

LES AMIBES: SUPPORT CELLULAIRE  
POUR LA DETECTION DE  
PATHOGENE EMERGENTS

Pr Bernard LA SCOLA

Unités des rickettsies, CNRS UMR 6020  
Faculté de Médecine de Marseille

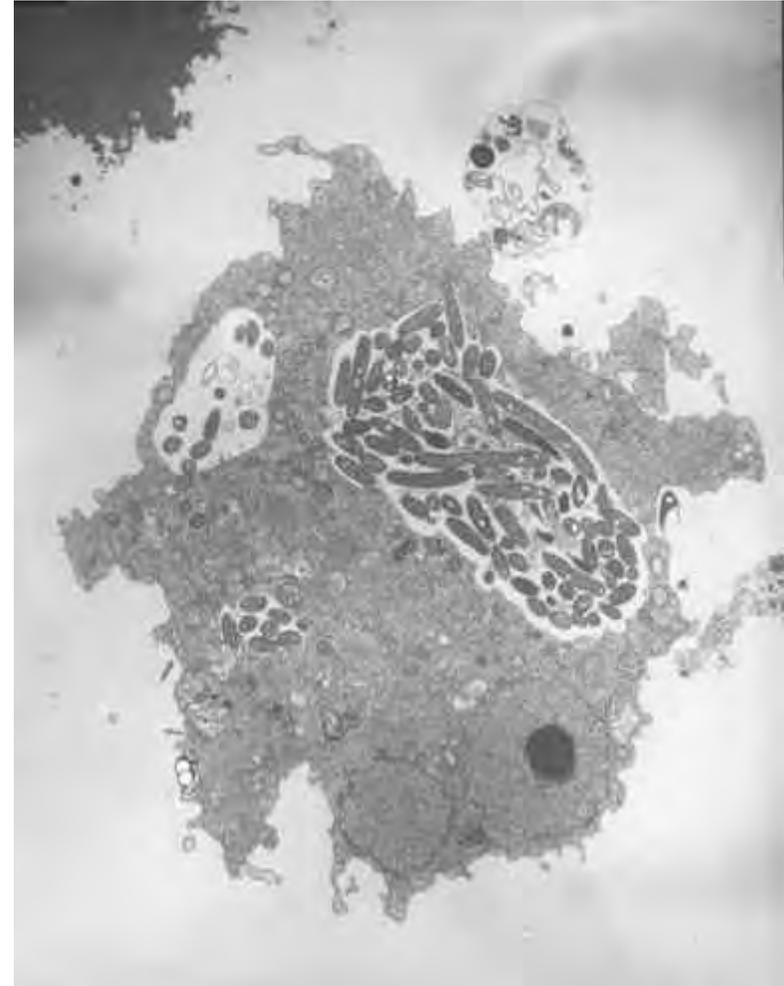
# LEGIONELLA PNEUMOPHILA

- Epidémie de pneumopathies dans un hôtel Philadelphie
- Pousse uniquement sur gélose buffered charcoal yeast extract (BCYE)
- Paradoxe d'une bactérie ubiquitaire dans l'eau mais de culture fastidieuse



# *LEGIONELLA* SPP.: ECOLOGIE

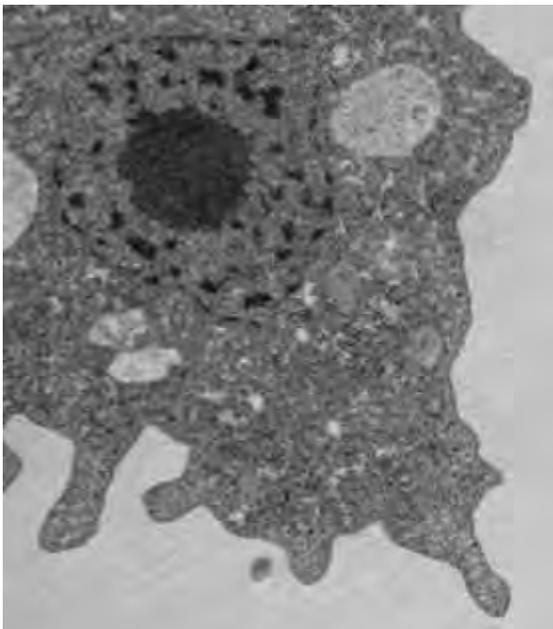
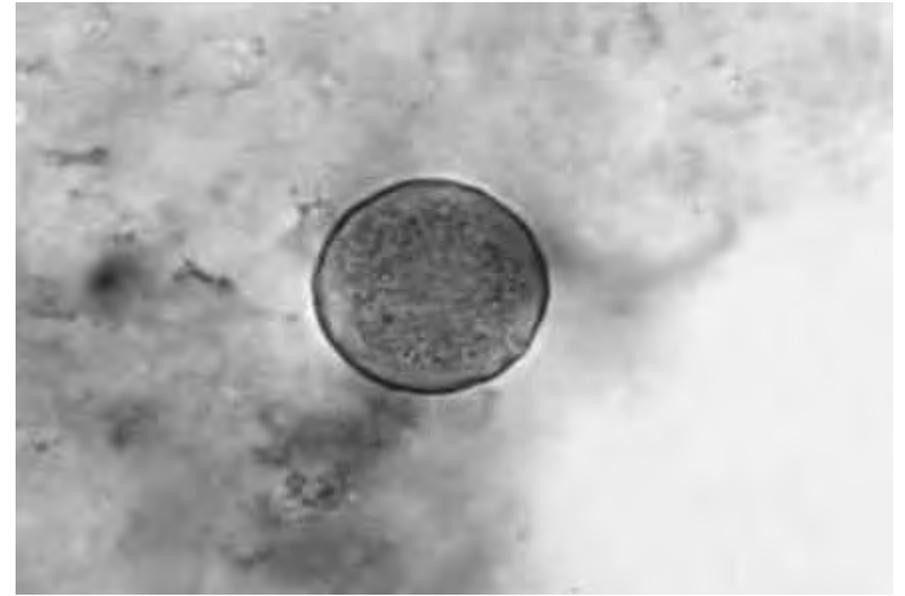
- Intracellulaires d'amibes
- Prolifération favorisée par des températures élevées
- Protection dans le milieu extérieur
- Contamination par aérosols: tours de climatisation, systèmes de distribution d'eau



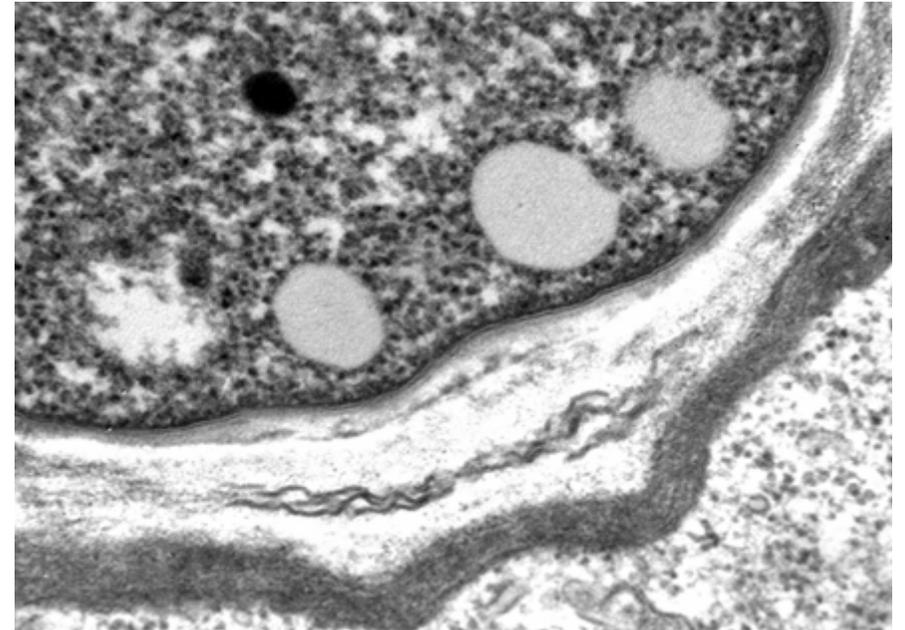
# Amibes libres: cycle



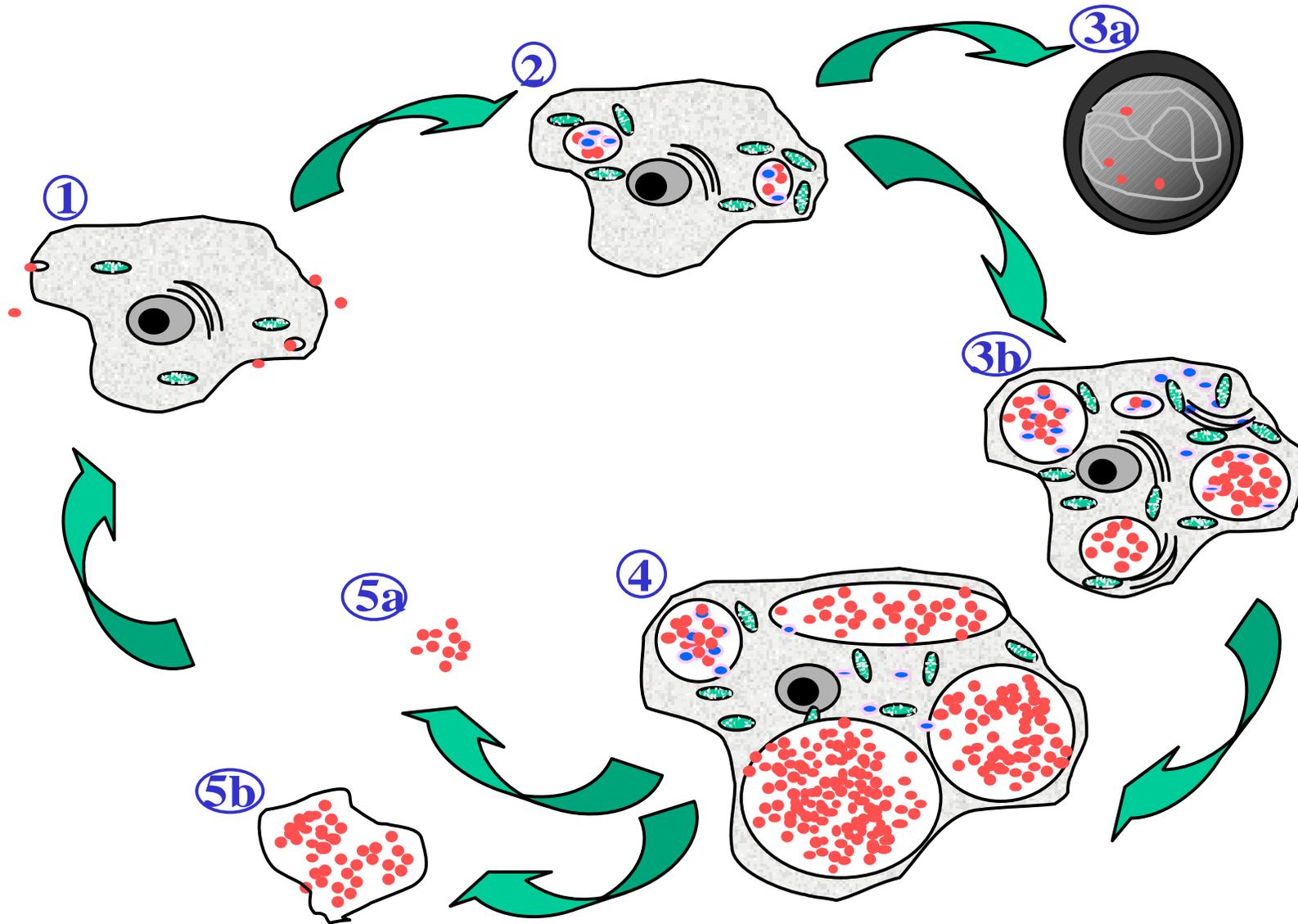
**Enkystement**



**Désenkystement**



# Cycle des bactéries résistantes à la phagocytose



# Projet de Recherche

## Isolement/caractérisation de bactéries associées aux amibes – Pouvoir pathogène

### HYPOTHESES DE DEPART

- 1° « Les bactéries de l'eau ayant la capacité de survivre à la phagocytose par les amibes sont capables de survivre à la phagocytose par les macrophages »
- 2° « Les bactéries pouvant survivre dans les macrophages peuvent survivre dans les amibes »
- 3° « Les bactéries de l'eau ayant la capacité de survivre à la phagocytose par les amibes et les macrophages sont des pathogènes humains potentiels»

# Bactéries intracellulaires et amibes

Les bactéries intracellulaires pathogènes humains sont-elles capables de survivre dans les amibes?

- *Rickettsia* spp.

- *Bartonella* spp.

- *Coxiella burnetii*

La Scola *et al.*, Clin. Microbiol. Infect. 2001, 7:75-79

- *Afipia felis*

La Scola *et al.* Lancet. 1999 353:1330

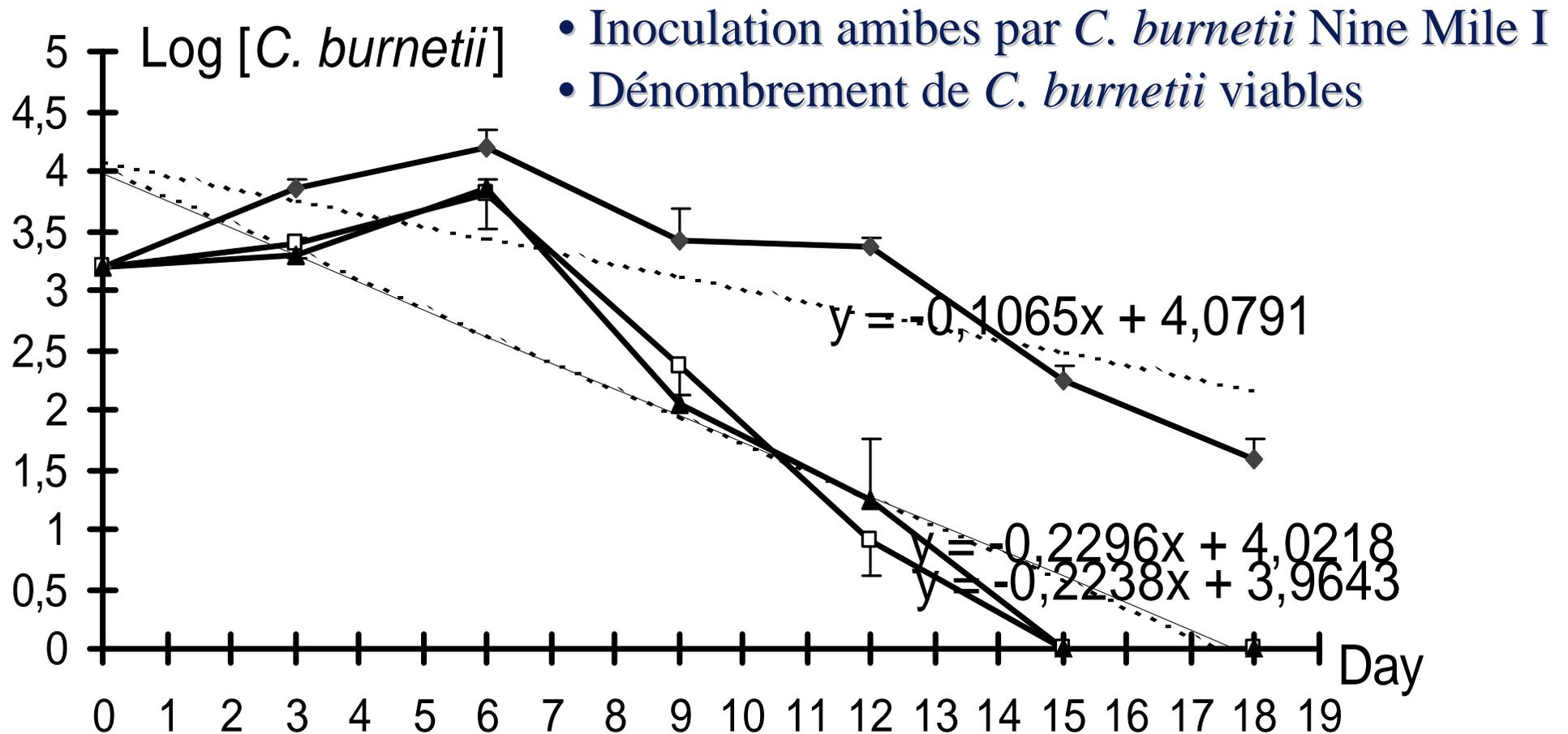
- Cellule endothéliale

- Globule rouge

- Macrophage

- Macrophage

# Survie de *Coxiella burnetii* dans les amibes *Acanthamoeba castellanii*

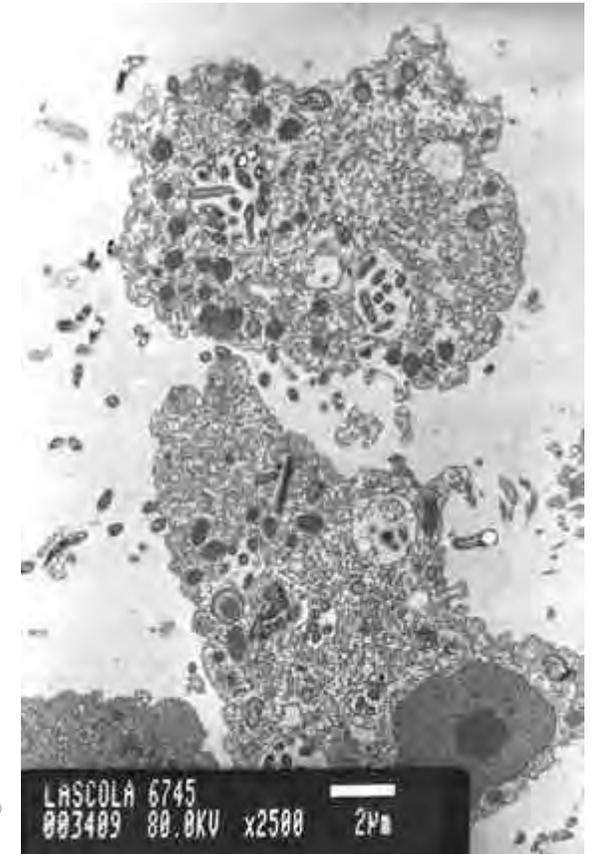


# Survie d'*Afipia felis* dans les amibes *Acanthamoeba polyphaga*

- Co-culture *A. felis* et *A. polyphaga* (contrôles lysats et milieu)
- Dénombrement d'*A. felis*: augmentation de  $3 \cdot \log_{10}$  en 6 jours en co-culture
- Enkystement d'amibes infectées, contact chlore 25 mg/l
- Ré-isolement d'*A. felis* après désenkystement

## Conclusions:

- *A. felis* croît dans les amibes et survit dans les kystes
- Bactérie de l'eau, probable contaminant de cultures



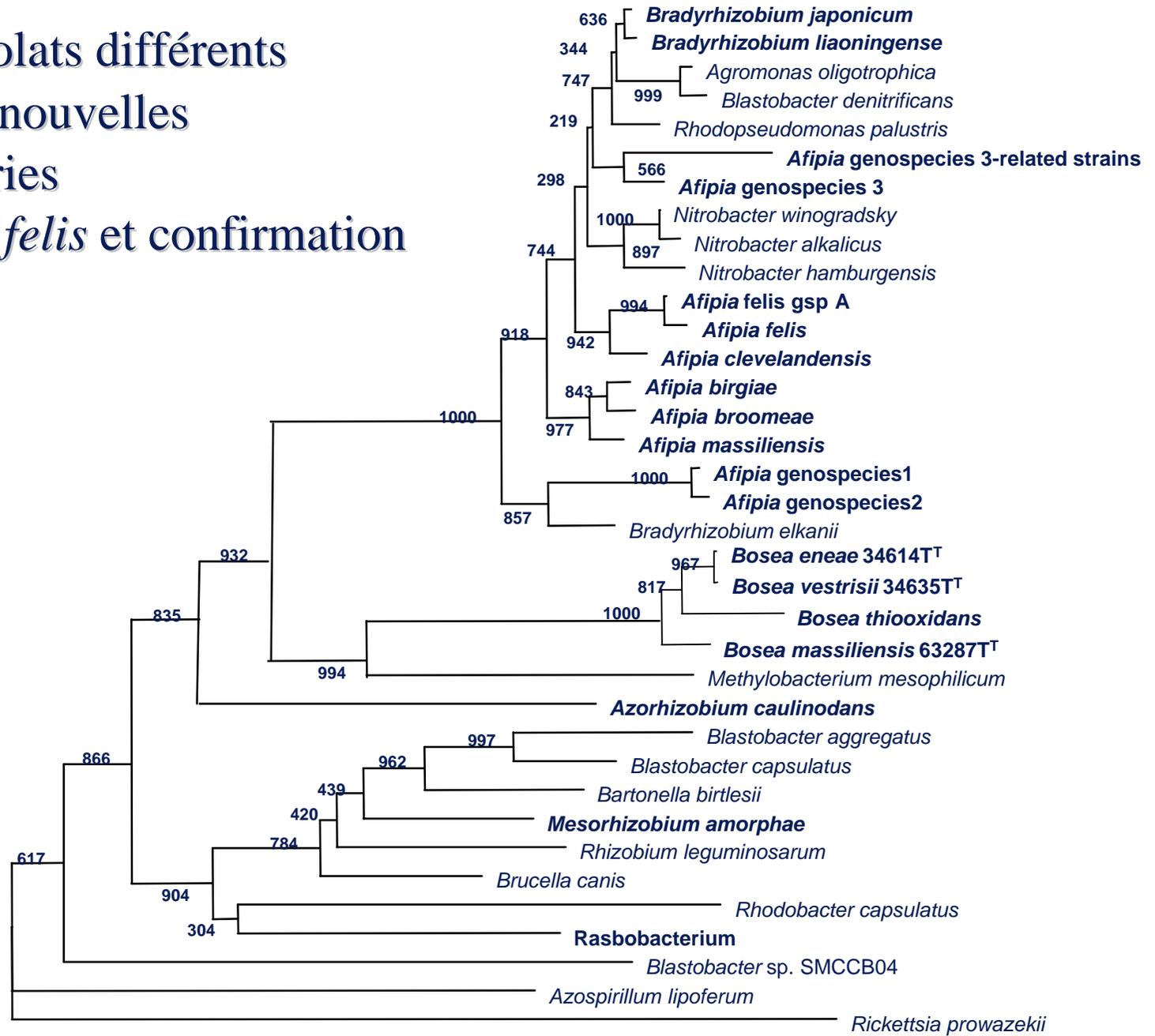
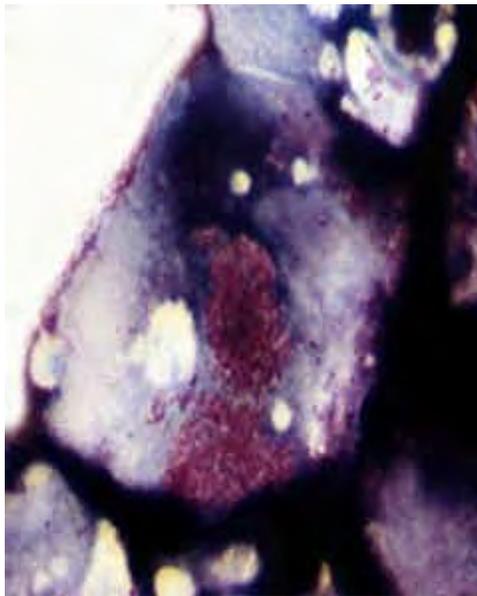
# Isolement de bactéries associées aux amibes dans l'eau du réseau hospitalier

Bactéries inconnues associées aux amibes dans le réseau d'eau hospitalier?  
(Résistants aux macrophages, agents de pneumonies nosocomiales)

- Inoculation de prélèvements de 100 robinets et 6 réservoirs
- Détection par effet cytopathogène et/ou croissance intra-amibienne
- Sous-culture sur gélose BCYE et amibes
- Identification par séquençage de l'ADN 16S r



- Isolement de 65 isolats différents
- Identification de 7 nouvelles alpha- Protéobactéries
- Isolement d'*Afipia felis* et confirmation de notre hypothèse



0.1 substitution per site

# Isolement de bactéries associées aux amibes dans l'eau du réseau hospitalier

La Scola *et al.* FEMS Microbiol. Ecol. 2000 34:129-137

La Scola *et al.* Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2002 52:1773-1782

La Scola *et al.* Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2003 53:14-20

La Scola *et al.* Res. Microbiol. 2004 155:47-51

- Isolement de bactéries des genres *Afipia* et *Bosea* avec description de 6 nouvelles espèces dans ces genres
- Bactéries du même genre isolées de produits d'expectoration
- Evidences sérologiques d'association pneumonies/présence d'anticorps contre *Afipia clevelandensis*
- Isolement d'une souche proche de *Rasbacterium*, bactérie isolée en culture cellulaire dans les hémocultures d'un patient avec syndrome septique sévère

## Conclusions:

Les nouvelles bactéries isolées sont de bons candidats comme agents de pneumopathies nosocomiales

# Isolement de bactéries associées aux amibes par co-culture de prélèvements humains

La Scola *et al.*, J. Clin. Microbiol. 2001, 39 :351-353

La technique est elle adaptable à des prélèvements cliniques?

- Technique d'isolement initialement décrite par T. Rowbotham
- Isolement de *L. pneumophila* d'expectorations et dans les selles
- Isolement de *L. lytica* (LLAP)



Technique adaptée dans le laboratoire

- Isolement tenté sur 1200 prélèvements pulmonaires profonds
- Ensemencement en parallèle gélose BCYE/co-culture avec amibes
- Isolement de 7 *L. pneumophila* et 1 *L. anisa* sur amibes
- Seules 3 *L. pneumophila* ont été isolées parallèlement sur gélose
- 4<sup>ème</sup> cas publié d'infection à *L. anisa*

# Rôle pathogène des bactéries associées aux amibes

## Etudes séroépidémiologiques

Les patients avec pneumopathies ont ils des anticorps contre les bactéries associées aux amibes?

Marrie *et al.* Emerg. Infect. Dis. 2001 7:1026-1029

- Collections de sérums de pneumopathies communautaires
  - 121 de pneumopathies ambulatoires
  - 255 de pneumopathies nécessitant une hospitalisation
- 1263 sérums testés contre 12 souches (dont 511 contrôles sains)
  - 9 LLAP
  - 2 *Parachlamydia*
  - *Afipia felis*
- Les patients avec pneumopathies ont des titres sérologiques significativement plus élevés que les contrôles
- Cas identifiés: LLAP1 (1), *Legionella drancourtii* (5) et *Parachlamydia* (2)

# Rôle pathogène des bactéries associées aux amibes

## Etudes séroépidémiologiques

La Scola *et al.*, Infect. Control. Hosp. Epidemiol. 2002 23:462-465

- Isolement de souches dans l'eau des USI de l'AP-HM (73 prélèvements réalisés en 8 mois)
- 85 sérums de pneumopathies nosocomiales testés contre les espèces isolées (+100 contrôles sains)
  
- Isolement de 8 espèces différentes
- Détection de patients séropositifs:
  - 1 contre *Rasbobacterium*
  - 2 contre *Mesorhizobium amorphae*
  - 1 contre *Afipia* gsp1
  - 1 contre *Bosea massiliensis*

# Rôle pathogène des bactéries associées aux amibes

## Etude longitudinale en USI pendant 6 mois (sérologie/PCR)

Les patients avec une pneumopathie en USI font ils des séroconversions contre les bactéries associées aux amibes et peut-on détecter ces bactéries dans le LBA des patients infectés?

La Scola *et al.*, Emerg. Infect. Dis. 2003 9:815-821

- Isolement de bactéries associées aux amibes aux niveaux des robinets d'une USI (prélèvement hebdomadaire)
- Pour chaque patient de cette USI, prélèvement d'un sérum et de sécrétions bronchiques par combicath\* à l'entrée puis toutes les semaines et à la sortie
- Détection par sérologie de séroconversions contres les bactéries isolées dans l'eau de l'USI
- Détection par PCR des mêmes bactéries dans les sécrétions bronchiques des patients

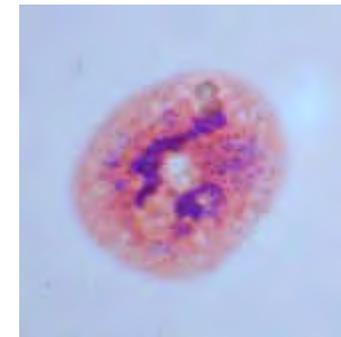


## Etude longitudinale en USI pendant 6 mois (sérologie/PCR)

- Isolement de 148 alpha Protéobactéries et de 163 *Legionella* spp.
- 40% des 30 patients évaluables présentent une séroconversion à l'une des bactéries isolées dans l'eau (dont 17% à *L. anisa* et 20 % à *B. massiliensis*)
- L'ADN des bactéries sources est détecté dans les sécrétions bronchiques des séroconvertisseurs
- Association significative entre séroconversion et pneumopathie prolongée (p=0.024)
- Association significative entre séroconversion et sévérité de la pneumopathie (p=0.026)
- Association significative entre fréquence d'isolement des bactéries dans l'eau et survenue d'une infection (62 % des isolats: *L. anisa* et *B. massiliensis*) (p=0.021)

# PERSPECTIVES

- Poursuite du suivi de l'eau et des patients en USI et dans l'environnement humain
- Recherche et caractérisation de nouvelles espèces



## Mimivirus

La Scola *et al.*, Science. 2003 299:2033

Raoult *et al.*, Science. 2004. 306:1344-1350

La Scola *et al.*, Emerg. Infect. Dis. 2005. 11:449-452

- Micro-organisme intra-amibien strict Gram +
- Non identifiable par séquençage de l'ARN 16S r
- Virus à ADN de 400 nm de diamètre
- Génome de 1.2 Mb
- Plus gros virus connu à ce jour
- Proposé comme nouvelle famille « *Mimiviridae* »
- Evidences d'un pouvoir pathogène humain
  - 26 patients avec pneumonie en ICU, 50 contrôles
  - 5/26 séropositifs versus 0/50 ( $p < 0.01$ )
  - Les anticorps reconnaissent le virus en immunogold
- Développement d'outils moléculaires plus discriminant pour l'étude la taxonomie de ces bactéries

