

ISOLEMENT ET CULTURE *IN VITRO* DES AMIBES DU GENRE *NAEGLERIA* (*)

par

E. WILLAERT

Résumé — Un milieu de culture liquide monophasique est mis au point pour l'isolement, l'entretien et la culture massive de *Naegleria gruberi* parasite. Une différence de cultivabilité entre les *Naegleria* libres et parasites est observée.

Schardinger, en 1899, fut le premier à isoler, sur un milieu d'infusion de foin solidifié par de l'agar, à partir de selles diarrhéiques d'origine humaine, une amibe qu'il appela *Naegleria gruberi*. En 1904 et 1906, Musgrave et Clegg emploient de l'agar alcalinisé pour isoler des amibes du même type à partir de selles dysentériques, à partir de l'eau et à partir du sol.

Chez ces amibes isolées de différentes sources, ces auteurs n'ont pu observer aucun caractère permettant de les séparer en différentes espèces, ni même de distinguer microscopiquement les souches d'origine libre des souches trouvées dans l'intestin humain. Ils considèrent que probablement n'importe quelle amibe libre peut devenir pathogène dans certaines conditions.

Wells, en 1911, emploie cette même gélose additionnée d'extrait de bœuf pour isoler des amibes à partir de l'air.

Un grand nombre de chercheurs emploient par la suite l'agar à 1,5 p. cent recouverte d'une couche de bactéries. Seules quelques modifications ont été apportées par l'incorporation de produits nutritifs comme la protéose-peptone, l'extrait de bœuf et l'extrait de levure. C'est sur ce milieu que furent généralement isolées les souches de *Naegleria* provenant de cas de méningo-encéphalite primitive.

Seul Mandal, en 1968, isola en milieu axénique liquide (de Schuffner) une souche provenant d'un cas de méningo-encéphalite primitive. Les subcultures sur ce milieu, dépourvu de matériel cellulaire ou bactérien, maintenaient les amibes en vie, mais ne permettait pas une multiplication mesurable, à moins d'ajouter à ce même milieu gélifié des germes *Aerobacter*.

Pittam (1963) réussit à maintenir une souche de *Naegleria* libre en milieu liquide, en ajoutant des bactéries vivantes, tout en limitant leur

(*) Ce travail a été présenté à la réunion de la Société belge de Protozoologie du 16 juin 1971.

multiplication et en assurant une bonne oxygénation. Mais ses tentatives pour cultiver axéniquement cette amibe dans ce milieu restèrent sans succès.

Chang (1960) cultive une souche de *Naegleria* d'origine libre sur des cellules de rein de singe. Il obtient une multiplication modérée tant que les cellules ne se lysent pas, mais dès que la lyse cellulaire débute, une multiplication importante des amibes est observée.

Enfin, Cervà en 1969 fut le premier à réussir la culture axénique de *Naegleria* d'origine parasitaire en utilisant un milieu liquide à base de casitone et de sérum.

Dans le cadre des études menées par le Département de Protozoologie (Prof. Jadin), à propos des cas de méningo-encéphalite amibienne primitive survenus à Anvers, nous avons entrepris la caractérisation biologique et immuno-chimique de leur agent étiologique.

Dans un premier temps, il s'agissait d'isoler et d'adapter *Naegleria* aux conditions de culture *in vitro* afin d'obtenir leur multiplication massive.

Nous envisagerons successivement l'isolement et l'adaptation en culture *in vitro* de souches parasites et de souches libres, puis des modifications de milieu de culture afin d'obtenir une production massive de ces amibes.

1 — Isolement

a) Lors de l'isolement des souches parasites de *Naegleria gruberi* provenant des cas de méningo-encéphalite primitive (O 359 et O 360), nous avons eu recours à des milieux utilisés couramment dans notre laboratoire pour l'entretien et l'isolement des trypanosomes ainsi qu'à un milieu peptoné employé pour l'entretien d'une souche d'*Acanthamoeba castellanii*.

Dans le premier cas O 358, le liquide céphalo-rachidien a étéensemencé en eau peptonée et dans des milieux destinés à l'isolement d'*Entamoeba histolytica* et mis à incuber à 37 °C. Ces ensemencements n'ont pas donné lieu à une multiplication mesurable.

Dans le second cas O 359, l'ensemencement du liquide céphalo-rachidien a été effectué en milieux G. L. S. H., B. M. E., Serumless de Neumann et Tytell et en eau peptonée, à la température de 37 °C. Ces ensemencements ont donné lieu à un développement modéré. Les contrôles au 5^e jour montrent un nombre limité d'éléments arrondis et immobiles.

Quant aux souris injectées par voie intracérébrale avec le liquide céphalo-rachidien, elles présentent, après 48 heures déjà, des signes de paralysie. A l'autopsie, le cerveau montre de nombreuses amibes bien mobiles. Un broyat de cerveau de souris est ensemencé sur les mêmes milieux et incubé à 37 °C. Cette fois une multiplication importante est obtenue.

En milieu Serumless (N. T.), les amibes sont peu nombreuses et peu mobiles, elles s'arrondissent et se rétractent. La culture se lyse assez vite.

En milieu G. L. S. H., les amibes sont nombreuses et très mobiles durant les trois premiers repiquages; ensuite elles diminuent sensiblement en nombre et une lyse importante s'observe.

En eau peptonée, nous obtenons une culture riche lors des 5 à 6 premiers repiquages, puis une lyse s'observe. Dès les premiers repiquages les amibes sont bien mobiles, mais elles deviennent rapidement arrondies et immobiles.

En milieu B. M. E., la multiplication est moins rapide qu'en G. L. S. H., mais presque aussi importante. La multiplication se maintient durant cinq passages puis se fait moins abondante. Les amibes sont devenues plus petites et on retrouve assez bien de formes arrondies. On a pu cultiver ainsi cette souche pendant un mois sur ces milieux qui servent habituellement aux cultures des trypanosomes.

Dans aucun cas nous n'avons observé de kystes ni de formes flagellées dans ces cultures.

Troisième cas 0 360 : nous recevons un autre liquide céphalo-rachidien, conservé depuis 15 jours à la température ambiante. A l'examen microscopique nous retrouvons les mêmes amibes.

L'inoculation par voie intracérébrale ainsi que la mise en culture vont nous permettre d'effectuer les mêmes observations que dans le cas précédent.

Trois à quatre semaines après l'isolement de ces souches, nous avons employé le milieu de Cervà à base de casitone.

Les deux souchesensemencées en casitone à partir des cultures entretenues en B. M. E. et G. L. S. H. donnent de suite lieu à un développement abondant. Il n'y a pas eu de phase d'adaptation.

Au premier repiquage, nous observons une multiplication abondante avec un polymorphisme marqué. On retrouve des formes amiboïdes très mobiles, des formes rondes immobiles et même de rares formes flagellées.

b) Nous avons procédé à l'isolement de souches de *Naegleria* des eaux de bassins de natation à Anvers.

1) On peut obtenir des cultures de *Naegleria* libres avec la méthode employée pour l'isolement d'amibes *limax* libres, c'est-à-dire une couche d'agar à 1,5 p. cent recouverte préalablement de bacilles *Aerobacter aerogenes*, tués par chauffage à 65 °C pendant une heure. Pour éviter le plus possible une surinfection par levures ou champignons, nous incorporons à l'agar 500 unités de Nystatine par ml.

A la surface de l'Agar on dépose des confetti à antibiotiques (nous employons Pénic. 12U et Kana. 3,1 γ) sur lesquels on dépose une goutte de l'eau à examiner.

Un développement s'observe à partir de 48 heures déjà mais plus souvent à partir du 4^e au 5^e jour. Au début de la multiplication on observe surtout des formes amiboïdes, lesquelles se transforment en kystes après avoir envahi la plaque d'agar et épuisé la nourriture. Nous avons observé que le genre *Naegleria* s'enkyste plus facilement sur la couche d'agar que les *Hartmannella*, lesquelles se maintiennent pendant plusieurs semaines sous forme amiboïde. A partir de ces plaques d'agar nous avons pu clôner et mettre en culture en milieu casitone avec une réussite de 75 p. cent quant il s'agit d'*Hartmannella*.

2) Quant à *Naegleria*, des problèmes se posent encore maintenant. Il n'a pas encore été possible de cultiver des *Naegleria* d'origine libre en milieu liquide axénique.

Nous avons obtenu un développement transitoire en milieu liquide enrichi de bactéries vivantes ou tuées.

La multiplication s'arrête au bout de 6 à 8 repiquages successifs toutes les 48 heures.

3) Une souche a été inoculée par voie intracérébrale à la souris. Elle s'est montrée peu pathogène lors des 10 premiers repiquages et est devenue plus pathogène au cours des 25 passages suivants effectués de cerveau à cerveau.

Plusieurs tentatives d'isolement de cette souche en milieu liquide axénique à partir de cerveau de souris sont restées sans résultat. Nous sommes donc obligés d'entretenir cette souche en boîte de Pétri sur une couche d'agar garnie d'*Aerobacter aerogenes*.

En conclusion on peut dire que les souches de *Naegleria* isolées de l'eau ne se développent pas en milieu axénique liquide, mais sont aisément isolées sur gélose en présence d'*Aerobacter* tué. D'autre part, les souches isolées du liquide céphalo-rachidien se montrent pathogènes d'emblée pour la souris et se multiplient aisément en milieu axénique. Dans ce dernier cas, le milieu d'isolement le plus favorable paraît être le milieu de Cervà.

2 — Culture *in vitro*

Notre but étant d'obtenir des cultures massives, afin de pouvoir préparer des extraits antigéniques solubles:

a) nous avons pris comme point de départ le milieu de Cervà dont la composition est la suivante :

Bacto-casitone (Difco)	20 g	Pénicilline	500.000 U
Sérum de veau (ou de poulain)	100 ml	Streptomycine	50.000 mcg
		Eau bidistillée	900 ml

Nous avons modifié ce milieu en ajoutant par litre de milieu :

Glucose	1 g	Biotin	20 mcg
Acide folique	2 mg	Rutine	5 mg

Nous appelons ce milieu « C. G. V. S. ».

Nous avons observé que différents lots de sérums peuvent se montrer plus ou moins favorable à la multiplication des amibes *Naegleria*. En décomplémentant le sérum à 56 °C pendant 30 minutes, tous les lots se montrent uniformément favorables.

b) Quatre souches de *Naegleria* ont été observées durant quinze repiquages sur ces différents milieux. Outre les deux souches anversoises, nous avons pu étudier les souches VITEK (isolées par Cervà en 1969 en Tchécoslovaquie d'un cas de méningo-encéphalite primitive) et HB-1 (isolée par Butt en 1966 aux U. S. A.).

En entretien de routine, les cultures sont ensemencées sur des milieux neufs en veinules contenant 3 ml de milieu. L'inoculum, 1/2 ml environ, est prélevé au fond du tube. Les repiquages à 28 °C se font tous les 8 à 10 jours et tous les 6 jours à 37 °C. De plus, pour les deux souches anversoises, les taux de multiplication dans le milieu de Cervà et le milieu C. G. V. S. ont été mesurés et comparés aux températures de 28 °C et de 37 °C. Dans ce but, des cultures de *Naegleria* âgées de six jours ont été ensemencées à raison de 100.000 à 150.000 amibes par ml de milieu neuf.

Des numérations quotidiennes ont été effectuées en cellule de Thoma après agitation mécanique de la culture pendant cinq minutes. Les chiffres obtenus sur les diagrammes représentent la moyenne de quatre cultures distinctes.

Résultats

Nous observons :

1) a - à 28 °C en milieu de Cervà : les 4 souches étudiées se comportent de la même façon. On retrouve des formes amiboïdes mobiles, des formes arrondies et de rares formes flagellées.

Nous observons au départ une multiplication lente pendant les 4 à 5 premiers jours. Puis le taux de multiplication s'accroît jusqu'au 10^e à 11^e jour où nous obtenons une moyenne de 1 million d'amibes par ml. Débute alors la période de lyse. Quatre semaines après l'ensemencement on retrouve encore des formes mobiles et viables.

b - à 28 °C en milieu C. G. V. S. : l'aspect de la culture se montre à peu près comparable à celle obtenue dans le milieu de Cervà. Néanmoins les formes flagellées se montrent plus nombreuses et la lyse après le 11^e jour est moins importante. La multiplication est beaucoup plus considérable et la population atteint une moyenne de 1.700.000 amibes par ml. Après un mois on retrouve toujours des formes mobiles et subcultivables (figure 1).

2) a - à 37 °C en milieu de Cervà : les 4 souches se comportent de la même façon. Nous observons des formes amiboïdes mobiles, des formes arrondies et des formes flagellées peu nombreuses. La multiplication est active durant les huit premiers jours et la population atteint une moyenne de 1.400.000 d'amibes par ml. Un début de lyse s'observe à partir du 10^e jour. Vingt jours après l'ensemencement il ne subsiste que peu de formes viables.

b - à 37 °C en milieu C. G. V. S. : les formes flagellées sont nombreuses. Les amibes ont tendance à se multiplier en grumeaux, tout comme nous l'observons pour les trypanosomes.

Parfois nous avons même observé une multiplication à la surface du milieu. Une croissance abondante s'observe durant les huit premiers jours, suivie d'une phase de multiplication modérée. La population atteint une moyenne de 2 millions, parfois de 2,5 millions d'amibes par ml. Aucune lyse ne s'observe durant les 10 premiers jours de culture. Après 24 jours de culture des formes viables subsistent encore (figure 2).

Nos essais pour cultiver des *Naegleria* parasites dans le milieu de Cervà modifié, dépourvu de sérum sont restés sans résultats, ainsi que

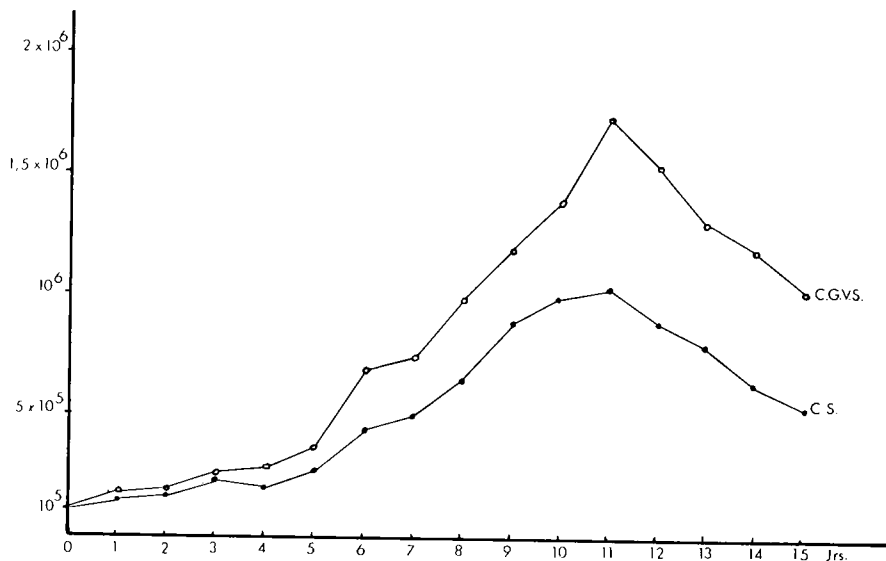


Figure 1

Croissance de *Naegleria gruberi* en milieu de Cervà et en milieu C. G. V. S. à 28 °C.
 Abscisse : nombre de jours. Ordonnée : nombre d'amibes par ml.

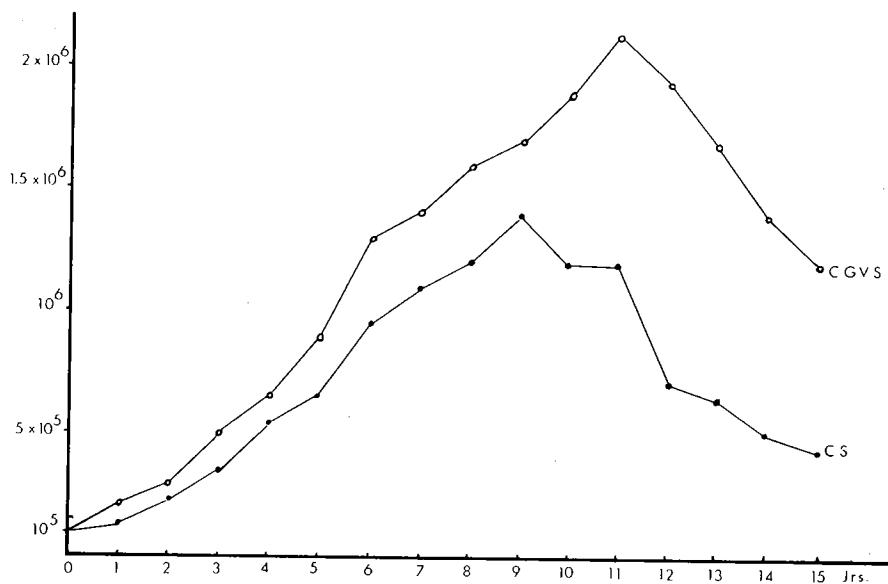


Figure 2

Croissance de *Naegleria gruberi* en milieu de Cervà et en milieu C. G. V. S. à 37 °C.
 Abscisse : nombre de jours. Ordonnée : nombre d'amibes par ml.

nos essais de culture sur ce même milieu solidifié par de l'agar. Quant aux amibes du genre *Hartmannella*, cultivées sur ces milieux, elles se multiplient abondamment.

Ces essais nous ont permis de sélectionner les conditions de culture les plus favorables et de préciser le moment optimum de la récolte des amibes. Nous avons décidé ainsi de cultiver en milieu C. G. V. S. à 37 °C et de récolter entre le 8^e et le 10^e jour.

Les cultures massives sont réalisées en flacons de Roux de 1000 ml préalablement siliconés, contenant 200 ml de milieu de culture. Dans ces flacons le milieu est étalé en une couche mince, assurant une bonne oxygénation. L'ensemencement est réalisé par l'inoculation de 40 ml d'une culture de 6 à 8 jours.

Pour obtenir une bonne appréciation du rendement des cultures, on pèse le culot de centrifugation obtenu après 10 minutes de rotation à 1.500 tours par minute. Nous avons obtenu, en poids humide et après lavages, entre 600 mg et 1 g d'amibes par litre de milieu de Cervà, tandis qu'en milieu C. G. V. S. nous obtenons entre 1 g et 1,5 g d'amibes par litre de milieu de culture.

Nos observations confirment le fait que les *Naegleria* d'origine libre ne sont cultivables qu'en présence de bactéries ou de débris cellulaires, tandis que les *Naegleria* parasites nécessitent du sérum. S'agit-il là de deux espèces différentes ou d'une même espèce qui peut se modifier et s'adapter à la vie parasitaire ?

C'est pour tenter de répondre à cette question que nous avons entrepris d'analyser et de comparer les structures immuno-chimiques de ces amibes et que nous avons mis au point une méthode de culture massive.

Conclusions

Pour isoler et entretenir *in vitro* les *Naegleria* parasites, l'emploi du milieu de Cervà ou du milieu C. G. V. S. est recommandé.

Dans les cas suspects de méningo-encéphalite amibienne primitive, l'inoculation par voie intracérébrale à la souris du liquide céphalo-rachidien assure un diagnostic rapide.

L'isolement des *Naegleria* libres se fera de préférence sur milieu gélosé recouvert de bactéries vivantes ou tuées.

La culture massive des *Naegleria* parasites s'obtiendra le mieux en milieu liquide C. G. V. S.

Samenvatting — In vitro kweek van Naegleria amoeben.

Beschrijving van een vloeibare voedingsbodem geschikt voor het kweken en de massieve produktie van *Naegleria gruberi*. Er blijkt een verschil in kweekbaarheid te bestaan tussen de vrijlevende en de parasitaire vormen van *Naegleria*.

Summary — Isolation and maintenance of Naegleria gruberi in vitro.

Description of a liquid monophasic culture medium suitable for the isolation, maintenance and mass production of *Naegleria gruberi* parasite.

A difference in culture behaviour between free-living and parasitic *Naegleria* is observed.

Département de Protozoologie (Directeur : Prof. J. B. Jadin). Institut de Médecine Tropicale Prince Léopold (Directeur : Prof. P. G. Janssens) Nationalestraat 155, 2000 Antwerpen.

Reçu pour publication le 9 juillet 1971.

REFERENCES

- Band, R. N., Biotin a growth requirement for four soil amoebae. *Nature*, 1961, **192**, 674.
- Butt, C. C., Primary amoebic meningo-encephalitis. *New Engl. J. Med.* 1966, **274**, 1473.
- Cerva, L., Amoebic meningo-encephalitis : Axenic cultures of *Naegleria*. *Science* 1969, **163**, 576.
- Cerva, L., Zimak, V. et Novak, L., Amoebic meningo-encephalitis. A new amoeba isolate. *Science* 1969, **163**, 575-576.
- Chang, S. L., Growth of small free-living amoebae in various bacterial and bacteria-free cultures. *Can. J. Microbiol.* 1960, **6**, 397-405.
- Jadin, J. et Wéry, M., La culture des Trypanosomidae. *Ann. Soc. belge Méd. trop.*, 1963, **43**, 831-842.
- Jadin, J. et Le Ray, D., Acquisitions récentes dans les techniques de culture des Trypanosomes africains. *Ann. Soc. belge Méd. trop.* 1969, **49** (4), 331-340.
- Jadin, J. B., Hermanne, J., Robyn, G. et Willaert, E., Trois cas de méningo-encéphalite amibienne primitive en Europe occidentale à Anvers. *Bull. Acad. Nat. Méd.* 1971, **155**, 11-12, 232-239.
- Jadin, J. B., Hermanne, J., Robyn, G., Willaert, E., Van Maercke, Y. et Setvens, W., Trois cas de méningo-encéphalite amibienne primitive observés à Anvers (Belgique). *Ann. Soc. belge Méd. trop.*, 1971, **51**, 2, 255-266.
- Jadin, J. B. et Willaert, E., Trois cas de méningo-encéphalite amibienne à *Naegleria gruberi* observés à Anvers. Xe Réunion Annuelle du Groupement des Protistologues de Langue Française. 1971.
- Le Ray, D., Jadin, J., Fameree, L., Willaert, E. et Beckers, A., Quelques observations sur l'isolement et l'adaptation *in vitro* des trypanosomes africains pathogènes. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1970, **63**, 6, 675-684.
- Mandal, B. N., Gudex, D. J. et Fitchett, M. R., Acute meningo-encephalitis due to amoeba of the order Myxomycetale (slime mould). *New Zeal. Med. J.*, 1970, **71**, 16-23.
- Musgrave et Clegg, The cultivation and pathogenesis of Amoebae. *Philippine Journ. of Science*, 1906, **1**.
- Neumann, R. E. & Tytell, A. A., Serumless medium for cultivation of cells of normal and malignant origin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1960, **104**, 252-256.
- Page, I. C., Taxonomic criteria from limax amoebae with description of 3 new species of *Hartmannella* and 3 of *Vahlkampfia*. *J. Protozool.* 1967, **14**, 499-512.
- Pittam, M. D., Studies of an amoeba-flagellate *Naegleria gruberi*. *Q. Journ. Microb. Sci.* 1963, **104**, 513-529.
- Schardinger, F., Entwicklungskreis einer *Amoeba lobosa* (*Gymnamoeba*). *Amoeba gruberi*. *S. K. Acad. Wiss. Wien.* 1899, **108**, 713-734.
- Wells, R. T., Aerial contamination as a fallacy in the study of amoebic infections by cultural methods. *Parasitology*, 1912, **4**, 204-219.