramètres biologiques

### 2.3.1 Ressource nutritive bactérienne

Aussi bien dans le milieu naturel qu'en laboratoire, les bactéries constituent une base nutritive indispensable à la croissance de *N. fowleri* (Schuster et Visvesvara, 2004). En laboratoire pour permettre la croissance de *N. fowleri*, les géloses non nutritives sont recouvertes le plus souvent d'*Escherichia coli*, ou également d'*Enterobacter aerogenes* ou *Klebsiella pneumoniae* (Schuster et Visvesvara, 2004).

La présence de *N. fowleri* apparaîtrait plus fréquente dans les eaux avec des concentrations en coliformes totaux élevées (Sykora, 1983). De même, Kyle et Noblet (1987) indiquent que *N. fowleri* a été détectée dans une « couche détritique » formée consécutivement aux efflorescences algales, notamment riche en bactéries. Toutefois, dans une étude précédente (Kyle et Noblet, 1985), ces mêmes auteurs ont montré que le nombre d'amibes libres est corrélé positivement avec le nombre de bactéries (méthode de mesure non précisée) et avec l'atténuation (spectre 490-950 nm), l'atténuation apparaissant comme un meilleur indicateur de la distribution verticale des amibes libres dans la colonne d'eau d'un lac que la teneur en bactéries. Ettinger *et al.* (2003) décrivent une relation entre les bactéries coliformes fécales et les amibes libres lors de leur étude des populations amibiennes dans la rivière James (Virginie, États-Unis) recevant des effluents de stations d'épuration et des rejets d'égouts.

En revanche, Jamerson *et al.* (2009) indiquent l'absence de relation entre *N. fowleri* et la présence de coliformes et Maclean *et al.* (2004) soulignent que la température et la présence de coliformes ne sont pas les seuls facteurs influençant la présence du pathogène.

Plus récemment, Goudot *et al.* (2012) ont montré que la multiplication de *N. fowleri* dans un biofilm d'eau de rivière, reproduit en laboratoire, dépendait de la température (> 32°C) et de la quantité de bactéries disponibles au regard de l'abondance amibienne (ratio bactéries/amibes libres). Danso et Alexander (1975 cité par Brown *et al.*, 1983) ont également démontré qu'un seuil de densité bactérienne doit être atteint pour permettre la nutrition amibienne.

**La présence de *N. fowleri* semble plus fréquente dans les eaux au sein desquelles la population bactérienne est importante.**

### 2.3.2 Interaction de *N. fowleri* avec les bactéries

Outre le fait que les bactéries constituent la principale ressource nutritive de *N. fowleri*, des relations particulières peuvent exister entre certaines d'entre elles et les amibes libres.

Les amibes libres sont décrites comme un site essentiel de multiplication des *Legionella pneumophila* dans l'environnement (Lau et Ashbolt, 2009), *L. pneumophila* étant capable de résister à la digestion par l'amibe. La résistance de *L. pneumophila* aux amibes libres peut conduire à une résistance aux macrophages, car ces deux types cellulaires montrent des similitudes dans leur mécanisme de phagocytose (Molmeret *et al.*, 2005).

Concernant les études environnementales, plusieurs publications relatent que *L. pneumophila* et *Naegleria* (incluant *N. fowleri*) sont retrouvées dans les mêmes environnements, suggérant des interactions possibles (Declerck *et al.*, 2007; Hsu *et al.*, 2009; Hsu *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2011). Hsu *et al.* (2011) et Huang *et al.* (2011) retrouvent ces micro-organismes dans les eaux de sources et les bains de boues. Declerck *et al.* (2007) montrent cette présence simultanée dans des environnements naturels (lacs, mares, ruisseaux) ou artificiels (tours aéro-réfrigérantes (TAR)).

L'interaction entre *L. pneumophila* et *Naegleria*, ainsi qu'*Acanthamoeba*, a été décrite initialement par Rowbotham (1980) puis par Tyndall et Domingue (1982).

L'étude menée en laboratoire par Newsome (1985) montre que *L. pneumophila* est capable de se multiplier dans les vacuoles de l'amibe comme cela a été montré pour d'autres amibes.

Plus récemment, il a été montré en laboratoire le rôle de la température (entre 24 et 41°C) sur la croissance de *L. pneumophila* dans *N. fowleri* (Buse *et al.*, 2011). La tolérance à la température est dépendante des souches de *L. pneumophila* mais la multiplication dans *N. fowleri* peut être différente de celle constatée dans les autres amibes étudiées.

Enfin, une dernière étude de laboratoire a quantifié la croissance de *L. pneumophila* au sein de *N. fowleri* et *A. polyphaga* (Buse *et al.*, 2012). Elle confirme que la bactérie se multiplie dans *N. fowleri* mais moins que dans *A. polyphaga*.

**Bien que la présence de *L. pneumophila* n'ait pas été démontrée dans *N. fowleri* présente dans les échantillons environnementaux, l'infection de *N. fowleri* par des légionelles peut être envisagée au regard des études de laboratoire et de la relation des légionelles avec des amibes libres du même genre ou d'autres genres.**

La sécrétion de toxines amoebicides a été mise en évidence chez trois souches différentes de *Bacillus licheniformis* (Galvez *et al.*, 1994; Galvez, 1993; Lebbadi *et al.*, 1995). Ces toxines seraient des peptides cycliques hydrophobes produits durant la phase de sporulation des bacilles et semblent très résistantes à des pH extrêmes, à la chaleur et à l'action d'enzymes protéolytiques (Galvez, 1994). Ces toxines agiraient par perturbation de la structure de la membrane cytoplasmique des amibes, ainsi que par blocage des synthèses d'ADN et d'ARN (Lebbadi *et al.*, 1994). Elles sont relativement spécifiques des *Naegleria*,

n'ayant apparemment pas de toxicité vis-à-vis des amibes du genre *Acanthamoeba*, et peu de toxicité vis-à-vis des cellules mammifères testées (Lebbadi et al., 1994 ; Galvez et al., 1994).

La survie de différentes souches de *Vibrio cholerae* a été rapportée dans les trophozoïtes et les kystes de *Naegleria gruberi* (Thom et al., 1992), ainsi que la survie et un effet lytique de *Ralstonia pickettii* sur les trophozoïtes de *N. lovaniensis* (Michel et Hauröder, 1997).

Marciano-Cabral et al. (1987) (cités par Jamerson et al., 2009) ont montré l'enkystement de *N. fowleri* en présence de *Pseudomonas*.

La plupart des espèces de *Chlamydia* décrites ces dernières années sont capables de survivre et de se développer dans les amibes. L'une d'entre elles : *Protochlamydia naegleriophila*, a initialement été décrite chez *N. lovaniensis* mais peut également infecter de nombreuses autres espèces appartenant au genre *Naegleria* ou à d'autres genres amibiens (*Acanthamoeba*, *Hartmannella*, *Vahlkampfia*, *Dictyostelium*, *Balamuthia*, etc.) (Michel et al., 2000). Bien que l'interaction avec *N. fowleri* n'ait pas été directement testée, il est probable que *P. naegleriophila* puisse aussi infecter cette espèce. De manière similaire, la croissance de la *Chlamydia* environnementale *Simkania negevensis* a été rapportée chez *N. clarki* (Michel et al., 2005). Une autre espèce apparentée aux *Chlamydia* a été décrite chez une souche de *Naegleria* environnementale (espèce non précisée), et la bactérie était par ailleurs elle-même porteuse d'un phage (Michel et al., 2001).

**Il existe peu d'études sur l'inhibition de *N. fowleri* par les bactéries. La sécrétion de toxines amoebicides n'a été mise en évidence que chez *Bacillus licheniformis*. Plusieurs espèces de *Chlamydia* sont capables de survivre et de se développer dans les amibes libres.**

### 2.3.3 Relation de *Naegleria fowleri* avec d'autres populations amibiennes

#### 2.3.3.1 Occurrence des amibes libres

Des études menées dans des environnements aquatiques différents permettent d'identifier des amibes libres rencontrées simultanément à *N. fowleri*.

Une étude a été réalisée durant l'été sur différents écosystèmes de Virginie (États-Unis) : (i) des sols agricoles fertilisés ou non avec des boues d'épuration, (ii) un ruisseau recevant des eaux usées, (iii) un ravin recevant les eaux de ruissellement provenant d'un élevage, qui représentent des sources potentielles de contamination des eaux de baignades par les amibes libres pathogènes. Plusieurs espèces d'amibes ont été retrouvées dans l'ensemble des sols même si certains d'entre eux étaient éloignés d'une source d'eau. Dans cette étude, cinq espèces potentiellement pathogènes d'*Acanthamoeba*, ont été identifiés parmi d'autres non pathogènes mais *N. fowleri* n'a pas été retrouvée (Sawyer, 1989).

Une étude réalisée en Espagne au début des années 1990, dans une douzaine de bains à remous à visée thérapeutique, alimentés par des sources d'eau chaude sulfureuse (Penas-Ares et al., 1994) a mis en évidence, dans les trois quarts des bassins analysés, la présence simultanée de 5 souches de *Vahlkampfia* dont trois espèces ont pu être identifiées, deux souches de *Naegleria* non pathogènes et trois souches d'*Acanthamoeba* dont deux espèces pathogènes chez la souris ont pu être identifiées .

John et Howard (1995) ont prélevé mensuellement pendant un an des échantillons d'eau et de surfaces dans différents milieux aquatiques d'Oklahoma (États-Unis) : points d'eau pour bétail, étangs, terrains de golf. Après dépôt sur boîte de culture (après centrifugation pour les

échantillons d'eau uniquement), les amibes se développant après incubation à 42°C ont été soumises à un test de pathogénicité sur souris. Trente-quatre souches pathogènes pour l'Homme ou la souris ont été isolées sur les 2016 échantillons prélevés dont *N. australiensis* (38 %), *Acanthamoeba* (35 %), *N. fowleri* (18 %) et des leptomyxidés (9 %). *N. fowleri* a été détectée dans un seul des trois sites (terrain de golf) ; et sa détection n'a été concomitante avec une autre amibe libre pathogène que pour un échantillon sur trois, elle était alors associée à *N. australiensis*.

Tiewcharoen *et al.* (2001) ont mené une étude en 1998 visant à rechercher *N. fowleri* dans des eaux stagnantes échauffées autour de zones industrielles dans trois provinces thaïlandaises. Les résultats indiquent que *N. fowleri* représente 10% des amibes libres *Naegleria* spp (caractérisation morphologique et test de pathogénicité sur souris). Pour compléter ces observations, une proportion de 14 % *Naegleria* spp a été rapportée parmi la population d'amibes libres dans des eaux et des sols de Thaïlande (Nacapunchai *et al.*, 1999). Ces résultats tendent à montrer que malgré des conditions climatiques tropicales, *N. fowleri* n'est pas l'amibe libre prédominante.

Behets *et al.* (2007a) ont examiné des eaux de circuits de refroidissement de centrales électriques en Belgique entre juin et septembre de 2004 et 2005. Sur sept sites différents, cent vingt trois prélèvements ont été effectués. Après incubation à 44°C, différents tests ont été utilisés afin de réaliser l'inventaire amibien : la présence de *N. fowleri* peut être associée à celle de *N. lovaniensis* ou *N. australiensis*.

Par ailleurs, une recherche d'amibes libres a été réalisée par Edagawa *et al.* (2009) à Osaka sur les eaux de rivière (captage pour eau potable) et de stations d'épuration (STEP). Parmi la quinzaine d'espèces de *Naegleria*, *N. thihangensis* (22 %), *N. australiensis* (20 %), *N. pagei* (20 %) et *N. americana* (11 %) sont les espèces majoritairement rencontrées, les deux premières espèces étant les seules à avoir été isolées aussi bien à 30°C que 42°C. Aucune *N. fowleri* n'a été détectée.

Une étude en Suisse menée la même année et visant à tester une série d'eaux récréatives (lacs, rivière, étangs) de températures moyennes proches de 20°C a révélé la présence de différentes amibes libres y compris du genre *Naegleria*, mais pas l'espèce *N. fowleri* (Gianinazzi *et al.*, 2009).

Ithoi *et al.* (2011) ont isolé en Malaisie 41 souches de *Naegleria* après mise en culture d'échantillons d'eaux et de poussières isolées de piscines, eaux récréatives, mosquées et circuits d'air conditionné. Aucune *N. fowleri* n'a été détectée. Parmi les 41 isolats, une grande majorité (32/41) a été identifiée comme *N. philippinensis* ; deux souches de *Vahlkampfia* ont été identifiées.

Les résultats d'analyses réalisées par Lares-Villa (2010) et Hernandez-Pena (2010) au Mexique dans des zones aquatiques de loisirs en 2007 et 2008 dénombrent 10 % de *Naegleria* spp parmi les amibes libres thermophiles dont 20 % de *N. fowleri*.

Les recherches d'amibes libres thermophiles entreprises sur les sources chaudes de plusieurs sites de baignade à Taïwan ont révélé la présence de cinq espèces de *Naegleria* dont principalement *N. lovaniensis*, suivie de *N. australiensis*, *N. clarki*, *N. americana* et *N. pagei* sans pouvoir mettre en évidence *N. fowleri* (Huang et Hsu, 2010). La suite de cette étude dans le centre et le sud de Taïwan sur différentes sources et rivières aux températures élevées (entre 25 et 45°C) a mis en évidence d'autres espèces du genre *Naegleria* sans mettre en évidence *N. fowleri* (Huang et Hsu, 2011).

Enfin, des travaux menés récemment dans la région de Téhéran en Iran, sur différentes aires de baignade en rivières, ont mis en évidence la présence d'amibes libres dans l'eau,

dont 80 % d'*Acanthamoeba* et 20 % de *Naegleria*, mais pas de *N. fowleri* (Niyiyati *et al.*, 2012).

**Les résultats des études tendent à montrer que, malgré des conditions climatiques favorables, *N. fowleri* n'est pas l'amibe libre prédominante dans l'environnement.**

#### 2.3.3.2 Compétition amibienne

Griffin (1983) a recherché la présence de *N. fowleri* dans un large panel d'échantillons : rivières, étangs, ruisseaux, station de boues d'épandage, piscines, eau du robinet, *etc.* Cette étude a permis de mettre en évidence une distribution sporadique de *N. fowleri* qui est fortement concurrencée dans les eaux naturelles. En effet, l'auteur estime qu'il existerait une amibe libre thermophile pour 10 000 amibes libres isolées d'eaux naturelles à température ambiante. De plus, il ajoute que sur quarante échantillons positifs en amibes libres thermophiles, seulement deux échantillons étaient positifs en *N. fowleri*. Par ailleurs, il explique qu'une perturbation naturelle ou humaine de l'environnement (rejet d'eau échauffée, désinfection chlorée, *etc.*) peut éliminer une partie de la communauté de protozoaires dont certaines, en compétition avec *N. fowleri*, empêchaient son implantation dans le milieu. Leur élimination conduit alors à la création d'une niche « vide » qui peut être temporairement colonisée par *N. fowleri*, favorisée par sa capacité à flageller. Toutefois, l'auteur souligne que la détection de *N. fowleri* est rare et en faible concentration dans les environnements aquatiques peu échauffés, mais également en condition de température plus élevée, probablement en raison de sa faible vitesse de croissance et de sa faible capacité à s'imposer dans un habitat « mature » (microbiologiquement en équilibre) .

Detterline et Wilhelm (1991) ont mené une étude pour éprouver l'hypothèse de « l'habitat vide » de Griffin (1983). Cinquante-neuf échantillons d'eaux douces lenticules ou lotiques ont été prélevés en surface, dans des habitats très variés. L'objectif était d'établir une relation entre la présence de *N. fowleri* et un indice de perturbation du milieu, que la perturbation soit naturelle ou anthropique, et qu'elle soit thermique, chimique ou physique. Trois indices de perturbations ont été définis : 1) absence de perturbation, 2) perturbation de plus de trois ans avec un démarrage du retour à un état normal, 3) perturbation de moins de trois ans avec un environnement encore perturbé. Les perturbations peuvent être par exemple des rejets d'effluents échauffés de centrales thermiques, des rejets de sources d'eau chaude, des rejets de pesticides et d'engrais, les blooms algaux, la canalisation des rivières, la création de retenues d'eau artificielles, la formation de bras morts, *etc.* L'occurrence de *N. fowleri* est corrélée à la perturbation de l'environnement (présence de *N. fowleri* significative dans un environnement récemment perturbé = indice 3). Cette observation corrobore l'hypothèse de « l'habitat vide » de Griffin (1983). L'élimination des compétiteurs et des prédateurs serait hypothétiquement favorable à la présence de *N. fowleri*. La relation de *N. fowleri* avec ses compétiteurs est importante puisque dans 8 milieux sur 12 perturbés (indice 3), *N. fowleri* est peu présente voire absente alors que ses compétiteurs sont abondants, indiquant qu'une perturbation du milieu peut également être favorable à *N. lovaniensis* et *Acanthamoeba*. Toutefois, l'observation de Sykora *et al.* (1983) montrant que des eaux échauffées de manière relativement constantes abritent davantage de *Naegleria* spp non pathogènes que de *N. fowleri*.

**L'occurrence de *N. fowleri* serait hypothétiquement favorisée en cas de perturbation naturelle ou anthropique de l'environnement créant alors une niche vide exempte de compétiteurs que *N. fowleri* pourrait alors momentanément coloniser, avant que les équilibres microbiens ne s'établissent.**

### 2.3.4 Association avec les biofilms

*N. fowleri* est capable de survivre de façon prolongée en association avec les biofilms bactériens. Cela a été démontré par les travaux de Biyela *et al.* (2010, 2012), dans lesquels les auteurs étaient capables de retrouver *N. fowleri* jusqu'à cinq mois après son introduction dans des biofilms développés sur canalisations en laboratoire (alimentation en eau du robinet non chlorée) (Biyela *et al.*, 2010 et 2012). Les travaux de Goudot *et al.* (2012) sur des réacteurs de laboratoire montrent qu'un minimum de  $10^4$  bactéries par amibe est nécessaire pour pouvoir détecter une croissance de *N. fowleri* dans les biofilms d'eau de rivière, et que plus la température est élevée (32° à 42°C) plus la croissance des *N. fowleri* est importante (Goudot *et al.*, 2012). Les auteurs de cette étude observent aussi, qu'après une période de croissance en conditions favorables, *N. fowleri* finit tout de même par être remplacée par d'autres amibes thermophiles (Goudot *et al.*, 2012). *N. fowleri* a par ailleurs été détectée par la méthode d'amplification en chaîne par polymérisation (PCR) dans des échantillons de biofilms prélevés sur des réseaux d'eau potable réels (Puzon *et al.*, 2009), confirmant ainsi l'association avec les biofilms.

**Les équilibres amibiens dans les environnements naturels complexes sont probablement liés à la variation de multiples facteurs abiotiques et biotiques ; ces relations sont méconnues et il est nécessaire de les approfondir pour une meilleure prévention et une meilleure surveillance de l'environnement (Behets *et al.*, 2007).**

## 2.4 Efficacité des traitements biocides sur *Naegleria fowleri*

L'élimination des *N. fowleri* dans les eaux repose principalement sur les traitements chimiques. Les produits de désinfection chlorés sont les plus utilisés mais d'autres produits ou procédés ont pu être testés.

Il est difficile de comparer les résultats d'études d'inactivation d'amibes publiés dans la littérature car il n'existe pas de méthodologie standardisée permettant de reproduire les conditions expérimentales d'un laboratoire à un autre, et donc d'aboutir à des résultats comparables. Pour les amibes appartenant au genre *Acanthamoeba*, beaucoup plus étudiées que les *Naegleria*, il a été clairement démontré que les méthodes de culture des amibes, de production des kystes, de détermination de la viabilité des amibes exposées aux biocides ont une importance primordiale lors de l'évaluation de l'efficacité des produits de désinfection (Hughe *et al.*, 2003; Buck *et al.*, 2000). La virulence des *N. fowleri* étant elle aussi modifiée en fonction du milieu de culture utilisé (Toney *et al.*, 1994; Marciano-Cabral *et al.*, 1994; Wong *et al.*, 1977), il est probable que la composition du milieu joue aussi un rôle dans la formation de kystes plus ou moins matures et donc dans la résistance de ces kystes aux traitements de désinfection. Par ailleurs pour une espèce amibienne donnée, les souches testées peuvent présenter des niveaux de résistance très différents (Coulon *et al.*, 2010).

Les traitements doivent être évalués en fonction de l'objectif envisagé : éradication des trophozoïtes pour éliminer le risque infectieux (piscines, eaux de baignade, *etc.*), ou éradication des kystes pour éviter la persistance de cette amibe pathogène dans différents environnements (rivières, réseaux de distribution, *etc.*). Dans l'environnement naturel (eaux de surface, *etc.*) ou artificiel (réseaux de distribution, *etc.*) les amibes, et notamment *N. fowleri* sont associées au biofilm bactérien (Biyela, 2010 ; Goudot *et al.*, 2012) qui peut conférer une protection vis-à-vis de l'action des désinfectants. Ce phénomène de protection rend nécessaire des études de validation des désinfectants en conditions réelles ou sur des pilotes reproduisant des conditions réelles, plutôt qu'en laboratoire dans des conditions peu représentatives de la réalité. Ces remarques préliminaires doivent être prises en compte lors de la consultation des résultats rapportés ci-dessous.

## 2.4.1 Chlore

L'action microbicide du chlore est très dépendante des conditions physico-chimiques locales (pH, température, teneur en matières organiques, *etc.*) qui modifient de façon importante les proportions des différents dérivés chimiques générés lors de l'hydrolyse du chlore. Parmi ces dérivés, le chlore actif (acide hypochloreux HClO) possède l'activité microbicide la plus élevée mais peut facilement réagir avec des molécules organiques présentes dans l'eau à traiter, diminuant sa disponibilité pour l'action microbicide. Ainsi l'incapacité d'un choc chloré à la dose de 10 mg/L à éradiquer les *N. fowleri* dans une piscine, décrite par Anderson et Jamieson en 1972, est sans doute due à l'absence de prise en compte de la demande en chlore, c'est-à-dire le chlore consommé par réaction avec les molécules organiques, la température élevée, *etc.* (Dorsch, 1982). En revanche, ces mêmes auteurs rapportent qu'une salinisation de l'eau à 0,7 % (p/v) sans chloration supplémentaire a permis d'éradiquer la contamination par *N. fowleri* (Anderson et al., 1972).

### 2.4.1.1 Études menées en laboratoire

#### Trophozoïtes

Des études plus documentées menées en laboratoire par Derreumaux *et al.* ont permis de montrer qu'une concentration minimale de 0,5 mg/L de chlore actif devait être maintenue dans de l'eau distillée afin d'inactiver les trophozoïtes de *N. fowleri* (Derreumaux et al., 1974). Sur la base de ces études semi-quantitatives (trophozoïtes survivants non dénombrés précisément), les auteurs préconisent donc de maintenir en permanence une concentration de 0,5 à 1 mg/L de chlore actif dans les eaux de piscines afin de se prémunir du risque de contamination amibienne (Derreumaux et al., 1974).

De manière relativement similaire, Cursons *et al.* rapportent que des concentrations de 0,74 mg/L de chlore libre permettent d'inactiver  $1,9 \cdot 10^4$  trophozoïtes de *N. fowleri* en suspension dans du tampon phosphate 0,01M en 30 min (pH 7,0 à 25°C) (Cursons et al., 1980). Les travaux de thèse de Sarkar ont permis de déterminer que l'exposition des trophozoïtes de *N. fowleri* à 1 mg/L de chlore libre résiduel dans de l'eau tamponnée (pas de demande en chlore) permettait d'inactiver  $10^2$ ,  $10^3$  et  $10^4$  trophozoïtes en 6, 9 et 12 min (pH 7,5 à 25°C) (Sarkar, 2008). Les résultats obtenus pour inactiver  $10^2$  trophozoïtes sont identiques à ceux de Cassels *et al.* (1995). Quand le pH était augmenté à pH 9,0, ces durées passaient respectivement à 18, 23 et 27 min.

Les valeurs passaient à 10, 14 et 19 min lorsque les essais étaient menés sur une eau d'origine souterraine (pH 8,2, 31°C, présence de matières organiques), non stérilisée et dopée en trophozoïtes de *N. fowleri* (Sarkar, 2008 ; Sarkar et Gerba, 2012).

Une étude thaïlandaise rapporte quant à elle une concentration minimale de 1 mg/L de chlore libre résiduel (pH 7,3 à 25°C) nécessaire pour inactiver  $10^3$  trophozoïtes de *N. fowleri* en 1 h (Tiewcharoen et Junnu, 1999). Ces derniers essais présentent l'intérêt d'avoir testé plusieurs souches de *Naegleria* : trois souches cliniques (probablement *N. fowleri*) et une souche de *N. fowleri* de référence (souche CDC VO3081). Cependant les expositions au chlore ont apparemment été réalisées en présence de milieu de culture contenant du glucose, de l'extrait de foie et du sérum (milieu de Nelson). En comparaison avec les travaux de Sarkar dans lesquels les trophozoïtes étaient repris en eau avant exposition au chlore, cette différence peut expliquer la durée d'exposition plus importante pour arriver au même abattement en exposant à 1 mg/L de chlore libre (Sarkar, 2008).

Les travaux de Dawson et Brown ont consisté à tester l'efficacité de la décontamination des trophozoïtes de *N. fowleri* (plusieurs souches), de *N. gruberi* (1 souche) et d'*Acanthamoeba* spp par le chlore en présence de bactéries et de matières organiques, ceci afin de simuler un peu mieux les conditions réelles rencontrées dans les environnements contaminés, notamment des demandes en chlore plus ou moins importantes (Dawson et Brown, 1987). Par ailleurs avant d'être exposées au chlore les amibes étaient cultivées en bouillon stérile ou en présence de bactéries. Cette différence de conditionnement des trophozoïtes avant exposition au chlore ne semblait pas jouer un rôle important car les mêmes résultats

d'inactivation étaient généralement obtenus quelle que soit la méthode de production des trophozoïtes. Quand  $10^5$  bactéries / mL étaient ajoutées au moment de l'exposition au chlore, plus de  $1,5 \cdot 10^4$  trophozoïtes de *N. fowleri* et *N. gruberi* étaient inactivés par 1,5 mg/L de chlore total en 30 min, tandis que 3,0 mg/L étaient nécessaires pour *Acanthamoeba* spp. En présence de 0,1 % de matières fécales bovines et sans ajout de bactéries, 3 à 4,5 mg/L de chlore total devenaient nécessaires pour inactiver plus de  $1,5 \cdot 10^4$  trophozoïtes de *Naegleria* en 30 min; dans ces mêmes conditions 30 % des *Acanthamoeba* survivaient même en présence de 8 mg/L de chlore total. En présence de 0,4 % de matière fécale bovine, 6 mg/L de chlore total ne permettaient d'éliminer que 80 à 85 % des trophozoïtes de *Naegleria* exposés et environ 40 % des trophozoïtes d'*Acanthamoeba* en 30 min. Si 0,1 % de matières fécales bovines ainsi que  $10^5$  bactéries / mL étaient ajoutées au moment de l'exposition, 4,5 mg/L et 6 mg/L de chlore total permettaient d'inactiver tous les trophozoïtes de *Naegleria* et d'*Acanthamoeba* respectivement, en 30 min. Ces résultats prouvent clairement l'importance cruciale de la demande en chlore de l'eau traitée.

### Kystes

De Jonckheere et Van de Voorde (1976) notent qu'une concentration de 0,5 mg/L de chlore libre permet d'inactiver  $10^4$  kystes de *N. fowleri* en une heure (pH 7,3, 25°C) et qu'une concentration de 2 mg/L permet de réduire cette durée à 15 min. À titre d'information, les kystes d'*Acanthamoeba* testés dans cette même étude se sont révélés beaucoup plus résistants. Chang (1978) présente l'intérêt d'avoir testé l'efficacité du chlore sur les kystes provenant de trois souches différentes de *N. fowleri*. L'auteur démontre une sensibilité comparable des trois souches testées et une relation linéaire entre l'abattement constaté et la durée d'exposition à une concentration donnée de chlore libre résiduel (pH 7,2 à 25°C). En appliquant cette relation linéaire, l'auteur calcule que  $10^4$  kystes seront théoriquement inactivés par exposition pendant approximativement 10 min à une concentration de 5 mg/L de chlore libre résiduel, en 25 min à une concentration de 2 mg/L, et en 50 min à une concentration de 1 mg/L (Chang, 1978). Lors d'expérimentations menées sur une souche de *N. gruberi*, Rubin *et al.* (1983) ont constaté que la relation entre l'abattement et la durée d'exposition à une concentration donnée de chlore libre résiduel présentait d'abord une allure courbe durant les premières minutes d'exposition, avant de devenir linéaire. Cet « épaulement » pourrait être le temps nécessaire pour la pénétration du chlore actif au travers de la paroi du kyste amibien. L'étude rapporte qu'une dose théorique de chlore libre résiduel de 1,2 mg/L est nécessaire pour inactiver  $10^3$  kystes de *N. gruberi* en 10 min (pH 7, 25°C). Enfin, les travaux de thèse de Sarkar rapportent que l'exposition des kystes de *N. fowleri* à 1 mg/L de chlore libre résiduel permet d'inactiver  $10^2$ ,  $10^3$  et  $10^4$  kystes en 31, 42 et 53 min à pH 7,5 (25°C), ces durées passant respectivement à 37, 50 et 62 min à pH 9 (25°C) (Sarkar, 2008). Les valeurs passaient à 25, 35 et 44 min lorsque les essais étaient menés sur une eau d'origine souterraine à pH 7,4 (28°C), et à 40, 48 et 56 min lorsque les essais étaient menés sur une eau d'origine souterraine à pH 8,0 (38°C) (Sarkar, 2008 ; Sarkar et Gerba, 2012).

#### 2.4.1.2 Études de terrain

Les analyses de la qualité des eaux des piscines menées par Esterman *et al.* (1984b) en Australie ont permis aux auteurs de mettre au point un modèle mathématique de prédiction de la présence d'amibes en fonction des paramètres physico-chimiques et microbiologiques relevés. Une concentration de 1 mg/L de chlore libre est retenue comme valeur seuil permettant de limiter le risque de colonisation par les *Naegleria*. Les auteurs signalent cependant que cette concentration est trop faible pour empêcher la colonisation par d'autres amibes éventuellement pathogènes (*Acanthamoeba* spp). Par ailleurs le modèle mathématique a été mis au point à partir d'une analyse de la présence des *Naegleria* totales car aucune *N. fowleri* n'a été isolée durant cette étude. Il n'est donc pas complètement sûr que le modèle puisse directement s'appliquer à *N. fowleri*.

L'acide cyanurique, fréquemment utilisé comme stabilisant du chlore dans les piscines, aurait un effet négatif sur l'action du chlore sur les kystes de *N. gruberi*, ceci par formation de cyanurates chlorés qui sont inactifs sur les kystes et qui pourraient même réagir avec les kystes pour les rendre plus résistants au chlore actif (HOCl) (Engel et *al.*, 1983). Il faut cependant souligner que ces résultats n'ont été décrits que dans une étude et sont donc sujets à caution.

Tableau II: Efficacité de différents désinfectants sur les kystes de *N. fowleri* et *Naegleria* spp (adapté de Loret et Greub, 2010).

Désinfectant	Espèce	Souches	Température (°C)	pH	Ct 99% (mg min/L)	Référence
Chlore	<i>N. fowleri</i>	HB1	25	7,3–7,4	9–24*	(De Jonckheere et Van de Voorde, 1976)
	<i>N. fowleri</i>	ATCC 30894	25	7,5	31	(Sarkar, 2008)
	<i>N. fowleri</i>	HB1	25	7,2–7,3	28*	(Chang, 1978 )
	<i>Naegleria</i> spp (pathogènes)	TY, A1	25	7,2–7,3	28*	(Chang, 1978 )
	<i>N. gruberi</i>	1518/1e	25	7,3–7,4	9–30*	(De Jonckheere et Van de Voorde, 1976)
	<i>N. gruberi</i>	NEG	25	7	12.1	(Rubin et al., 1983)
Dioxyde de chlore	<i>N. fowleri</i>	2 souches	25	8–9	0,9–1,2*	(Pringuez et al., 2001)
	<i>N. gruberi</i>		25	7	5.5	(Chen et al., 1985)
	<i>N. lovaniensis</i>		25	8–9	1,7–2,7*	(Pringuez et al., 2001)
Monochloramine	<i>N. fowleri</i>	2 souches	25	8–9	44,5–51,6*	(Pringuez et al., 2001)
	<i>N. lovaniensis</i>		25	8–9	23–30*	(Pringuez et al., 2001)
	<i>N. lovaniensis</i>	ATCC 3011	25	7–9	118–237*	(Ercken et al., 2003)
Ozone	<i>N. gruberi</i>	NEG	25	7	1,3	(Wickramanayake et al., 1984 )
	<i>N. gruberi</i>	1518/1d	25	7	1,6*	(Langlais et Perrine, 1986)
	<i>N. gruberi</i>	Echirolles	25	7	<1,6*	(Langlais et Perrine, 1986)
	<i>N. spp</i>	MO5	25	7	<1,6*	(Langlais et Perrine, 1986)
	<i>N. spp</i>	Cl10	25	7	<1,6*	(Langlais et Perrine, 1986)
	<i>N. spp</i>	An24	25	7	<1,6*	(Langlais et Perrine, 1986)
	<i>N. fowleri</i>	0359	25	7	<1,6*	(Langlais et Perrine, 1986)

\* Estimations basées sur les références citées

## 2.4.2 Dioxyde de chlore

Le dioxyde de chlore ( $\text{ClO}_2$ ) a été testé en laboratoire sur des trophozoïtes de *N. gruberi* et de *N. fowleri* (Cursons et al., 1980), et sur les kystes de *N. gruberi* (Chen et al., 1985). L'un des avantages de cette molécule est qu'elle est plus active que le chlore à pH alcalin. Dans l'étude de Cursons et al., l'exposition des trophozoïtes à des concentrations résiduelles de dioxyde de chlore de 0,25 mg/L pendant 30 min (pH 7, 25°C) permettait de passer de  $1,9 \times 10^4$  à moins de 50 trophozoïtes / mL. Dans les travaux de Chen, l'exposition à 0,35 mg/L de  $\text{ClO}_2$  résiduel permettait d'inactiver 99 % des kystes de *N. gruberi* en 14,2 min, cette durée tombant à 4 min lors de l'exposition à 1,26 mg/L de  $\text{ClO}_2$  résiduel (pH 7, 25°C). L'augmentation du pH augmentait l'efficacité du  $\text{ClO}_2$  sur les kystes. Les travaux de Dawson menés afin de comparer l'efficacité du chlore et du dioxyde de chlore sur les trophozoïtes de *Naegleria* et d'*Acanthamoeba* en présence de matière organique et/ou de bactéries montrent que le  $\text{ClO}_2$  requiert une concentration plus importante que le chlore pour une efficacité comparable. Par ailleurs certaines souches de *N. fowleri* semblent plus résistantes que d'autres au traitement  $\text{ClO}_2$  (Dawson et Brown, 1987).

## 2.4.3 Dérivés halogénés

D'autres dérivés halogénés ont été évalués vis-à-vis des *Naegleria* mais les études publiées sont très peu nombreuses, rendant difficile toute conclusion définitive quant aux doses efficaces. La monochloramine a été testée en laboratoire sur des kystes de *N. lovansensis* (Ercken et al., 2003). Des concentrations allant de 3,9 mg/L (à 35°C) à plus de 7,9 mg/L (à 15 et 25°C) étaient nécessaires pour inactiver  $10^3$  kystes. Les modifications de pH (7 à 9) ne modifiaient pas ces valeurs. La monochloramine est utilisée à une dose de  $0,25 \pm 0,05$  mg/L afin de limiter les rejets d'amibes pathogènes dans les effluents de centrales de production d'électricité. Dans l'étude de Chang et al., l'iode (pH 6, 25°C) semble efficace contre les kystes de *N. fowleri* et l'auteur calcule que 7,1 mg/L d'iode doivent permettre d'inactiver  $10^4$  kystes en un peu plus de 5 min, 5,4 mg/L en un peu moins de 10 min, 3,4 mg/L en environ 15 min et 1,6 mg/L en plus de 30 min (Chang, 1978). Ces résultats sont confirmés par De Jonckheere et al. qui mentionnent qu'après 24h d'incubation en présence de 2 mg/L d'iode dans une « eau de piscine reconstituée », les kystes de *N. gruberi* sont inactivés (De Jonckheere et Van de Voorde, 1976).

## 2.4.4 Ozone

L'ozone est un oxydant puissant utilisé pour traiter un volume limité d'eau circulante. La décomposition de l'ozone dans l'eau est très influencée par la présence de matière organique et il n'y a pas ou très peu d'activité résiduelle. Par ailleurs l'activité microbicide de l'ozone diminue à basse température. L'exposition de trophozoïtes de *Naegleria* à une concentration de 0,4 mg/L d'ozone pendant 4 min a permis d'inactiver environ  $10^4$  trophozoïtes (pH 7, 25°C, différentes souches, dont *N. gruberi* et *N. fowleri*) (Langlais et al., 1986). Ces mêmes conditions d'exposition se sont avérées efficaces sur les kystes de *Naegleria*, ainsi que sur des kystes d'*Acanthamoeba* et d'*Hartmannella* (Langlais et al., 1986). Les travaux de Wickramanayake et al. ont rapporté une efficacité comparable de l'ozone sur les kystes de *N. gruberi*, avec cependant un effet défavorable d'une augmentation du pH (pH 9) ou d'une diminution de la température (Wickramanayake et al., 1984). Les essais de Cursons sur trophozoïtes de *N. gruberi* et de *N. fowleri* montrent aussi une bonne efficacité : passage de  $1,9 \times 10^4$  à 20 trophozoïtes après exposition pendant 30 min. La méthodologie employée dans cette étude n'est pas très claire mais les valeurs de concentrations d'ozone rapportées permettent de supposer que les auteurs ont procédé à une brève injection d'ozone permettant d'atteindre très rapidement une concentration de 6,75 mg/L, puis ont laissé les trophozoïtes en incubation pendant 30 min sans réinjecter d'ozone supplémentaire, avec pour conséquence une concentration très faible d'ozone résiduelle en fin d'incubation (0,08 mg/L).

### 2.4.5 Autres traitements de désinfection chimique

L'acide peracétique a été testé sur des kystes de *N. lovaniensis* (Ercken et al., 2003). Son efficacité diminuait si le pH et/ou la température augmentaient, avec des concentrations minimales de 5,3 à plus de 13,2 mg/L requises pour éliminer 10<sup>3</sup> kystes en 30 min (température variant de 15 à 35°C et pH de 7 à 9). Des concentrations relativement similaires ont été rapportées par Kilvington qui a exposé des trophozoïtes et des kystes de *N. fowleri* à l'acide peracétique pendant 2 à 18 h à pH 6,9 ou 8,0 (Kilvington, 1990).

### 2.4.6 Les rayonnements ultraviolets

Les rayonnements ultraviolets (UV) agissent notamment par induction de dimères de thymine empêchant le fonctionnement de l'ADN polymérase. Il semblerait que les amibes possèdent de bonnes facultés de réparation des lésions induites par les UV à l'ADN car des expositions relativement importantes sont nécessaires pour obtenir une inactivation : Sarkar et al. ont rapporté qu'une exposition à 126 J/m<sup>2</sup> était nécessaire pour inactiver les trophozoïtes de *N. fowleri*, passant à 630 J/m<sup>2</sup> pour inactiver les kystes (Sarkar, 2008 ; Sarkar et Gerba, 2012). Les auteurs signalent, à titre de comparaison, que l'inactivation des oocystes de *Cryptosporidium* requiert seulement 100 J/m<sup>2</sup>. Une exposition à 600 J/m<sup>2</sup> est généralement utilisée dans les centrales de production d'électricité pour inactiver les amibes pathogènes éventuellement présentes dans les effluents. Signalons enfin qu'un article de De Jonckheere rapporte que des *N. lovaniensis* ont été isolées à partir de piscines thérapeutiques traitées aux UV mais que le peu d'indications données ne permet pas de savoir si les traitements UV étaient appliqués correctement ou non (De Jonckheere, 1982).

**En comparaison de la plupart des amibes libres de l'environnement, l'espèce *N. fowleri* ne semble pas particulièrement résistante aux traitements chimiques usuels de désinfection de l'eau potable. Une concentration en chlore libre résiduel de 1 mg/L semble suffisante pour inactiver les trophozoïtes (forme infectante) à condition que la charge en matières organiques de l'eau ne soit pas trop élevée. La résistance des kystes aux rayonnements UV nécessite une exposition à 600 J/m<sup>2</sup> pour les inactiver.**

## 3 La pathologie : méningo-encéphalite amibienne primitive

L'infection due à *N. fowleri* conduit à une méningo-encéphalite amibienne primitive aiguë ou MEAP (Marciano-Cabral, 1988 ; Marshall, 1997 ; Trnkova, 2008 ; Trabelsi, 2012). La MEAP est une maladie à progression rapide qui entraîne habituellement la mort en quelques jours. La plupart des infections à *N. fowleri* surviennent chez des enfants (Barnett, 1996 ; Dempe, 1982 ; Venkatesh, 1979 ; Trabelsi, 2012) et de jeunes adultes (Grundi, 1968 ; Nicoll, 1973 ; Gupta, 2009 ; Tuppeny, 2011) qui ont été récemment exposés au micro-organisme pendant une activité de nage ou de plongée dans des eaux douces chaudes.

La découverte d'anticorps chez des personnes saines ou d'un portage asymptomatique laisse penser que l'infection par *N. fowleri* peut être asymptomatique ou d'évolution spontanément favorable (Ugonabo et al., 1989 ; Rivera et al., 2001 ; Cerva et al., 1989 ; Dubray et al., 1987 ; Marciano-Cabral et al., 2007 ; Cursons et al., 1980).

### 3.1 Épidémiologie

Le tableau de l'annexe 3 décrit une partie des cas de MEAP dus à *N. fowleri* recensés depuis les années 1970. Il apparaît que le mode d'exposition principal à *N. fowleri* est l'exposition via des activités aquatiques (natation, plongeon, bains, ski nautique, etc.). Bien que les études ne décrivent pas précisément les sites où sont pratiquées ces activités, il semble que les lieux de baignades soient des sites alimentés par des eaux superficielles non traitées (lac, mare, canal d'irrigation, rivière) dont la température de l'eau est proche ou supérieure à 30°C.

Quelques cas ont été également recensés dans des baignades dont la ressource est une résurgence chaude (cas de la Guadeloupe) ou en piscine. Quelques cas consécutifs à des lavages sinusiens avec de l'eau destinée à la consommation humaine contaminée et survenus en Louisiane, ont été publiés (Yoder, 2012).

Sur la base de la bibliographie listée en annexe 3, une cartographie des cas a pu être établie (Figure 2). La distribution des cas est mondiale et les infections apparaissent dans les pays tempérés et dans les pays tropicaux. Elles sont contractées majoritairement durant la période estivale, de mai à septembre.

La figure 3, construite sur la base du tableau de l'annexe 3, confirme que les individus les plus exposés sont les enfants et les jeunes adultes. L'âge médian des cas répertoriés dans ce rapport est de 13,5 ans. Les infections sont généralement observées chez des individus de sexe masculin mais plusieurs cas d'infection chez des sujets féminins de tous âges ont également été décrits.



Figure 2 : Répartition mondiale des cas de MEAP dues à *Naegleria fowleri*

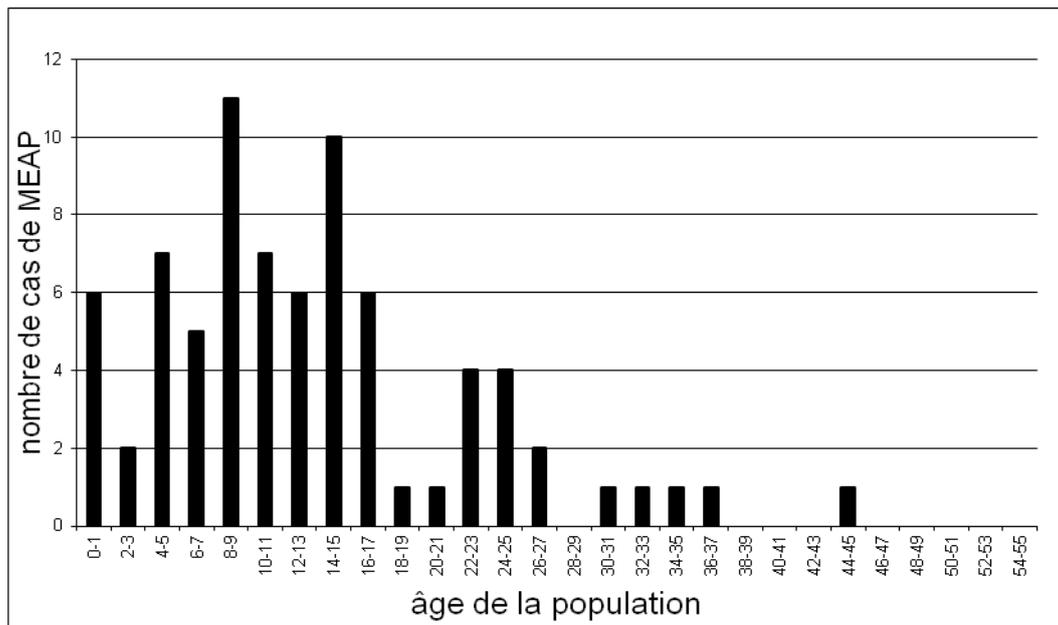


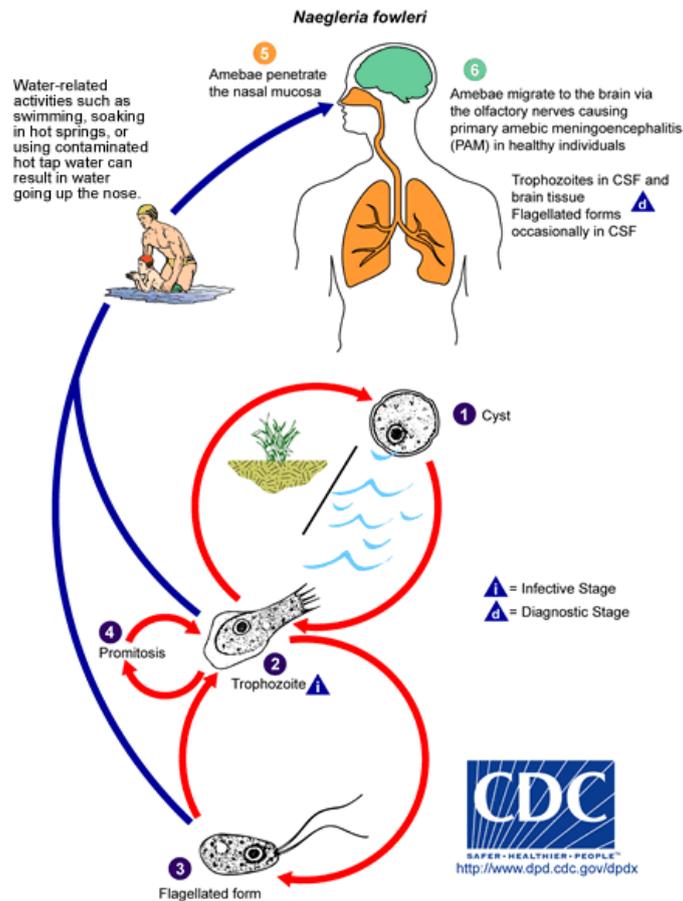
Figure 3 : Répartition des cas rapportés de MEAP en fonction de l'âge

***N. fowleri* est présent dans les pays tempérés et tropicaux. Les sujets les plus couramment infectés sont des enfants et des jeunes adultes de sexe masculin.**

### 3.2 Physiopathologie de l'infection

*N. fowleri* pénètre l'organisme à travers les cavités de la muqueuse nasale (Visvesvara, 2010 ; Trabelsi, 2012). Les amibes sont aspirées dans les voies nasales et, migrent, après fixation sur la muqueuse, à travers la fosse olfactive pour atteindre la lame criblée en suivant le trajet des nerfs olfactifs. Elles atteignent ensuite le cerveau causant des dommages importants dans le lobe frontal.

Au-delà du mode de contamination par la baignade, le succès de l'infection est aussi lié au fait que la lame criblée est relativement plus poreuse chez les sujets jeunes.



**Figure 4 : *Naegleria fowleri* : pathogénèse et cycle de vie**

*N. fowleri* présente trois stades de son cycle de vie : le kyste (1), le trophozoïte amiboïde (2), et la forme flagellée (3). Le stade infectieux de l'amibe est le trophozoïte de 10-35 µm de long avec un aspect granuleux et un noyau unique. Ils se reproduisent par division binaire au cours de laquelle la membrane nucléaire reste intacte, un processus appelé promitose (4). Les trophozoïtes infectent les humains ou les animaux en pénétrant le tissu nasal (5) et la migration vers le cerveau (6) via les nerfs olfactifs entraînant une méningo-encéphalite amibienne primaire (MEAP).

(source : CDC<sup>2</sup>)

La souris, le singe, le cobaye, le mouton et le lapin ont été utilisés comme modèles d'étude de la physiopathologie des MEAP (Marciano-Cabral, 2007 ; Bardn, 2012). Bien que ces animaux de laboratoire aient prouvé leur sensibilité à l'infection, le modèle souris est le plus largement utilisé en raison de sa facilité de manipulation et de sa capacité à développer une maladie mortelle qui ressemble à la MEAP chez l'Homme.

La dose infectante de *N. fowleri* chez l'Homme n'est pas connue. Lors d'essais chez la souris, 10<sup>4</sup> amibes injectées par voie intra nasale, conduisent à la mort des animaux en quelques jours (Kim, 2013). La période d'incubation varie de 1 à 14 jours (Hannisch et Hallagan, 1997). Dès 24 h après l'inoculation, la présence de foyers inflammatoires et d'amibes est observée dans le nerf plexus sous-muqueux, les nerfs olfactifs qui traversent la lame criblée, et le bulbe olfactif du cerveau (Jarolim, 2000 ; Rojas-Hernandez, 2004). Les trophozoïtes se retrouvent par la suite (après 96 et 120 heures) dans le tissu conjonctif entourant les vaisseaux sanguins et les sutures, et dans les sinusoides veineux entre les plaques osseuses du crâne (Jarolim, 2002). Lors de la migration vers le cerveau, *N. fowleri* doit traverser l'épithélium et rentrer en contact avec des composants (glycoprotéines et protéoglycanes) de la matrice extracellulaire (Jarolim, 2000) à travers des points focaux

<sup>2</sup> [http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Frames/A-F/FreeLivingAmebic/body\\_FreeLivingAmebic\\_naegleria.htm](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Frames/A-F/FreeLivingAmebic/body_FreeLivingAmebic_naegleria.htm)

d'adhérence dans lesquels certaines protéines amibiennes spécifiques sont retenues (Jamerson, 2012).

**La souris reproduit les étapes essentielles de la physiopathologie due à *N. fowleri*. Ce modèle reflète la MEAP chez l'Homme.**

Bien que le modèle souris soit pertinent, une analyse détaillée des différentes étapes de la pathogénèse de MEAP et la mise en évidence du rôle de la réponse immunitaire de l'hôte contre *N. fowleri* sont à ce jour incomplètes. Une des raisons est que les isolats d'amibes pathogènes provenant de patients atteints de MEAP ont tendance à perdre leur virulence en culture *in vitro*. Tel est l'exemple de la souche LL en culture axénique qui, après dix ans de maintien en culture, a perdu son pouvoir pathogène chez la souris ; des trophozoïtes viables sont d'ailleurs retrouvés dans le cerveau de certains animaux (Dempe, 1982). Aucune des souris survivantes n'a montré de symptômes cliniques de la maladie.

Cette variabilité dans la pathogénicité peut être due à la coexistence supposée des amibes plus ou moins virulentes au sein de la même souche (Dempe, 1982). Cependant, il semble que la perte du caractère pathogène soit plus complexe que le simple mélange de souches car la virulence peut être restaurée ou augmentée par le passage sur des cellules de cerveau de souris (Marciano-Cabral, 1988) ainsi que par plusieurs passages dans des cultures de tissus, ou même en cultivant ces amibes sur des monocouches de tissus (Visvesvara, 2010). Il a été suggéré que des changements au niveau de la régulation de l'expression génétique ont lieu pendant le changement de virulence (Yun, 2002). La viabilité ainsi que le caractère virulent de *N. fowleri* sont maintenus par congélation pendant de nombreuses années (John, 1996a et 2006). Récemment, des variations de la pathogénicité ont également été observées lors de la croissance de *N. fowleri* dans des milieux synthétiques de compositions différentes (Burri, 2012).

Les systèmes de culture *in vitro* ont permis d'étudier la pathogénèse de MEAP en analysant les éléments participant à l'interaction trophozoïtes-cellules isolées d'un neuroblastome humain (Tiewcharoen, 2008a et b). Après adhésion, les trophozoïtes détruisent les cellules par phagocytose et action cytolitique des enzymes sécrétées (John, 1984). Des glycoconjugués présents à la surface des amibes participent à l'adhérence de *N. fowleri* et aux dommages qui en découlent sur les cellules épithéliales (Cervantes-Sandoval, 2008 2009, 2010). Un large éventail de protéines est associé à la cytotoxicité médiée par *Naegleria* (Marciano-Cabral, 2007) : deux amibapores, naegleriapores A et B (Herbst *et al.* 2004 ; Herbst *et al.*, 2002), l'actine (Sohn *et al.*, 2010), une cystéine protéase, qui catalyse la dégradation *in vitro* des protéines de la matrice extracellulaire (Kim 2009 ; Aldape *et al.*, 1994), la protéine du choc thermique 70 importante pour la viabilité (Song, 2008) et une protéine (Nf314) présentant des homologies avec une serine carboxypeptidase (Hu *et al.* 1991 ; Hu *et al.* 1992). Le rôle exact de ces protéines n'est pas encore complètement élucidé et de nouveaux facteurs restent à identifier. Les cellules épithéliales sont par la suite activées et la production des molécules réactives de l'oxygène est augmentée conduisant ainsi à la mort cellulaire (Cervantes-Sandoval, 2009). Un mécanisme de mort de type apoptotique est observé pour les cellules (Kim, 2008). Dans certains cas, en absence d'adhérence aux cellules, des produits sécrétés par les amibes peuvent induire une mort cellulaire avec la production de molécules réactives de l'oxygène (Song, 2011). De plus, la locomotion de *N. fowleri* est augmentée par l'importance de la surface de contact, suggérant que la complexité des tissus pouvait augmenter la dispersion de l'amibe à partir d'un site d'infection (Price, 1995).

**L'adhérence des amibes aux cellules humaines ainsi que des facteurs sécrétés sont des éléments clés de la pathogénèse.**

### 3.3 Mécanismes d'inflammation et réponse immunitaire

Les moyens de lutter contre l'infection par *N. fowleri* sont limitées en raison de la progression rapide de la maladie et du développement de stratégie que *N. fowleri* a développé pour échapper au système immunitaire (Marciano-Cabral, 2007). L'impact en santé publique de ces amoebo-flagellés de vie libre ne doit pas être sous-estimé. En effet, ce sont des agents de maladies humaines et des réservoirs de bactéries pathogènes.

Pour étudier la mise en place de marqueurs de l'inflammation, l'interaction amibe-cellules a été utilisée avec des cellules humaines de type astrogliales, qui servent de support aux neurones et participent à la formation de la barrière hémato-encéphalique. Il a été montré que *N. fowleri* est un puissant inducteur de l'interleukine-8 (marqueur pro-inflammatoire) à travers l'activation de protéines kinases et l'activation du complexe de facteurs de transcriptions AP-1 facteur de transcription activateur protéine-1 (AP-1) (Kim, 2012). De plus, les cellules microgliales, qui sont la principale défense immunitaire active du système nerveux central, co-cultivées avec *N. fowleri* sécrètent aussi des cytokines pro-inflammatoires (OH, 2005). Ces données montrent que les cellules cibles sont rapidement activées par la présence de *N. fowleri*.

Plusieurs axes de recherche ont mis l'accent sur le rôle de l'immunité à médiation cellulaire dans la résistance de l'hôte à une MEAP. Les neutrophiles à partir de souris immunisées avec *N. fowleri*, sont par exemple capables de tuer les amibes, et un facteur d'inhibition chez le macrophage a été détecté en réponse à une infection par des espèces *Naegleria*. Par ailleurs, il est bien établi que *N. fowleri* peut être lysée par le complément<sup>3</sup> et du sérum humain agglutine les amibes (Reilly, 1983 b). Les souris carencées en facteur hémolytique du complément diminuent leur résistance à l'infection par *N. fowleri* (Reilly, 1983 a).

De plus, certains facteurs participent à la survie de *N. fowleri* pendant l'infection : par exemple la production d'oxyde nitrique (NO) et la résistance des amibes à l'attaque par les molécules du complément. *N. fowleri* synthétise une protéine servant comme facteur de virulence qui la protège de molécules lytiques du complément (Fritzinger, 2006). L'activation de protéines kinases et la phosphorylation de leur substrat sont importants pour la résistance au complément (Chu, 2000).

NO est un agent multifonctionnel qui régule les activités antimicrobiennes et joue un rôle bien établi dans le système immunitaire. Les trophozoïtes de *N. fowleri* produisent cet oxyde, grâce à l'activité d'une isoforme de la NO-synthétase, qui a des homologues avec la NOS chez des mammifères (Rojas-Hernandez, 2007). Le fait que *N. fowleri* est capable de produire du NO soulève l'hypothèse selon laquelle le NO peut être un élément additionnel du mécanisme pathogène utilisé par cette amibe afin d'envahir les tissus.

D'autres mécanismes d'échappement à la réponse immune ont été suggérés après l'étude de l'interaction *in vitro* d'immunoglobulines sécrétoires humaines A avec des trophozoïtes de *N. fowleri* (Shibayama, 2003). Il a été montré la capacité de ces anticorps à inhiber l'adhérence des amibes au collagène de type I. Les amibes sont capables d'éliminer le complexe antigène-anticorps qui se forme à leur surface. De ce fait, l'immunité locale spécifique empêcherait l'adhérence des trophozoïtes et l'invasion de la muqueuse nasale. Ce blocage pourrait contribuer à la présence des infections asymptomatiques.

**La pathogénie et le rôle de l'immunité de l'hôte lors de MEAP sont mal compris bien que les cellules cibles soient rapidement activées par la présence de *N. fowleri*.**

<sup>3</sup> Système du complément : groupe de protéines sériques ou membranaires agissant de pair avec les complexes antigène-anticorps ou des constituants des microorganismes pour réaliser la destruction des particules étrangères telles que bactéries, amibes, etc.

Plusieurs tentatives ont été conduites afin d'induire chez la souris une immunité protectrice à la base d'une fabrication potentielle de vaccin contre *N. fowleri*. Le niveau de protection varie selon le protocole d'immunisation utilisé (Carrasco-Yepe, 2010). L'immunisation par des lysats amibiens combinée à une protéine immunogène (la protoxine Cry1Ac bactérienne), semble la plus appropriée et augmente l'immunité protectrice contre *N. fowleri* par rapport à la vaccination par des lysats amibiens seuls (Carrasco-Yepe, 2010 ; Jarillo-Luna, 2008).

Le facteur de transcription (STAT 6) lié à l'immunité cellulaire pourrait jouer un rôle essentiel dans la production des interleukines-4 qui assurent le bon fonctionnement de la réponse immunitaire et attendu en défense vis-à-vis de *N. fowleri* (Carrasco-Yepe, 2010).

En utilisant du sérum de personnes ou de souris infectées et une technique de criblage immunologique le gène *nfa1* a été identifié (Shin *et al.*, 2001) ; il code une protéine de 13,1 kDa immunodominante, la protéine NFA1 (Cho, 2003 ; Lee, 2007 et 2011). Des anticorps spécifiques contre NFA1 réduisent la destruction de cellules par *N. fowleri* (Cho, 2003).

Le blocage de l'expression du gène *nfa 1* par génie génétique conduit à des trophozoïtes qui ont une activité cytotoxique réduite quand ils sont incubés avec des cellules épithéliales (Jung, 2008 et 2009).

Pour évaluer les réponses immunitaires vis-à-vis de la protéine NFA1 des souris ont été inoculées par voie intranasale avec des particules virales exprimant le gène codant *nfa1* (Kim, 2012b). Chez les animaux, cette inoculation stimule considérablement la production des immunoglobulines de type G2a et G1 présentes jusqu'à 12 semaines après l'injection. L'analyse des cytokines a montré que les souris traitées (par rapport au souris contrôles non traitées) présentaient une augmentation d'interleukine-4 et d'interféron gamma, un résultat qui suggère la mise en place d'une réponse immunitaire mixte de type Th1/Th2 (Kim, 2013). Pour évaluer si la protéine NFA1 pouvait induire une protection contre l'infection par *N. fowleri*, les souris précédemment traitées ont été infectées par voie intranasale avec une dose létale de  $5 \times 10^4$  trophozoïtes une semaine après la dernière inoculation virale portant le gène *nfa1*. Les souris présentent un taux de survie élevé allant jusqu'à 90 % après la réinfection avec *N. fowleri*. Ces expériences suggèrent que la protéine NFA1 induit effectivement une protection immunitaire par des réponses humorale et cellulaire et indiquent que le vecteur viral exprimant le gène *nfa1* peut être un outil vaccinal prometteur contre l'infection par *N. fowleri*.

**La protéine NFA1 est le premier candidat expérimental pour la mise en place d'un vaccin prévenant la survenue de MEAP.**

### 3.4 Clinique

Les manifestations cliniques d'une MEAP sont celles d'un syndrome méningé (céphalées, raideur de nuque, photophobie, vomissements) fébrile de survenue brutale, parfois associé à une irritation de la gorge et une rhinite. Cette période aiguë est marquée par une triade symptomatique : migraine intolérable, hyperthermie (39 à 41°C), troubles digestifs (nausées, vomissements, anorexie). Dans les 2/3 des cas, des troubles de la vigilance (léthargie, somnolence), de l'humeur (irritation, agitation) ainsi que des vertiges et des hallucinations sont observés.

Les céphalées prédominent en localisation frontale ou fronto-temporale, là où prédominent les lésions induites par l'infection ; des troubles olfactifs ou gustatifs sont parfois allégués. L'évolution se fait rapidement vers l'apparition d'atteintes des paires crâniennes et de signes d'atteinte encéphalique : épilepsie, coma. L'analyse cytochimique du liquide céphalorachidien (LCR) est celle d'une méningite purulente (formule leucocytaire où prédominent sur les polynucléaires, hyperprotéinorachie et hypoglycorachie), qui oriente en pratique vers une étiologie bactérienne, et conduit à la prescription en urgence d'une antibiothérapie inactive sur *N. fowleri*. L'infection évoluant, le décès survient le plus souvent dans les trois à dix jours suivant le début des signes cliniques (Hannisch et Hallagan, 1997).

Peu de renseignements concernent d'éventuelles infections chroniques ou latentes dues à ces protozoaires. Bien qu'il ait été présumé, par plusieurs auteurs que certaines formes asymptomatiques ou paucisymptomatiques de l'infection existent chez l'Homme (Dempe, 1982), toutes les données expérimentales consécutives à des inoculations intra-nasales ou cérébrales montrent que *N. fowleri* est un agent très virulent.

### 3.5 Diagnostic

La clé du diagnostic dans l'urgence est la réalisation d'un examen microscopique direct en contraste de phase du LCR conservé à température ambiante. Cet examen permet de mettre en évidence des trophozoïtes, avec leurs pseudopodes. L'exflagellation des amibes ainsi isolées dans le LCR peut être provoquée par incubation du LCR dilué dans une eau stérile jusqu'à trois heures à 37°C (Hannisch et Hallagan, 1997), et contribue à affirmer ce diagnostic par l'examen direct. Les colorations (Giemsa, trichrome) de produit pathologique permettent aussi de visualiser les trophozoïtes. Il est possible de cultiver *N. fowleri* en lui donnant pour substrat une culture de colibacilles (Hannisch et Hallagan, 1997), le développement des amibes se faisant aux dépens des bactéries. La sérologie n'a pas d'intérêt pour le diagnostic de méningo-encéphalite dans la mesure où l'évolution est trop rapide pour pouvoir identifier avant le diagnostic une réponse anticorps (Ma *et al.*, 1990). Plus récemment, des techniques de biologie moléculaire ont été développées pour établir le diagnostic (Pelandakis, 2002 ; Visvesvara, 2007).

La MEAP est une cause exceptionnelle de méningo-encéphalite (un cas répertorié sur le territoire national en avril 2008, et quelques dizaines de cas publiés dans le monde). La majorité des diagnostics de méningo-encéphalite amibienne primitive sont donc établis au stade de l'autopsie.

### 3.6 Thérapie

La rareté des cas et les difficultés de diagnostic constituent un obstacle à la réalisation d'essais thérapeutiques randomisés comparatifs. Les recommandations sont donc fondées sur des arguments d'efficacité obtenus *in vitro*, dans des modèles expérimentaux murins et à partir des séries cliniques qui détaillent les traitements administrés aux quelques patients qui ont survécu.

Les études d'efficacité *in vitro* sont peu nombreuses et elles utilisent soit des isolats cliniques, soit des souches entretenues en laboratoire ; ces études ont produit des résultats discordants avec certains médicaments selon les souches testées (Goswick, 2003b). Les traitements actifs *in vitro* (Kim, 2008a ; Seidel, 1982 ; Tiewcharoen, 2003 ; Goswick 2003 a et b ; Schuster, 2006 ; Ondarza 2006 et 2007) appartiennent aux catégories suivantes de traitement : les antifongiques (l'amphotéricine B, le miconazole, le kétoconazole, le fluconazole, le voriconazole), les antibiotiques (azithromycine, minocycline, quinupristine-dalfopristine), les antiparasitaires (mépacrine, miltéfosine) et les neuroleptiques (chlorpromazine, trifluopérazine). L'amphotéricine B et le miconazole sont synergiques *in vitro* (Seidel, 1982).

Les traitements évalués avec succès dans les modèles expérimentaux sont certains macrolides : azithromycine, roxithromycine (Goswick, 2003 ; Kim, 2008b), l'amphotéricine (Goswick, 2003b ; Kim, 2008a), le kétoconazole (Goswick, 2003b), la quinupristine-dalfopristine (Goswick, 2003b), la miltéfosine (Kim, 2008a), la chlorpromazine (Kim, 2008a). Les rares personnes ayant survécu à une MEAP ont toutes bénéficiées d'un traitement utilisant l'amphotéricine B (Visvesvara, 2010) soit en monothérapie administrée par voie intraveineuse parfois complétée d'une administration intrathécale, soit associée à d'autres traitements potentiellement synergiques : miconazole, fluconazole, kétoconazole et rifampicine (Hannisch, 1997).

**Les rares guérisons d'une MEAP sont obtenues pour des patients auxquels ont été administrés de l'amphotéricine B par voie intraveineuse, aux doses habituellement utilisées pour traiter les infections méningées. Des antifongiques azolés ou de la rifampicine ont pu être associés à ce traitement.**

### 3.7 Pronostic

Le nombre de cas mondiaux publiés en 2012 était de 310 (Trabelsi et al., 2012). Aux États-Unis, d'où provient environ la moitié des cas rapportés (Grate, 2006), 113 MEAP ont été dénombrées entre 1962 et 2009 (Yoder, 2010). Les survivants de méningo-encéphalite amibienne primitive (MEAP) sont rares puisque 11 cas seulement ont été jusqu'à présent publiés (Jain, 2002 ; Wang, 1993 ; Loschiavo, 1993 ; Pougvarin, 1991 ; Brown, 1991 ; Seidel, 1982 ; Anderson, 1973 ; Apley, 1970 ; Vargas-Zepeda, 2005 ; Kaushal, 2008 ; Saleem, 2009). Le taux de létalité est donc effroyable.

L'administration d'un traitement adapté en urgence est le plus souvent suivi d'une évolution fatale probablement en raison du retard apporté au diagnostic (Heggie, 2010), mais le pronostic d'infections qui seraient diagnostiquées rapidement (situation exceptionnelle) et traitées de manière adaptée n'est pas connu (Vargas-Zepeda, 2005 ; Grate, 2006).

## 4 Identification et dénombrement de *Naegleria fowleri*

Ce chapitre expose les éléments recueillis sur les méthodes de prélèvement, ainsi que sur les méthodes d'identification spécifique de *N. fowleri* et de dénombrement.

*Naegleria fowleri* étant un micro-organisme classé en groupe de danger 3 en raison de la gravité des infections potentielles et du risque de dissémination ; sa manipulation requiert un laboratoire de niveau de sécurité biologique de niveau 3.

### 4.1 Méthodes de prélèvements

Les prélèvements d'eau se font le plus souvent en surface (Huizinga et al., 1990 ; Moussa et al., 2013 ; Maclean et al., 2004, Detterline et al., 1991 ; De Jonckheere, 1977), ou à moins de 1 m sous la surface (Jamerson et al., 2009 ; Ettinger, 2003), ou au fond de bassins (Moussa et al., 2013). L'eau est prélevée dans des bouteilles stériles (Huizinga et al., 1990 ; Moussa et al., 2013 ; Kasprzak et al., 1982), parfois en verre (De Jonckheere, 1977) ou en polypropylène (Kyle et Noblet, 1985), dans des tubes de centrifugation stériles (Jamerson et al., 2009) ou des récipients en plastique (Jamerson et al., 2009), parfois stériles (Detterline et al., 1991).

En parallèle des prélèvements, la température de l'eau, le pH, la conductivité et l'oxygène dissous sont les paramètres physico-chimiques les plus souvent mesurés (Behets et al., 2007 b ; Huizinga et al., 1990 ; Jamerson et al., 2009 ; Moussa et al., 2013 ; Ettinger, 2003 ; De Jonckheere, 1977).

Des prélèvements de sédiments dans le fond de lacs (Tyndall, 1989), peuvent s'échelonner entre 1 et 12,5 m (Huizinga et al., 1990). Selon la profondeur, les prélèvements de sédiments peuvent être réalisés avec des bennes à sédiments (de type drague Ponar ; Huizinga et al., 1990) ou des tubes stériles (Moussa et al., 2013).

Le délai d'ensemencement de l'échantillon après son prélèvement varie de 2 à 4h (Behets et al., 2007b ; Moussa et al., 2013), s'organise parfois en prélevant le matin et en ensemençant l'après-midi (De Jonckheere, 1977) ; voire est traité après 24h (Jamerson et al., 2009 ; Maclean et al., 2004). L'ensemencement de l'échantillon d'eau après récolte doit être très rapide (immédiat à 2 h) (Behets, 2003 ; Pougard, 2002) et l'échantillon maintenu agité pendant la mise en culture (Pernin, 1998 ; Pougard, 2002). Des échantillons prélevés en

Guadeloupe ont été transportés à température ambiante, autour de 30°C entre les bains chauds et le laboratoire d'analyse sur une période variant de une à trois heures (Moussa *et al.*, 2013).

Kilvington et White (1986) indiquent qu'une identification précise de *N. fowleri* nécessite de traiter l'échantillon juste après son prélèvement, notamment en raison des compétitions existantes entre *N. fowleri* et *N. lovaniensis*, défavorables au pathogène (croissance plus rapide de *N. lovaniensis*).

**Il est difficile actuellement de privilégier une méthode de prélèvement. Les données recueillies relatives aux procédés d'échantillonnages sont issues d'études avec des objectifs différents, dont il est difficile d'extraire une pratique commune. Globalement les échantillons doivent être analysés le plus rapidement possible après leur récolte pour obtenir un résultat fiable.**

## 4.2 Méthodes culturales

Les méthodes culturales nécessitent la réalisation de différentes étapes décrites ci-après : le choix du milieu de culture, la technique d'ensemencement des échantillons, le choix de la température et de la durée de l'incubation, les tests d'identification des fronts amibiens et enfin, la méthode de comptage

### 4.2.1 Milieux de culture

De façon générale, la mise en culture de *N. fowleri* peut être réalisée :

- En milieu xénique sur des géloses d'agar non nutritives ou faiblement nutritives (peptone 0,05 %, extrait de levure 0,05 %, glucose 0,1 %), en présence de bactéries mortes ou vivantes (*Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp, *Escherichia coli*).
- En milieu axénique, dont le milieu spécifique de l'amibe pathogène SCGYEM (caséine, glucose, extrait de levure, serum de veau foetal, penicilline/streptomycine) (De Jonckheere, 1977), et le milieu de Chang qui comprend, en supplément du milieu SCGYEM, du sang de mouton et un extrait de foie (Schuster, 2002).

La croissance de *N. fowleri* nécessite globalement peu de ressources nutritives (Schuster, 2002).

La procédure classique d'analyse d'échantillons environnementaux comprend comme pour les échantillons cliniques, la mise en culture sur une gélose non nutritive recouverte de bactéries. La culture en milieu axénique est à proscrire en raison d'emploi de milieux riches favorables au développement des bactéries et champignons présents dans ce type d'échantillon, ce qui inhiberait la croissance amibienne (Schuster, 2002).

Les échantillons environnementaux sont majoritairement cultivés sur des géloses non nutritives recouvertes d'une couche de *Escherichia coli* – NNA-E – (Puzon *et al.*, 2009 ; Robinson *et al.*, 2006 ; Pougard *et al.*, 2002 ; Pélandakis *et al.*, 2002 ; Behets, 2003 ; Pernin, 1998) ou plus rarement de *Enterobacter aerogenes* (Sykora *et al.*, 1983) ou de *Klebsiella edwardsii* (Kilvington, 1995b).

### 4.2.2 Ensemencement des échantillons

Les volumes de 1 ou 0,1 mL sont directement déposés sur les boîtes NNA-E, alors que les volumes supérieurs (100 ou 10 mL) nécessitent une filtration préalable sous vide (3 à 5 kPa). Des volumes plus importants (1 ou 2 L) sont plus rarement ensemencés, en raison du

colmatage des filtres avec des eaux naturelles. Les filtres peuvent être de différentes natures : acétate de cellulose, nitrate de cellulose ou nitrocellulose ; et de différentes porosités : 0,22, 1, 1,2 ou 3  $\mu\text{m}$ , la porosité de 1,2  $\mu\text{m}$  étant la plus classique (Ithoi, 2011 ; Pelandakis *et al.*, 2002 ; Reveiller *et al.*, 2003 ; Huang *et al.*, 2011 ; Sparagano, 1994 ; Behets, 2003 ; Behets *et al.*, 2007 ; Pernin, 1998). Après filtration, le filtre est coupé en deux ou plus (Moussa *et al.*, 2013), retourné puis déposé à la surface d'une boîte NNA-E.

En 1998, une étude spécifique a été réalisée par Pernin *et al.* pour améliorer la détection de *N. fowleri* dans des eaux de rivière nécessitant d'extraire les amibes avant la mise en culture. En effet, la concentration en *N. fowleri* dans le milieu naturel est généralement inférieure aux limites de détection (LD) des méthodes de culture par ensemencement direct. Deux techniques de concentration ont été comparées sur des échantillons d'eaux de rivière préalablement filtrées pour éliminer les populations amibiennes puis dopés avec des quantités connues de différentes souches de laboratoire de *Naegleria* (*N. fowleri*, *N. australiensis*, *N. lovaniensis*), sous les formes trophozoïte et kystique :

- la filtration sous vide (3 à 5 kPa) de 10 ou 100 mL d'échantillon avec des filtres en acétate de cellulose d'une porosité de 1,2  $\mu\text{m}$  ;
- la centrifugation de 10 mL à 1000 g pendant 15 minutes et la centrifugation de 100 mL à 3000 g pendant 10 minutes (Pernin *et al.*, 1998).

Pour les deux techniques, le rendement de récupération après culture à 42°C est meilleur pour les kystes que pour les trophozoïtes, en raison d'une meilleure résistance à la contrainte mécanique de la paroi kystique. Le rendement de récupération de *Naegleria* (toutes espèces confondues) sous forme trophozoïte après filtration est très faible (5 % +/- 5 %), il est significativement meilleur après centrifugation (22 % +/- 5 %). Pour les kystes, les rendements après filtration ou centrifugation sont proches (53 % +/- 21 % et 57 % +/- 25 %). Le rendement de récupération des kystes de l'espèce *N. fowleri* est meilleur après filtration (51 % +/- 24 %) qu'après centrifugation (36 % +/- 23 %) (Pernin *et al.*, 1998).

La quantification précise des faibles concentrations de *N. fowleri* (<100/L) est difficile, notamment à cause de la variabilité du taux de récupération (écart-types élevés) (Pernin, 1998), mais également lors de la présence de compétiteurs amibiens thermotolérants (*N. lovaniensis*) sur les boîtes de culture (Pernin, 1998 ; Puzon *et al.*, 2009).

**Dans la mesure du possible, il est préférable de favoriser les ensemencements directs (sans filtration ni centrifugation) pour limiter la perte des trophozoïtes et des kystes lors de l'étape de concentration du contenu de l'échantillon, mais également les phénomènes de compétitions inter-amibiennes lors de la culture sur gélose (Pernin, 1998).**

#### 4.2.3 Température et durée d'incubation, examen microscopique des cultures

Les températures d'incubation pour la détection de *N. fowleri* varient entre 42 et 45°C (Puzon *et al.*, 2009 ; Robinson *et al.*, 2006 ; Reveiller *et al.*, 2003 ; Pougard *et al.*, 2002 ; Pélandakis *et al.*, 2002 ; Pernin *et al.*, 1998 ; Sykora *et al.*, 1983). Selon les auteurs, la durée d'incubation des boîtes de culture varie de 2 à 9 jours (Puzon *et al.*, 2009 ; Robinson *et al.*, 2006 ; Behets *et al.*, 2003 ; Reveiller *et al.*, 2003 ; Pougard *et al.*, 2002 ; Pélandakis *et al.*, 2002 ; Pernin *et al.*, 1998 ; Sykora *et al.*, 1983), avec une durée classique de 3 à 5 jours. L'examen microscopique régulier durant cette période permet de repérer la croissance de fronts amibiens avant leur confluence. Les fronts présentant les caractéristiques morphologiques du genre *Naegleria* : double paroi des kystes, kystes vides, pseudopodes éruptifs des trophozoïtes (Page, 1976 ; Pelandakis *et al.*, 2002 ; Reveiller *et al.*, 2003) sont prélevés.

#### 4.2.4 Essais de flagellation

L'essai de flagellation peut être un indicateur pour établir l'appartenance au genre *Naegleria*. Pour chaque front amibien présent sur les boîtes NNA-E, des petits cubes de gélose recouverts de trophozoïtes sont découpés et placés dans un tube contenant 0,5 mL d'eau déminéralisée, brièvement vortexé et incubé à 37°C pendant 2 à 4 h (Behets *et al.*, 2003 ; Reveiller *et al.*, 2003 ; Pougard *et al.*, 2002 ; Sykora *et al.*, 1983 ; Cable *et al.*, 1986). L'observation d'amibe exerçant un mouvement hélicoïdal confirme la présence de flagelles et l'appartenance au genre *Naegleria*. Toutefois, par comparaison avec une identification moléculaire du genre *Naegleria*, il a été identifié des souches de *Naegleria* spp non flagellées (Behets *et al.*, 2003 ; De Jonckheere *et al.*, 2001). *A contrario*, lors d'une étude sur 825 souches de *Naegleria* spp prélevées dans l'environnement, toutes les *N. fowleri* identifiées par un test immunologique (ELISA) étaient positives au test de flagellation (Behets, 2007).

Sykora réalise deux étapes supplémentaires de purification des amibes sur boîtes de culture entre la culture principale sur gélose non nutritive recouverte d'*Enterobacter aerogenes* et le test de flagellation (Sykora *et al.*, 1983). De Jonckheere propose deux autres protocoles de test de flagellation (1/ lavage de la surface de la boîte de Pétri avec 100 µL de tampon Tris, récupération de la suspension dans un tube de 300 µL, incubation à 20°C et 30°C, recherche d'amibes flagellées par observation microscopique régulière pendant 1 à 24 h ; 2/ lavage de la surface de la boîte de Pétri avec 20 mL de tampon Tris, récupération de la suspension dans un flacon de 50 mL, incubation sous agitation à 20 et 30°C, prélèvement d'échantillons entre 0,5 et 6 h puis fixation au glutaraldéhyde, observation microscopique des amibes flagellées) (De Jonckheere *et al.*, 2001).

#### 4.2.5 Identification de l'espèce pathogène

Plusieurs méthodes d'identification de l'espèce pathogène ont été développées et peuvent être appliquées à différentes étapes de la méthode culturale (à partir de l'enrichissement sur boîtes ou après le test de flagellation). Elles sont détaillées ci-après.

#### 4.2.6 Dénombrement amibien

La méthode de dénombrement par détermination du Nombre le Plus Probable (NPP) permet d'estimer la concentration amibienne cultivable dans un échantillon. Cette méthode est une estimation statistique du nombre de micro-organismes distribués aléatoirement dans l'échantillon (loi de Poisson) (Champsaur, 1996). C'est une méthode très sensible mais peu précise. En pratique, différents volumes d'échantillon sontensemencés communément à raison de 5 à 30 boîtes par volume. Le comptage du nombre de boîtes « positives » par volume permet, en se reportant à une table des NPP, de déterminer la concentration en micro-organismes de l'échantillon.

L'utilisation de la filtration implique un comptage indirect (type NPP), et non un comptage direct (type UFC : unité formant colonie), en raison du dépôt d'un filtre sur la boîte de culture qui pourrait masquer le développement de fronts amibiens (Pernin et Grelaud, 1989). Toutefois, le fait de découper le filtre en 5 ou 10 pièces avant mise en culture peut permettre une bonne estimation du nombre d'amibes pour les échantillons peu contaminés (Moussa *et al.*, 2013).

## 4.3 Méthodes immunologiques

### 4.3.1 Test d'immunoabsorption enzymatique (ELISA)

En 2003, Reveiller *et al.* ont développé un test ELISA d'immunoabsorption enzymatique (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) pour la détection spécifique de *N. fowleri* dans des eaux environnementales.

La spécificité de l'anticorps monoclonal 5D12 utilisé pour développer ce test a été démontrée quelques années auparavant (Sparagano *et al.*, 1993 ; Reveiller *et al.*, 2000). Il réagit avec des antigènes membranaires (Reveiller *et al.*, 2000).

Ce test permet la détection des trois formes de *N. fowleri* (trophozoïtes, flagellées et kystiques). La spécificité du test ELISA a été vérifiée (absence de détection d'amibes libres de l'environnement telles que *Hartmannella*, *Acanthamoeba* ou autres espèces thermotolérantes non pathogènes de *Naegleria*). La validation de la méthode a été réalisée à partir de 939 échantillons d'eau de rivière et de circuit de refroidissement de centrales nucléaires françaises, en comparant les résultats du test ELISA à la méthode IEF (isoenzyme electrophoretic focusing), alors « méthode de référence » pour l'identification de *N. fowleri* (Pernin et Grelaud, 1989). 97,1 % des résultats sont identiques avec les deux méthodes (détection ou absence de détection de *N. fowleri*).

Le test ELISA est réalisé après mise en culture sur une gélose non nutritive recouverte d'une couche d'*E. coli* placée à 44°C pendant 3 à 5 jours, à partir d'une suspension d'amibes flagellées (cube de gélose inséré dans un tube contenant de l'eau distillée et placé 2h à 37°C). La mise en culture des échantillons, préalablement nécessaire, est plus courte pour le test ELISA (3 à 5 jours) que pour le test IEF (8 à 9 jours en raison de l'enrichissement sur gélose des échantillons) (Reveiller *et al.*, 2003).

### 4.3.2 Essai d'immunofluorescence couplé à la cytométrie en phase solide

En 2002, Pougard *et al.* ont publié une nouvelle technique de dénombrement rapide sans mise en culture de *N. fowleri* dans des eaux de rivière par immunofluorescence couplée à la cytométrie en phase solide.

Le principe de la méthode repose sur la détection de *N. fowleri* grâce à l'anticorps monoclonal spécifique 5D12. Cet anticorps est couplé à la biotine et *N. fowleri* est révélée grâce à la fixation de cet enzyme à la streptavidine marquée avec deux fluorochromes RPE-Cy5 (R-phycoerythrine – cyanine).

Le protocole de dénombrement débute par la filtration d'un échantillon d'eau sur une membrane de polycarbonate de porosité 2 µm. Après marquage avec l'anticorps biotinylé et le complexe streptavidine-RPE-Cy5, la membrane est placée dans un cytomètre en phase solide pour détection de la fluorescence. La quantification de l'amibe libre pathogène est réalisée après un examen microscopique nécessaire à l'élimination des événements non spécifiques.

Lors du développement métrologique, les concentrations mesurées dans les eaux de circuits de refroidissement (environ 2000 à 160000 cellules / L) par cytométrie en phase solide n'ont pas été significativement différentes de celles mesurées avec la méthode classique par culture ( $r^2 = 0,982$ ,  $n=7$ ). Cette méthode de quantification de *N. fowleri* est directe (absence de mise en culture) et rapide (quelques heures au lieu de 5 jours par culture). La limite de détection (LD) de la méthode dépend du volume filtré sur la membrane. Pour pouvoir appliquer cet outil aux eaux faiblement concentrées en *N. fowleri*, il est nécessaire d'accroître la capacité de filtration. Cette méthode ne fournit pas d'information sur la viabilité des cellules (Pougard *et al.*, 2002).

Il est à noter que la microscopie à épifluorescence couplée à la cytométrie en flux habituellement utilisée pour le dénombrement de cellules fluorescentes manque de sensibilité pour permettre de détecter de faibles concentrations de pathogènes dans les eaux environnementales.

## 4.4 Méthodes biochimiques

Chez les amibes, comme chez de nombreux protistes, l'analyse morphologique est capable de décrire les taxons jusqu'au niveau du genre mais elle ne permet pas de définir l'espèce, par manque de critères suffisants. Ainsi au sein du genre *Naegleria*, toutes les espèces qu'elles soient pathogènes comme *N. fowleri* ou non sont morphologiquement semblables. Le développement des techniques biochimiques puis des techniques moléculaires a permis de réaliser des diagnostics spécifiques de l'espèce et en particulier de l'espèce pathogène *N. fowleri*.

L'application de la méthode biochimique requiert préalablement une mise en culture des échantillons, et plusieurs étapes de purification des souches.

La méthode biochimique repose essentiellement sur le polymorphisme des locus enzymatiques. En 1979, Nerad et Dagett examinent cinq locus enzymatiques dans le but de discriminer les souches pathogènes des souches non pathogènes de *Naegleria*. Les résultats indiquent que les souches d'une même espèce révèlent des profils enzymatiques identiques, alors que les souches de *N. gruberi* et *N. lovaniensis* ont des profils très différents de l'espèce *N. fowleri*. De même, l'étude du polymorphisme enzymatique des estérases a permis de différencier l'espèce pathogène *N. fowleri* de *N. gruberi*, espèce non pathogène (Visvesvara, 1980). L'analyse de l'aspartate aminotransférase permet de différencier *N. fowleri* de *N. lovaniensis*, espèce non pathogène et la plus proche phylogénétiquement de *N. fowleri* (Kilvington et al., 1984).

D'autres études ont suivi en profilant les principales espèces de *Naegleria*, particulièrement *N. fowleri*, *N. australiensis* et *N. lovaniensis* (De Jonckheere, 1982 ; Pernin, 1984). Ces dernières études utilisent l'IEF, considérée comme la plus résolutive pour le typage des *Naegleria*. Cette méthode permet de séparer les protéines par électrophorèse en réalisant un gradient de pH. Les protéines sont alors séparées sur gel de polyacrylamide en fonction de leur point isoélectrique (dans ce cas la charge nette de l'enzyme est nulle). Par isoélectrofocalisation, l'acide malique et la thréonine déshydrogénase ont été retenus comme locus diagnostiques pour détecter spécifiquement l'espèce pathogène *N. fowleri* ainsi que les espèces *N. lovaniensis* et *N. australiensis*. (Pernin, 1984 ; Pernin et al., 1985).

En 1995, Kilvington propose une méthode de détection de *N. fowleri* et autres espèces de *Naegleria* par électrophorèse sur membrane d'acétate de cellulose (CAME) de l'isomérase phosphate glucose (GPI). Cette méthode permet de détecter spécifiquement : *N. fowleri*, *N. lovaniensis*, *N. australiensis* (spécificité des profils GPI). Mais *N. italica* et *N. jadini* présentent le même profil GPI, ne permettant donc pas de les distinguer. Aucune différence de profil GPI n'est mise en évidence en fonction du type de mise en culture (axénique et xénique), la méthode présente l'avantage de pouvoir être réalisée sur des souches cultivées en milieu xénique. La préparation des échantillons, l'électrophorèse et la détection des protéines nécessitent 40 minutes sans compter la mise en culture à 45°C (Kilvington, 1995).

Notons que le polymorphisme des locus enzymatiques étudiés n'est pas suffisant pour réaliser une analyse intraspécifique chez *N. fowleri*.

## 4.5 Méthodes moléculaires

### 4.5.1 Méthode par réaction en chaîne par polymérase conventionnelle

Le développement des outils moléculaires (clonage et séquençage de l'ADN) a permis de mieux connaître la génétique de *N. fowleri*. Cette méthode proposée dans les années 90 chez *Naegleria*, présente un avantage certain par rapport aux précédentes. Les procédures

diagnostiques sont plus simples et plus rapides et l'analyse plus sensible. Enfin, les données obtenues sont des produits nucléotidiques qui peuvent mettre en évidence une variabilité intraspécifique.

McLaughlin *et al.* (1991) sont les premiers à proposer une amplification spécifique de *N. fowleri* par réaction en chaîne par polymérase (PCR) en ciblant une région codante d'ADN mitochondrial (sous-unité d'ATPase). Cependant, l'utilisation de cette PCR par d'autres auteurs a révélé qu'il était aussi possible d'amplifier l'ADN d'une autre espèce, *N. lovaniensis* qui est non pathogène et phylogénétiquement très proche de *N. fowleri*. Sparagano *et al.*, (1993, 1994) proposent une amplification PCR spécifique en ciblant une région séquencée par Hsu *et al.* (1991). La méthode a ensuite été appliquée par Kilvington et Beeching (1995) en amplifiant un fragment de 1,5 kb spécifique des principaux variants de *N. fowleri*. La sensibilité selon les auteurs est de 1pg d'ADN purifié (équivalent à trois cellules) par analyse PCR et de 100 fg (0,3 cellule) si le produit est marqué radioactivement. Réveiller *et al.* (2003) procèdent à une nested PCR par utilisation de deux couples d'amorces. La cible est une région codante pour une protéine membranaire. La sensibilité est de 5 cellules. Une autre étude a été réalisée en ciblant la région ITS de l'ADN ribosomique. La sensibilité est identique aux travaux précédents. Une procédure multiplexe a été mise au point pour détecter spécifiquement *N. fowleri* et non spécifiquement les autres espèces *Naegleria* et des genres apparentés (*Willaertia* et *Vahlkampfia*) (Pélandakis et Pernin, 2002). L'analyse PCR multiplexe permet par ailleurs de révéler différents variants ou génotypes de *N. fowleri*.

#### 4.5.2 PCR quantitative

La PCR conventionnelle est uniquement qualitative et met en évidence la présence ou l'absence de l'espèce pathogène. Cette méthode, plus fiable et plus rapide que les méthodes biochimiques, permet de détecter spécifiquement *N. fowleri* et de la quantifier.

La PCR quantitative (qPCR) est une méthode basée sur la détection de l'ADN des cellules par utilisation de molécules fluorescentes. Elle permet d'avoir une quantification rapide de l'ADN et par extrapolation du nombre de cellules. La qPCR est une méthode rapide, quantitative, sensible et spécifique, néanmoins elle ne permet pas de distinguer les cellules vivantes des cellules mortes. Les premières applications de la qPCR pour la détection de *N. fowleri* datent de 2006 (Behets *et al.*, 2006 ; Qvarnstrom *et al.*, 2006 ; Robinson *et al.*, 2006).

Une première étude (Robinson *et al.*, 2006) utilise des amorces déjà décrites dans la littérature et qui ciblent la région ITS flanquant le gène de l'ARNr 5.8S (De Jonkheere, 1998). Cependant, ces amorces ne sont pas spécifiques et amplifient également l'ADN de *Willaertia*. Les auteurs ont particulièrement étudié les courbes de dissociation et tentent d'utiliser les profils des courbes pour identifier l'espèce de *Naegleria*. En effet ces courbes présentent plusieurs pics, probablement dus aux variations dans la séquence des ITS au sein d'une même souche. Les auteurs ont calculé que la sensibilité de la méthode est de l'ordre d'une cellule.

La seconde étude (Behets *et al.*, 2006) utilise également des amorces détectant la région ITS flanquant le gène de l'ARNr 5,8S, déjà utilisées dans la littérature (Pélandakis *et al.*, 2000). L'ADN est issu de cultures pures de différentes souches d'amibes. Là encore, ces amorces ne sont pas spécifiques, elles amplifient également l'ADN de *Willaertia*, de *Vahlkampfia* et d'*Hartmannella*. La taille des amplicons est comprise entre 400 et 800 pb, ce qui est un peu long pour avoir une bonne efficacité avec la méthode qPCR. Comme dans l'étude précédente, la courbe de fusion est utilisée pour distinguer différentes souches. Selon ces auteurs la sensibilité est de l'ordre de 0,1 cellule pour *Naegleria* mais de l'ordre de 10 cellules pour *Hartmannella* et *Willaertia*. Le nombre de copies d'ITS par cellule influe sur la

sensibilité de la méthode et ce nombre est estimé à 4000 pour *Naegleria*. En 2009, une nouvelle étude (Puzon *et al.*, 2009) a été décrite utilisant une adaptation des amorces citées ci-dessus, ciblant la région ITS. L'amorce sens a été modifiée pour être spécifique de *N. fowleri*. La méthode semble spécifique de *N. fowleri* et la sensibilité affichée est de 0,01 cellule.

La troisième étude décrit une approche multiplexe pour la détection simultanée d'*Acanthamoeba*, *Balamuthia mandrillaris* et *N. fowleri* dans des échantillons cliniques (Qvarnstrom *et al.*, 2006). Les auteurs ont dessiné de nouvelles amorces ciblant le gène codant l'ARNr 18S et la méthode utilise également une sonde (TaqMan). Les amorces pour *N. fowleri* ont été choisies pour être spécifiques de l'espèce ce qui n'était pas le cas dans les publications précédentes et la présence de la sonde permet d'avoir une plus grande spécificité. Des essais ont été réalisés sur plusieurs espèces de *Naegleria* et semblent confirmer la spécificité des amorces pour *N. fowleri*. La limite de détection est de l'ordre d'une cellule.

En 2007, une nouvelle publication (Behets *et al.*, 2007b) décrit des amorces spécifiques de *N. fowleri*, ciblant un gène particulier, nommé MP2Cl5 déjà utilisé en PCR classique (Réveiller *et al.*, 2002), et utilisant une sonde TaqMan. La méthode est utilisée pour la détection de *N. fowleri* dans des échantillons d'eau de circuit de refroidissement par dopage et la limite de détection est située autour de 10 cellules. Les mêmes amorces et sondes ont été utilisées dans une autre étude recherchant *N. fowleri* dans des échantillons de LCR et d'eau d'une piscine dopée avec *Naegleria* (Mađarová *et al.*, 2010).

Enfin, une dernière étude a porté sur une méthode de détection globale des amibes libres (Le Calvez *et al.*, 2012). Cette approche multiplexe utilise deux paires d'amorces, une pour la détection des *Amoebazoa* et une pour la détection des *Vahlkampfiidae* (dont *Naegleria*). Cette approche a été réalisée sur des cultures pures seules ou en mélange.

**Historiquement, les premières méthodes développées pour identifier les amibes libres ont été des méthodes d'observation microscopique. Bien que des caractéristiques morphologiques permettent d'identifier le genre *Naegleria* après mise en culture, aucune ne permet de distinguer *N. fowleri* des autres espèces de *Naegleria* non pathogènes (en particulier *N. australiensis* et *N. lovaniensis*). Il est donc nécessaire de disposer de techniques d'identification spécifiques à l'espèce pathogène. Initialement, *N. fowleri* était identifiée avec un test de pathogénicité sur des souris soumises à une inoculation intranasale d'une suspension d'amibe libre (De Jonckheere, 1977 ; Sykora *et al.*, 1983). Ensuite, des méthodes biochimiques basées notamment sur des profils électrophorétiques enzymatiques ont été développées (Kilvington, 1995 ; Pernin et Grelaud, 1989). Puis des méthodes moléculaires par PCR ou RFLP (Pélandakis, 2002 ; Kilvington, 1995) et des tests immunologiques type ELISA (Reveiller *et al.*, 2003) ont été mis au point. Ces méthodes sont appliquées à des échantillons enrichis par ensemencement sur boîtes de culture. Bien que la réalisation d'une pré-culture soit largement utilisée pour dénombrer *N. fowleri*, de nouvelles techniques plus rapides sans mise en culture préalable ont été plus récemment développées ou sont encore en cours de développement : test d'immunofluorescence couplée à la cytométrie en phase solide (Pougnard, 2002), nested-PCR (Ahmad, 2011), q-PCR (Qvarnstrom *et al.*, 2006 ; Behets *et al.*, 2007b).**

## 5 Exposition par la baignade

Si de façon générale, la définition d'une baignade en milieu naturel (rivière, lac) ou dans les eaux libres semble assez bien partagée au niveau international, la définition d'une piscine est hétérogène selon les pays. En effet, les piscines sont de façon générale des bassins artificiels utilisés pour les activités aquatiques (récréatives sportives et/ou thérapeutiques).

Mais la notion complémentaire notamment en France d'une eau filtrée, désinfectée et désinfectante, renouvelée et recyclée n'est pas toujours associée.

De ce fait dans le cadre de cette expertise il apparaît nécessaire de détailler la terminologie des différents types de baignades.

## 5.1 Typologies des baignades

Plusieurs paramètres peuvent être proposés pour classer les baignades :

- La **nature de la masse d'eau** : elle peut être soit une eau libre (masse d'eau de surface en renouvellement permanent) soit une eau captée et captive (eau prélevée dans une masse d'eau de surface ou souterraine et maintenue artificiellement dans un espace) ;
- La **présence ou l'absence d'un traitement de l'eau**. Le critère « eau désinfectée et désinfectante » est le paramètre qui permet de distinguer, dans la réglementation, une piscine d'une baignade. Sera considéré comme piscine tout lieu de bain dont l'eau est désinfectée et désinfectante ;
- La **gestion hydraulique** de la masse d'eau : renouvellement, recirculation, recyclage et hydraulité. On distinguera notamment les systèmes ouverts (apport d'eau et évacuation de l'eau sans recirculation) et les systèmes fermés comprenant une recirculation de l'eau ;
- **La température de l'eau.**

Sur la base de ces paramètres, les experts proposent une typologie des baignades reprenant celle définie précédemment dans les rapports de l'Agence relatifs aux baignades artificielles et piscines (Afsset, 2009 et 2010 ; Anses, 2013) à savoir :

### ➤ Les baignades en eau libre

L'activité de baignade se pratique dans une masse d'eau naturelle (rivière, mer, lac) aménagée ou non. Une baignade aménagée est une baignade comprenant une ou plusieurs zones d'eau douce ou d'eau de mer dans lesquelles les activités de baignades sont expressément autorisées et encadrées réglementairement. L'eau de ces baignades n'est pas traitée et ne fait pas l'objet d'une recirculation.

### ➤ Les piscines

Le groupe de travail a retenu comme définition d'une piscine, la terminologie spécifique à la France proposée par la commission P91L de l'AFNOR pour définir une piscine : « *Une piscine est un bassin artificiel étanche dans lequel se pratiquent des activités aquatiques et dont l'eau est filtrée, désinfectée et désinfectante renouvelée et recyclée ainsi que tous les équipements nécessaires à son fonctionnement* ».

### ➤ Les baignades artificielles

Une baignade est dite artificielle lorsque qu'elle se pratique dans une zone où, par artificialisation du milieu naturel, l'eau est captée et maintenue captive. L'eau peut être traitée ou non par des procédés autres que des procédés de désinfection.

Parmi les baignades artificielles, il peut être distingué :

- les baignades artificielles à système ouvert ; l'eau alimente la zone de baignade en amont et s'évacue en aval sans recirculation de l'eau au sein de la zone de baignade ;
- les baignades artificielles à système fermé ; l'eau de la baignade recircule au sein de la baignade, le renouvellement de l'eau et l'évacuation de l'eau vers le milieu extérieur sont limités.

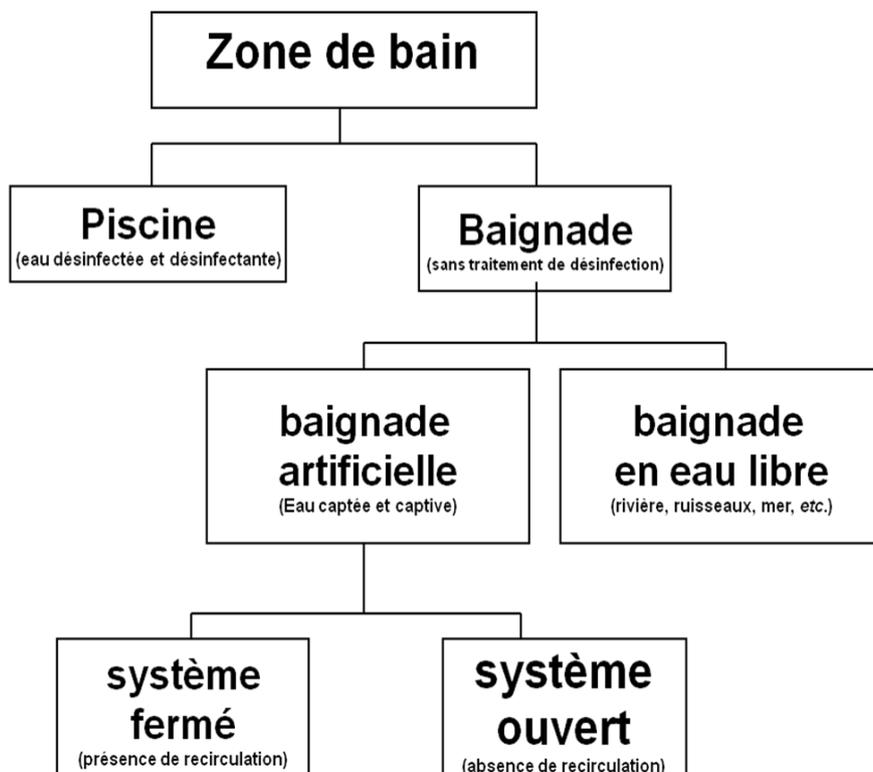


Figure 5 : Typologie des baignades

Indépendamment de la classification précédente, les baignades peuvent également être classées en fonction de la température moyenne de l'eau. Quatre classes d'eaux de baignades peuvent être définies :

- eau dont la température est inférieure à 25°C (rivières, lacs, étangs, bassins, piscines) ;
- eau chauffée naturellement par le soleil avec des températures pouvant être supérieures à 25°C (lacs, étangs, bassins, piscines) ;
- eau dont la température est supérieure à 25°C, d'origine géothermale (rivières, lacs, étangs, bassins, piscines) ;
- eau chauffée artificiellement par l'Homme (piscines, bains à remous) ou par des rejets industriels et dont la température peut être supérieure à 25°C.

## 5.2 Réglementation française

D'un point de vue réglementaire, seule la catégorie des baignades en eau libre fait l'objet d'un encadrement juridique européen selon la directive 2006/7/CE du 15 février 2006 concernant la gestion de la qualité des eaux de baignade. Cette directive a été transposée en droit français dans le Code de la santé publique (CSP) en 2008.

Cette réglementation européenne exclut :

- les bassins de natation et de cure ;
- les eaux captives qui sont soumises à un traitement ou sont utilisées à des fins thérapeutiques ;
- les eaux captives artificielles séparées des eaux de surface et des eaux souterraines.

Les piscines recevant du public font l'objet d'une réglementation française spécifique.

Les textes relatifs aux baignades artificielles sont en cours d'élaboration. Une circulaire du Ministère chargé de la santé précise toutefois les modalités de gestion pour ces types de baignades.

En ce qui concerne l'eau des piscines thermales, l'arrêté du 27 février 2007 relatif aux traitements de l'eau minérale naturelle (EMN) utilisée à des fins thérapeutiques dans les établissements thermaux prévoit qu'elle peut faire l'objet d'un traitement de désinfection visant à prévenir les risques sanitaires spécifiques à certains soins. Ce traitement doit respecter notamment les dispositions techniques définies dans l'arrêté fixant les dispositions techniques applicables aux piscines.

L'ensemble des textes réglementaires en vigueur sont listés dans le Tableau III.

**Tableau III : Textes règlementaires relatifs aux baignades et aux piscines collectives en vigueur en France**

Baignades	Baignades artificielles	Piscines recevant du public
Directive européenne 2006/7/CE du 15 février 2006  CSP L1332-1 à L1332-9  CSP D1332-14 à D1332-38	Circulaire du 2 juin 2008 relative à la gestion des baignades artificielles	CSP L 1332-1 à L 1332-9  CSP D1332-1 à D1332-13  Code du sport A322-18  Arrêté du 27/02/2007 relatif au traitement de l'eau minérale naturelle utilisée à des fins thérapeutiques

### 5.3 Exposition à *Naegleria fowleri* lors des activités de baignade

Les données de la littérature concernant les risques d'exposition aux *N. fowleri* lors de la baignade peuvent être divisées en cinq volets : (i) les baignades en eau libre, (ii) les piscines, (iii) les baignades artificielles, (iv) les baignades alimentées par des eaux de refroidissement industrielles et (v) les autres points d'eau.

#### 5.3.1 Baignades en eau libre

Les premiers cas de MEAP dus à l'amibe libre *N. fowleri* ont été mis en évidence chez l'Homme, au sud de l'Australie (Fowler et Carter, 1965). Peu de temps après cette première description, des cas semblables ont été identifiés un peu partout dans le monde. Tout d'abord en Floride où cinq des sept premiers cas de MEAP relevés aux États-Unis, ont pu être associés à la baignade dans des lacs de la région d'Orlando (Butt, 1966 et 1968). L'association de cette pathologie à la baignade a ensuite été confirmée de nouveau en Floride (Welling, 1977), en Virginie (Callicott 1968 ; Wagner et Duma, 1969), au Texas (Patras et Anduiar, 1966) puis en Australie (Carter, 1968 et 1969), et Nouvelle-Zélande (Mandel et Gudex, 1970). À la même époque, toujours aux États-Unis, les résultats des études menées sur l'eau du Missouri, de l'Ohio, du lac Falmouth et du lac de Richmond

(Chang, 1971 ; Duma, 1971), soulignaient le lien étroit entre les eaux récréatives et les amibes libres pathogènes. Parallèlement en Europe, les travaux de Jadin ont mis en évidence la présence de *Naegleria* en Belgique, dans les petites et grandes rivières ainsi que dans les canaux (Jadin, 1974.). Des amibes libres pathogènes ont également été détectées dans une rivière, un canal et dans une vingtaine de lacs en Pologne (Kasprzak et Mazur, 1972).

Entre 1976 et 1979, les lacs de Virginie ont à nouveau fait l'objet d'une étude extensive sur près d'un millier de prélèvements d'eau et de sédiments, suite à la multiplication des cas de MEAP dans cette région. Dans cette étude, un quart des prélèvements présentait des *Naegleria* dont 6 % étaient pathogènes (Duma, 1981).

Par la suite, les travaux sur les amibes libres présentes dans les eaux de baignades naturelles se sont développés dans les régions où sont apparus les cas de MEAP. Huit souches de *N. australiensis* pathogènes pour la souris ont été mis en évidence dans un lac d'Oklahoma suggérant un risque potentiel pour la baignade (John et De Jonckheere, 1985), tandis que *N. fowleri* a été mise en évidence dans un lac de Rio de Janeiro au Brésil (Salazar *et al.*, 1986).

La plupart de ces études étaient qualitatives et tentaient de mettre en évidence la présence ou non d'amibes pathogènes dans les eaux de surface et dans les sédiments. Toutefois certaines études quantitatives sur les eaux de baignades ont été réalisées avec des numérations précises d'amibes : non pathogènes, dans un lac du Nebraska (O'Dell et Crowe, 1979) ou pathogènes, en Floride (Welling, 1979).

Par la suite, une étude sur près de 60 sites de baignades aux États-Unis a confirmé la présence de *N. fowleri* dans 34 des sites étudiés (Detterline et Wilhelm, 1991). A la même époque, plusieurs études ont été également menées en Afrique et en Asie, suite à des cas de MEAP mettant en évidence la présence de *N. fowleri* dans différents sites de baignades (lac, rivière, bassin d'eau chaude stagnante, étang) (Shoeman *et al.*, 1993 ; Mansour *et al.*, 1991 ; Gupta, 1992).

Plus récemment, en 2006, une étude menée au Vénézuéla a permis de tester une trentaine d'échantillons d'eau prélevés dans différentes zones récréatives du parc Cocuizas de Maracay, huit d'entre elles présentaient des formes d'amibes compatibles avec *N. fowleri* suggérant le risque potentiel de la baignade dans ces sites (Avila *et al.*, 2006). Parallèlement, une étude au Nicaragua (Leiva *et al.*, 2008) a cherché à mettre en évidence la prévalence d'agents pathogènes dans les différentes sources d'eau de la région de Léon (rivière, eau de surface, eau chaude). La moitié des échantillons présentaient des amibes libres, *Acanthamoeba* spp. et *Naegleria* spp. ont été détectées, mais *N. fowleri* n'a pas été mise en évidence.

Une étude quantitative a été réalisée au Mexique afin de déterminer la concentration de *N. fowleri* dans une baignade en système ouvert et dans un lagon (Lares-Villa et Hernandez-Pena, 2010). Les concentrations maximales de *N. fowleri* entre août et octobre ont été estimées à 201 NPP/L pour la baignade en système ouvert et à 18 NPP/L pour le lagon.

Deux importantes synthèses réalisées aux États-Unis ont permis de faire le point sur les épidémies déclarées suite à la baignade dans des eaux récréatives, entre 1971 et 2000 (Craun et Calderon, 2005) et entre 1995 et 2004 (Craun et Wade, 2008). Une étiologie bactérienne ou liée aux protozoaires a été confirmée dans les trois quarts des foyers et 8 % se sont avérés d'origine virale (*Norovirus*), tandis que 23 % des foyers sont restés d'étiologie indéterminée. Les agents les plus fréquemment identifiés ont été *Cryptosporidium* (15 %), *Pseudomonas* (14 %), *Shigella* (13 %), *Naegleria* (11 %), *Giardia* (6 %), et *E. coli* (6 %). Les épidémies attribuées à *Naegleria* ont été principalement associées à la baignade dans les eaux douces comme les lacs, les étangs et les rivières.

Une étude en Suisse visant à tester une série d'eaux récréatives (lacs, rivière, étangs) de températures moyennes proches de 20°C a révélé la présence de différentes amibes libres y compris du genre *Naegleria*, mais pas l'espèce *fowleri* (Gianinazzi et al., 2009).

Les recherches d'amibes libres thermophiles entreprises sur les sources chaudes de plusieurs sites de baignade et rivières présentant des températures élevées (entre 25 et 45°C) à Taïwan ont révélé la présence de plusieurs espèces de *Naegleria* sans mise en évidence de *N. fowleri* (Huang et Hsu, 2010 ; Huang et Hsu, 2011).

Le premier cas de décès par MEAP, observé en France, a été détecté en Guadeloupe (Nicolas et al., 2010). Cette région volcanique des Antilles françaises possède de nombreuses résurgences géothermales qui produisent ou réchauffent de petits torrents de montagne (31°C à 45°C) dans lesquels la baignade sous une végétation luxuriante est très prisée par les populations locale et touristique. Les eaux chaudes de ces bains naturels en eau libre et les sédiments qui s'y déposent (Bain de Capes, Rivière Grosse-Corde) sont propices au développement de *N. fowleri*. L'ARS de Guadeloupe a mis en place depuis 2008 un suivi de plusieurs bassins de baignade en eau chaude sélectionnés en fonction de la température de l'eau et de leur fréquentation. Les résultats des analyses des échantillons d'eau prélevée en surface et en profondeur, montrent la présence d'une population amibienne complexe et parfois abondante. *N. fowleri* a été identifiée dans l'eau et les sédiments de la plupart des bassins à des concentrations allant de 2 à 50 Nf/L qui restent inférieures au seuil recommandé par le CSHPF pour les baignades en aval de CNPE (Moussa et al., 2013).

## 5.3.2 Piscines

### 5.3.2.1 Bassin de natation privés et publics

L'eau des piscines privées et publiques dont la température est maintenue entre 25 et 30°C, constitue un milieu favorable au développement des amibes si le traitement de l'eau mis en place n'est pas efficace (renouvellement, filtration, désinfection). Des études ont montré qu'une concentration en chlore actif comprise entre 0,5 et 1 mg/L était nécessaire pour détruire, après une minute de contact, les amibes *Naegleria* (Cerva, 1971 ; Deurremaux et al., 1974 ; Jadin, 1974).

Plusieurs auteurs ont mis en cause la qualité de l'eau dans l'apparition des cas de MEAP observés dans les piscines (Carter, 1968 ; Cerva et Novak, 1968) alors que la présence de *N. fowleri* n'a pas toujours été démontrée (Cerva, 1971 ; Anderson et al., 1973). Par ailleurs, les résultats obtenus montrent que les filtres à sable sont impliqués de façon très significative dans la contamination des eaux de piscine et de réseau (Cerva, 1971 ; Cercova et al., 1972).

À la suite de la découverte des premiers cas de MEAP imputables à l'eau des piscines, des recherches de *Naegleria* dans les piscines privées et publiques et l'étude des systèmes de filtration et de désinfection ont été menées un peu partout dans le monde. Aux États-Unis, une étude menée sur 30 piscines publiques couvertes et non couvertes désinfectées majoritairement au chlore (moyenne 0,8 mg/L) et équipées de filtres à sable, montre la présence d'amibes libres non pathogènes mais l'absence de *N. fowleri* (Lyons et Kapur, 1977).

En Nouvelle-Zélande, un cas de MEAP a été diagnostiqué après une baignade dans une piscine alimentée par deux puits dont une source d'eau chaude. Les puits semblent contaminés par des eaux usées provenant d'un camping voisin et des eaux de ruissellement. Aucune information sur le traitement de désinfection n'est donnée (Curson et al., 1979). À la

même époque, en Europe, le pouvoir désinfectant du chlore et de différents autres halogènes (brome, iode, etc.) est à nouveau testé et confirmé pour des doses allant de 0,5 mg à 1mg/L (De Jonckheere et Van de Voorde, 1976 ; Van De Voorde *et al.*, 1977).

Des analyses ont été également réalisées dans le nord de la France dans des piscines publiques. Dive *et al.* (1978) mettent en évidence la présence d'amibes non pathogènes situées principalement dans le fond et sur les parois des bassins. La recolonisation était plus importante après la vidange.

Une étude similaire a été réalisée en Belgique et a également montré la présence d'amibes non pathogènes sur les parois des bassins et dans l'eau des douches. La présence d'amibes dans l'eau a été montrée lorsque la concentration en chlore libre est inférieure à 2,5 mg/L (De Jonckheere, 1979). En Allemagne, l'analyse de neuf piscines couvertes et cinq piscines extérieures chauffées, sans préciser leur caractère public ou privé, révèle la présence principalement d'*Acanthamoeba* (Janitschke *et al.*, 1980). *N. fowleri* est mise en évidence dans une piscine couverte en ex-Tchécoslovaquie (Pospisilova et Cerva, 1981). Une inspection de routine dans une piscine sportive a mis en évidence la survie de souches pathogènes de *N. fowleri* dans la cloison du bassin et la recontamination de ce dernier, 12 ans après la série de MEAP préalablement décrite par Cerva et Novak (Kadlec et Cerva, 1978 ; Kadlec *et al.*, 1979, 1980).

À la suite de ces travaux, une surveillance de plusieurs bassins sportifs a été également mise en place à Mexico et a révélé la présence importante d'amibes pathogènes, dont plusieurs souches de *N. fowleri* alors que la concentration en chlore libre résiduel était en moyenne de 0,7 mg/L (Rivera *et al.*, 1983).

Parallèlement, en Australie, un important programme de surveillance a été mis en place sur une centaine de piscines pour déterminer les caractéristiques physico-chimiques, vérifier la qualité microbiologique des bassins et tester les pratiques de désinfection. Dans cette étude, la concentration en chlore libre n'était pas suffisante dans 40 % des piscines, les échantillons présentaient un pH éloigné de la norme recommandée (pH 7,0 – 7,6), et contenaient différents micro-organismes ainsi que des amibes libres, mais aucune *Naegleria* pathogène (Esterman *et al.*, 1984 a).

En Inde, à la même époque, une surveillance a été menée sur plusieurs piscines : l'eau d'un bassin située dans le centre de Bombay s'est révélée contaminée par *N. fowleri* (Gogate, 1985). Quelques années plus tard, en Allemagne, une centaine de piscines ont été analysées et 34 % des piscines ayant fait l'objet de prélèvements se sont avérées contenir des *Acanthamoeba* pathogènes pour la souris, tandis qu'aucune d'entre elles ne contenait *N. fowleri* (Kuhlencord *et al.*, 1989).

Plus récemment, en Pologne, une comparaison entre piscines couvertes et non couvertes a également révélé la présence d'*Acanthamoeba* dans tous les bassins, mais les souches pathogènes pour la souris n'ont été détectées que dans les piscines à l'air libre (Gornik, 2004). En revanche, en Suisse, une souche d'*Acanthamoeba lenticulata*, pathogène chez la souris, a été détectée, cette fois, dans l'eau d'une piscine couverte publique, suggérant un risque potentiel pour les patients immunodéprimés (Gianinazzi *et al.*, 2009b).

Parallèlement, une étude sur 14 piscines de Malaisie a montré la présence nettement plus importante d'*Acanthamoeba* que de *Naegleria*, dans les bassins suggérant que les kystes à paroi double d'*Acanthamoeba* sont probablement plus résistants à la dessiccation sur les plages et aux traitements chlorés que ceux de *Naegleria* (Init, 2010).

### 5.3.2.2 Les bains thérapeutiques et bains à remous.

Plusieurs études ont été réalisées dans des bassins alimentés par des eaux d'origine géothermale :

- le 3<sup>e</sup> cas décrit de MEAP en Angleterre a été recensée dans une piscine couverte alimentée par une eau chaude naturelle (Cain *et al.*, 1981) ;
- des recherches ont été menées en Italie, dans les années 1980, dans une trentaine de piscines thérapeutiques d'un site géothermal présentant une eau bromurée et iodurée, hyperthermale (80°C), prélevée à 300 m de profondeur. Après une longue maturation biologique et plusieurs refroidissements jusqu'à 35°C, cette eau est utilisée pour alimenter des bassins d'hydrothérapie régulièrement chlorés (0,5 mg/L). Les résultats ont montré la présence dans ces bains de plusieurs souches de *Naegleria* thermophiles très pathogènes pour la souris, identifiées comme *N. australiensis* par immunofluorescence (Scaglia *et al.*, 1983, 1984, 1987).
- la présence de *Naegleria* non pathogènes a été également mise en évidence lors d'une étude similaire réalisée en Espagne dans une douzaine de bains à remous à visée thérapeutique, alimentés par des sources d'eau chaude sulfureuse (Penas-Ares *et al.*, 1994). A la même époque, une étude a été entreprise au Japon, dans la province de Kanagawa, pour déterminer la distribution et le niveau de contamination par les légionelles et les amibes libres de 30 prélèvements réalisés à partir d'une douzaine de stations thermales non traitées (*hot spring spas*). Les analyses ont révélé la présence de *Naegleria* (46,7 %), *Platyamoeba* (33,3 %), *Acanthamoeba* (10,0 %) sur 22 échantillons de 11 sites (Kuroki, 1998). En Suisse, l'étude de quatre stations thermales (*hot spring resorts*) traitées à l'ozone, a révélé la présence de différentes espèces d'amibes libres non pathogènes dans les systèmes de filtrations (en amont, à l'intérieur et en aval) ainsi que dans l'un des bassins (Gianinazzi *et al.*, 2010).

Enfin, une étude sur des piscines d'hydrothérapie en milieu hospitalier a été menée en Belgique pour comparer le pouvoir désinfectant des composés halogénés (chlore et brome) et des réacteurs équipés de lampes à ultra-violet (UV). Six piscines traitées au chlore, deux par le brome, et deux autres aux U.V ont été testées. L'eau des piscines traitées aux U.V s'est révélée de très mauvaise qualité bactériologique et largement contaminée par des amibes thermophiles de type *N. lovaniensis*, contrairement à celles traitées au chlore ou au brome (De Jonckheere, 1982).

### 5.3.3 Baignades artificielles

Aucune étude relative à la recherche de *N. fowleri* dans une baignade artificielle, comme définie par ce groupe, n'a été publiée à notre connaissance et aucun cas de MEAP suite à la pratique d'activités aquatiques dans ce type de baignade n'a été recensé.

### 5.3.4 Baignades alimentées par des eaux de refroidissement industrielles

Les eaux chaudes rejetées en rivière ou en lacs par les industries, sont également susceptibles d'être à l'origine d'une multiplication des amibes pathogènes comme cela a été montré dès les années 1980 en Europe. Citons l'un des premiers cas de MEAP en Belgique, celui d'un jeune garçon en bonne santé, décédé après avoir nagé dans un cours d'eau chauffé par les effluents d'une usine produisant du zinc et du plomb. (Vandepitte *et al.*, 1974). À la suite de ces travaux, entre 1974 et 1980 en Pologne, l'analyse de deux lacs, de canaux, de circuits de refroidissements et d'une rivière attenante à deux centrales électriques a permis de mettre en évidence 64 souches de *N. fowleri* dont 13 pathogènes

pour la souris, isolées à proximité du condenseur de vapeur ainsi que dans les effluents chauds et la rivière (Kasprzak *et al.*, 1982).

De même, à cette époque, les premières souches de *N. fowleri* découvertes en France ont été mises en évidence, dans la région de Metz, dans les effluents d'une centrale électrique alimentant une lagune de refroidissement installée en dérivation sur la Moselle (Dive *et al.*, 1981). La poursuite de ces travaux dans le Nord-Est de la France, sur 23 aires industrielles différentes, a montré le développement d'amibes thermophiles (sur 19 sites), de *Naegleria* (sur 12 sites) et d'amibes pathogènes sur deux sites dans les centrales électriques et les décharges industrielles (Delattre et Oger, 1981). Cette même année, une étude menée au printemps et en été dans six rejets liquides de centrales thermiques et dans des eaux de surface environnantes, a révélé le développement plus important d'amibes pathogènes du genre *Acanthamoeba* au printemps qu'à l'automne et un plus fort pourcentage de souches virulentes de cette espèce dans les rejets thermiques que dans les eaux de surface (De Jonckheere, 1981).

Parallèlement, en ex-Tchécoslovaquie, neuf souches d'amibes considérées comme *N. fowleri* dont trois pour lesquelles la virulence a été démontrée, ont été isolées à partir des eaux de refroidissement de neuf centrales et uniquement dans la zone de pollution thermique, montrant la nécessité, selon les auteurs, d'interdire toute utilisation de ces eaux chaudes à des fins sportives ou de loisirs (Cerva *et al.*, 1980, 1982, 1983).

Des études similaires, menée à la même époque aux États-Unis (Pennsylvanie) à partir des eaux de refroidissement de huit centrales électriques au charbon ont révélé la présence de *N. fowleri* dans les échantillons de deux d'entre elles, de même que la présence d'*Acanthamoeba* et de nombreuses autres amibes non pathogènes (Shapiro *et al.*, 1983) en soulignant une incidence plus forte en été (Sykora *et al.*, 1983). Une étude quantitative portant sur plusieurs centaines d'échantillons d'eau et de sédiments a été menée en Géorgie (Savannah River Plant) sur un lac de refroidissement (450 Ha) créé pour recevoir les effluents d'un réacteur nucléaire. Pendant les périodes d'additions d'eau chaude, les concentrations d'amibes thermophiles et de *Naegleria* spp relevées en aval des reflux de la centrale à 40°C ont atteint 5 log et celles de *N. fowleri* ont augmenté de 2 log. Les concentrations sont revenues à la normale 30 et 60 jours après l'arrêt des ajouts thermiques (Tyndall *et al.*, 1989).

Plus récemment, une étude importante a été menée sur le lac Anna, l'un des plus grands lacs artificiels de Virginie, aménagé également pour refroidir une centrale nucléaire et utilisé pour des activités sportives et de loisirs. La présence de *N. fowleri* a été détectée par PCR nichée (nested PCR) dans neuf des seize sites échantillonnés au cours de l'été 2007, avec des températures situées entre 27 et 36°C et des densités d'amibes libres totales atteignant 240 amibes libres par litre (y compris *N. fowleri*). L'absence de cas de MEAP dans cette région laisse suggérer que la prédation naturelle ou les perturbations des activités nautiques pourraient freiner le développement de *N. fowleri* dans cette eau réchauffée artificiellement (Jamerson, 2009). En Belgique, des amibes thermophiles ont été détectées dans presque toutes les eaux de refroidissement de sept centrales électriques, nucléaires et conventionnelles avec *N. fowleri* comme espèce majoritaire (Behets *et al.*, 2007a).

En France, les CNPE équipées de condenseurs en acier inoxydable sont confrontées au développement de *N. fowleri* dans leur circuit de refroidissement. Des traitements anti-amibiens sont mis en place à base de monochloramine pour traiter l'eau des circuits ou de rayonnements ultra-violet pour traiter les rejets. Le suivi des concentrations en *N. fowleri* dans l'eau à l'amont et à l'aval des centrales nucléaires d'EDF, ainsi que dans les circuits de refroidissement, est défini réglementairement par les arrêtés propres à chaque site. Ces arrêtés contiennent notamment, en cas de dépassement de la valeur seuil proposée par le CSHPF (100 Nf/L), des conditions de suspension de la baignade et des activités nautiques

en aval du site. Le calcul des concentrations en amibes dans le cours d'eau en aval des sites, est réalisé à partir des mesures de *N. fowleri* dans le rejet général et en fonction des valeurs des débits de rejet et de la rivière. Il est affecté d'un facteur correctif spécifique à chaque site.

Des campagnes permettant de caractériser les concentrations en amibes dans l'eau et dans les sédiments en amont et en aval de la centrale de Civaux ont été instaurées par l'ARS de Poitou-Charentes depuis l'ouverture de la centrale en 1998 jusqu'en 2009. Les analyses effectuées durant la période estivale, ont été réalisées sur des sites de baignades, sur des sites de pratiques nautiques (kayak notamment) ainsi que sur des captages de production d'eau destinée à la consommation humaine (EDCH). Des mesures ponctuelles ont également été effectuées sur des points estimés significatifs (possible élévation de température, moulin, etc.). L'ensemble des baignades répertoriées du département ont été suivies.

Une surveillance plus approfondie a été réalisée sur plusieurs sites de baignades à raison de 3 mesures par an durant la période estivale. Les concentrations moyennes en *N. fowleri* dans l'eau et dans les sédiments en amont et en aval de la centrale qui ont été mesurées sur ces sites sont résumées dans le tableau IV.

**Tableau IV : Concentrations moyennes de *Naegleria fowleri* mesurées en amont et en aval de la CNPE de Civaux (Source ARS de Poitou Charente)**

	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
Concentration en <i>N. fowleri</i> dans l'eau (N.f./L)	nd	nd	nd	a = 2	a < 2 b = 57 c < 2 d < 2 e < 2	c < 2 d < 2	nd	nd	nd	nd
Concentration en <i>N. fowleri</i> dans les sédiments (N.f./ 10g)	nd	nd	nd	a = 4	b < 1 e < 1	e = 47	c = 4	nd	c = 4 d = 3 e = 7	nd

nd : non détecté

- (a) Eaux de baignade en amont de la centrale
- (b) Cubord situé à 2,6 km en aval de la centrale
- (c) Chauvigny situé à 14,6 km en aval de la centrale
- (d) Bonnes situé à 19 km en aval de la centrale
- (e) Bonneuil - Matours situé à 28 km en aval de la centrale

*N. fowleri* n'a pas été détectée chaque année cependant ces mesures ont permis de mettre en évidence d'autres espèces d'amibes libres comme *N. australiensis* en amont et en aval et *N. lovaniensis* en aval.

### 5.3.5 Autres points d'eau

D'autres cas de MEAP ont été recensés dans des baignades dont la définition ne correspond pas aux types de baignades utilisés dans ce rapport.

Un cas de MEAP a été recensé dans un site de baignade situé dans un désert en Californie et alimenté par une source d'eau chaude (Hecht *et al.*, 1972). Un nouveau cas de MEAP a été détecté en Nouvelle-Zélande à partir d'une source thermique (Anderson et Jamieson, 1973 ; Jamieson, 1973).

À la suite de ce cas, une étude approfondie des différentes sources thermales de Nouvelle-Zélande a été entreprise. Une partie des résurgences sont aménagées en bassins façonnés, plus ou moins exploités et entretenus, mais la majorité d'entre elles sont des sites de baignades non aménagés très fréquentés par une population locale ou touristique. Ces bassins sont situés à même le sol, généralement entourés de la flore locale et ne disposent

d'aucun traitement de l'eau ou d'autres mesures de prévention sanitaire. Brown *et al.* (1983), dans cette étude ont montré que 60 % des eaux analysées contenaient des *N. fowleri*.

Le premier cas de décès par MEAP, observé en France, a été détecté en Guadeloupe, chez un jeune garçon âgé de neuf ans après une baignade dans un bassin similaire (bassin de Dolé) (Nicolas *et al.*, 2010). Ce site, très fréquenté, est situé au pied du volcan la Soufrière et alimenté par une résurgence d'origine géothermale de température proche de 31°C. L'eau de bonne qualité minérale est captée en amont, à une profondeur de plusieurs mètres pour alimenter une usine d'embouteillage. Le trop plein est rejeté dans le milieu naturel où il s'écoule à un débit de l'ordre de 10 à 30 m<sup>3</sup>/heure dans la végétation avant de remplir plusieurs bassins ouverts, situés les uns au-dessous des autres en cascades. Les bassins façonnés en béton et dalles naturelles sont anciens, plus ou moins bien entretenus. Le bassin principal est celui de Dolé, le plus accessible et le plus fréquenté. Il est vidangé puis lavé au jet d'eau sous pression plusieurs fois par semaine. Les parois sont désinfectées au chlore avant remise en eau. Ce protocole de nettoyage limite le développement des amibes libres. En effet les concentrations en *N. fowleri* mesurées dans ce bassin sont inférieures à celles mesurées dans les autres sites de baignades situés dans les rochers limitrophes et qui ne sont pas entretenus. Toutefois, malgré ce nettoyage, la souche de *N. fowleri* (génotype euro-américain), qui a été identifiée dans le liquide céphalo-rachidien de l'enfant décédé, persiste toujours dans ces bassins et alentour en 2012-2013 (Moussa *et al.*, 2013). Plusieurs autres baignades de ce type existent en Guadeloupe (Bain des Amours, Bains Jaunes, Bain de Matouba, Bain du Curé, Bains de la Lise, Douches de Sofaïa, Bain de Morphy, Ravine Chaude, *etc.*). Ils proviennent de résurgences plus ou moins canalisées alimentant des bassins ouverts de tailles variables plus ou moins bien entretenus. Les résultats des analyses menées par l'ARS de Guadeloupe depuis 2008 montrent la présence ponctuelle de *N. fowleri* dans ces bassins.

D'autres cas de MEAP ont été décrits suite à des baignades ou des activités aquatiques dans des « points d'eau » peu profonds, chauffés par le soleil.

Trois cas de MEAP chez des enfants ont été diagnostiqués en Grande-Bretagne après que ces derniers aient joué dans une flaque d'eau boueuse (Apley *et al.*, 1970).

Un cas de MEAP a été décrit à Mexico, après une baignade dans l'eau stagnante d'un fossé d'irrigation (Valenzuela *et al.*, 1984).

**Depuis la découverte dans les années soixante, en Australie, de l'amibe libre *N. fowleri*, comme agent responsable de la MEAP, de nombreuses études essentiellement qualitatives ont été menées sur les sites de baignade. Les recherches ont été entreprises dans les différentes régions du globe où les cas de MEAP ont été signalés telles que les États-Unis, et particulièrement en Floride, en Amérique Latine, en Nouvelle-Zélande, en Guadeloupe, en Europe, ainsi qu'en Asie.**

**Cette amibe libre pathogène a été détectée dans les eaux douces principalement pendant la saison chaude.**

**Elle a été détectée dans l'ensemble des types de baignade : baignade aménagée en eau libre (lacs, rivières, canaux, étangs) dont l'eau peut être réchauffée par des eaux de refroidissement industrielles, piscines (privées et publiques), ainsi que dans les bains thérapeutiques et bains à remous. Des sites naturels de baignade alimentés par de l'eau d'origine géothermale peuvent être également contaminés par cette amibe.**

**Quelques études quantitatives ont permis d'estimer la concentration de *N. fowleri* entre 2 et 200 cellules par litre, selon les cas et les protocoles de comptage. Les cas de MEAP attribués après examen biologique du LCR, à *N. fowleri* sont principalement**

**associés à la baignade dans des eaux douces dont la température dépasse 25°C et qui ne sont pas ou mal traitées.**

## 6 Caractérisation du risque

L'évaluation quantitative d'un risque sanitaire lié à un micro-organisme nécessite pour un danger identifié, de disposer de données relatives à l'occurrence, la dose infectante, les populations exposées et les voies d'exposition.

Compte tenu du manque de connaissances et des spécificités liées à *N. fowleri* concernant notamment :

- son infectiosité ;
- son devenir dans l'environnement (résistance, influence des facteurs environnementaux) ;
- la variabilité de la réponse d'un individu à un autre ;
- son échantillonnage et son analyse qui restent problématique ;
- les concentrations en *N. fowleri* lors de l'exposition des cas de MEAP ;

il est possible que les cas de MEAP soient sous-rapportés.

Par ailleurs la dose minimale infectieuse n'est pas connue (Agence de la santé publique du Canada, 2001).

Il n'a donc pas été possible de réaliser une quantification du risque lié à la présence de *N. fowleri* dans les eaux de baignade. Cependant, plusieurs auteurs ont tenté de développer des modèles permettant de caractériser ce risque.

Wellings *et al.* (1977) ont quantifié le risque pour les baigneurs, lié à l'exposition à *N. fowleri* en développant une approche épidémiologique. L'étude a consisté à comparer le nombre de cas de MEAP enregistrés en Floride de 1962 à 1977 avec le nombre de baigneurs en eau douce. Le modèle établi estime la probabilité d'apparition d'un cas annuel de MEAP pour 2,6 millions de baigneurs soit un risque de  $3,85 \cdot 10^{-7}$ .

Bard et Siclet (1995) ont développé plusieurs modèles visant à établir une probabilité d'infection à *N. fowleri* chez l'Homme suite à une exposition par la baignade. Les probabilités de contracter une MEAP ont été calculées à partir des relations doses-réponses établies chez l'animal et transposées ensuite à l'Homme et de la probabilité d'exposition. Celle-ci correspond à la probabilité que des amibes pénètrent l'organisme en fonction de la concentration dans l'eau. Deux des modèles donnent des résultats comparables à celui de Wellings *et al.* Pour une eau contenant une cellule de *N. fowleri* par litre, le risque de contracter une MEAP est de  $10^{-8}$  par baignade.

Plus récemment, Cabanes *et al.* (2001) ont développé un modèle visant à estimer le risque lié à l'exposition à *N. fowleri* par la baignade. En faisant l'hypothèse que l'exposition à une seule cellule de *N. fowleri* peut entraîner le développement d'une MEAP, les résultats montrent que le risque de contracter cette infection lors d'une baignade serait de  $7 \cdot 10^{-9}$  dans une eau contenant 1 Nf/L et de  $7,8 \cdot 10^{-7}$  pour 50 Nf/L. Le risque serait de 1/140 000 baignades lorsque le seuil recommandé par le CSHPF est dépassé. **Lors de l'évaluation du risque lié à un agent pathogène dans l'eau, l'OMS estime que le risque est acceptable s'il est d'une infection pour  $10^3$  personnes par an. L'US EPA estime que le risque acceptable est d'une infection pour  $10^4$  personnes par an. Les différents modèles développés pour quantifier le risque lié à la présence de *Naegleria fowleri* dans les eaux de baignade montrent que la probabilité de développer une MEAP se situe bien en dessous de ces seuils ( $10^{-7}$  à  $10^{-8}$ ). Globalement, le risque pour les baigneurs lié à *N. fowleri* apparaît donc comme faible.**

## 7 Modalités de gestion du risque

Plusieurs organismes comme les CDC<sup>4</sup> (Centers for disease control and prevention) ou le département de la santé de l'Australie de l'ouest<sup>5</sup> (Department of health western Australia) préconisent des mesures de prévention à mettre en œuvre afin de limiter l'exposition à *N. fowleri* lors de la baignade dans des eaux non traitées. La contamination se faisant par exposition de la muqueuse nasale à de l'eau contenant des *Naegleria fowleri* par inondation des fosses nasales, il est préconisé d'adopter lors des activités de baignade des pratiques qui limitent le contact avec de l'eau susceptible d'être contaminée :

- « ne pas plonger ou sauter dans les sources d'eau chaude non traitées (eau de surface, eau souterraine, eau minérale naturelle) ;
- éviter de mettre la tête sous l'eau/garder la tête hors de l'eau ;
- tenir le nez fermé, utiliser un pince-nez ;
- éviter les activités aquatiques dans l'eau douce chaude pendant les périodes de température élevée de l'eau et de faibles niveaux d'eau ;
- entretenir les pataugeoires et les piscinettes pour enfant en les nettoyant, en les vidant et en les faisant sécher entre chaque utilisation. »

Les mesures de prévention visent aussi à ne pas favoriser la présence de *N. fowleri* dans l'eau de la baignade :

- améliorer les conditions d'hygiène générales de la baignade pour limiter l'apport de pollution par les baigneurs et donc l'introduction éventuelle d'amibes libres via les sédiments ;
- procéder dans la mesure du possible compte tenu de la configuration de la baignade, à un entretien régulier de la zone de baignade ;
- dans le cas de bassin, le nettoyer et évacuer tous les sédiments ;
- éviter de creuser, ou remuer le sédiment en pratiquant les activités liées à l'eau en particulier quand les eaux sont peu profondes.

Ces recommandations sont des mesures de bon sens, mais ne sont pas fondées sur une évaluation scientifique. Compte tenu du faible nombre d'infections, il est difficile de montrer leur efficacité.

En France, l'ARS de Guadeloupe a mis en place depuis 2008 un suivi des amibes thermophiles (dénombrement de *Naegleria* totales et identification/dénombrement de *N. fowleri*) dans un nombre de sites déterminé. Les représentants de l'ARS de Guadeloupe ont indiqué qu'en parallèle, des analyses physico-chimiques et microbiologiques prévues dans le cadre du contrôle sanitaire, sont réalisées sur ces mêmes sites lorsqu'ils ont été déclarés officiellement par une collectivité en tant que « site de baignade » au titre du CSP. Le choix des sites suivis a été fait en fonction de la température de l'eau (moyenne des températures annuelles sur la base des résultats de SISE Baignades s'il s'agissait d'un site inclus au contrôle sanitaire ou sur la base du rapport du BRGM de février 2007), du type d'eau au contact du public (les sources dont l'eau est un mélange d'eau douce et d'eau de mer sont exclues), de la fréquentation du site et de son accessibilité. Des panneaux d'information ont été mis en place sur certains sites depuis septembre 2012. Selon les membres de l'ARS de Guadeloupe les recommandations présentées sur les panneaux pour limiter le risque de contamination ne sont pas réellement suivies.

<sup>4</sup> [www.cdc.gov/parasites/naegleria/prevention.html](http://www.cdc.gov/parasites/naegleria/prevention.html)

<sup>5</sup> [www.public.health.wa.gov.au/cproot/3649/2/Amoeba%20Response%20Protocol.pdf](http://www.public.health.wa.gov.au/cproot/3649/2/Amoeba%20Response%20Protocol.pdf)

## 8 Conclusions et recommandations

### 8.1 Conclusions

Si l'exposition aux amibes libres, et en particulier celle de l'espèce *N. fowleri*, est mondiale, l'examen des différents cas de MEAP publiés montre que l'infection reste un évènement rare.

*N. fowleri* est principalement présente dans les eaux douces à faible débit voire dans certains cas stagnantes, de pays tropicaux ou tempérés. Elle a été également détectée dans les sédiments et les biofilms. Dans les pays tempérés, sa distribution est saisonnière ; la détection de cette espèce se faisant principalement en été et en automne. *N. fowleri*, sous forme de kyste, peut survivre à différents stress environnementaux, ce qui pourrait expliquer sa détection dans les sédiments en hiver.

Plusieurs facteurs physico-chimiques et microbiologiques sont concomittants à la détection de *N. fowleri* dans les eaux récréatives sans que les mécanismes les associant soient totalement connus :

- une température de l'eau supérieure à 25°C, la température de l'eau élevée bien que nécessaire, n'étant pas un facteur suffisant à la prolifération de *N. fowleri* ;
- des prédateurs ou des compétiteurs en faible concentration ;
- de la matière organique et des matières en suspension afin que *N. fowleri* puisse y trouver une source de nourriture et un support pour s'y développer.

La recherche de la présence de *N. fowleri* est complexe. Selon les études réalisées depuis près de 40 ans, les prélèvements sont réalisés dans l'eau ou dans les sédiments selon des pratiques différentes. L'analyse des échantillons se pratique généralement dans une période courte (moins de 24h) après le prélèvement. Les pré-traitements de ces derniers ont un impact sur le résultat des analyses puisque la filtration et la centrifugation aboutissent notamment à une perte importante de la population amibienne quantifiée. Les méthodes d'identification font le plus souvent appel à la mise en culture des amibes puis à des tests spécifiques (ELISA, PCR, etc.). Toutefois, il est probable que toutes les amibes vivantes ne soient pas cultivables. Des méthodes émergentes sans mise en culture (Q-PCR, immunofluorescence couplé à la cytométrie en phase solide) ont été développées et font l'objet d'optimisation. **Il n'existe pas de protocole standardisé pour prélever, identifier et quantifier *N. fowleri* dans les eaux récréatives.**

L'étude de l'efficacité des traitements biocides sur l'élimination de *N. fowleri* dans l'eau montre que **le respect des conditions de mise en œuvre des traitements de désinfection actuellement autorisés en France pour l'eau alimentant les piscines publiques est suffisant pour empêcher le risque de contamination de l'eau par cette amibe.**

De l'expertise collective des études épidémiologiques recensées dans ce rapport, il ressort que sont « à risque » les personnes de sexe masculin (45 cas de sexe masculin recensés dans ce rapport contre 24 de sexe féminin), enfants ou adultes jeunes (15 ans étant la moyenne des cas recensés dans ces travaux). Cette tranche de la population ne montre pas une sensibilité physiologique particulière mais il est suspecté de sa part, une pratique des activités aquatiques entraînant l'immersion de la tête ou l'insertion d'eau dans les cavités nasales plus fréquentes. Il faut également noter que la lame criblée est relativement plus poreuse chez les sujets jeunes ce qui faciliterait l'infection. Par ailleurs, ces études ont montré que l'injection d'amphotéricine B par voie intra-veineuse, aux doses habituellement utilisées pour traiter les infections méningées conduit rarement à la guérison d'une MEAP.

Dans les études analysées, les conditions d'exposition à *N. fowleri* (lieu, activité pratiquée, etc.) sont peu décrites voir inconnues notamment la concentration en *N. fowleri* au moment de l'exposition. Il n'est donc pas possible, en l'état actuel des connaissances :

- de proposer une relation dose-effet ;
- de fixer un seuil en-deçà duquel le risque d'infection est nulle ;
- d'établir une relation entre l'exposition aux amibes libres de l'espèce *N. fowleri* et un éventuel risque pour la santé ;
- de décrire des scénarios d'exposition réalistes ;

et, par conséquent, de réaliser une quantification des risques.

En outre, la question de la possibilité d'une infection à *N. fowleri* en dehors de la baignade peut être posée. En effet, plusieurs cas publiés de MEAP contractés à la suite de lavages sinusiens, d'ablution d'eau destinée à la consommation humaine ou à la suite de jeux dans des flaques soulèvent la possibilité d'une infection liée à d'autres circonstances que la baignade.

**En conclusion, considérant :**

- **le très faible nombre de cas recensés de MEAP dus à *N. fowleri* en France (1 cas) et dans le monde (310 cas) rapporté à la présence ubiquitaire de *N. fowleri* ;**
- **les modalités d'exposition (baignade en eau chaude, exposition de la muqueuse nasale à de l'eau contenant des *Naegleria fowleri* par inondation des fosses nasales) ;**
- **et malgré le taux de létalité de MEAP très important (95 % des cas) ;**

**les experts, bien que la quantification du risque n'ait pas pu être menée, estiment que le risque pour la santé publique est faible par rapport à celui d'autres maladies infectieuses liées à la baignade<sup>6</sup>.**

## 8.2 Recommandations

Les experts reprennent les recommandations du CDC qui indique que : « *pour l'ensemble des baignades, la seule mesure efficace de prévention d'une infection à *N. fowleri* est d'éviter d'y être exposée et donc de s'abstenir de pratiquer les activités de baignade dans des eaux chaudes ou réchauffées notamment lorsque la température de l'air est élevée et le niveau de l'eau bas.* »

S'il paraît parfois difficile d'appliquer une telle mesure, une information et des actions de prévention doivent être mises en place sur l'ensemble des sites où des activités aquatiques sont pratiquées et pour lesquels la température de l'eau est élevée :

- certaines incombent aux gestionnaires de ces baignades afin de ne pas favoriser la présence de *N. fowleri* dans l'eau :

---

<sup>6</sup> Afsset. (2009) Risques sanitaires liés aux baignades artificielles et Anses (2010). Note relative aux choix de la valeur limite de *Pseudomonas aeruginosa* dans les baignades artificielles

- en aménageant les abords de la baignade afin de limiter l'introduction de sédiments et de faire respecter les règles élémentaires d'hygiène (installation de pédiluve, de douches, etc.) ;
- en procédant, dans la mesure du possible compte tenu de la configuration de la baignade, à un entretien régulier de la zone de baignade ; dans le cas des bassins, une vidange suivi d'un nettoyage afin d'évacuer les sédiments doivent être réalisés ;
- d'autres incombent aux baigneurs afin de limiter le contact de l'eau avec les voies nasales et d'adopter des pratiques adaptées qui doivent leur être signalées :
  - ne pas plonger ou sauter dans les sources d'eau chaude non traitées (eau de surface, eau souterraine) ;
  - éviter de creuser ou de remuer les sédiments en pratiquant les activités liées à l'eau ;
  - éviter d'immerger la tête et la garder hors de l'eau ;
  - utiliser, dans la mesure du possible, un pince nez ;
  - respecter les règles d'hygiène de base (respect des zones de déchaussages, passage par un pédiluve afin de limiter l'introduction d'amibes, de pollutions particulières ou organiques par les baigneurs).

Par ailleurs, afin de limiter l'exposition des baigneurs à *N. fowleri*, les membres du groupe proposent des recommandations pour chaque type de baignade, basées notamment sur la connaissance des facteurs favorisant la multiplication de *N. fowleri* (température, faible débit en particulier).

➤ **Cas des piscines**

Comme indiqué dans le rapport de l'Agence relatif aux piscines réglementées (Afsset, 2010), un traitement de l'eau efficace (floculation, filtration et désinfection) semble être suffisant pour maîtriser le risque lié à *N. fowleri* dans les piscines privées et publiques.

➤ **Cas des sites de baignades au sens de la directive européenne 2006/7/CE concernant la gestion de la qualité des eaux de baignade**

Des températures de l'eau élevées peuvent être constatées pour des sites de baignades naturellement chauffées par le soleil (lacs, étangs, etc.) ainsi que pour des sites de baignades situées à l'aval d'activités à l'origine de réchauffement artificiel de l'eau (aval de CNPE, rejets industriels, etc.).

Issu de la directive européenne 2006/7/CE, le dispositif réglementaire actuel, concernant la gestion de la qualité des eaux de baignade, prévoit l'établissement d'un profil permettant d'identifier les sources de pollution susceptibles d'avoir un impact sur la qualité des eaux de baignades et d'affecter la santé des baigneurs. **Les experts recommandent que, lors de l'actualisation de ces profils, les risques sanitaires liés à *N. fowleri* soient pris en compte quand les usages en amont, ou la nature du plan d'eau sont susceptibles d'être à l'origine d'une température de l'eau élevée.**

En fonction des conclusions du profil, des études complémentaires permettant de confirmer la présence de *N. fowleri* devraient être mise en place. Dans le cas où sa présence serait vérifiée, des mesures de gestion pour les baignades devraient être proposées (surveillance de l'eau adaptée, information du public, etc.).

➤ **Cas des baignades artificielles**

Dans son avis du 17 juillet 2009 relatif à l'évaluation des risques sanitaires liés aux baignades artificielles, l'Agence a recommandé des prescriptions techniques (rappelées ci-dessous) minimales à respecter pour l'exploitation d'une baignade artificielle.

En ce qui concerne la gestion hydraulique de la masse d'eau de baignade, il est notamment préconisé « *l'existence d'un dispositif permettant le renouvellement de la totalité du volume de la baignade en moins de 12 heures, l'absence de zone morte pour l'ensemble du volume d'eau de la baignade et l'existence d'un dispositif de reprise du film d'eau superficiel pour au moins 50 % du débit en système ouvert ou du débit recyclé en système fermé* ».

Il est également demandé de maîtriser « *la température maximale de l'eau entre 23 et 25 °C en particulier pour les baignades en système fermé localisées en zone géographique à conditions climatiques favorables* ».

**Le respect de ces dispositions, ainsi que celles relatives au respect du taux de fréquentation maximale instantanée (10 m<sup>3</sup> par baigneur) et de la fréquentation journalière, apparaissent suffisantes pour la gestion du risque sanitaire lié à *N. fowleri*.** Des dispositions complémentaires spécifiques aussi bien en ce qui concerne les aménagements des baignades que les mesures de prévention à adopter par les baigneurs pour ce type de baignade n'apparaissent pas nécessaires.

Les experts souhaitent souligner l'importance du respect de ces dispositions dans les baignades artificielles existantes et que ne soient pas créées de nouvelles baignades artificielles avec un renouvellement de l'eau insuffisant et une configuration qui pourrait entraîner une température de l'eau élevée ; *de facto* de telles baignades ne répondraient pas à la définition de baignades artificielles telle que proposée par l'Agence et la baignade ne saurait être recommandée dans de tels sites.

#### ➤ **Cas de sites naturels d'eaux chaudes**

Les experts ont porté une attention particulière au cas spécifique des sites de baignades alimentés par des eaux chaudes d'origine géothermale en site naturel (résurgence, cascade, bassins naturels) ou en sites plus ou moins aménagés artificiellement aux abords des résurgences (ex : cas du bassin de Dolé de Guadeloupe). Les experts rappellent que l'enfant décédé en France d'une MEAP s'était baigné dans ce type de baignade dans laquelle la présence de *N. fowleri* avait été suspectée au moment des faits et avérée par la suite.

Ces baignades n'entrent pas dans le champ de la directive européenne relative à la gestion de la qualité des eaux de baignade. Cependant, certains de ces sites peuvent répondre à la définition d'une baignade artificielle comme proposée par l'Agence mais les dispositions préconisées notamment en termes de température de l'eau ou/et de fréquentation ne peuvent y être appliquées. De fait, de telles baignades n'entrent dans aucun cadre réglementaire et ne sont pas contrôlées d'un point de vue sanitaire pour la plupart d'entre elles. Néanmoins, ces baignades sont habituellement fréquentées par un nombre important de baigneurs et les responsables considèrent souvent comme difficile de les interdire.

Au-delà du risque sanitaire liés à *N. fowleri*, qui semble plus important pour ce type de baignade qui peuvent présenter un ou plusieurs facteurs favorisant la présence de ce pathogène (température de l'eau élevée, présence de sédiments, biofilms, etc.), d'autres micro-organismes pathogènes sont susceptibles d'être présents dans l'eau de ces sites.

**L'expertise ayant révélé une connaissance insuffisante de ce type de baignade, les experts recommandent qu'un recensement soit réalisé sur l'ensemble du territoire français (métropole et outre-mer) et qu'un profil de baignade y soit établi afin que des mesures de gestion adaptées puissent y être appliquées.**

**Les experts demandent en outre que l'Agence soit saisie sur ce type de baignade particulière afin qu'une analyse de l'ensemble des dangers soit réalisée.**

Concernant l'exposition à *N. fowleri* dans ce type de baignade, les facteurs de risque d'une contamination de l'Homme lors d'un bain paraissent trop mal connus pour justifier un affichage spécifique au risque de MEAP sur ces sites. En revanche, dans un souci de transparence **les baigneurs devraient être informés, par la mise en place d'un affichage, que les dispositions de prévention des risques sanitaires liés à la baignade préconisées par les pouvoirs publics ne pouvant y être appliquées, notamment en termes de température de l'eau ou/et de traitement de l'eau et/ou de fréquentation, par conséquent toute pratique de baignade conduisant à ingérer cette eau, à inonder les fosses nasales ou mettre de l'eau au contact d'une plaie ou d'une muqueuse est déconseillée.**

**En complément, quel que soit le type de baignade, les experts recommandent de mettre en place particulièrement dans les régions concernées par les cas cliniques déjà décrits, une recherche systématique du diagnostic de MEAP dans les méningites purulentes dont le diagnostic étiologique n'a pas été établi après réalisation des explorations habituelles (cultures et/ou PCR dans le liquide céphalo-rachidien à la recherche de bactéries pyogènes ou d'entérovirus).** Dans de telles études, les méningites purulentes non documentées devraient être investiguées quelle que soit leur issue, car des formes auto-limitées d'infections ne peuvent être *a priori* exclues (Dempe, 1982).

L'exposition des professionnels n'a pas été abordée dans ce rapport alors qu'il existe des lieux où *N. fowleri* est susceptible d'être détectée (piscicultures par exemple). Bien qu'aucun cas n'ait été décrit à ce jour, l'exposition de cette catégorie de la population devrait être explorée. Les professionnels, notamment ceux qui effectuent l'entretien des sites de baignade, devraient d'ores et déjà être sensibilisés au minimum au port d'équipements de protection individuels adaptés.

### **8.3 Proposition d'amélioration des connaissances**

Pour améliorer les connaissances nécessaires à l'évaluation des risques sanitaires liés à la présence de *N. fowleri* dans les baignades, plusieurs mesures sont proposées :

- un recensement des sites de baignade susceptibles d'être contaminés :
  - sites aménagés de baignade dont la température de l'eau est élevée ;
  - les sites aménagés ou naturels alimentés par de l'eau chaude et notamment dans le cas des eaux minérales naturelles ;
  - sites non conventionnels (mare, fossés, fontaine, etc.) ;
- une harmonisation des méthodes de prélèvements et d'analyses de *N. fowleri* ;
- une campagne d'analyses sur des sites contrastés permettant de déterminer :
  - le niveau de contamination ;
  - l'origine de la contamination ;
  - l'évolution annuelle de la contamination ;
  - l'influence des caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques de l'eau sur la présence de *N. fowleri*.
- accroître les connaissances sur :
  - le comportement de *N. fowleri* dans le milieu naturel ;

- la prévalence du portage naso-pharyngé asymptomatique de *N. fowleri* et séroprévalence de *N.fowleri* en Guadeloupe chez des baigneurs exposés dans les sites naturels comme celle de Dolé ;
  - la prévalence de *N. fowleri* dans les méningites purulentes sans diagnostic étiologique en Guadeloupe ;
  - la susceptibilité particulière de certains individus ;
  - les méthodes de prélèvements et d'analyses ;
- développer la recherche sur les mesures thérapeutiques à proposer.

## Références bibliographiques

### Réglementation

Directive 2006/7/CE du parlement européen et du conseil du 15 février 2006 concernant la gestion de la qualité des eaux de baignade et abrogeant la directive 76/160/CEE.

### Norme

AFNOR (2003). NF X50-110 Qualité en expertise - Prescriptions générales de compétence pour une expertise.

### Publications

Adams M., Andrews R.H., Robinson B., *et al.* (1989). A genetic approach to species criteria in the amoeba genus *Naegleria* using allozyme electrophoresis. *Int. J. Parasitol.* ; 19 : 823-834.

Adl S.M., Simpson A.G.B., Farmer M.A., *et al.* (2005). The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists. *J. Eukaryot. Microbiol.* ; 52 : 399–451.

Afsset (2009). Risques sanitaires liés aux baignades artificielles. Évaluation des risques sanitaires. Avis de l'Afsset. Rapport d'expertise collective. Maisons-Alfort.

Afsset (2010). Risques sanitaires liés aux piscines. Évaluation des risques sanitaires liés aux piscines. Partie 1 : piscines réglementées. Avis de l'Afsset. Rapport d'expertise collective. Maisons-Alfort.

Agence de la santé publique du Canada (2001). *Naegleria fowleri* – fiches techniques santé/sécurité (FTSS). 16 mai 2001. En ligne : [www.phac-aspc.gc.ca/msds-ftss/msds106f-fra.php](http://www.phac-aspc.gc.ca/msds-ftss/msds106f-fra.php)

Aldape K., Huizinga H., Bouvier J., *et al.* (1994). *Naegleria fowleri* : characterization of a secreted histolytic cysteine protease. *Exp. Parasitol.* ; 78 : 230–241.

Anderson K., Jamieson A. (1972). Primary Amoebic Meningoencephalitis. *Lancet* ; 299 (7756) : 902-903.

Anderson K., Jamieson A., Jadin J.B., *et al.* (1973). Primary amoebic meningoencephalitis. *Lancet* ; 1 (7804) : 672.

Anses (2013). Éléments d'évaluation des risques sanitaires liés aux piscines. Partie 2 : bains à remous. Avis de l'Anses. Rapport d'expertise collective. Maisons-Alfort.

Apley J., Clarke S.K., *et al.* (1970). Primary amoebic meningoencephalitis in Britain. *Br. Med. J.*; 1 (5696) : 596-599.

Ávila I., Rodríguez De G.M., Infante D., *et al.* (2006). Amibas de vida libre potencialmente patógenas en aguas del parque "Las Cocuizas", Maracay, Venezuela. *Rev. Cubana Med. Trop.* ; 58 (1) : 19-24.

Bard D., Lambrozo J. (1992). Les méningo-encéphalites et les encéphalites à amibes libres. *Méd. Mal. Inf.*, 22 : 698-705.

- Bard D., Siclet F. (1995). Amibes libres et santé publique. ENSP, Électricité de France, Rennes, Paris. 142 p
- Barnett N.D., Kaplan P., Hopkin A.M., *et al.* (1996). Primary amoebic meningoencephalitis with *Naegleria fowleri* : Clinical review. *Pediat. Neurol.*; 15 (3) : 230-234.
- Bedi H.K., Devapura J.C. et Bomb B.S. (1972). Primary amoebic meningoencephalitis. *J. Indian med. Ass.*; 58 : 13-14.
- Behets J., Declerck P., Delaedt Y., *et al.* (2006). Quantitative detection and differentiation of free-living amoeba species using SYBR green-based real-time PCR melting curve analysis. *Curr. Microbiol.* ; 53 : 506-509.
- Behets J., Declerck P., Delaedt Y., *et al.* (2007). A duplex real-time PCR assay for the quantitative detection of *Naegleria fowleri* in water samples. *Water Res.* ; 41 : 118-126.
- Behets J., Declerck P., Delaedt Y., *et al.* (2007). Survey for the presence of specific free-living amoebae in cooling waters from Belgian power plants. *Parasitol. Res.*; 100 (6) : 1249-1256.
- Biddick C.J., Rogers L.H., Brown T.J. (1984). Viability of pathogenic and non-pathogenic free-living amoebae in long-term storage at a range of temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* ; 48 (4) : 859-860.
- Biyela T. (2010) . Water Quality Decay and Pathogen Survival in Drinking Water Distribution Systems. PhD Thesis. The University of Arizona.
- Biyela T., Ryu H., Brown A., *et al.* (2012). Distribution systems as reservoirs of *Naegleria fowleri* and other amoebae. *Journal AWWA* ; 104 (4) : 9-50.
- Brass K. (1972). Primäre Amöben-Meningoencephalitis. *Dtsch. Med. Wschr.*, 97 : 1983-1985.
- Brown T.J., Cursons R.T.M., Keys E.A. (1983). The occurrence and distribution of pathogenic free-living amoebae in thermal areas of the North Island of New Zealand. *N. Zeal. J. Mar. Fresh.* ; 17 (1) : 59-69.
- Brown R.L. (1991). Successful treatment of primary amebic meningoencephalitis. *Arch. Intern. Med.* ; 151 : 1201-1202.
- Buck S.L., Rosenthal R.A., Schlech B.A. (2000). Methods used to evaluate the effectiveness of contact lens care solutions and other compounds against *Acanthamoeba* : a review of the literature. *Clao J.* ; 26 (2) : 72-84.
- Bunjongpuk S. (2000). Primary amebic meningoencephalitis (PAM). *Thai J. Ped.* ; 39 : 38-49.
- Burri D.C., Gottstein B., Zumkehr B. *et al.* (2012). Development of a high-versus low-pathogenicity model of the free living amoeba *Naegleria fowleri*. *Microbiology* ; 158 (10) : 2652-2660.
- Buse H.Y., Ashbolt N.J. (2011). Differential growth of *Legionella pneumophila* strains within a range of amoebae at various temperatures associated with in-premise plumbing. *Lett. Appl. Microbiol.* ; 53 (2) : 217-224.

- Buse H.Y., Ashbolt N.J. (2012). Counting *Legionella* Cells within Single *Amoeba* Host Cells. *Appl. Environ. Microbiol.* ; 78 (6) : 2070-2072.
- Butt C.G. (1966). Primary amoebic meningo-encephalitis. *New Engl. J. Med.* ; 274 : 1473-1476.
- Butt C.G., Baro C., Knorr R.W. (1968). *Naegleria* (sp.) identified in amoebic encephalitis. *Am. J. Clin. Pathol.* ; 50 (5) : 568-574.
- Cabanes P., Wallet F., Pringuez E., *et al.* (2001). Assessing the Risk of Primary Amoebic Meningoencephalitis from Swimming in the Presence of Environmental *Naegleria fowleri*. *Appl. Environ. Microbiol.* ; 67 (7) : 2927-2931.
- Cable B.L., John D.T. (1986). Conditions for maximum enflagellation in *Naegleria fowleri*. *J. Protozool.* ; 33 (4) : 467-472.
- Cain A.R.R., Wiley P.F., Brownell B., *et al.* (1981). Primary amoebic meningoencephalitis. *Arch. Dis. Child.* ; 56 (2) : 140-143.
- Callicott J.H. (1968). Amoebic meningoencephalitis due to free living amoeba of the *Hartmanella* (*Acanthamoeba*) *Naegleria* groups. *Am. J. Clin. Pathol.* ; 49 : 84-91.
- Callicott J.H., Jones M.M., Nelson E.C, *et al.*, (1968) Meningoencephalitis due to pathogenic free-living amoeba. *J. Amer. Med. Ass.* ; 206 : 579-582.
- Cariou M.L., Pernin P. (1987). First Evidence for Diploidy and Genetic Recombination in Free-Living Amoebae of the Genus *Naegleria* on the Basis of Electrophoretic Variation. *Genetics* ; 115 : 265-270.
- Carrasco-Yeppez M., Rojas-Hernandez S., Rodriguez-Monroy M.A., *et al.* (2010). Protection against *Naegleria fowleri* infection in mice immunized with Cry1Ac plus amoebic lysates is dependent on the STAT6 Th2 response. *Parasite Immunol.* ; 32 (9-10) : 664-670.
- Carter R.F. (1968). Primary amoebic meningo-encephalitis : clinical, pathological and epidemiological feature of six fatal cases. *J. Path. Bact.* ; 96 : 1-25.
- Carter R.F. (1969). Sensitivity to amphotericin B of a *Naegleria* sp. isolated from a case of primary amoebic meningoencephalitis. *J. Clin. Pathol.* ; 22 (4) : 470-474.
- Carter R.F. (1970). Description of a *Naegleria* sp. isolated from two cases of primary amoebic meningo-encephalitis, and of the experimental pathological changes induced by it. *J. Pathol.* ; 100 (4) : 217-244.
- Carter R.F. (1972). Primary amoebic meningoencephalitis. An appraisal of present knowledge. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* ; 66 : 193-213.
- Caruzo G., Cardozo J. (2008). Primary meningoencephalitis : a new case from Venezuela. *Trop. Doct.* ; 28 : 256-257.
- Cassells J.M., Yahya M.T., Gerba C.P., *et al.* (1995). Efficacy of a combined system of copper and silver and free chlorine for inactivation of *Naegleria fowleri* amoebas in water. *Water Sci. Technol.* ; 31 (5-6) : 119-122.

- Cercova H., Cerva L., Macek J. (1972). Quantitative follow-up study of the frequency of limax groupe Amebas in the Podolf swimming pool. *Ceskoslovenuka epidem. microbiol. Immunol.* ; 21 : 203-210.
- Cermeño J.R., Hernández I., El Yasin H., *et al.* (2006). Meningoencephalitis by *Naegleria fowleri*. Epidemiological study in Anzoategui State, Venezuela. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* ; 39 (3) : 264-268.
- Cerva L. and Novak K. (1968). Amoebic meningoencephalitis : 16 fatalities. *Science* ; 160 (3823) : 92.
- Cerva L. (1969). Amoebic meningoencephalitis : axenic culture of *Naegleria*. *Science* ; 163 : 576.
- Cerva L., Ferdinandova M., Novak K. *et al.* (1969) Meningoenphalitis durch *Amoebida naegleriidae*. Einer weiteren Fall in der Tschechoslowakei. Isolierung des Erregers. *Münch. Med. Wschr.* ; 111 : 2090-2094.
- Cerva L. (1971). Experimental infection of laboratory animals by the pathogenic *Naegleria gruberi* strain Vitek. *Folia Parasitol. (Praha)* ; 18 (2) : 171-176.
- Cerva L. (1978). Some further characteristics of the growth of *Naegleria fowleri* and *Naegleria gruberi* in axenic culture. *Folia Parasitol. (Prague)* ; 25 : 1-8.
- Cerva L (1989). Acanthamoeba culbertsoni and Naegleria fowleri: occurrence of antibodies in man; *J Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* ; 33 (1) : 99-103.
- Cerva L., Jecna P., Hyhlik R. (1980). *Naegleria fowleri* from a canal draining cooling water from a factory. *Folia Parasitol. (Praha)* ; 27 (2) : 103-107.
- Cerva L., Kasprzak W., Mazur T. (1982). *Naegleria fowleri* in cooling waters of power plants. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* ; 26 (2) : 152-161.
- Cerva L., Simanov L. (1983). *Naegleria fowleri* in cooling circuits of industrial and power plants in North Moravia. *Folia Parasitologica* ; 30 (2) : 97-101.
- Cervantes-Sandoval I., Serrano-Luna J., Garcia-latorre E. *et al.*, (2008). Characterization of brain inflammation during primary amoebic meningoencephalitis. *Parasitol. Int.* ; 57 : 307-313.
- Cervantes-Sandoval I., Serrano-Luna J., Meza-Cervantes J., *et al.* (2009). *Naegleria fowleri* induces MUC5AC and proinflammatory cytokines in human epithelial cells via ROS production and EGFR activation. *Microbiology* ; 155 (11) : 3739-3747.
- Cervantes-Sandoval I., Serrano-Luna J., Pacheco-Yépez J., *et al.* (2010). Differences between *Naegleria fowleri* and *Naegleria gruberi* in expression of mannose and fucose glycoconjugates. *Parasitol. Res.*; 106 (3) : 695-701.
- Chang S.L. (1971). Small, free-living amebas: cultivation, quantitation, identification, classification, pathogenesis, and resistance. *Curr. Top. Comp. Pathobiol.* ; 1 : 201-254.
- Chang S.L. (1978). Resistance of pathogenic *Naegleria* to some common physical and chemical agents. *Appl. Environ. Microbiol.* ; 35 (2) : 368-375.

- Chen Y.S.R., Sproul O.J., Rubin A.L. (1985). Inactivation of *Naegleria gruberi* cysts by chlorine dioxide. *Water Res.* ; 19 (6) : 783-789.
- Choo M.S., Jung S.Y., Park S., *et al.* (2003). Immunological Characterizations of a Cloned 13.1-Kilodalton Protein from Pathogenic *Naegleria fowleri*., *Clin. Vaccine Immunol.*; 10 (5) : 954-959.
- Chu D.T., Ferguson T.J., Marciano-Cabral F. (2000). Protein Kinase Activation and Protein Phosphorylation in *Naegleria fowleri* Amebae in Response to Normal Human Serum. *J. Eukaryotic Microbiology* ; 47 (1) : 40–47. Clark C.G., Cross G.A. (1987). rRNA genes of *Naegleria gruberi* are carried exclusively on a 14-kilobase-pair plasmid. *Mol. Cell. Biol.* ; 7 : 3027-3031.
- Clark C.G. (1990). Genome structure and evolution of *Naegleria* and its relatives. *J. Eukaryotic. microbiology* ; 37 (4) : 2S-6S.
- Cogo P.E., Scaglia M., Gatti S., *et al.* (2004). Fatal *Naegleria fowleri* meningoencephalitis, Italy. *Emer. Infect. Dis.* ; 10 (10) : 1835-1837.
- Coulon C., Collignon A., Mc Donnell G., *et al.* (2010). Resistance of *Acanthamoeba* cysts to disinfection treatments used in health care settings. *J. Clin. Microbiol.* ; 48 (8) : 2689-2697.
- Coulon C., Dechamps N., Meylheuc T. *et al.* (2012). The Effect of In Vitro Growth Conditions on the Resistance of *Acanthamoeba* Cysts. *J. Eukaryot. Microbiol.* ; 59 (9) : 198-205.
- Cooter R. (2002). The history of the discovery of primary amoebic meningoencephalitis. *Australian family physician*; 31 (4) : 399-400.
- Craun GF, Calderon RL, Craun MF. (2005). Outbreaks associated with recreational water in the United States. *Int J Environ Health Res.* ;15 (4) : 243-62.
- Craun G.F. and Wade T.J. (2008). Outbreaks associated with recreational water in the United States, 1995-2004. *Hygiene Statni Zdravotni Ustav* ; 53 (3) : 76-83.
- CSHPF (1996). Le problème des amibes libres pathogènes : éléments d'évaluation des risques et actualité du problème en aval de la centrale de Dampierre en Burly, Séances des 14 mai et 11 juin 1996. Avis. 1996-1.
- Cursons R.T.M., Brown T.J., Keys E.A., *et al.* (1979). Primary amoebic meningo-encephalitis in an indoor heat-exchange swimming pool. *N. Zeal. Med. J.* ; 90 (646) : 330-331.
- Cursons R.T.M., Brown T.J., Keys E.A. (1980). Effect of disinfectants on pathogenic free-living amoebae : In axenic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* ; 40 (1) : 62-66.
- Cursons R.T., Sleight J.W., Hood D. (2003). A case of primary amoebic meningoencephalitis : North Island, New Zealand. *N. Zeal. Med. J.* ; 116 : 1187.
- Dawson M.W., Brown T.J. (1987). The effect of chlorine and chlorine dioxide on pathogenic free-living amoebae (PFLA) in simulated natural conditions: The presence of bacteria and organic matter. *New Zel. J. Mar. Fresh.* ; 21 (1) : 117-123.
- Declerck P., Behets J., Van Hoef V., *et al.* (2007). Detection of *Legionella* spp. and some of their amoeba hosts in floating biofilms from anthropogenic and natural aquatic environments. *Water Res.* ; 41 : 3159-3167.

- De Jonckheere J., Van De Voorde H. (1976). Differences in destruction of cysts and pathogenic and nonpathogenic *Naegleria* and *Acanthamoeba* by chlorine. *Appl. Environ. Microbiol.* ; 31 (2) : 294-297.
- De Jonckheere J. et Van de Voorde H. (1977). Comparative study of six strains of *Naegleria* with special reference to nonpathogenic variants of *N. fowleri.*, *J. Protozool.*, 24 : 304-309.
- De Jonckheere J.F. (1979). Occurrence of *Naegleria* and *Acanthamoeba* in aquaria. *Appl Environ. Microbiol.* ; 38 (4) : 590-593.
- De Jonckheere J.F. (1981). Pathogenic and nonpathogenic *Acanthamoeba* spp. in thermally polluted discharges and surface waters. *J. Protozool.* ; 28 (1) : 56-59.
- De Jonckheere J.F (1981). *Naegleria australiensis* sp nov., another pathogenic *Naegleria* from water. *Protistologica* ; 17 (3) : 423-429.
- De Jonckheere J.F. (1982). Isoenzyme patterns of pathogenic and non-pathogenic *Naegleria* spp. using agarose isoelectric focusing. *Ann. Microbiol. (Paris)* ; 133 (2) : 319-342.
- De Jonckheere J.F. (1982). Hospital hydrotherapy pools treated with ultra violet light: bad bacteriological quality and presence of thermophilic *Naegleria*. *J. Hyg. (Lond)* ; 88 (2) : 205-214.
- De Jonckheere J.F., Pernin P.; Scaglia M., et al. (1984). A comparative study of 14 strains of *Naegleria australiensis* demonstrates the existence of a highly virulent subspecies: *N. australiensis italica* n. spp. *J. Protozool.* ; 31 (2) : 324-31.
- De Jonckheere J.F. (1987). Characterization of *Naegleria* species by restriction endonuclease digestion of whole-cell DNA. *Mol. Biochem. Parasitol.* ; 24 : 55–66.
- De Jonckheere J.F. (1988). Geographic origin and spread of pathogenic *Naegleria fowleri* deduced from restriction enzyme patterns of repeated DNA. *Biosystems* ; 21 : 269-75.
- DeJonckheere J.F. (1998). Sequence Variation in the Ribosomal Internal Transcribed Spacers, Including the 5.8 SrDNA of *Naegleria* spp. *Protist.* ; 149 : 221-228.
- De Jonckheere J.F., Brown S., Dobson P., et al. (2001).The Amoeba-to-Flagellate Transformation Test is not Reliable for the Diagnosis of the Genus *Naegleria*. Description of three new *Naegleria* spp. *Protist.* ; 152 (2) : 115–121.
- De Jonckheere J.F. (2002). A Century of Research on the Amoeboflagellate Genus *Naegleria*. *Acta Protozool.*; 41: 309 – 342.
- De Jonckheere J.F. (2011a). Origin and evolution of the worldwide distributed pathogenic amoeboflagellate *Naegleria fowleri*. *Infect. Genet. Evol.* ; 11 (7) : 1520- 1528.
- De Jonckheere J.F. (2012) The impact of man on the occurrence of the pathogenic free-living amoeboflagellate *Naegleria fowleri*. *Future Microbiol.* ; 7 (1) : 5-7.
- Delattre J.M., Oger C. (1981). *Naegleria fowleri* and heated aquatic environments : A possible mechanism. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* ; 61 (4) : 441-452.
- Dempe S., Martinez A.J., Janitschke K. (1982) Subacute and chronic meningoencephalitis in mice after experimental infection with a strain of *Naegleria fowleri* originally isolated from a patient. *Infection* ; 10 : 5–8.

- DeNapoli T., Robinson J., Rutman J., *et al.* (1996). Primary amoebic meningoencephalitis after swimming in the Rio Grande. *Texas Medicine* ; 92 (10) : 59-63.
- Derreumaux A.L., Jadin J.B., Willaert E., *et al.* (1974). Effect of chlorine on aquatic amoebae. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* ; 54 (4-5) : 415-428.
- Detterline J.L., Wilhelm W.E. (1991). Survey of pathogenic *Naegleria fowleri* and thermotolerant amebas in federal recreational waters. *T. Am. Microscop. Soc.* ; 110 (3) : 244-261.
- Dive D., Leclerc H., *et al.* (1978). Amoebae in swimming-pools: microbiological and epidemiological aspects (author's transl). *Ann Microbiol (Paris)* ; 129B (2) : 225-244.
- Dive D.G., Leclerc H., *et al.* (1981). Isolation of *Naegleria fowleri* from the cooling pond of an electric power plant in France. *Ann. Microbiol. (Paris)* ; 132A (1) : 97-105.
- Dorsch M.M. (1982). Primary amoebic meningoencephalitis : an historical and epidemiological perspective with particular reference to South Australia, Epidemiology Branch, South Australian Health Commission ; 67.
- Dos Santos J.G.N. (1970). Fatal primary amebic meningoencephalitis. A retrospective study in Richmond. Virginia. *Amer. J. Clin. Path.* . 54 : 737-742.
- Dubray B.L., Wilhelm W.E., Jennings B.R. (1987). Serology of *Naegleria fowleri* and *Naegleria lovaniensis* in a Hospital Survey<sup>1</sup>. *J. Eukar. Microbiol.* ; 34 (3) : 322-327.
- Duma R.J. (1970). In vitro susceptibility of pathogenic *Naegleria gruberi* to amphotericin B. *Antimicrob. Agents Chemother.* ; 10 : 109-111.
- Duma R.J., Rosenblum W.I., McGehee R.F. (1971). Primary amoebic meningoencephalitis caused by *Naegleria*. Two new cases, response to amphotericin B, and a review. *Annals of Internal Medicine* ; 74 (6) : 923-931.
- Duma R.J. (1981). Study of pathogenic free-living amebas in fresh-water lakes in Virginia. *Environmental Protection Agency* ; EPA-PB-126369 Duma R.J., Shumaker J.B., *et al.* (1971). Primary amebic meningoencephalitis. A survey in Virginia. *Arch. Environ. Health* ; 23 (1) : 43-47.
- Dunnebacke T.H., Schuster F.L. (1971). Infectious agent from a free-living soil amoeba, *Naegleria gruberi*. *Science* ; 174 (8) : 516-518.
- Dunnebacke T.H., Schuster F.L. (1977). The nature of a cytopathogenic material present in amebae of the genus *Naegleria*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* ; 26 (3) : 412-421.
- Dunnebacke T.H., Schuster F.L. (1985). Morphological response of cultured cells to *Naegleria* amoeba cytopathogenic material. *J. Cell. Sci.*; 75 : 1-16.
- Dunnebacke T.H., Walen K.H. (1999). A protein from *Naegleria* amoebae causes apoptosis in chick embryo and CHO cells after they become confluent. *Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*; 35 (5) : 252-261.
- Dunnebacke T.H., Schuster F.L. (1974). An infectious agent associated with amebas of the genus *Naegleria*. *J. Protozool.* ; 21 (2) : 327-329.

- Edagawa A., Kimura A., Kawabuchi-Kurata T., *et al.* (2009). Isolation and genotyping of potentially pathogenic *Acanthamoeba* and *Naegleria* species from tap-water sources in Osaka, Japan. *Parasitol. Res.* ; 105 : 1109–1117.
- Engel J.P., Rubin A.J., Sproul O.J. (1983). Inactivation of *Naegleria gruberi* cysts by chlorinated cyanurates. *Appl. Environ. Microbiol.* ; 46 (5) : 1157-1162.
- Ercken D., Verelst L., Declerck P., *et al.* (2003). Effects of peracetic acid and monochloramine on the inactivation of *Naegleria lovaniensis*. *Water Sci. Technol.* ; 47 (3) : 167-171.
- Esterman A., Dorsch M., Cameron S., *et al.* (1984a). The association of *Naegleria fowleri* with the chemical, microbiological and physical characteristics of South Australian water supplies. *Water Res.*; 18 (5) : 549-553.
- Esterman A., Roder D.M., *et al.* (1984b). Determinants of the microbiological characteristics of South Australian swimming pools. *Appl. Environ. Microbiol.* ; 47 (2) : 325-328.
- Ettinger M.R., Webb S.R., Harris S.A., *et al.* (2003) Distribution of free-living amoeba in James River, Virginia USA. *Parasitol. Res.* ; 89 : 6-15.
- Fiordalisi I. Christie J., Moffitt C. (1992) Primary amebic meningoencephalitis - North Carolina, 1991. *JAMA* ; 268 (7) : 862-863.
- Fowler M., Carter R.F. (1965). Acute Pyogenic Meningitis Probably Due to *Acanthamoeba* sp. : a Preliminary Report. *Brit. Med. J.* ; 2 : 740-742.
- Fritzinger A.E., Toney D.M., Mac Lean R.C. (2006). Identification of a *Naegleria fowleri* Membrane Protein Reactive with Anti-Human CD59 Antibody. *Infect. Immun. February* ; 74 (2) : 1189-1195.
- Fritz-Laylin L.K., Prochnik S.E., Ginger M.L., *et al.* (2010). The Genome of *Naegleria gruberi* Illuminates Early Eukaryotic Versatility. *Cell.* ; 140 (5) : 631–642.
- Fulton C. (1970). Amebo-flagellates as research partners : the laboratory biology of *Naegleria* and *Tetramitus*. *Methods Cell. Physiol.* ; 4 : 341-476.
- Fulton C., Dingle A. (1971). Basal bodies but not centrioles in *Naegleria*. *J. Cell. Biol.* 51 : 826-36.
- Fulton C. (1977). Cell differentiation in *Naegleria gruberi*. *Annu. Rev. Microbiol.* 31 : 597-629.
- Galvez A., Valdivia E., Gonzalez-Segura A., *et al.* (1993). Purification, characterization, and lytic activity against *Naegleria fowleri* of two amoebicins produced by *Bacillus licheniformis* A12. *Appl. Environ. Microbiol.* 59 (5) : 1480-1486.
- Galvez A., Maqueda, M., Cordovilla P. *et al.* (1994). Characterization and biological activity against *Naegleria fowleri* of amoebicins produced by *Bacillus licheniformis* D-13. *Antimicrob. Agents Chemother.* ; 38 (6) : 1314-1319.
- Gautam P.L., Sharma S., Puri S., *et al.* (2012). A rare case of survival from primary amebic meningoencephalitis. *Indian J. Crit. Care Med.* ; 16 (1) : 34-36.

- Gianinazzi C., Schild M., *et al.* (2009). Screening Swiss water bodies for potentially pathogenic free-living amoebae. *Res. Microbiol.* ; 160 (6) : 367-374.
- Gianinazzi C., Schild M., *et al.* (2009). Potentially human pathogenic *Acanthamoeba* isolated from a heated indoor swimming pool in Switzerland. *Exp. Parasitol.* ; 121 (2) : 180-186.
- Gianinazzi C., Schild M., *et al.* (2010). Screening of Swiss hot spring resorts for potentially pathogenic free-living amoebae. *Exp. Parasitol.* ; 126 (1) : 45-53.
- Gogate A., Deodhar L. (1985). *Isolation and identification of pathogenic Naegleria fowleri* (aerobia) from a swimming pool in Bombay. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*; 79 (1) : 134-135.
- González-Robles A, Cristóbal-Ramos A.R., González-Lázaro M., *et al.* (2009). *Naegleria fowleri* : Light and electron microscopy study of mitosis. *Exp. Parasitol.* ; 122 : 212–217.
- Gornik K., Kuzna-Grygiel W. (2004). Presence of virulent strains of amphizoic amoebae in swimming pools of the city of Szczecin. *Ann. Agric. Environ. Med.* ; 11 (2) : 233-236.
- Goswick S.M., Brenner G.M. (2003). Activities of therapeutic agents against *Naegleria fowleri* in vitro and in a mouse model of primary amebic meningoencephalitis. *J. Parasitol.* ; 89 (4) : 837-842.
- Goswick S.M., Brenner G.M. (2003b). Activities of azithromycin and amphotericin B against *Naegleria fowleri* in vitro and in a mouse model of primary amebic meningoencephalitis. *Antimicrob. Agents Chemother.* ; 47 (2) : 524-528.
- Goudot S., Herbelin P., Mathieu L., *et al.* (2012). Growth dynamic of *Naegleria fowleri* in a microbial freshwater biofilm. *Water Res.* ; 46 : 3958-3966.
- Grate Jr I. (2006). Primary amebic meningoencephalitis : A silent killer. *Can. J. Emerg. Med.* ; 8 (5) : 365-369.
- Griffin J.L. (1983). The pathogenic amoebflagellate *Naegleria fowleri* : Environmental isolations, competitors, ecologic interactions, and the flagellate-empty habitat hypothesis. *J. Protozool.* ; 30 (2) : 403-409.
- Grundy R. et Blowers R. (1970). A cas of primary amoebic meningoencephalitis treated with chloroquine. *E. Afr. Med. J.* ; 47 : 153-158.
- Gupta S., Das S.R. (1999). Stock cultures of free-living amebas: Effect of temperature on viability and pathogenicity. *J. Parasitol.*; 85 (1) : 137-139.
- Gupta S. (1992). Isolation of *Naegleria fowleri* from pond water in West Bengal, India. *Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg.* ; 86 (1) : 46.
- Gupta N., Bhaskar H., Duggal S. *et al.* (2009). Primary amoebic meningoencephalitis : First reported case from Rohtak, North India; *Braz. J. infec. Dis.*; 13 (3) : 236-237.
- Gustave J., Cassadou S., Nicolas M., *et al.* (2010). Bilan des recherches de *N. fowleri* dans les sites de baignade en eau chaude de Guadeloupe, 2009. *Bulletin de veille sanitaire* ; 2 : 2-5.
- Hannish W., Hallagan L.F. (1997). Primary amebic meningoencephalitis. A review of the clinical literature. *Wild. environ. med.* ; 8 : 211-213.

- Hebbar S., Bairy I., Bhaskaranand N. *et al.* (2005). Fatal case of *Naegleria fowleri* meningoencephalitis in an infant : case report. *Ann. trop. Paediatr.* ; 25 : 223-226.
- Hecht R.H., Cohen A.H., Stoner J., *et al.* (1972). Primary amebic meningoencephalitis in California. *Calif. Med.* ; 117 (1) : 69-73.
- Heggie T.W. (2010). Swimming with death: *Naegleria fowleri* infections in recreational waters. *Travel Med. Infect. Dis.* ; 8 (4) : 201-206.
- Herbst R., Ott C., Jacobs T., *et al.* (2002). Pore-forming polypeptides of the pathogenic protozoon *Naegleria fowleri*. *J. Biol. Chem.* ; 277 : 22353–22360.
- Herbst R., Marciano-Cabral F. et Leippe M. (2004). Antimicrobial and pore-forming peptides of free-living and potentially highly pathogenic *Naegleria fowleri* are released from the same precursor molecule. *J. Biol. Chem.* 279 : 25955–2595.
- Hermanne J., Jadin J.B., Martin J.J. (1972). Méningo-encéphalite amibienne primitive en Belgique (primary amoebic meningoencephalitis in Belgium). *Ann. Pediat.* ; 19 : 425-436.
- Hermanne J., Jadin J.B., Martin J.J. (1973). Meningoencephalite amibienne primitive en Belgique. Quatre premiers cas. *Acta paed. Belg.*; 27 : 348-365.
- Hsu B.M., Huang C.C., Chen J.S., *et al.* (2011). Comparison of potentially pathogenic free-living amoeba hosts *by Legionella* spp. in substrate-associated biofilms and floating biofilms from spring environments. *Water Res.* ; 45 : 5171-5183.
- Hsu B.M., Lin C.L., *et al.* (2009). Survey of pathogenic free-living amoebae and *Legionella* spp. in mud spring recreation area. *Water Res.* ; 43 : 2817-2828.
- Hu W.N., Band R.N. et Kopachik W.J. (1991) Virulence related protein synthesis in *Naegleria fowleri*. *Infect. Immun.* 59 : 4278–4282.
- Hu W.N., Kopachik W., Band R.N. (1992). Cloning and Characterization of Transcripts Showing Virulence-Related Gene Expression in *Naegleria fowleri*. *Infect. Immun.*; 60 (6) : 2418-2424.
- Huang S.W., Hsu B.M. (2010). Survey of *Naegleria* and its resisting bacteria-*Legionella* in hot spring water of Taiwan using molecular method. *Parasitol. Res.* ; 106 (6) : 1395-1402.
- Huang S.W., Hsu B.M. (2011). Survey of *Naegleria* from Taiwan recreational waters using culture enrichment combined with PCR. *Acta Tropica* ; 119 (2-3) : 114-118.
- Huang S.W., Hsu B.M., Chen N.H., *et al.* (2011). Isolation and identification of *Legionella* and their host amoebae from weak alkaline carbonate spring water using a culture method combined with PCR. *Parasitol. Res.* ; 109 : 1233-1241.
- Hughes R., Heaselgrave W., Kilvington S. (2003). *Acanthamoeba polyphaga* strain age and method of cyst production influence the observed efficacy of therapeutic agents and contact lens disinfectants. *Antimicrob. Agents Chemother* ; 47 (10) : 3080-3084.
- Huizinga H.W., McLaughlin G.L. (1990). Thermal ecology of *Naegleria fowleri* from a power plant cooling reservoir. *Appl. Environ. Microbiol.* ; 56 (7) : 2200-2205.

- Init I., Lau Y.L., *et al.* (2010). Detection of free living amoebae, *Acanthamoeba* and *Naegleria*, in swimming pools, Malaysia. *Trop. Biomed.* ; 27 (3) : 566-577.
- Ithoi I., Ahmad A.F., Nissapatorn V. *et al.* (2011). Detection of *Naegleria* species in environmental samples from peninsular Malaysia ; PLoS ONE 6 : 9.
- Jadin J.B. (1974). Dispersion and cycle of free-living amoebae. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* ; 54 (4-5) : 371-385.
- Jadin J.B., Willaert E. (1972). Trois cas de méningo-encéphalite amibienne primitive à *Naegleria gruberi* observés à Anvers (Belgique). *Protistologica* ; 8 : 95-100.
- Jaffar-Bandjee M.C., Alessandri J.L., Molet B., *et al.* (2005). Primary amebic meningoencephalitis : 1 st Case observed in Madagascar ; *Bull. Soc. Pathol. Exot.* ; 98 (1) : 11-13.
- Jahnes W., Fullmer H., Li C.P. (1957). Free-living amoeba as contaminants in monkey kidney tissue culture. *Proc. Soc. Expt. Biol. Med.* ; 96 : (484-488).
- Jain R., Prabhakar S., Modi M. (2002). *Naegleria* meningitis : A rare survival. *Neurology India*; 50 (4) : 470-472.
- Jain R., Tilak V. (2011). Primary amoebic meningoencephalitis due to *Naegleria fowleri*. *J. Indian dent. Assoc.* ; 109 (7) : 500-501.
- Jamerson M., Remmers K., Cabral R. *et al.* (2009). Survey for the presence of *Naegleria fowleri* Amebae in lake water used to cool reactors at a nuclear power generating plant. *Parasitol. Res.* ; 104 (5) : 969-978.
- Jamerson M., da Rocha-Azevedo B., Cabral G.A., *et al.* (2012). Pathogenic *Naegleria fowleri* and non-pathogenic *Naegleria lovaniensis* exhibit differential adhesion to, and invasion of, extracellular matrix proteins. *Microbiology* ; 158 (Pt 3) : 791-803.
- Jamieson A. (1973). The epidemiology of primary amoebic meningo-encephalitis in South Australia. *Prog. Protozool.* : 198.
- Janitschke K., Werner H., *et al.* (1980). Examinations on the occurrence of free-living amoebae with possible pathogenic traits in swimming pools (author's transl). *Zentralbl. Bakteriol. B.*; 170 (1-2) : 108-122.
- Jariya P., Makeo S., Jaroovvesama N., *et al.* (1983). Primary amoebic meningoencephalitis : a first reported case in Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* ; 14 : 525-527.
- Jarolim K.L., McCosh J.K., Howard M.J., *et al.* (2010). A light microscopy study of the migration of *Naegleria fowleri* from the nasal submucosa to the central nervous system during the early stage of primary amoebic meningoencephalitis in mice. *J. Parasitol.* ; 86 (1) : 50-55.
- Jarolim K.L., McCosh J.K., Howard M.J. (2002). The role of blood vessels and lungs in the dissemination of *Naegleria fowleri* following intranasal inoculation in mice. *Folia Parasitol.* ; 49 (3) : 183-186.

Jarillo-Luna A., Moreno-Fierros L., Campos-Rodríguez R. *et al.* (2008). Intranasal immunization with *Naegleria fowleri* lysates and Cry1Ac induces metaplasia in the olfactory epithelium and increases IgA secretion. *Parasite Immunol.* ;30 (1) : 31-38.

John D.T., Cole T.B., Marciano-Cabral M. (1984). Sucker-Like Structures on the Pathogenic Amoeba *Naegleria fowleri*. *Applied environ. Microbiol.* ; 47 (1) : 12-14.

John D.T., De Jonckheere J.F. (1985). Isolation of *Naegleria australiensis* from an Oklahoma Lake. *J. Protozool.* ; 32 (4) : 571-575.

John D.T., Howard, M.J. (1995). Seasonal distribution of pathogenic free-living amebae in Oklahoma waters. *Parasitol. Res.*, 81 (3) : 193-201.

John D.T., John R.A. (1996a). Viability of pathogenic *Acanthamoeba* and *Naegleria* and virulence of *N. fowleri* during long-term cryopreservation. *Folia Parasitol.* ; 43 (1) : 43-46.

John D.T., John R.A. (1996). Viability of pathogenic *Acanthamoeba* and *Naegleria* and virulence of *N. fowleri* during long-term cryopreservation. *Folia Parasitol. (Praha)* ; 43 (1) : 43-46.

John D.T., Howard M.J. (1996). Techniques for isolating thermotolerant and pathogenic freeliving amebae. *Folia Parasitol.* ; 43 : 267-271.

John D.T., Howard M.J. (1996b). Isolation of Thermotolerant Freelifving Amebae from Lake Tenkiller, Oklahoma. *Proceedings of the Oklahoma Academy of Science* 76: 1-4

John D.T., John R.A. (2006). Viability of pathogenic *Naegleria* and *Acanthamoeba* isolates during 10 years of cryopreservation. *Folia Parasitol. (Praha)* 53 : 311-312.

Jung S.Y., Kim J.H., Lee Y.J. *et al.* (2008). *Naegleria fowleri* : *nfa1* gene knock-down by double-stranded RNAs. *Experimental Parasitology* ; 118 (2) : 208-213.

Jung S.Y., Kim J.H., Song K.J., *et al.* (2009). Gene silencing of *nfa1* affects the *in vitro* cytotoxicity of *Naegleria fowleri* in murine macrophages. *Mol. biochem. parasitol.* ; 165 (1) : 87-93.

Kadlec V., Cerva L., Skvarova J. (1978). Virulent *Naegleria fowleri* in an indoor swimming pool. *Science* ; 201 (4360) : 1025.

Kadlec V., Skvarova J., Cerva L. (1979). Pathogenic *Naegleria fowleri* in an indoor swimming pool. *Ceskoslovenska Hygiena* ; 24 (2) : 81-83.

Kadlec V., Skvarova J., *et al.* (1980). Virulent *Naegleria fowleri* in indoor swimming pool. *Folia Parasitol. (Praha)* ; 27 (1) : 11-17.

Kasprzak W., Mazur T. (1972). Free-living amoebae isolated from waters frequented by people in the vicinity of Poznan, Poland. Experimental studies in mice on the pathogenicity of the isolates. *Z. Trop. med. Parasitol.* ; 23 (4) : 391-398.

Kasprzak W., Mazur T., Cerva L. (1982). *Naegleria fowleri* in thermally polluted waters. *Folia Parasitol (Praha)* ; 29 (3) : 211-218.

Karanis P. (2006). A review of an emerging waterborne medical important parasitic protozoan. *Jpn J. Protozool.* ; 39 (1) : 5-19.

- Kaushal V., China D.K., Ram S. *et al.* (2008). Primary amoebic meningoencephalitis due to *Naegleria fowleri*. *J. Assoc. Physicians India* ; 56 (june) : 459-462.
- Keeling J., Burger G., Durnford D.G., *et al.* (2005). The tree of eukaryotes. *Trend. Ecol. Evol.* ; 20 (12) : 670-676.
- Kemble S.K., Lynfield R., DeVries A.S., *et al.* (2012). Fatal *Naegleria fowleri* Infection Acquired in Minnesota : Possible Expanded Range of a Deadly Thermophilic Organism. *Clinical Infectious Diseases* ; 54 (6) : 805-809.
- Kilvington S., Mann P., Warhurst D. (1984). Differentiation between *Naegleria fowleri* and *N. lovaniensis* using isoenzyme electrophoresis of aspartate aminotransferase. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* ; 78 (4) : 562-563.
- Kilvington S. (1990). Activity of water biocide chemicals and contact lens disinfectants on pathogenic free-living amoebae. *International Biodeterioration* ; 26 (2-4) : 127-138.
- Kilvington S. (1995a). Identification of *Naegleria fowleri* and other *Naegleria spp* (free-living amoebae) using cellulose acetate membrane electrophoresis of glucose phosphate isomerase. *FEMS Microbiol. Letter* ; 133 : 219-223.
- Kilvington S., Beeching J. (1995b). Development of a PCR for the identification of *Naegleria fowleri* from the environment. *Appl. Environ. Microbiol.*; 61 (10) : 3764-3767.
- Kim J.H., Jung S.Y., Lee Y.J. (2008a). Effect of Therapeutic Chemical Agents In Vitro and on Experimental Meningoencephalitis Due to *Naegleria fowleri*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52 (11) : 4010-4016.
- Kim J.H., Lee Y.J., Sohn H.J. *et al.* (2008b). Therapeutic effect of rokitamycin in vitro and on experimental meningoencephalitis du to *Naegleria fowleri*. *Int J. Antimicrob. Agents.* ; 32 : 411-417.
- Kim J.H., Yang A.H., Sohn H.J., *et al.* (2009). Immunodominant antigens in *Naegleria fowleri* excretory-secretory proteins were potential pathogenic factors. *Parasitol. Res.* ; 105 (6) : 1675-1681.
- Kim J.H., Sohn H.J., Lee S.H., *et al.* (2012). Induction of interleukin-8 by *Naegleria fowleri* lysates requires activation of extracellular signal-regulated kinase in human astroglial cells. *Parasitol. Res.* ; 1-6.
- Kim J.H., Sohn H.J., Lee J, *et al.* (2013). Vaccination with Lentiviral Vector Expressing the *nfa1* Gene Confers a Protective Immune Response to Mice Infected with *Naegleria fowleri* ; *Clin Vaccine Immunol.* ; 20 (7) : 1055-1060.
- Koehsler M., Leitsch D., Fürnkranz U. , *et al.* (2008). *Acanthamoeba* strains lose their abilities to encyst synchronously upon prolonged axenic culture. *Parasitol. Res.* ; 102 (5) : 1069-1072.
- Koehsler M., Leitsch D., Duchêne M., *et al.* (2009). *Acanthamoeba castellanii*: growth on human cell layers reactivates attenuated properties after prolonged axenic culture. *FEMS Microbiol. Lett.*; 299 (2) : 121-127.
- Kuhlencord A., Mergerian H., Bommer W. (1989). Studies on the pathogenesis of *Acanthamoeba*-associated meningoencephalitis. *Zentralbl. Bakteriol.* ; 271 (2) : 256-260.

- Kuroki T., Yagita K., *et al.* (1998). Experimental infection of *Naegleria fowleri* in mice. *Kansenshogaku zasshi. Jpn. J. Infect. Dis.* ; 72 (10) : 1064-1069.
- Kyle D.E., Noblet G.P (1985). Vertical distribution of potentially pathogenic free-living amoebae in freshwater lakes. *J. Protozool.* ; 32 (1) : 99-105.
- Kyle D.E., Noblet G.P. (1987). Seasonal distribution of thermotolerant free-living amoebae. II. Lake Issaqueena. *J. Protozool.* ; 34 (1) : 10-15.
- Langlais B., Perrine D. (1986). Action of ozone on trophozoites and free amoeba cysts, whether pathogenic or not. *Ozone : Sci. Eng.* ; 8 : 187-198.
- Lares-Villa F., De Jonckheere J.F., De Moura H., *et al.* (1993). Five cases of primary amebic meningoencephalitis in Mexicali, Mexico : Study of the isolates. *J. Clin. Microbiol.*; 31 (3) : 685-688.
- Lares-Villa F., Hernandez-Pena C. (2010). Concentration of *Naegleria fowleri* in natural waters used for recreational purposes in Sonora, Mexico (November 2007-October 2008). *Exp. Parasitol.* ; 126 (1) : 33-36.
- Lawande R.V., Duggan M.B., Constantinidou M., *et al.* (1979). Primary amoebic meningoencephalitis in Nigeria (report of two cases in children). *J. Trop. Med. Hyg.*, 82 (4) : 84-88.
- Lau H.Y., Ashbolt N.J. (2009). The role of biofilms and protozoa in *Legionella* pathogenesis: implications for drinking water. *J. Appl. Microbiol.* ; 107 : 368-378.
- Lebbadi M., Galvez A., Valdivia E., *et al.* (1994). Purification of amoebolytic substances from *Bacillus licheniformis* M-4. *Arch. Microbiol.*; 162 (1-2) : 98-102.
- Lebbadi M., Valdivia E., Galvez A., *et al.* (1995). Cocultivation of the amoeba *Naegleria fowleri* and the amoebicin- producing strain *Bacillus licheniformis* M-4. *Appl. Environ. Microbiol.* ; 61 (4) : 1649-1652.
- Le Calvez T., Trouilhe M.C., Humeau P., *et al.* (2012). Detection of free-living amoebae by using multiplex quantitative PCR. *Mol. Cell. Probes* ; 26 : 116-120.
- Lee Y.J., Kim J.H., Jeong S.R., *et al.* (2007). Production of Nfa1-specific monoclonal antibodies that influences the in vitro cytotoxicity of *Naegleria fowleri* trophozoites on microglial cells. *Parasitology Research* ; 101 (5) : 1191-1196.
- Lee Y.J., Kim J.H., Sohn H.J., *et al.* (2011). Effects of immunization with the rNfa1 protein on experimental *Naegleria fowleri*-PAM mice. *Parasite Immunology* ; 33 (7) : 382-389.
- Leiva B., Clasdorfer E., *et al.* (2008). Free-living *Acanthamoeba* and *Naegleria* spp. amoebae in water sources of León, Nicaragua. *Rev. Biol. Trop.*; 56 (2) : 439-446.
- Lopez C., Budge P., Chen J., *et al.* (2012). Primary amebic meningoencephalitis. A case report and literature review. *Pediatr. Emerg. Care*; 28 (3) : 272-276.
- Loret J.F., Greub G. (2010). Free-living amoebae : Biological by-passes in water treatment. *Int. J. Hyg. Environ. Health* ; 213 (3) : 167-175.

- Loschiavo F., Ventura-Spagnolo T., Sessa E. (1993). Acute primary meningoencephalitis from entamoeba *Naegleria Fowleri*. Report of a clinical case with a favourable outcome. *Acta Neurologica* ; 48 (5) : 333-340.
- Lyons T.B., Kapur R. (1977). *Limax* amoebae in public swimming pools of albany, schenectady, and rensselaer counties, new york: their concentration, correlations, and significance. *Appl. Environ. Microbiol.* ; 33 (3) : 551-555.
- Ma P., Visvesvara G.S., Martinez A.J., et al. (1990). *Naegleria* and *Acanthamoeba* infections. *Rev. Infect. Dis.*; 12 (3) : 490-513.
- Mac Cool J., Spudis E.V., Mc Lean W. et al. (1983). Primary amebic meningoencephalitis diagnosed in the emergency department. *An. Emerg. Med.*; 35-37.
- Mac Croan J.E., Patterson J., (1970). Primary amebic meningoencephalitis. Georgia. *Morbid. Mortal. Wkly. Rep.*; 19 : 413-414.
- McLaughlin G.L., Vodkin M.H., Huizenga H.W. (1991). Amplification of Repetitive DNA for the Specific Detection of *Naegleria fowleri*. *J. clinical. Microbiol.* ; 29 (2) : 227-230.
- Maďarová L., Trnková K., Feiková S., et al. (2010). A real-time PCR diagnostic method for detection of *Naegleria fowleri*. *Exp. Parasitol.* ; 126 : 37-41.
- Mandel B.N., Gudex D.J., et al. (1970). Amoebic meningo-encephalitis due to amoebae of the order Myxomycetale (slime mould). *New Zeal. Med. J.* ; 71 : 16-23.
- Mansour N.S., Saoud A.F., et al. (1991). Fresh-water amoebae from four aquatic sites in Egypt. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* ; 21 (1) : 15-22.
- Marciano-Cabral F. et Cline M. (1987). Chemotaxis by *Naegleria fowleri* for bacteria. *J Protozool.* ; 34: 127–131.
- Marciano-Cabral F. (1988). Biology of *Naegleria spp.* *Microbiol. Rev.*; 52 : 114–133.
- Marciano-Cabral F., Toney D.M. (1994). Modulation of biological functions of *Naegleria fowleri* amoebae by growth medium. *J. Eukaryot. Microbiol.* ; 41 (1) : 38-46.
- Marciano-Cabral F., Cabral G.A. (2007). The immune response to *Naegleria fowleri* amebae and pathogenesis of infection. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*; 51 (2) : 243-259.
- Maclellan R.C., Richardson D.J., LePardo R. et al. (2004). The identification of *Naegleria fowleri* from water and soil samples by nested PCR. *Parasitol. Res.*; 93 : 211–217.
- Marshall M.M, Naumovitz D., Ortega Y., et al. (1997). Waterborne protozoan pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.*; 10 (1) : 67-85.
- Michel R., Hauröder B. (1997). Isolation of an *Acanthamoeba* strain with intracellular *Burkholderia pickettii* infection. *Zentralbl. Bakteriol.* ; 285 (4) : 541-557.
- Michel R., Muller K.D., Hauröder B.; et al. (2000). A coccoid bacterial parasite of *Naegleria* sp. (Schizopyrenida: Vahlkampfiidae) inhibits cyst formation of its host but not transformation to the flagellate stage. *Acta Protozoologica* ; 39 : 199 - 207.

- Michel R., Muller K.D., Zöller L., *et al.* (2005). Free-living amoebae serve as a host for the *Chlamydia*-like bacterium *Simkania negevensis*. *Acta Protozoologica* ; 44 : 113-121.
- Michel R., Schmi E.N., Gmeiner G., *et al.* (2001). Evidence for bacteriophages within Gram-negative cocci-obligate endoparasitic bacteria of *Naegleria sp.* *Acta Protozoologica* ; 40 : 229-232.
- Molmeret M., Horn M., Wagner *et al.* (2005). Amoebae as training grounds for intracellular bacterial pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* ; 71, 20-28.
- Moussa M., De Jonckheere J.F., *et al.* (2013). Survey of *Naegleria fowleri* in Geothermal Recreational Waters of Guadeloupe (French West Indies). *PLoS ONE* ; 8 (1) : e54414.
- Nacapunchai D., Lamom C., Ruangsittichai C., *et al.* (1999). Isolation of free-living amoebae from soil and water resources in Thailand. *J. Trop. Med. Parasitol.* ; 22 : 22-6.
- Nerad T.A., Daggett P.M. (1979). Starch gel electrophoresis: an effective method for separation of pathogenic and nonpathogenic *Naegleria* strains. *J. Protozool.* 26 (4) :613-615.
- Newsome A.L., Baker R.L., *et al.* (1985). Interactions between *Naegleria fowleri* and *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* ; 50 (2) : 449-452.
- Newsome A.L., Wilhelm W.E. (1981). Effect of exogenous iron on the viability of pathogenic *Naegleria fowleri* in serum. *Experientia* ; 37 (11) : 1160-1162.
- Newsome A.L., Wilhelm W.E. (1983). Inhibition of *Naegleria fowleri* by microbial iron-chelating agents : ecological implications. *Appl. Environ. Microbiol.* ; 45 (2) : 665-668.
- Nicolas M., De Jonckheere J.F., Pernin P., *et al.* (2010). Molecular diagnosis of a fatal primary amoebic meningoencephalitis in Guadeloupe (French West Indies). *Bull. Soc. Pathol. Exot.* ; 103 (1) : 14-18.
- Nicoll A.M. (1973). Fatal primary amoebic meningoencephalitis. *N. Zeal. Med.J.* ; 78 (496) : 108-112.
- Niyyati M., Lasjerdi Z., *et al.* (2012). Screening of recreational areas of rivers for potentially pathogenic free-living amoebae in the suburbs of Tehran, Iran. *J. Water Health* ; 10 (1) : 140-146.
- Norton R., Harris P., Ryan P. (2010). Another killer of the Australian Bush: A rapidly fatal meningoencephalitis in a child. *Clini. Infect. Diseases* ; 50 (10) : 1375-1376 + 1422-1424.
- O'Dell S.J., Crowe J.H. (1979). Freezing in nematodes : the effects of variable water contents. *Cryobiology* ; 16 (6) : 534-541.
- Oh Y.H., Jeong S.R., Song K.J., *et al.* (2005) Cytopathic changes and proinflammatory cytokines induced by *Naegleria fowleri* trophozoites in rat microglia cells and protective effects of an anti-Nfa1 antibody. *Paras. Immunol.* ; 27 : 453-459.
- Ondarza R.N., Iturbe A., Hernández E. (2006). In Vitro Antiproliferative Effects of Neuroleptics, Antimycotics and Antibiotics on the Human Pathogens *Acanthamoeba polyphaga* and *Naegleria fowleri*. *Arch. Med. Res.* ; 37(6) : 723-729.

Ondarza R.N., Iturbe A., Hernández E. (2007). The effects by neuroleptics, antimycotics and antibiotics on disulfide reducing enzymes from the human pathogens *Acanthamoeba polyphaga* and *Naegleria fowleri*. *Exp. Parasitol.* ; 115 (1) : 41-47.

Pan N.R., Ghosh T.N. (1971). Primary amoebic meningoencephalitis in two Indian children. *J. Indian. Med. Ass.*; 56 : 134-137.

Page F.C. (1976). An illustrated key to freshwater and soil amoebae. Freshwater biological association scientific Publication. Ambleside.

Page F.C. (1987). The classification of 'naked' amoebae (Phylum Rhizopoda). *Arch.Protistenkd.* 133 (3-4) : 199–217.

Patras D., Andujar J.J (1966). Meningoencephalitis due to *Hartmannella* (*Acanthamoeba*). *Am. J. Clin. Pathol.* ; 46 (2) : 226-233.

Pélandakis M., Kaundun S.S., De Jonckheere J.F., *et al.* (1997). DNA diversity among the free-living amoeba *Naegleria fowleri* detected by the RAPD method FEMS. *Microbiol. Lett.* ; 151 : 31–39.

Pélandakis M., De Jonckheere J.F., Pernin P. (1998). Genetic variation in the free-living amoeba *Naegleria fowleri*. *Appl. Environ. Microbiol.*; 64 : 2977–2981.

Pélandakis M., Serre S., Pernin P. (2000). Analysis of the 5.8S rRNA gene and the internal transcribed spacers in *Naegleria* spp. and in *N. fowleri*. *J. Eukaryot. Microbiol.* ; 47 : 116–121.

Pélandakis M., Pernin P. (2002). Use of multiplex PCR and PCR restriction enzyme analysis for detection and exploration of the variability in the free-living amoeba, *Naegleria fowleri* in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* ; 68 : 2061–2065.

Penas-Ares M., Paniagua-Crespo E., Madriñan-Choren R.; *et al.* (1994). Isolation of free-living pathogenic amoebae from thermal spas in NW Spain. *Water Air Soil Poll.*; 78 : 83-90.

Pernin P. (1984). Isoenzyme patterns of pathogenic and nonpathogenic thermophilic *Naegleria* strains by isoelectric focusing. *Int. J. Parasitol.* ; 14 (5) : 459-465.

Pernin P., Cariou M.L., Jacquier A. (1985). Biochemical Identification and Phylogenetic Relationships in Free-Living *Amoebas* of the Genus *Naegleria*. ; *J. Euk. Microbiol.* ; 32 (4) : 592-603.

Pernin P., Grelaud G. (1989). Application of isoenzymatic typing to the identification of nonaxenic strains of *Naegleria* (Protozoa, Rhizopoda). *Parasitol. Res.* ; 75 (8) : 595-598.

Pernin P., Pélandakis M., Rouby Y., *et al.* (1998). Comparative recoveries of *Naegleria fowleri* amoebae from seeded river water by filtration and centrifugation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64 (3) ; 955-959.

Petchsuwan K., Reungsuwan S. (1997). Pathology and cytology of primary amoebic meningoencephalitis. *Buddhachinaraj Med. J.* ; 15 : 62-68.

Petit F., Vilchez V., Torres G., *et al.* (2006). Primary amoebic meningoencephalitis: Two new cases report from Venezuela. Meningoencephalitis amebiana primaria: *Comunicacion de dos nuevos casos Venezolanos* ; 64 (4) : 1043-1046.

Pospisilova D., Cerva L. (1981). The finding of *Naegleria fowleri* in an indoor swimming pool. *Ceskoslovenska Hygiena* ; 26 (4) : 192-195.

Pougnard C., Catala P., Drocourt J.L., *et al.* (2002). Rapid detection and enumeration of *Naegleria fowleri* in surface waters by solid-phase cytometry. *App. Environ. Microbiol.* ; 68 (6) : 3102-3107.

Poungvarin N., Jariya P. (1991). The fifth nonlethal case of primary amoebic meningoencephalitis. *J. Med. Assoc. Thai* ; 112-115.

Puzon G.J., Lancaster J.A., Wylie J.T. *et al.* (2009). Rapid detection of *Naegleria fowleri* in water distribution pipeline biofilms and drinking water samples. *Environ. Sci. Technol.* ; 43 : 6691-6696.

Price J.A. (1995). Some factors stimulating movement by *Naegleria fowleri*. *Eur. Protistol. J.* ; 31 (1) : 8-15.

Pringuez E., Khalanski M., Gueraud S., *et al.* (2001). Traitements visant à contrôler la croissance de l'amibe *Naegleria fowleri* dans les circuits de refroidissement des centrales. *Energies Santé* ; 12 (3 (102)) : 346-356.

Pumidonming W., Koehsler M., Walochnik J. (2010). *Acanthamoeba* strains show reduced temperature tolerance after long-term axenic culture. *Parasitol. Res.*; 106 (3) : 553-559.

Qvarnstrom Y., Visvesvara G.S., Sriram R. *et al.* (2006). Multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, and *Naegleria fowleri*. *J. Clin. Microbiol.* ; 44 : 3589-3595.

Rai R., Singh D.K., Srivastava A.K., *et al.*, (2008). Primary amebic meningoencephalitis. *Indian Pediatrics*; 45 (12) : 1004-1005.

Ramesh M.A., Malik S.B., Logsdon J.M. (2005). A Phylogenomic Inventory of Meiotic Genes : Evidence for Sex in *Giardia* and an Early Eukaryotic Origin of Meiosis. *Current Biology* ; 15 : 185–191.

Reilly M.F., White K.L., Bradley S.G. (1983). Host resistance of mice to *Naegleria fowleri* infections. *Infect. Immun.* 42 (2) : 645-652.

Reilly M.F., Marciano-Cabral F., Bradley D.W., *et al.*, (1983). Agglutination of *Naegleria fowleri* and *Naegleria gruberi* by antibodies in human serum. *J. Clin. Microbiol.* ;17 (4) : 576-581.

Reveiller F.L., Varenne M.P., Pougnard C., *et al.* (2003). An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the identification of *Naegleria fowleri* in environmental water samples. *J. Eukaryot. Microbiol.* ; 50 : 109–113.

Réveiller F.L., Cabanes P.A., Marciano-Cabral F. (2002). Development of a nested PCR assay to detect the pathogenic free-living amoeba *Naegleria fowleri*. *Parasitol. Res.* ; 88 : 443-450.

Réveiller F.L., Marciano-Cabral F., Pernin P., *et al.* (2000). Species specificity of a monoclonal antibody produced to *Naegleria fowleri* and partial characterization of its antigenic determinant. *Parasitol. Res.* ; 86 (8) : 634-641.

Rivera F., Ramirez P., Vilaclara G., *et al.* (1983). A survey of the pathogenic and free-living amoebae inhabiting swimming pool water in Mexico City. *Environ. Res.* ; 32 (1) : 205-211.

Rivera V., Hernández D., Rojas S. *et al.* (2001). IgA and IgM anti-*Naegleria fowleri* antibodies in human serum and saliva. *Can. J. Microbiol.* ; 47 (5) : 464-466.

Robinson B.S., Monis P.T., Dobson P.J. (2006). Rapid, sensitive, and discriminating identification of *Naegleria* spp. by real-time PCR and melting-curve analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* ; 72 : 5857-5863.

Robinson B.S., Christy P., Hayes S.J., *et al.* (1992). Discontinuous Genetic Variation Among *Mesophilic Naegleria* Isolates : Further Evidence that *N. gruberi* Is Not a Single Species. *J. Protozool.* ; 39 : 702-712.

Robinson B. (1996). The ecology of free-living amoebae and sources of infection. *Aust. J. Med. Sci.* ; 17.

Robinson B.S., Monis P.T., Henderson M., *et al.* (2004). Detection and significance of the potentially pathogenic amoeboflagellate *Naegleria italica*. *Austr. Parasitol. Int.* ; 53 (1) : 23-27.

Rodriguez-Zaragoza S. (1994). Ecology of free-living amoebae. *Crit. Rev. Microbiol.* ; 20 : 225-241.

Rojas-Hernández S., Jarillo-Luna A., Rodríguez-Monroy M., *et al.* (2004). Immunohistochemical characterization of the initial stages of *Naegleria fowleri* meningoencephalitis in mice. *Parasitol. Res.*; 94 (1) : 31-6.

Rojas-Hernández S., Rodríguez-Monroy M., Morenos-Fierros L., *et al.* (2007). Nitric oxide production and nitric oxide synthase immunoreactivity in *Naegleria fowleri*. *Parasitol. Res.* ; 101 (2) : 269-274.

Rowbotham T.J. (1980). Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J. Clin. Pathol.* ; 33 : 1179-1183.

Rubin A.J., Engel J.P., Sproul O.J. (1983). Disinfection of amoebic cysts in water with free chlorine. *Water Pollution Control Federation Journal* ; 55 (9) : 1174-1182.

Salazar H.C., Moura H., Fernandes O., *et al.* (1986). Isolation of *Naegleria fowleri* from a lake in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *Trans. Royal Soc. Trop. L. Med. Hyg.* ; 80 (2) : 348-349.

Saleem T., Rabbani M., Jamil B. (2009). Primary amoebic meningoencephalitis : two new cases from Pakistan. *Tropical Doctor.* ; 39 : 242-243.

Sarkar P. (2008). Occurrence and inactivation of emerging pathogens in the environment. PhD Thesis, The University of Arizona.

Sarkar P., Gerba C.P. (2012). Inactivation of *Naegleria fowleri* by chlorine and ultraviolet light. *J. Am. Wat. Works Assoc.* ; 104 (3) : 51-52.

Sawyer T.K. (1989). Free-living pathogenic and nonpathogenic amoebae in Maryland soils. *Appl. Environ. Microbiol.* ; 55 (5) : 1074-1077.

- Scaglia M., Gatti S., Brustia R., *et al.* (1987). Pathogenic and non-pathogenic *Naegleria* and *Acanthamoeba* spp. : a new autochthonous isolate from an Italian thermal area. *Microbiol.* ; 10 (2) : 171-182.
- Scaglia M., Strosselli M., *et al.* (1984). First isolation in Italy of *Naegleria australiensis* (De Jonckheere, 1981). *Parasitol.* ; 26 (3) : 305-309.
- Scaglia M., Strosselli M., Grazioli V., *et al.* (1983). Isolation and identification of pathogenic *Naegleria australiensis* (*Amoebida, Vahlkampfiidae*) from a spa in northern Italy. *Appl. Environ. Microbiol.* ; 46 (6) : 1282-1285.
- Schoeman C.J., Van der Vyver A.E., Visvesvara G.S. (1993). Primary amoebic meningo-encephalitis in southern Africa. *J. Infect.* ; 26 (2) : 211-214.
- Schuster F.L. (1969). Intranuclear virus-like bodies in the amoeboflagellate *Naegleria gruberi*. *J. Protozool.* ; 16 (4) : 724-727.
- Schuster F.L., Dunnebacke T.H. (1971). Formation of bodies associated with virus-like particles in the amoeboflagellate *Naegleria gruberi*. *J. Ultrastruct. Res.*; 36 (5): 659-668.
- Schuster F.L., Dunnebacke T.H. (1974). Growth at 37 degrees C of the EGs strain of the amoeboflagellate *Naegleria gruberi* containing viruslike particles. II. Cytoplasmic changes. *J. Invertebr. Pathol.* ; 23 (2) : 182-189.
- Schuster F.L. (2002). Cultivation of pathogenic and opportunistic free living amebas. *Clin. Microbiol.* ; 15 (3) : 342-354.
- Schuster F.L., Visvesvara G.S. (2004). Opportunistic amoebae : challenges in prophylaxis and treatment. *Drug Resist. Updat.* ; 7 : 41-51.
- Schuster F.L., Guglielmo B.J., Visvesvara G.S. (2006). In-vitro activity of miltefosine and voriconazole on clinical isolates of free-living amebas: *Balamuthia mandrillaris*, *Acanthamoeba* spp., and *Naegleria fowleri*. *J. Eukaryot. Microbiol.* ; 53 (2) : 121-126.
- Seidel J.S., Hartz P., Visvesvara G.S. (1982). Successful treatment of primary amebic meningoencephalitis. *NEJM.* ; 306 (6) : 346-348.
- Shakoor S., Be M.A., Mahmood S.F., *et al.* (2011). Primary amebic meningoencephalitis caused by *Naegleria fowleri*, Karachi, Pakistan ; *Emerging infectious diseases* 17 (2) : 258-261.
- Shapiro M.A., Karol M.H., Keleti G., *et al.* (1983). The role of free-living amoebae occurring in heated effluents as causative agents of human disease. *Wat. Sci. Technol.* ; 15 : 135-147.
- Shenoy S., Wilson G., Prashanth H.V. (2002). Primary meningoencephalitis by *Naegleria fowleri* : First reported case from Mangalore, South india ; *J. Clin. Microbiol.* ; 40 (1) : 309-310.
- Shibayama M., Serrano-Luna J.J., Rojas-Hernández S., *et al.* (2003). Interaction of secretory immunoglobulin A antibodies with *Naegleria fowleri* trophozoites and collagen type I. *Revue canadienne de microbiologie* ; 49 (3) : 164-170.

- Shin H.J., Cho M.S., Jung S.Y., *et al.* (2001). Molecular cloning and characterization of a gene encoding a 13.1kDa antigenic protein of *Naegleria fowleri*. *J. Eukaryot. Microbiol.* ; 48 : 713–714.
- Sifuentes L.Y. (2012). The Occurrence of Free Living Amoebae in Water. PhD Thesis, The University of Arizona.
- Sirinavin S., Jariya P., Lertlaituan P., *et al.* (1989). Primary amoebic meningoencephalitis in Thailand : Report of a case and review literatures. *J. Med. Assoc. Thai.*; 72 (suppl1) : 174-176.
- Sithinamsuwan P., Sangruchi T., Chiewvit P., *et al.* (2000). Free living ameba infections of the central nervous system in Thailand. Report of two patients. *Int. Med. J. Thai.* ; 17 : 350-360.
- Sohn H.J., Kim J.H., Shin M H. (2010). The Nf-actin gene is an important factor for food-cup formation and cytotoxicity of pathogenic *Naegleria fowleri*. *Parasitol. Res.* ; 106 (4) : 917-924.
- Song K.J., Song K.H., Kim J.H., *et al.* (2008). Heat shock protein 70 of *Naegleria fowleri* is important factor for proliferation and in vitro cytotoxicity. *Parasitol. Res.* ; 103 (2) : 313-317.
- Song K.J., Jang Y.S., Lee Y.A. (2011). Reactive oxygen species-dependent necroptosis in Jurkat T cells induced by pathogenic free-living *Naegleria fowleri*. *Parasite Immunol.* ; 33 (7) : 390-400.
- Somboonyosdej S., Pinkaew P. (1987). Primary amoebic meningoencephalitis : a report of two cases in Trad Hospital. *J. Ped. Soc. Thai.* ; 26 : 6-8.
- Sparagano O., Drouet E., Denoyel G., *et al.* (1994). Polymerase chain reaction to detect the pathogenic *Naegleria fowleri* : Application to water samples. *J. Microbiol. Methods* ; 19 (2) : 81-88.
- Sugita Y., Fujii T., Hayashi I., *et al.* (1999). Case report : Primary amebic meningoencephalitis due to *Naegleria fowleri* : An autopsy case in Japan. *Pathol. inter.*, 49 : 468-470.
- Symmers W.S.C. (1969). Primary amoebic meningoencephalitis in Britain. *Brit. Med. J.* ; 4 : 449-454.
- Sykora J.L., Keleti G., Martinez A.J. (1983). Occurrence and pathogenicity of *Naegleria fowleri* in artificially heated waters. *Appl. Environ. Microbiol.* ; 45 (3) : 974-979.
- Thom S., Warhurst D., Drasar B.S. (1992). Association of *Vibrio cholerae* with fresh water amoebae. *J. Med. Microbiol.* ; 36 (5) : 303-306.
- Tiewcharoen S., Junnu V. (1999). Factors Affecting the Viability of Pathogenic *Naegleria* Species Isolated from Thai Patients. *J. Trop. Med. Parasitol.* ; 22 : 15-21.
- Tiewcharoen S., Junnu V. (2001). Distribution of pathogenic *Naegleria* spp in Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* ; 32 (suppl 2) : 172-178.
- Tiewcharoen S., Junnu V., Suvoutho S. (2003). Effect of antifungal drugs on pathogenic *Naegleria* spp isolated from natural water sources. *J. Med. Assoc. Thai* ; 86 : 876-82.

- Tiewcharoen S., Junnu V., Sassa-deepaeng T., *et al.* (2007). Analysis of the 5.8S rRNA and internal transcribed spacers regions of the variant *Naegleria fowleri* Thai strain. *Parasitol. Res.* ; 101 : 139–143
- Tiewcharoen S., Malainual N., Junnu, V. *et al.* (2008). Cytopathogenesis of *Naegleria fowleri* Thai strains for cultured human neuroblastoma cells. *Parasitol. Res.* ; 102 (5) : 997-1000.
- Tiewcharoen S., Rabablert J., Chetanachan P. (2008). Scanning electron microscopic study of human neuroblastoma cells affected with *Naegleria fowleri* Thai strains. *Parasitol. Res.* ; 103 (5) : 1119-1123.
- Toney D.M., Marciano-Cabral F. (1994). Modulation of complement resistance and virulence of *Naegleria fowleri* amoebae by alterations in growth media. *J. Eukaryot. Microbiol.* ; 41 (4) : 337-343.
- Trabelsi H., Dendana F., Sellami A., *et al.* (2012). Pathogenic free-living amoebae: Epidemiology and clinical review. *Pathol. Bio. L* ; 60 (6) : 399.
- Trnková K., Maďarová L., Klement C. (2008). Is primary amoebic meningoencephalitis (naegleriasis) a public health problem ? *Hygiene* ; 53 (2) : 53-59.
- Trolio R., Bath A., Gordon C., *et al.* (2008). Operational management of *Naegleria* spp. in drinking water supplies in Western Australia. *Water Sci. Technol.* ; 8 (2) : 207-215.
- Tuppeny M. (2011). Primary amoebic meningoencephalitis with subsequent organ procurement : A case study. *J. Neurosci. Nursing* ; 43 (5) : 274-279.
- Tyndall R.L. , Domingue E.L. (1982). Cocultivation of *Legionella pneumophila* and free-living amoebae. *Appl. Environ. Microbiol.* ; 44 : 954-959.
- Tyndall R.L., Ironside K.S., Metler P.L., *et al.* (1989). Effect of thermal additions on the density and distribution of thermophilic amoebae and pathogenic *Naegleria fowleri* in a newly created cooling lake. *Appl. Environ. Microbiol.* ; 55 (3) : 722-732.
- Ugonabo J.A., Gugnani H.C. (1989). Nasal carriage of *Naegleria fowleri* and its environmental occurrence in Borno State, Nigeria. *J. comp. dis.* ; 21 (2) : 111-113.
- Vandepitte J., Van Den Driessche E., Van Dijck, *et al.* (1974). A new case of primary amoebic meningoencephalitis observed in Belgium. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* ; 54 (4-5) : 297-303.
- Valenzuela G., Lopez-Corella E., De Jonckheere J.F. (1984). Primary amoebic meningoencephalitis in a young male from northwestern Mexico. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.*; 78 (4) : 558-559.
- Van De Voorde H., Beumer J., *et al.* (1977). Influence of halogenation on microorganisms in swimming pool water. *Arch. Belg. Med. Soc. Hyg. Med. Trav. Leg.*; 35 ( 3 ) : 168-180.
- Van den Driessche E., Vandepitte J., Van Dijck P.J. (1973). Letter : Primary amoebic meningoencephalitis after swimming in stream water. *The Lancet* ; 2 (7835) : 971.

- Vandepitte J., Van Den Driessche E., Van Dijck P.J., *et al.* (1974). A new case of primary amoebic meningoencephalitis observed in Belgium. *Ann. Soc. Belge Med. Trop.* ; 54 (4-5) : 297-303.
- Vargas-Zepeda J., Gómez-Alcalá A.V., Vázquez-Morales J.A., *et al.* (2005). Successful treatment of *Naegleria fowleri* meningoencephalitis by using intravenous amphotericin B, fluconazole and rifampicin. *Arch. Med. Res.* ; 36 (1) : 83-86.
- Venkatesh R. *et al.* (1979). Recovery of Soil Amebas from the Nasal Passages of Children During the Dusty Harmattan Period in Zata. *Am. J. Clin. Path.* ; 71 : 201-203.
- Visvesvara G.S., Healy G.R. (1980). Disc electrophoretic patterns of esterase isoenzymes of *Naegleria fowleri* and *N. gruberi*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* ; 74 (3) : 411-412.
- Visvesvara G.S., Jonckheere J.F., Marciano-Cabral F., *et al.* (2005). Morphologic and molecular identification of *Naegleria dunnebackei* n. sp. isolated from a water sample. *J Eukaryot Microbiol.* ; 52 (6) : 523-531.
- Visvesvara G.S., Moura H., Schuster F.L. (2007). Pathogenic and opportunistic free-living amoebae : *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* ; 50 : 1–26.
- Visvesvara G.S. (2010a). Amebic meningoencephalitis and keratitis : Challenges in diagnosis and treatment Current Opinion in Infectious Diseases ; 23 (6) : 590-594.
- Viriyavejakul P., Rochanawutanon M., Sirinavin S. (1997). Case report : *Naegleria meningomyeloencephalitis*. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* ; 28 : 237-240.
- Wagner W.P., Duma R.J., McGehee R.F., *et al.* (1997). Case report : Primary amoebic meningoencephalitis. Virginia. *Morb. Mortal. Wkly Rep.*, 18 : 241-242.
- Wang A., Kay R., Poon W.S., *et al.* (1993). Successful treatment of amoebic meningoencephalitis in a Chinese living in Hong Kong. *Clin. Neurol. Neurosurg.* ; 95 (3) : 249-252.
- Warhurst D.C., Carman J.A., Mann P.G. (1980). Survival of *Naegleria fowleri* cysts at 4 °C for eight months with retention of virulence. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* ; 74 (6) : 832.
- Wattanaweeradej W., Rudeewilai S., Simasathien S., (1996). Primary amoebic meningoencephalitis : the first case report in Pramongkutkloa Hospital and literature review. *Royal Thai Army Med. J.* ; 49 : 221-227.
- Wellings F.M. (1979). Pathogenic *Naegleria* : distribution in nature, Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, (Office of Health and Ecological Effects), Health Effects Research Laboratory.
- Wellings F.M., Amuso P.T., Chang S.L., *et al.* (1977). Isolation and identification of pathogenic *Naegleria* from Florida lakes. *Appl. Environ. Microbiol.* ; 34 (6) : 661-667.
- Weik R.R., John D.T. (1977). Agitated mass cultivation of *Naegleria fowleri*. *J. Parasitol.* ; 63 : 868-871.
- Wickramanayake G.B., Rubin A.J., *et al.* (1984). Inactivation of *Naegleria* and *Giardia* cysts in water by ozonation. *J. water pollut. Con. F. A.* ; 56 (8) : 983-988.

Wong M.M., Karr S.L.Jr., Ching K.C. (1977). Changes in the virulence of *Naegleria fowleri* maintained in vitro. *J. Parasitol.* ; 63 (5) : 872-878.

Yoder J.S., Eddy B.A., Visvesvara G.S. *et al.* (2010). The epidemiology of primary amoebic meningoencephalitis in the USA, 1962-2008. *Epidemiol. Infect.* ; 138 (7) : 968-975.

Yoder J.S., Straif-Bourgeois S., Roy S.L., *et al.* (2012). Deaths from *Naegleria fowleri* associated with sinus irrigation with tap water : a review of the changing epidemiology of primary amoebic meningoencephalitis. *Clin. Infect. Dis.* ; 1-7.

Yun H.C., Park S.J., Kong H.H., *et al.* (2002). Isolation of genes induced in *Naegleria fowleri* during mouse brain passage. *Europ. J. Protistol.* ; 38 : 105–111.

Zhou L., Sriram R., Visvesvara G.S., *et al.* (2003). Genetic variations in the internal transcribed spacer and mitochondrial small subunit rRNA gene of *Naegleria* spp. *J. Eukaryot. Microbiol.* ; 50 Suppl : 522-526.

## Annexes

## ANNEXE 1 : COURRIER DE LA SAISINE

→ UERE

ANSES Reçu le  
 20 JUL. 2011



2011-SA-0190

Ministère du Travail, de l'Emploi et de la Santé

**SECRETARIAT D'ETAT A LA SANTE**

**Direction générale de la santé**  
 Sous-direction Prévention des risques  
 liés à l'environnement et à l'alimentation  
 Bureau Qualifié des eaux  
 DGS/EA4 - N° 297

Personne chargée du dossier :  
 Anne PILLEBOUT  
 Tél. : 01.40.56.57.35  
 E-mail : [anne.pillebout@sante.gouv.fr](mailto:anne.pillebout@sante.gouv.fr)

Paris, le 18 JUIN 2011

Le Directeur Général de la Santé

à

Monsieur le Directeur général de  
 l'Agence nationale de sécurité sanitaire  
 de l'alimentation, de l'environnement et  
 du travail - Direction de l'Evaluation  
 des Risques (D.E.R.) - UERE  
 27-31, Avenue du Général Leclerc  
 94701 MAISONS-ALFORT CEDEX

**Objet :** Evaluation des risques liés à la présence d'amibes *Naegleria fowleri* dans les eaux de baignade  
**N/Réf. :** N° 110021 (Numéro de dossier à rappeler dans toute correspondance)  
**PJ :** - Courrier de la DSDS de Guadeloupe du 4 février 2010.  
 - Bulletin d'Alerte et de Surveillance Antilles Guyane - n°8 - Août 2008.  
 - Bulletin de veille sanitaire - CELLULE INTERRÉGIONALE D'ÉPIDÉMIOLOGIE ANTILLES GUYANE - février 2010.  
 - Avis du Conseil supérieur d'hygiène publique de France (cf. liste en annexe).

Les amibes libres pathogènes correspondant à l'espèce *Naegleria fowleri* (N.f.) sont responsables de la méningo-encéphalite amibienne primitive (MEAP). Cette maladie s'avère être rare (quelques centaines de cas recensés dans le monde) mais mortelle dans 95 % des cas.

Ces amibes vivent dans les eaux douces dont la température dépasse 25° C. C'est pourquoi, l'échauffement des eaux dans les circuits de refroidissement des centrales thermiques est favorable au développement des amibes. Ainsi, les sites de baignade situés en aval des centrales thermiques font l'objet d'un contrôle sanitaire renforcé, comprenant des recherches des amibes dans l'eau. Conformément aux recommandations<sup>1</sup> du Conseil supérieur d'hygiène publique de France (CSHPF), le seuil au-delà duquel la baignade est interdite est de 100 *N. fowleri* par litre.

Par ailleurs, en avril 2008, en Guadeloupe, un enfant est décédé des suites d'une méningite. Les analyses réalisées par biologie moléculaire sur le liquide céphalo-rachidien (LCR), ont mis en évidence la présence de *N. fowleri* dans le prélèvement et confirmé le diagnostic de méningo-encéphalite amibienne primitive (MEAP). Dans les semaines précédant le début des signes, l'enfant avait pratiqué une baignade avec plongeons dans le bassin de Dolé, une zone de baignade de Guadeloupe. Cette zone de baignade est une retenue d'eau douce renouvelée en continu par une source d'eau dont la température est naturellement supérieure à 27° C. Les prélèvements environnementaux réalisés dans ce bassin ont permis d'isoler quelques souches de *Naegleria* spp mais pas l'espèce *N. fowleri* (espèces *N. lovaniensis*, *N. australiensis*, non pathogènes). Ces résultats, s'ils ne permettaient pas de confirmer la présence de *Naegleria fowleri* dans le bassin au moment du prélèvement, ne permettaient pas non plus d'écartier un lien de cause à effet entre la survenue de la MEAP chez cet enfant et sa baignade dans le bassin. Suite à cet événement, un plan de prévention a donc été élaboré par l'Agence régionale de santé pour ce bassin. Ce bassin est ainsi nettoyé (vidange, évacuation des sédiments, brossage des parois, désinfection au chlore) à une fréquence minimale mensuelle.

<sup>1</sup> Cf. liste des avis en annexe et joints au courrier.

- 1 / 4 -

14, avenue Duquesne 75 350 Paris 07 SP - Téléphone : 01 40 56 60 00 - Télécopie : 01 40 56 40 56 - [www.sante.gouv.fr](http://www.sante.gouv.fr)

Par ailleurs, un programme de recherche exploratoire de *Naegleria spp.* a été mis en place sur certains bassins d'eau chaude du département. Les analyses ont mis en évidence la présence d'amibes d'espèce *Naegleria fowleri* uniquement sur le site de Dolé, mais à des valeurs très faibles et très largement inférieures à la limite de 100 N.f./L recommandée par le CSHPF. Ces résultats suggèrent que l'infection aurait pu se produire en présence de *N. fowleri* à des concentrations très faibles.

Dans ce contexte, je vous demande :

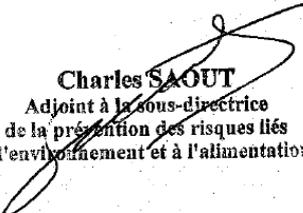
- Au regard de la possible évolution des connaissances sur *N. fowleri* d'analyser la valeur de 100 N.f./L recommandée par le CSHPF pour encadrer réglementairement la pratique de la baignade ou d'activités nautiques ;
- De déterminer les facteurs susceptibles de favoriser le développement de *N. fowleri* dans les eaux de sites de baignade, tels que la température de l'eau ou le confinement ;
- D'analyser l'état de l'art en termes de prélèvements ;
- De proposer des mesures de maîtrise du risque sanitaire pour l'Homme vis-à-vis de *N. fowleri* dans le cadre des activités de baignade ou activités nautiques notamment concernant les modalités de surveillance (fréquence et modalités de prélèvement et d'analyses) ;
- De proposer des mesures correctives le cas échéant ;
- Enfin, d'indiquer si vos conclusions peuvent être applicables aux baignades artificielles, ou si une saisine spécifique s'avère nécessaire.

Je vous précise que ce dossier est enregistré à la Direction Générale de la Santé sous l'intitulé suivant :

**EVALUATION DES RISQUES LIES A LA PRESENCE D'AMIBES NAEGLERIA FOWLERI DANS LES EAUX DE BAINNADE**

et porte le numéro : 110021.

Vos conclusions sont attendues pour le mois de février 2012.

  
**Charles SAOUT**  
Adjoint à la sous-directrice  
de la prévention des risques liés  
à l'environnement et à l'alimentation

- 2 / 4 -

14, avenue Duquesne 75 350 Paris 07 SP - Téléphone : 01 40 56 60 00 - Télécopie : 01 40 56 40 56 - [www.sante.gouv.fr](http://www.sante.gouv.fr)

## **ANNEXE 2 : REQUETES FORMULEES PENDANT LES RECHERCHES BIBLIOGRAPHIQUES**

---

- 14 septembre 2011, sur la base Scopus (jusqu'au 14 septembre 2011)
  - o *Naegleria* AND *fowleri* : 634 réponses,
- 31 mai 2012, sur la base Scopus (entre le 1<sup>er</sup> janvier 2011 et le 31 mai 2012)
  - o *Naegleria* AND *fowleri* : 33 réponses, dont 16 nouvelles depuis la recherche du 14 septembre 2011,
- Juillet 2013 : interrogation de la base du système d'information en santé-environnement dédiée à la qualité des eaux de baignade (Sise-Eaux baignade) : aucune donnée relative à la recherche de *Naegleria fowleri* est disponible dans cette base.

**ANNEXE 3 : DESCRIPTION DE CAS DE MEAP DANS LE MONDE**

Référence article	Descriptif des cas									Descriptif des lieux de baignades				
	Année	Pays	Nombre de cas	Age des personnes contaminées en années	période (mois, saison)	Sexe	Personne saine ou immunodéprimée	Issue de la contamination	Activités	Descriptif	Type de baignade	Traitement mis en place	Nature de l'eau	Observation
Symmers (1969)	1909	Angleterre	1	8	avril	M		mortelle		inconnu				
Dos Santos (1970)	1937	Etats-Unis	1	13	juillet	F		mortelle		lac				
Symmers (1969)	1937	Irlande du nord	1	10		F		mortelle						
Dos Santos (1970)	1950	Etats-Unis	1	12	septembre	F		mortelle		lac				
Dos Santos (1970)	1951	Etats-Unis	1	14	juillet	M		mortelle		lac				
Dos Santos (1970)	1951	Etats-Unis	2	14-23	juillet	M, F		mortelle		lac				
Dos Santos (1970)	1952	Etats-Unis	4	8 et 25	juillet	1M, 3F		mortelle		lac				
Dos Santos (1970)	1957	Etats-Unis	2	11 et 13	juillet	M		mortelle		lac				
Carter (1970)	1966	Australie	1	10	janvier	M		mortelle		piscine d'eau de mer				
Callicot et al (1968)	1966	Etats-Unis	1	14	juillet	M		mortelle		lac				
Butt et al	1966	Etats-Unis	1	16	juillet	M		mortelle		lac				
Callicot (1968)	1967	Etats-Unis	2	8 et 27	juin/juillet	M		1 mortelle/1 guérison		lac, trous de boue et piscine				
Grundt et blowers	1968	Ouganda	1	23	novembre	M		guérison		inconnu				
Dumas <i>et al.</i> (1970)	1968	Etats-Unis	1	15	août	F		mortelle		lac				

Cerva <i>et al</i> (1969)	1968	République tchèque	1	11	juin	M		mortelle		piscine				
Dumas <i>et al.</i> (1971)	1969	Etats-Unis	2	14 et 25	juillet	M		mortelle		lac				
Wagner <i>et al.</i> (1969)	1969	Etats-Unis	1	17	mai	M		mortelle		rivière				
Apley <i>et al</i> (1970)	1969	Angleterre	3	3, 4 et 6	août	M		mortelle		flaque de boue				
Carter (1972)	1970	Australie	1	8	janvier	F		mortelle		effluents de fosses septiques				
Mc Croan <i>et al.</i>	1970	Etas-Unis	1	7	août	M		mortelle		piscine				
Hecht <i>et al</i> (1972)	1970	Belgique	3	12 et 14	octobre-novembre	1M, 2F		1 mortelle / 2 guérisons		piscine				
Pan <i>et al</i> (1971)	1970	Inde	2	3 mois et 6 mois	mai	M		guérison		flaque d'eau				
Carter (1972)	1971	Australie	1	16	janvier	M		mortelle						
Anderson <i>et al.</i> (1972)	1971	Australie	1	14	octobre	M		guérison		piscine				
Bedi <i>et al.</i> (1972)	1971	Inde	1	45	avril	F		mortelle		eau de puits				
Hecht <i>et al.</i>	1971	Etats-Unis	1	16	avril	F		mortelle		source chaude				
Anderson <i>et al.</i> (1972)	1972	Australie	2	5 et 7	février	M, F		mortelle		bain dans une piscine gonflable				
Brass (1972)	1972	Venezuela	1	27		F		Mortelle	baignade ou jet ski					
Hermanne <i>et al.</i> (1973)	1972	Belgique	1	14	octobre	F		mortelle		piscine				
Nicoll (1973)	1972	Nouvelle Zélande	1	21	avril	M		mortelle		piscine d'eau chaude				
Van den driessche <i>et al</i> (1973)	1973	Belgique	1	14	juillet	M		mortelle		ruisseau d'eau chaude				

Vandepitte	1974	Belgique	1	14	juin	M	saine	mortelle	natation	petit ruisseau connecté à un canal drainant les effluents d'une usine de zinc et de plomb	baignade naturelle		eau de surface	26,5° quelques jours après la baignade (record de chaleur)
Curson	1979	Nouvelle Zélande	1			M	infection des voies respiratoires	mortelle	plongeon + natation	piscine chauffée	piscine chauffée	chloration	forage : eau souterraine (22 m de profondeur) + 15% eau thermale souterraine (plusieurs centaines de mètres de profondeur)	contamination possible de la ressource par effluent d'eau usée. Bassin de stockage peut être contaminé également par eau de pluie
Lawande	1979	Nigeria	1	8 mois	novembre-février "Harmattant période"	F	saine	mortelle	inhalation de sol contaminé					
Lawande	1979	Nigeria	1	4	novembre-février	F	saine		inhalation de sol contaminé					
Cain	1981	Angleterre	1	11		F		mortelle			Piscine chauffée		source d'eau chaude	
Jariya	1983	Thaïlande	1	5	saison des pluies	M		mortelle	natation	étang près d'une rizière				
Mc Cool	1983	USA	1	14		F	saine	Mortelle	natation	piscine,	piscine avec murs en ciment ret fond en sable	pas de chloration	eau sale	32°C
Valenzuela	1984	Mexique	1	16	août	M		mortelle	natation	fossé d'irrigation				

Somboonyosdej	1987	Thaïlande	1	14	été	M		mortelle	natation					
Somboonyosdej	1987	Thaïlande	1	0,67	été	M		mortelle	natation					
Charoenlarp	1988	Thaïlande	1	17	été	M		mortelle	projection d'eau					
Sirinavin	1989	Thaïlande	1	4,5	mai	M	saine	mortelle	natation	canal d'eau d'alimentation				
Poungvarin	1991		1	61	été	M		guérison	natation					
Brown	1991	USA	1	32	été	M	saine	guérison	ski nautique	petit plan d'eau			eau de surface	stagnant
Fiodalisi	1992	USA	2	3	septembre	F	saine	mortelle	natation en eau peu profonde	étang			eau de surface	
Fiodalisi	1992	USA		4	septembre	M	saine	mortelle	natation	marais (18 jours avant l'admission à l'hôpital) lac (5 jours avant)			eau de surface	
Chotmongkol	1993	Thaïlande	1	18	été	F		guérison	natation					
Wang	1993	Hong Kong	1	38		M	saine	guérison	baignade	eau chaude				
Schoeman	1993	Afrique du Sud	1	7		F	saine	mortelle	natation	rivière + plan d'eau chaude	piscine d'eau stagnante			
Lares-villa	1993	Mexique	5	18	août-septembre	M		mortelle	Natation	canal d'irrigation				
Wattanaweeradej	1996	Thaïlande	1	5	été	M		mortelle	natation					
Barnett	1996	USA	1	9	été	F	saine	mortelle	natation, plongeon	fossé				
Barnett	1996	USA	1	8 mois	été			mortelle	immersion	bain baptismal				
De Napoli	1996	USA	3	13, 14, 17		M	saine	mortelle (13 ans) guérison (14 et 17 ans)	natation	rivière puis retenue d'eau			eau de surface polluée (contamination fécale + effluents)	
Viriyavejakul	1997	Thaïlande	1	12	été	M		mortelle	natation	canal				
Petchsuwan	1997	Thaïlande	1	9,5	été	F		mortelle	natation					

Sugita	1999	Japon	1	25	novembre	F		mortelle	Inhalation supposée	patiente vivant dans une ville dont l'activité principale est la culture du riz				
Bunjongpak	2000		1	9	été	F		mortelle	natation					
Sithinamsuwan	2001		1	27	été	M		mortelle	aspersion d'eau bénite					
Shenoy	2002	Inde	1	5 mois				mortelle	lavage	puits		pas de traitement		
Curson	2003	Nouvelle Zélande	1	10	pâques	F		mortelle	natation+ tête sous l'eau		baignade artificielle + piscine	piscine chlorée + toboggan + piscine eau thermale uniquement filtrée	eau thermale	
Vargas-Zepeda	2003	Mexique	1	10	avril	M	saine	guérison	Natation	canal d'irrigation				
Cogo	2004	Italie	1	9	été très chaud	M		mortelle	Natation+ plongeon	plan d'eau				eau de surface (Pô)
Hebbar	2005	Inde	1	6 mois		M	saine	mortelle						eau de puits suspecté
Jaffar-Bandjee	2005	Madagascar	1	7		M	saine - antécédent de chirurgie ORL	mortelle	natation	piscine, lagon et lac d'eau chaude stagnante				eau de surface
Grate	2006	USA	1	9		M		mortelle	natation	lac	baignade artificielle			
Cermeno	2006	Venezuela	1	8		F	vaccination BCG	mortelle	Natation	ruisseau		pas de traitement		26-30
Petit	2006	Venezuela	1	10		M		mortelle	natation	étang				eau douce
Petit	2006	Venezuela	1	23		M			natation	étang				eau douce
Caruzo	2008	Venezuela	1	33		M		mortelle	natation	étang				eau douce

Kaushal	2008	Inde	1	36	été	M	Syncopes quelques semaines auparavant	mortelle	baignade	étang				
Rai	2008	Inde	1	8 mois		M		guérison	baignade	étang				
Nicolas (2010)	2008	France	1	9	avril	M	saine	mortelle	baignade dans un bain alimenté par une source d'eau chaude					
Gupta	2009	Inde	1	20		M	Leucémie aigue	mortelle	pas de baignade					
Saleem	2009	Pakistan	2	24 et 30		H		mortelle	baignade					
Norton	2010	Australie	1	8 mois	octobre	F	saine							
Tuppeny	2011	USA	1	22		M	saine	mortelle	pratique du wakeboard					
Jain	2011	Inde	1	35		M	HIV positif	mortelle	baignade			faiblement chlorée	eau stagnante	
shakoor	2011	Pakistan	13	16-64		12 M, 1F		mortelle	ablution				eau du robinet	
Lopez	2012	USA	1	13	été	M	saine	mortelle		lac	baignade naturelle			
Kemble	2012	USA	1	7	août	F		mortelle	natation	2 lacs et une rivière	baignade naturelle		21-24°C	1er Lac bloom algal Turbidité importante autres sites: bloom algal et meilleure turbidité. Dans tous les cas rejets d'eaux usées ou pluviales à proximité de la zone de baignade
Gautam	2012	Inde	1	72		M	diabète II, pb coronaires	Guerison	pas de baignade					









Agence nationale de sécurité sanitaire  
de l'alimentation, de l'environnement et du travail  
27-31 avenue du général Leclerc  
94701 Maisons-Alfort Cedex  
[www.anses.fr](http://www.anses.fr)