Les amibes libres, un cheval de Troie pour les bactéries pathogènes

Période : septembre 2015 à novembre 2015

Jérôme GUERLOTTÉ | jerome.guerlotte@univ-ag.fr

Université des Antilles - ISYEB, UMR 7205 CNRS MNHN UPMC EPHE - Pointe à Pitre - France

Mots clés : ***acanthamoeba castellanii*, amibes libres, *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori*, jus de fruits, lait frais, *Vibrio cholerae***

Les amibes se rencontrent dans tous les environnements naturels (sols, rivières...) et artificiels (habitations, élevages, réseaux d'eau, équipements industriels agro-alimentaires ou médicaux..). Ces eucaryotes unicellulaires sont en interaction constante avec les biofilms et possèdent la capacité d'héberger, de protéger et de disséminer des micro-organismes pathogènes avérés ou émergents. Par ailleurs, certaines de ces amibes, du genre *Acanthamoeba*, en particulier au stade de kyste, présentent une résistance très élevée aux traitements de désinfection ou de décontamination (1). Ainsi, de nombreuses espèces bactériennes pathogènes, telles que les légionelles ou les mycobactéries, dont l'importance en santé humaine et animale est en constante augmentation, utilisent ces amibes comme cheval de Troie pour survivre et proliférer dans les milieux hostiles. Les articles de cette note s'intéressent à cet aspect de la résistance des bactéries et illustrent l'importance de sa prise en compte dans l'évaluation du risque d'exposition aux microorganismes dans l'environnement hydrique et dans les produits de consommation. L'étude de Van der Henst *et al.*, (2015) décrit un mode de cohabitation original, entre le vibrion du choléra et l'amibe libre *A. castellanii*. L'article de Olofsson *et al.*, (2015) montre que le lait et les jus de fruits non pasteurisés peuvent être responsables d'infections à *Campylobacter jejuni*, quand le pathogène est en présence de l'amibe *A. polyphaga,* tandis que celui de Moreno-Mesonero *et al.*, (2015) montre comment *Helicobacter pylori* est capable de survivre à un traitement de chloration, si la bactérie est associée à l'amibe *A. castellanii*.

Une niche de réplication intracellulaire pour *Vibrio cholerae* au sein de l'amibe *Acanthamoeba castellanii*

Van der Henst C, Scrignari T, Maclachlan C, Blokesch M. An intracellular replication niche for *Vibrio cholerae* in the amoeba *Acanthamoeba castellanii. The ISME Journal 2015: 1–14*

Résumé

Le choléra est une maladie diarrhéique causée par la bactérie aquatique *Vibrio cholerae* qui reste une menace grave pour la santé des populations. Dans les eaux contaminées, le vibrion se trouve à l'état libre ou associé au plancton (2). Par ailleurs, l'amibe libre *Acanthamoeba castellanii* que l'on retrouve aussi dans les milieux aquatiques (3) et dans les mêmes habitats que le vibrion a été décrite comme un réservoir de bactéries pathogènes (4). Elle est caractérisée par une forme trophozoïte, active du point de vue métabolique dans les environnements favorables et un stade kystique, dans les environnements défavorables, muni d'une paroi rigide qui lui permet de résister aux traitements désinfectants et autres stress environnementaux (5). Différentes études, basées sur des comptages de colonies, ont montré que *V. cholerae* survit mieux en présence des amibes qu'en leur absence, mais sans en préciser les mécanismes intracellulaires (6). L'étude présentée ici, utilise une approche d'imagerie cellulaire qui révèle un mode de cohabitation original, entre *V. cholerae* et l'amibe libre *A. castellanii*.

Les auteurs montrent que la plupart des vibrions phagocytés par l'amibe se retrouvent dans de petites vésicules d'endocytose qui fusionnent avec les phagolysosomes dans lesquels ils sont digérés, tandis que certains d'entre eux, non digérés, sont relargués dans l'environnement par exocytose. De plus, les auteurs ont découvert qu'une fraction des vibrions résiste à la digestion en colonisant la vacuole contractile, un compartiment très dynamique de l'amibe, impliqué dans l'osmorégulation et qui leur offre un environnement protecteur. Les vibrions peuvent se multiplier dans la vacuole, la détruire pour proliférer dans le cytoplasme ou conserver cette niche intracellulaire jusqu'à l'enkystement, s'y multiplier et se disséminer dans l'environnement en lysant la paroi du kyste.

Par ailleurs, les auteurs ont montré que les polysaccharides du vibrion sont impliqués dans la lyse de la vacuole, et que le système moléculaire QS qui est un mécanisme de communication, serait impliqué dans la virulence. *Vibrio cholerae* est donc un pathogène intracellulaire facultatif et ce mode de cohabitation au sein des amibes augmente sa survie et sa prolifération dans l'environnement.

Commentaire

Les travaux sur le vibrion cholérique concernent le plus souvent les aspects cliniques de la maladie. La première originalité de cette publication est de s'intéresser à la nature insidieuse et complexe de l'agent pathogène ainsi qu'à son mode de vie dans l'environnement. Par ailleurs, si des travaux antérieurs ont déjà montré la prédation de *V. cholerae* par des flagellés, on sait beaucoup moins de choses sur les interactions entre le vibrion cholérique et les amibes libres, ainsi que sur les mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents. L'étude de ses interactions avec *A. castellanii* confère à cet article un intérêt supplémentaire.

Par ailleurs, l'utilisation de la microscopie confocale à balayage laser, doublée de la microscopie électronique à transmission, représente une approche d'investigation nouvelle, car les résultats vont au delà du simple comptage des colonies de vibrions en présence ou en absence d'amibes. L'imagerie cellulaire et les enregistrements vidéo permettent aux auteurs d'analyser de façon dynamique le comportement des vibrions au sein des amibes et de décrire précisément leur localisation subcellulaire. Enfin, la découverte d'une niche intracellulaire protectrice du vibrion cholera, au sein de la vacuole contractile, constitue le point réellement novateur de cette étude. En revanche, il est difficile de savoir si l'enkystement, la destruction de la vacuole et la lyse amibienne sont activement induits par le vibrion ou si la colonisation de la vacuole contractile entrave ses fonctions osmorégulatrices et aboutit à sa destruction passive suivie de celle du kyste.

L'amibe libre commune *Acanthamoeba polyphaga*, augmente la survie de *Campylobacter jejuni* dans le lait et dans le jus d'orange

Olofsson J, Berglund PG, Olsen B, Ellstrom P, Axelsson-Olsson D. The abundant free-living amoeba, *Acanthamoeba polyphaga*, increases the survival of *Campylobacter jejuni* in milk and orange juice. *Infection Ecology and Epidemiology* 2015; **5**: 28675

Résumé

Campylobacter jejuni est une bactérie responsable de nombreuses diarrhées humaines dans la plupart des régions du monde et provoque 200.000 infections chaque année dans l'Union européenne (7). La majorité des cas sont sporadiques et acquis à partir de volailles contaminées, mais de nombreuses autres sources existent, telles que le lait non pasteurisé, l'eau et les jus de fruits (8). Pourtant, contrairement à de nombreux autres agents pathogènes d'origine alimentaire, *C. jejuni* est sensible aux conditions environnementales et en particulier à l'acidité des jus de fruits (9). Cependant, des études de co-cultures avec l'amibe libre *Acanthamoeba polyphaga*, ont montré qu'elle pouvait héberger *C. jejuni* et le protéger des pH faibles (10). Ces amibes très répandues ont été isolées à partir des systèmes de distribution d'eau à travers le monde. L'utilisation d'eau pour préparer les jus à partir de concentrés, à la fois dans l'industrie et dans les ménages, est la principale source de leur contamination par *Acanthamoeba* spp. Ces amibes présentent un stade trophozoïte actif du point de vue métabolique dans les environnements favorables qui est capable de se transformer dans les environnements défavorables, en une forme kystique à double paroi, résistante à la chloration, aux antimicrobiens et aux désinfectants, ainsi qu'aux changements de pH et d'osmolarité (11). La capacité des amibes à résister dans ces conditions explique qu'on les retrouve sur les surfaces des équipements utilisés pour la préparation des aliments.

Dans cette étude, les auteurs ont étudié l'effet protecteur de l'amibe libre *A. polyphaga* sur la survie de *C. jejuni* dans le lait et dans le jus d'orange, après co-culture pendant 18h, 24h et 48h à +4°C, à température ambiante et après pasteurisation. Les bactéries et les amibes ont été mélangées, avant, ou après addition de lait ou de jus. La survie des bactéries a été évaluée par estimation du nombre de colonies se développant sur plaques de gélose au sang.

Les résultats montrent que la survie des bactéries est similaire dans le lait et dans le jus d'orange mais significativement plus élevée en présence d'amibes qu'en leur absence. Cet effet protecteur de l'amibe pour la bactérie est d'ailleurs plus prononcé à température ambiante qu'au froid. En revanche, l'effet protecteur des amibes n'existe plus après pasteurisation, confirmant ainsi l'efficacité du traitement. Les auteurs concluent que le lait et les jus de fruits frais, non pasteurisés, peuvent être responsables d'infections à *C. jejuni*, si le pathogène est associé aux amibes.

Commentaire

Les bactéries de l'espèce *C. jejuni* sont décrites comme pathogènes alimentaires depuis 1972 et font l'objet d'une surveillance par les services de santé publique depuis 1982. Il est donc bien connu que la consommation de volailles contaminées, de lait non pasteurisé ou d'eau de distribution non traitée présente un risque pour le consommateur. En revanche, la présence de *C. jejuni* dans les jus de fruits est bien moins documentée, compte tenu de sa faible résistance dans les milieux acides. L'originalité des travaux antérieurs de ces auteurs est d'avoir pris conscience dès 2005, que *C. jejuni* est capable d'infecter l'amibe libre *A. polyphaga* et de survivre dans des vacuoles, pour s'y multiplier et se disséminer en lysant son hôte (10). La publication, ici, va plus loin en précisant de façon quantitative que l'utilisation des amibes par *C. jejuni* pour survivre dans les milieux hostiles peut s'appliquer à des produits de consommation courante, comme le lait ou les jus de fruits dans lesquels le pathogène et l'amibe peuvent être présents simultanément. La principale limite de cette étude réside dans l'utilisation d'un ratio d'infection (MOI)* un peu élevé, d'environ une bactérie par amibe dans les co-cultures, car dans la majorité des cas, la concentration des amibes dans du jus ou du lait est probablement beaucoup plus faible.

Utilisation de la technique DVC-FISH et de la PMA-qPCR pour évaluer la survie *d'Helicobacter pylori* à l'intérieur de l'amibe libre *Acanthamoeba castellanii*

Moreno-Mesonero L, Moreno Y, Alonso, JL, Ferrus MA. DVC-FISH and PMA-qPCR techniques to assess the survival of *Helicobacter pylori* inside *Acanthamoeba castellanii. Research in Microbiology* 2015 (xx):1-6.

Résumé

Helicobacter pylori est une bactérie pathogène, potentiellement cancérogène et sa transmission par l'eau pourrait passer par la voie fécale-orale (12). Par ailleurs, les amibes libres du genre *Acanthamoeba* sont des protozoaires ubiquistes que l'on retrouve également dans l'eau (13) sous deux formes, le trophozoïte métaboliquement actif qui se nourrit de bactéries, et le kyste qui permet de résister aux environnements défavorables.

Certaines bactéries résistant aux amibes (ARB)* sont capables de survivre, mais également de se reproduire à l'intérieur de ces protozoaires pour se mettre à l'abri des environnements nocifs (14). Toutefois, peu d'études jusqu'à présent ont étudié l'interaction entre *H. pylori* et les amibes libres (15). De plus, les méthodes de détection moléculaires classiques, telles que l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH)* ou la PCR quantitative (q-PCR)* permettent de détecter la présence des bactéries à l'intérieur des amibes, mais ne sont pas capables de faire la distinction entre des bactéries vivantes et mortes. Dans la présente étude, à la suite de 24h de co-culture et d'un traitement de désinfection pour tuer les bactéries extra-amibiennes, les auteurs ont combiné le comptage direct des germes viables (DVC)* pour ne compter que les bactéries vivantes et la technique FISH pour les localiser, ainsi que la PMA-qPCR pour n'amplifier que l'ADN des bactéries vivantes. Les résultats révèlent la présence de formes viables de la bactérie à l'intérieur des amibes et démontrent que *H. pylori* est capable de survivre à un traitement de chloration si elle est en présence de l'amibe *A. castellanii*.

Commentaire

On sait maintenant qu'un certain nombre de pathogènes hydriques humains, tels que *Campylobacter*, *Salmonella*, *Listeria* ou *Legionella* appartiennent au groupe des bactéries ARB qui utilisent les amibes libres pour résister aux environnements désinfectants et se multiplier en augmentant ainsi leur potentiel d'infectivité (16). Cependant, peu de données existaient jusqu'à présent à ce sujet sur *H. pylori,* considéré pourtant comme l'agent infectieux le plus répandu au monde avec environ 50% de la population humaine infectée (17). Les études précédentes montraient seulement que la présence d'amibes augmente la survie du pathogène. Le point novateur de la présente publication est d'avoir utilisé des approches moléculaires combinées telles que la DVC-FISH et la PMA-qPCR pour révéler la présence *d'H. pylori* dans un état viable et potentiellement infectieux au sein de l'amibe *A. castellanii.* Toutefois, la microscopie photonique utilisée dans cette étude ne permet pas de préciser la localisation subcellulaire du pathogène, ni les mécanismes de colonisation mis en jeu. Pour démontrer qu'*H. pylori* appartient bien au groupe ARB, il reste aussi à montrer que la bactérie est capable de se répliquer à l'intérieur de l'amibe.

Conclusion générale

Les bactéries résistantes aux amibes peuvent être hébergées par ces protozoaïres très répandus dans l'environnement ce qui représente un mode de contamination qui doit être pris en compte dans la démarche d'évaluation des risques. Les publications sélectionnées décrivent ce phénomène pour trois espèces bactériennes de l'environnement hydrique, particulièrement pathogènes, *Vibrio cholerae*, *Campylobacter jejuni* et *Helicobacter pylori*. Les auteurs montrent que ces bactéries, comme cela a déjà été décrit pour Salmonella, Listeria, Legionella, Chlamydia ou pour les mycobactéries, sont également capables d'être phagocytées par des amibes libres du genre Acanthamoeba et de les utiliser comme cheval de Troie pour survivre dans des milieux hostiles. Les bactéries internalisées échappent à la digestion du protozoaire en s'abritant au sein de ses compartiments cellulaires, sont capables de s'y répliquer et profitent de la résistance à long terme de ces kystes amibiens pour attendre des conditions favorables à leur dissémination dans l'environnement. Il apparait ainsi, à la lecture de ces travaux, qu'il faut prendre garde aux amibes, car elles constituent un berceau évolutif pour les microbes internalisés qui développent sans cesse de nouvelles stratégies pour survivre et augmenter leur potentiel de transmission.

General conclusion

Amoeba-resistant bacteria can be hosted by these abundant protists in the environment, representing a new mode of contamination that must be considered in the risk assessment process. The publications presented here describe this phenomenon for three particularly pathogens bacterial species of the water environment, Vibrio cholerae, Campylobacter jejuni and Helicobacter pylori. The authors show that these bacteria, as described elsewhere for Salmonella, Listeria, Legionella, Chlamydia or Mycobacteria, are also phagocytosed by free-living amoebae of the genus Acanthamoeba and use them as a Trojan horse to survive in hostile environments. The internalized bacteria escape digestion in the protozoan, sheltering within its cell compartments, are able to replicate and enjoy the long-term resistance of amoebic cysts, waiting for more favorable conditions, to spread in the environment. It appears that free-living amoebae represent an evolutionary crib for internalized bacteria that develop new strategies to survive and increase their transmission potential.

Lexique

ARB : Les bactéries résistantes aux amibes " *amoeba-resistant bacteria* " (ARB) constituent un ensemble d'espèces bactériennes non digérées par les amibes qui peuvent être, soit lytiques pour leur hôte, soit ou au contraire capables de se répliquer à l'intérieur et en particulier dans les kystes, pour résister aux conditions défavorables de l'environnement telles que les traitements biocides.

DVC : Le comptage direct des germes viables "*Direct Viable Count*" (DVC) est réalisé après incubation des cellules avec un inhibiteur de synthèse d'ADN et un extrait de levures. Les bactéries viables, sensibles à l'antibiotique utilisent l'extrait de levures pour se diviser et prennent une forme allongée qui permet de les différencier et de les compter.

FISH : Le FISH " *fluorescence in situ hybridization* " ou hybridation *in situ* en fluorescence est une technique de biologie moléculaire et de cytogénétique utilisant des sondes nucléotidiques marquées à l'aide d'un fluorochrome pour révéler les gènes *in situ* sur des coupes observées en microscopie photonique et en imagerie moléculaire.

MOI : La multiplicité d'infection cellulaire *" multiplicity of infection "* (MOI) est définie par le rapport du nombre de microorganismes infectieux sur le nombre de cellules présentes

PMA : Le monoazide de propidium "*propidium monoazide*" (PMA) est un agent intercalant qui ne pénètre que dans les cellules dont la membrane est altérée et inhibe l'amplification de leur ADN par PCR, il est utilisé pour amplifier uniquement l'ADN des cellules vivantes.

q-PCR : La q-PCR "*quantitative real-time polymerase chain reaction* " ou PCR quantitative en temps réel est une méthode de polymérisation en chaîne qui permet de suivre la quantité d'ADN présente dans la réaction, au fur et à mesure de son amplification.

QS : Le système de détection du quorum "*quorum sensing*" (QS), correspond à un mécanisme moléculaire de régulation des gènes qui renseigne chaque bactérie sur la densité de la population de sa propre espèce ou des espèces environnantes, ce qui lui permet de mettre en place des comportements symbiotiques.

Trophozoïte : Le trophozoïte est la forme végétative d'un protozoaire, le corps cellulaire est déformable et dépourvu de flagelles, il se déplace par mouvements amiboïdes et se nourrit par phagocytose au moyen de pseudopodes.

Publications de référence

2 **Matz C, Kjelleberg S**. Off the hook--how bacteria survive protozoan grazing. *Trends Microbiol* 2005;**13**:302-7.

3 **Martinez AJ, Visvesvara GS**. Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. *Brain Pathol* 1997;**7**:583-598.

4 **Shanan S, Abd H, Hedenstrom I, Saeed A, Sandstrom G**. Detection of Vibrio cholerae and Acanthamoeba species from same natural water samples collected from different cholera endemic areas in Sudan. *BMC Res Notes* 2011;4:109.

6 **Abd H, Saeed A, Weintraub A, Nair GB, Sandstrom G**. Vibrio cholerae O1 strains are facultative intracellular bacteria, able to survive and multiply symbiotically inside the aquatic free-living amoeba Acanthamoeba castellanii. *FEMS Microbiol Ecol* 2007;**60**:33-39.

7 **ECDC**. Annual epidemiological report 2014 -food- and waterborne diseases and zoonoses, Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control 2014;20-4.

8 **Domingues AR, Pires SM, Halasa T, Hald T**. Source attribution of human campylobacteriosis using a meta-analysis of case-control studies of sporadic infections. *Epidemiol. Infect.* 2012;**140**:970-81.

9 **Park SF**. The physiology of Campylobacter species and its relevance to their role as foodborne pathogens. *Int J Food Microbiol* 2002;**74**:177-88.

10 **Axelsson-Olsson D, Waldenstrom J, Broman T, Olsen B, Holmberg M**. Protozoan Acanthamoeba polyphaga as a potential reservoir for Campylobacter jejuni. *Appl Environ Microbiol* 2005;**71**:987-92.

11 **Thomas JM, Ashbolt NJ**. Do free-living amoebae in treated drinking water systems present an emerging health risk? . *Environ Sci Technol* 2011;**45**:860-9.

12 **Engstrand L.** Helicobacter in water and waterborne routes of transmission. *J Appl Microbiol* 2001;**90**:80-4.

14 **Barker J, Brown MR**. Trojan horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. *Microbiology* 1994;**140** (Pt 6):1253-9.

15 **Winiecka-Krusnell J, Wreiber K, von Euler A, Engstrand L, Linder E**. Free-living amoebae promote growth and survival of Helicobacter pylori. *Scand J Infect Dis* 2002;**34**:253-6.

Revues de la littérature

1 **Thomas V**. Amibes libres de l'environnement : écologie et interactions avec des micro- organismes pathogènes émergents *Faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry*: Université Paris Sud-11 2012.

5 **Khan NA**. Acanthamoeba: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiol Rev* 2006;30:564-595.

13 **Rodriguez-Zaragoza S**. Ecology of free-living amoebae. *Crit Rev Microbiol* 1994;**20**:225-41.

16 **Greub G, Raoult D**. Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin Microbiol Rev* 2004;**17**:413-33.

17 **Torres J, Pérez-Pérez G, Goodman KJ *et al.*** A Comprehensive Review of the Natural History of Helicobacter pylori Infection in Children. *Archives of Medical Research*;**31**:431-469.

Autres publications identifiées

Lu J, Struewing I, Vereen E, Moe C, Ashbolt N. Molecular Detection of *Legionella* spp. and their associations with *Mycobacterium* spp., *Pseudomonas aeruginosa* and amoeba hosts in a drinking water distribution system. *J Appl Microbiol*. 2015 Nov 4.
Cette étude récente, conduite à grande échelle sur un réseau d'eau de distribution urbain aux USA, montre que les légionelles et les mycobactéries associées aux amibes libres sont les agents pathogènes opportunistes non fécaux les plus fréquemment rencontrés et pourraient servir d'indicateurs de la qualité microbiologique des eaux de distribution.

Lambrecht E, Bare J, Chavatte N, Bert W, Sabbe K, Houf K. Protozoan Cysts Act as a Survival Niche and Protective Shelter for Foodborne Pathogenic Bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 2015;**81**(16):5604-12
De nombreuses bactéries d'origine alimentaire (Salmonella enterica, Escherichia coli, Yersinia enterocolitica, and Listeria monocytogenes) associées à l'amibe libre Acanthamoeba castellanii, résistent aux traitements antibiotiques et aux pH acides et sont capables de se disséminer après sortie des kystes. Cette étude montre que le rôle des amibes libres dans la persistance et l'épidémiologie des agents pathogènes bactériens d'origine alimentaire est probablement sous-estimé.

Liens d'intérêts :

☒ Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt