THÈSE

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE POITIERS
UFR des sciences fondamentales et appliquées
Ecologie et biologie des interactions - EBI (Poitiers)
(Diplôme National - Arrêté du 7 août 2006)

École doctorale : Sciences pour l'environnement - Gay Lussac (La Rochelle)
Secteur de recherche : Aspects moléculaire et cellulaire de la biologie

Présentée par :
Renaud Bigot

Impact de la multiplication chez l'hôte Acanthamoeba castellanii sur le développement de biofilms chez Legionella pneumophila

Directeur(s) de Thèse :
Jean-Marc Berjeaud, Jacques Frère

Soutenue le 12 décembre 2013 devant le jury

Jury :

Président	**Yann Héchard**	Professeur des Universités, Université de Poitiers
Rapporteur	**Alain Dufour**	Professeur des Universités, Université de Bretagne Sud
Rapporteur	**Christine Roques**	Professeur des Universités, Université de Toulouse 3
Membre	**Jean-Marc Berjeaud**	Professeur des Universités, Université de Poitiers
Membre	**Joanne Bertaux**	Maître de conférences, Université de Poitiers
Membre	**Sylvie Chevalier**	Professeur des Universités, Université de Rouen

Pour citer cette thèse :
Renaud Bigot. *Impact de la multiplication chez l'hôte Acanthamoeba castellanii sur le développement de biofilms chez Legionella pneumophila* [En ligne]. Thèse Aspects moléculaire et cellulaire de la biologie. Poitiers : Université de Poitiers, 2013. Disponible sur Internet <http://theses.univ-poitiers.fr>

THÈSE

Pour l'obtention du Grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS

FACULTÉ DES SCIENCES FONDAMENTALES ET APPLIQUÉES
(Diplôme National - Arrêté du 7 août 2006)
Ecole Doctorale : Sciences pour l'Environnement Gay Lussac

Secteur de Recherche :
Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Présentée par :

Renaud BIGOT

Impact de la multiplication chez l'hôte *Acanthamoeba castellanii* sur le développement de biofilms chez *Legionella pneumophila*

Directeur de Thèse : Pr Jean-Marc BERJEAUD
Co-Directeur de Thèse : Pr Jacques FRERE

Soutenue le 12 décembre 2013, devant la Commission d'Examen :

Rapporteurs :	M. Alain DUFOUR	Professeur, Université de Bretagne Sud
	Mme Christine ROQUES	Professeur, Université de Toulouse
Examinateurs :	Mme Sylvie CHEVALIER	Professeur, Université de Rouen
	Mme Joanne BERTAUX	Maitre de Conférences, Université de Poitiers
	M. Yann HECHARD	Professeur, Université de Poitiers
	M. Jean-Marc BERJEAUD	Professeur, Université de Poitiers

« Savoir s'étonner à propos
est le premier pas fait sur la route de la découverte. »
Louis Pasteur

Remerciements

Cela fait plus de 3 ans que j'ai quitté ma Basse-Normandie natale avec ces embruns de mer et de cidre pour venir m'installer à Poitiers. Au cours de ces 3 années, j'ai rencontré et travaillé avec beaucoup de personnes que je ne pourrai pas oublier et que je souhaite remercier.

Je voudrai remercier le Professeur ***Didier Bouchon****, directeur de l'unité EBI (Ecologie, Biologie des Interactions), de m'avoir accueilli et m'avoir permis de réaliser ce projet de recherche Je remercie également* ***Yann Héchard****, responsable de l'équipe Microbiologie de l'Eau, pour sa gestion dynamique de l'équipe et son aide.*

J'adresse mes remerciements à Monsieur ***Alain Dufour****, Professeur à l'Université de Lorient et Madame* ***Christine Roques****, Professeur à l'Université de Toulouse, d'avoir accepté d'être rapporteurs de mon travail. Je remercie également chaleureusement Madame* ***Joanne Bertaux****, Maitre de conférence universitaire à l'Université de Poitiers, et Madame* ***Sylvie Chevalier****, Professeur de l'université de Rouen, d'avoir accepté de faire partie de mon jury.*

Je remercie le professeur ***Jacques Frère*** *de m'avoir donné la chance de travailler sur ce projet de thèse et de m'avoir encadré pendant un an et demi****.*** *Merci pour toutes les discussions scientifiques que nous avons eu ensemble.*

Je remercie tous les collaborateurs de ce projet, ***Tobias Sahr*** *pour son aide pour la réalisation microarrays ainsi que* ***Carmen Buchrieser****. Je remercie également le Professeur* ***Eric Déziel****, de l'institut Armand Frappier pour son aide et sa collaboration pour l'identification de Lvol. Merci à* ***Anne Cantereau****, de la plateforme ImageUp, de m'avoir aidé à faire mes premiers pas en microscopie confocale et à* ***Jérôme Labanowski****, de l'ancien LCME, pour son aide en chimie. Merci à* ***Daniel****, pour ces « mythiques » tartes aux fraises ainsi que pour son aide pour le séquençage.*

Merci à toute l'équipe et la directrice du LMDF, le Professeur ***Nicole Orange****, pour m'avoir accueilli 3 semaines au sein de leur laboratoire. Merci tout particulièrement, à* ***Sylvie Chevalier-Laurency****, à* ***Emeline Bouffartigues*** *et à* ***Olivier Maillot*** *pour leur accueil, leurs conseils et pour toutes nos discussions.*

Sans oublier, un grand merci à ***ma petite carotte*** *qui se reconnaitra, pour m'avoir hébergé, encadré et qui m'a fait découvrir la ville d'Evreux avec ses collègues. Depuis que l'on se connait, depuis la L1, même séparé par plusieurs centaines de kilomètres, on arrive toujours à trouver un moyen pour travailler ensemble et pour faire des soirées. Cela ne m'étonnerait pas qu'un jour, on finisse collègues…*

Je voudrai ensuite remercier une personne chère, ***Jean-Marc Berjeaud****, dit JMB, pour avoir accepté de reprendre et d'encadrer mon travail de thèse. Merci pour ton aide, ton écoute, ta patience et ton soutien au cours de cette dernière année. Merci pour tout ce que tu m'as appris et apporté, aussi bien au niveau scientifique qu'humain. Merci pour nos discussions, pour tes idées, pour m'avoir aidé à maitriser mon stress avant chaque présentation lors des congrès. Si aujourd'hui je peux présenter mon travail, c'est en grande*

partie grâce à toi. Pour tout cela, un grand merci du fond du cœur et j'espère qu'un jour, j'aurai l'occasion de te rendre au moins une partie de ce que tu m'as apporté.

Je remercie également ***Joanne Bertaux****, de l'équipe EES, pour ta formation en microscopie, pour nos discussions scientifiques et celles qui l'étaient un peu moins. Un grand merci pour toute l'aide que tu m'as apportée aussi bien sur le plan scientifique qu'humain. Merci pour tout ce que tu as fait, tu es une personne géniale. J'espère que dans le futur, on aura l'occasion de travailler à nouveau ensemble.*

Je remercie tous les membres de l'équipe Microbiologie De l'Eau, et plus particulièrement, ceux qui sont venu à mon mariage et qui ont joué le jeu même si le thème était un peu original. Merci à ***Mathieu****, d'avoir était là pour me montrer le fonctionnement du laboratoire, de m'avoir appris les « joies » de la culture des amibes. Merci d'avoir partagé toutes ces soirées ensembles à finir les arènes, j'espère qu'on remettra ça. Et surtout, merci d'avoir accepté d'être mon témoin pour le plus beau jour de ma vie. Alors maintenant que tu es Docteur et cela avant tes … ans (on ne parle pas de choses qui fâchent), pour une fois, arrêtes de râler et profites !!! Merci à* ***Julien Verdon*** *(et à* ***Karline****), le papa de « Johnny », pour ces précieux conseils en science, en pédagogie, son aide et ses soirées. Sans oublier ma collègue de bureau pendant presque 1 an :* ***Nawel****. On a vécu la période de rédaction et nos « aventures » de thèse ensemble, mais depuis ton départ, le bureau est bien calme. Merci à* ***Didi et Mika****,* ***Vanessa et Nico*** *pour toutes ces après midi et ces soirées jeux de sociétés. Merci à* ***Momo*** *de m'avoir fait découvrir le laboratoire et à* ***Anne*** *et* ***Emilie*** *pour toutes nos discussions.*

Je tiens à exprimer un grand merci à ***Marie-Claude****, ma petite « mamie » qui a toujours veillé sur moi, pour nos longues conversations et son aide précieuse au laboratoire. Grâce à toi, on a toujours eu de quoi travailler. Merci aussi à* ***Karine****,* ***Laurence*** *et* ***Sylvie****, pour leur aide et leurs solutions aux problèmes administratifs. Promis* ***Laurence****, si un jour je travail dans un laboratoire qui gagne le prix Nobel, je t'appelle !!! Merci aussi à* ***Stéphanie*** *pout tous ces bons moments en TP, pour la tasse de café pendant les longues séances de TP et pour ton aide pour la culture d'amibes durant mes derniers mois de manipulation. Sans oublier,* ***Christophe*** *pour la préparation des milieux* ***Damien****,* ***Marie-Hèlène****,* ***Christine****,* ***Marion****,* ***Jérôme****,* ***Ascel, Margaux****,* ***Clémence*** *et* ***Arnaud****. Merci à vous tous, pour toutes les heures de rigolades que nous avons partagé.*

Merci également à tous les moniteurs, les ATER et les enseignants avec qui j'ai partagé tous ces bons moments.

Merci également à tous les stagiaires que j'ai encadré, qui ont contribué à ce travail et qui ont du me supporter et plus particulièrement ***Maroua*** *et* ***Marion****. Je vous souhaite bonne chance et bon courage pour la suite.*

Merci également à tous les thésards et amis, qui ne sont pas du MDE, avec qui j'ai partagée tous ces bons moments, pour toutes nos discussions et toutes ces formations du CPMEC, tout particulièrement ***Aïna*** *(je ne me risquerai pas à écrire ton prénom en entier !!!) et* ***Lyse****.*

*Je remercie également **Laurence** et **Laurent** pour leur accueil à l'école de l'ADN, **Eric** du planétarium pour m'avoir laissé animer les séances, un vrai rêve d'enfance, ainsi que toutes les secrétaires de l'espace Mendés France pour leur gentillesse.*

*Sans oublier, tous mes camarades apiculteurs de l'Abeille de la Vienne et plus particulièrement, **Rémy** et **Henry**, les formateurs du Rucher-Ecole, pour toutes leurs anecdotes, leurs connaissances infinies des abeilles et leur aide précieuse.*

Et pour finir, je remercie du fond du cœur ma famille, plus particulièrement mes parents sans qui tout cela aurait été impossible. Merci d'avoir eu confiance et d'avoir cru en moi tout au long de ces années. Merci pour toute l'aide que vous m'avez apporté. Vous êtes les meilleurs parents du monde et je suis fier d'être votre fils. Et un grand merci à mon frère et à sa petite famille, qui, bien qu'il travaille dans un domaine très diffèrent, m'a toujours soutenu et m'a supporté tout au long de ces années.

*Je voudrai terminer avec la personne la plus chère à mon cœur, ma « petite » femme, qui a toujours été là pour moi, qui m'a soutenu et m'a réconforté quelque soit l'épreuve que j'ai du traverser. Sans oublier, que tu as tout laissé derrière toi, tes amis, ta famille, ton travail, pour venir vivre avec moi. Je n'ai pas les mots pour te remercier de tout ce que tu fais pour nous au quotidien. Tout ce que je sais, c'est que sans toi, je n'en serai pas là. Merci d'être devenu ma femme, avec un soupçon d'aide de quelques entremetteuses (**Charlène** et **Cielu**, par exemple !) et ceux malgré tous nos problèmes de santé que l'on a du surmonter. Merci pour ton esprit combattif et de me supporter au quotidien. Pour tout cela et pour tout ce que tu feras pour nous, pour moi, je n'ai qu'une chose à te dire du plus profond de mon coeur : **« Je t'aime »**.*

Sommaire

Table des matières

Liste des abréviations 1
Liste des figures 4
Liste des tableaux 10
Introduction générale 12
Introduction Bibliographique 15
Chapitre I : *Legionella* 16
A) Historique 16
B) Taxonomie 16
C) Caractéristiques 17
1) Morphologie 17
2) Biochimie 18
3) Légionellose 19
D) Cycle de vie 21
Chapitre II : Interactions Amibes / Légionelles 23
A) Les amibes 23
1) Généralités 23
2) Ecologie 23
3) Morphologie 23
4) Pathogènicité 26
B) Interaction amibes/ légionelles 26
1) Amoeba Resistant Bacteria (ARB) 26
2) Legionella pneumophila et les amibes 28
a) Interaction 28
b) Cycle intracellulaire (Figure 8) 29
c) Légionelles post-amibes 31
Chapitre III : Les biofilms 33
A) Généralités 33
B) Formation d'un biofilm 35
C) Interaction légionelles/biofilm 36
1) Adhésion 37
2) Colonisation 38
3) Développement du biofilm 39
4) Maturation 39

5) Dispersion 41
Chapitre IV : Quorum Sensing 42
A) Généralités 42
1) Le principe 42
2) Les différents systèmes de Quorum Sensing 43
a) Quorum Sensing chez les bactéries à Gram négatif 44
Le système d'Auto-Inducteur-1 (AI-1) 44
Le système d'AutoInducteur-3 (AI-3) 48
b) Quorum Sensing chez les bactéries à Gram positif 50
Le système d'AutoInducteur Polypeptidique (AIP) 50
c) Le système ubiquitaire Auto-Inducteur-2 (AI-2) 51
3) Communication entre les différents domaines 54
B) Le Quorum Sensing chez *Legionella* 55
1) LqsA : la synthase de LAI-1 57
2) LqsS : le récepteur histidine kinase 57
3) LqsR : le régulateur transcriptionnel 58
4) La protèine HdeD 59
5) La modulation génique par le système lqs 59
6) LqsT : un nouveau récepteur de QS 62
Matériels et Méthodes 65
A) Souches et conditions de cultures 66
1) Souches et plasmides 66
a) Légionelles 66
b) Bactéries non-légionelles 67
c) Amibe 67
d) Cilié 67
2) Conditions de culture 68
a) Légionelles 68
b) Non-légionelles 68
c) Amibes 69
d) Ciliés 69
e) Légionelles Post-Culture (PC) 70
f) Légionelles Post-*Acanthamoeba* (PA) 70

g) Légionelles Intra-*Acanthamoeba* (IA) 71
h) Légionelles Post-*Tetrahymena* (PT) 72
i) Légionelles Post-Culture traitées avec du Surnageant Post-*Acanthamoeba* (PC+Sur-PA) 73
j) Légionelles Post-Culture traitées en contact avec du lysat d'*Acanthamoeba* (PC+Ac) 74
k) Vérification des cultures de légionelles 74
B) Biofilm 74
1) Dosage colorimétrique 75
a) Développement des biofilms 75
b) Dosage au Cristal Violet 75
c) Dosage au Bleu d'Alcian 76
2) Extraction des ExoPolySaccharides (EPS) 77
a) Développement des biofilms 77
b) Extraction des EPS 77
3) Cinétique de croissance et de multiplication 78
a) Dénombrement par culture 78
b) Dénombrement par fluorescence 79
C) Microscopie 79
1) Microscopie à épifluorescence 79
a) Fixation 79
b) Observation 79
2) Microscopie à illumination structurée 80
a) Formation du biofilm multi-espèces 80
b) Marquage 80
c) Observation et traitement des images 80
D) Techniques de biologie moléculaire 81
1) Extraction d'ADN 81
a) Extraction d'ADN génomique 81
b) Extraction d'ADN plasmidique 81
c) Gel d'ADN 81
2) Extraction d'ARN 81
a) Extraction des ARN totaux 81
b) Gel d'ARN 82

3) Transformation des bactéries 83
a) Préparation de bactéries électrocompétentes 83
b) Electroporation 83
4) Réaction de Polymérisation en Chaine (PCR) 83
5) Réaction de Polymérisation en Chaine quantitative (PCR-q) 84
E) Techniques de biochimie 84
1) Extraction à l'acétate d'éthyle 84
2) Extraction en Phase Solide 85
3) Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance (HPLC) 85
4) Chromatographie sur Couche Mince (CCM) 85
F) Protèomique 86
1) Extraction des protéines totales 86
G) Détection de Quorum Sensing : Test de production/ inhibition de la violacéine 86
1) En milieu solide 86
2) Test de volatilité 87
Résultats et Discussion 88
Partie I : Colonisation et développement de biofilms par les Légionelles 89
A) Colonisation de biofilms pré-établis par *Legionella pneumophila* 89
1) Conditions de développement des biofilms 89
B) Localisation des légionelles après implantation 90
C) Rôle du consortium 92
D) Orientation de l'implantation de *L. pneumophila* 93
E) Développement de biofilm par *L. pneumophila*. 94
1) Etat à la sortie des amibes 94
2) Développement de biofilms par les légionelles PA 95
F) Développement de biofilm par regroupement 98
G) Mise en évidence de chimiotactisme 100
Partie II : Mise en évidence des facteurs impliqués 102
A) Cinétique d'implantation et synthèse des exopolysaccharides de *L. pneumophila*. 102
1) Cinétique d'adhérence 102
B) Quantification des exopolysaccharides sécrétés 105
C) Analyse des exopolysaccharides 109
D) Induction du phénotype biofilm par la molécule de Quorum Sensing inter-espèce 112

1) Détection de polysaccharides 113
2) Induction du phénotype biofilm par une molécule produite par les légionelles PA 113
1) Estimation de la durée de production de la molécule inductrice des légionelles. 116
2) Une communication inter-espèce 117
3) Un système Quorum Sensing de type AHL 119
4) Un auto-inducteur diffèrent de LAI-1 123
5) Utilisation du mécanisme de Quorum Quenching pour mettre en évidence un phénomène d'attraction. 125
6) Isolement et étude de la molécule auto-inductrice produite par les légionelles... 128
a) Extraction de l'auto-inducteur 128
b) Test de volatilité 131
c) Isolement de Lvol 132
d) Purification de Lvol 135
E) Induction du phénotype biofilm par la molécule amibienne 135
1) Mise en évidence du rôle de l'amibe dans le déclenchement du phénotype biofilm 136
2) Isolement de la molécule amibienne 139
a) Extraction à l'acétate d'éthyle 139
b) Séparation en phase solide 140
c) Séparation par HPLC 141
F) Activation par nécrotrophie 141
Partie III : Etude transcriptomique et protèomique des légionelles issues des différentes conditions 143
A) Etude transcriptomique 143
B) Etude protèomique 145
Conclusion générale et Perspectives 146
Publication 151
Références bibliographiques 180

Liste des abréviations

Liste des abréviations :

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AHC : α-HydroxyCètones

AHL : N-AcylHomosèrine Lactones

AI-1 : AutoInducteur-1

AI-2 : AutoInducteur-2

AI-3 : AutoInducteur-3

AIP : AutoInducteur Polypeptidique

ARB : Amoeba Resistant Bacteria

BA : Bleu d'Alcian

BCYE : Buffered Charcoal Yeast Extract

BHI : Brain Heart Infusion

BYE : Buffered Yeast Extract

CAI-1 : *Vibrio cholerae* AutoInducteur-1

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CNRL : Centre National de Référence pour *Legionella*

CV : Cristal Violet

di-GMPc : GMP cyclique dimèrique

DPD : 4,5-Dihydroxy-2,36PentaDione

ECEH : *Escherischia coli* EntéroHémorragiques

ED : Voie de Entner-Doudoroff

EDTA : Acide Ehylène Diamine Tétraacétique

EPS : ExoPolySaccharides

FDC : Faible Densité Cellulaire

GVPC : Glycine, Vancomycine, Polymyxine b et de Cylcloheximide

HDC : Haute Densité Cellulaire

HPLC : Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance

Hsp : Heat shock protein

IA : Légionelles Intra-*Acanthamoeba*

IQS : Inhibiteur de Quorum Sensing

LAI-1 : *Legionella* AutoInducteur-1

LB : Lysogeny Broth

Lcl : *Legionella*-Collagen Like

LCV : *Legionella*-Containing Vacuole

LEE : Locus of Enterocyte Effacement

LMG : Library of Microbiology Universiteit Gent

LLAP : *Legionella*-Like Amoebal Pathogens

Lqs : *Legionella* Quorum Sensing

MDE : Laboratoire de Microbiologie De l'Eau

MOI : Multiple Of Infection

OdDHL : N-3-Oxo-dodecanoyl Homosèrine Lactone

OHHL : N-3-(Oxo-Hexanoyl)-HomosèrineLactone

PA : Légionelles Post-*Acanthamoeba*

PC : Légionelles Post-Culture

PC + Ac : Légionelles Post-Culture traitées avec du lysat d'*Acanthamoeba*

PC + S : Légionelles Post-Culture traitées avec du Surnageant Post-*Acanthamoeba*

PCB : Plate Count Broth

PCR : Réaction de Polymérisation en Chaine

PCR-q : Réaction de Polymérisation en Chaine quantitative

PT : Légionelles Post-*Tetrahymena*

PYG : Peptone Yeast extract Glucose

QQ : Quorum Quenching

QS : Quorum Sensing

RE : Reticulum Endoplasmique

R-THMF : (2*R*,4*S*)-2-méthyl-2,3,3,4-tétrahydroxytétrahydrofurane

SAM : S-AdenosylMéthionine

SRH : S-Ribosyl-L-Homocystèine

TS : thymidylate synthase

Liste des figures

Liste des figures :

Figure 1: Cliché de microscopie électronique de Legionella pneumophila d'après Norbert Bannert. 18

Figure 2: Evolution du nombre de cas et du taux annuel d'incidence des cas notifiés de légionellose en France, 1988-2012d'après l'INVS. 21

Figure 3: Schéma du cycle de vie de L. pneumophila avec les amibes. 22

Figure 4: Observation en microscopie électronique à balayage (A et C) et à transmission (B et D) des différentes formes d'Acanthamoeba spp. 24

Figure 5:Observation en microscopie électronique de trophozoites ayant formé en surface des Food-Cup. 25

Figure 6 : Observation en microscopie électronique d'un trophozoite d'Acanthamoeba. 25

Figure 7: Les amibes libres sont des réservoirs de bactéries intra-cellulaires, de véritables « Chevaux de Troie » pour la transmission des maladies et une pré-adaptation à l'infection de macrophages. 28

Figure 8: Schéma du cycle intra-cellulaire de L. pneumophila. 31

Figure 9: Cliché de microscopie électronique de biofilms issus A) de réseaux d'eau B) de climatiseurs C) sur microfibre ou D) pluri-espèces. 33

Figure 10: Cliché de microscopie électronique de biofilm formé par des micro-colonies de Staphylococcus aureus empaquetés dans une matrice exopolysaccharidique. 34

Figure 11: Cliché de microscopie électronique de nanowires de Shewanella oneidensis. 35

Figure 12: Le cycle de vie d'un biofilm en 5 étapes: 1) Adhésion des cellules ,2) Colonisation, 3) Développement, 4) Maturation et 5) Dispersion. 36

Figure 13: La Lcl est exprimée à la surface de la cellule de L. pneumophila et montre une distribution en agrégats. 38

Figure 14: Schéma représentant la structure de base des AHL où R correspond à la chaîne latérale variable. 44

Figure 15: Quorum Sensing AHL-dépendant chez V. fischeri. 45

Figure 16: Reconnaissance de la noradrénaline, l'adrénaline et AI-3 par l'histidine kinase QseC. 49

Figure 17: Principe du QS basé sur les AIP. 51

Figure 18: Schéma illustrant le quorum Sensing chez Vibrio harveyi. 52

Figure 19: Groupe de gènes de Quorum sensing lqs, bqs, cqs, molécules AHC et phéromones d'insectes similaire aux AHC. 56

Figure 20: Le récepteur LqsS de Legionella pneumophila. 58

Figure 21: Le système de régulation par les AHC chez Legionella pneumophila. 61

Figure 22: Le groupe de gènes lqs et le système de QS basé sur LAI-1. 63

Figure 23: Structure du Cristal Violet. 76

Figure 24: Structure du Bleu d'Alcian. 77

Figure 25: Reconstitution 3D de clichés de microscopie à illumination structurée à J7 de l'implantation de L. pneumophila Post-Culture (A), Post-Acanthamoeba (B) et Post-Tetrahymena (C) sur un biofilm pré-établi. 91

Figure 26: Reconstitution 3D de clichés de microscopie à illumination structurée à J7 de l'implantation de L. pneumophila Lens Post-Culture sur un biofilm mono-espèce composé de P. aeruginosa (A), E. brevis (B), A. hydrophila (C), E. coli (D). 93

Figure 27 : Coupe orthogonale de l'implantation à J7 de L. pneumophila Lens A) Post-Culture B) Post-Acanthamoeba dans un biofilm maitrisé de souches issues de réseaux d'eaux. 94

Figure 28: Observation en microscopie à épifluorescence de L. pneumophila Lens A) PC et B) PA. 95

Figure 29: Reconstitution 3D de l'observation en microscopie à illumination structurée de l'implantation à J7 de L. pneumophila Lens A) Post-Culture C) Post-Acanthamoeba sur une surface en verre. En C) est uniquement présenté le marquage des sucres des légionelles B) PC et D) PA. 96

Figure 30 : Reconstitution 3D de l'observation en microscopie à illumination structurée de l'implantation à J15 de L. pneumophila Lens PC sur une surface en verre. 97

Figure 31: Reconstitution 3D de l'observation en microscopie à illumination structurée du mélange à J7 de L. pneumophila Lens PA sur une surface en verre. 98

Figure 32: Reconstitution 3D de l'observation en microscopie à illumination structurée du mélange à J7 de L. pneumophila Lens PC sur une surface en verre. 99

Figure 33: Histogramme présentant les résultats de PCR quantitative effectuées sur l'ADN extrait de légionelles PA et PC à T0 et à T7 jours. 100

Figure 34: Reconstitution 3D de l'observation en microscopie à illumination structurée du mélange à J7 de L. pneumophila Lens PC (Vert) et PA (Rouge) sur une surface en verre (A). 101

Figure 35: Histogramme présentant les résultats de dénombrements sur la cinétique d'implantation effectués sur L. pneumophila PA et PC. 102

Figure 36: Courbe réalisée par mesure de la fluorescence émise à partir d'une gamme étalon de L. pneumophila exprimant la GFP. 104

Figure 37 : Histogramme de l'intensité normalisée de la coloration au cristal violet déterminée à partir de biofilms de L. pneumophila PC et PA après 24 heures d'incubation. 106

Figure 40: Composition en monosaccharides de la fraction colloïdale (A) et la fraction liée (B) de la matrice des biofilms formés par les légionelles PC, PA et PT. 111

Figure 41: Reconstitution en 3D de l'observation en imagerie à illumination structurée de L. pneumophila PC incubées avec A) du surnageant d'une suspension de L. pneumophila PA de 24 heures en eau minérale ou avec B) du surnageant d'infection d'amibes. 114

Figure 42: Intensités normalisées de coloration au bleu d'Alcian de biofilms de L. pneumophila PC, PA et PC traitées avec du surnageant de L. pneumophila PA (PC + Sur PA) ou avec du surnageant d'infection d'amibe (PC +S)..... 115

Figure 43: Reconstitution en 3D de l'observation en imagerie à illumination structurée de L. pneumophila Lens PC traitée avec du surnageant d'une suspension de L. pneumophila Lens PA après 15 jours (A) et 20 jours (B) d'incubation en eau minérale. 116

Figure 44 : Reconstitution en 3D de l'observation en imagerie à illumination structurée de L. pneumophila Lens PC avec du surnageant d'une suspension de L. pneumophila A) Bloodmington, B) Chicago, C) Corby, D) L. oakridgensis et E) L. longbeachae PA après incubation en eau minérale. 119

Figure 45 : Test d'induction (A) et d'inhibition (B) de production de la violacéine par C. violaceum CV026 traitée avec du surnageant de L. pneumophila PA en suspension dans de l'eau minérale depuis 24 heures. 122

Figure 46: Photographie d'un gel d'agarose après migration des amplifications PCR effectuées sur les gènes lqsA, lqsR, lqsS et lqsT de L. pneumophila et L. longbeachae. 124

Figure 47: Reconstitution en 3D de l'observation en imagerie à illumination structurée de L. pneumophila PC (A) et L. pneumophila Lens PC mise en contact avec du surnageant de L. pneumophila PA traité(C) ou non (B) avec de la baicalin hydrate. 126

Figure 48: Reconstitution en 3D de l'observation en imagerie à illumination structurée de L. pneumophila Lens PA traitées (B) ou non (A) avec de la baicalin hydrate. 127

Figure 49: Intensités normalisées de coloration au bleu d'Alcian de biofilms de L. pneumophila PC traitée avec les différentes fractions d'extraction en phase solide et les différents contrôles. 129

Figure 50: Intensités normalisées de coloration au bleu d'Alcian de biofilms de L. pneumophila PC traitées avec l'extrait acétate d'éthyle. 130

Figure 51: Photographies du test de volatilité par inhibition de production de la violacéine par CV026 par ajout de surnageant de L. pneumophila PA (A), solvant dilué (contrôle négatif) (B) et de surnageant de L. pneumophila PA concentré 50 fois (C). 131

Figure 52: Photographies du test d'inhibition de production de violacéine par C. violaceum CV026 sur plaque de CCM après migration de l'extrait acétate d'éthyle du surnageant de légionelles PA. 133

Figure 53: Intensités normalisées de coloration au bleu d'Alcian de biofilms de L. pneumophila PC traitées par les différentes fractions récupérées de la CCM. 134

Figure 54:Reconstitution 3D de l'observation en microscopie à illumination structurée à J7 de L. pneumophila Lens PC traitée avec du tampon amibe (A), du surnageant d'amibe (B) ou avec du broyat d'amibe (C). 136

Figure 55: Reconstitution 3D de l'observation en microscopie à illumination structurée à J7 de L. pneumophila Lens PC traitée avec du lysat d'amibe clarifié (A), clarifié et filtré (B), clarifié et chauffé 20 min à 60°C (C), 80°C (D) ou 120°C (E). 138

Figure 56: Intensités normalisées de coloration au bleu d'Alcian de biofilms de L. pneumophila PC traitées avec les phases de l'extraction au solvant organique du broyat d'amibes. 139

Figure 57: Intensités normalisées de coloration au bleu d'Alcian de biofilms de L. pneumophila PC traitées avec les fractions obtenues par extraction en phase solide resolubilisées dans de l'eau minérale 140

Figure 58 : Reconstitution 3D de l'observation en microscopie à illumination structurée à J7 de L. pneumophila Lens PC traitée avec la fraction 0 % (A). 141

Figure 59: Reconstitution 3D de l'observation en microscopie à illumination structurée à J7 de L. pneumophila Lens Post-Culture mise en culture avec du broyat d'E. coli (A) ou avec du broyat de S. cerevisiae (B). 142

Figure 60: Photographie d'un gel d'agarose sous UV après migration des ARN extraits de L. pneumophila PC, PA, IA, PC + Surnageant de PA, PC +broyat d'amibes 144

Liste des tableaux

Liste des tableaux :

Tableau 1: Liste des souches et des espèces de légionelles utilisées. 66

Tableau 2: Liste des bactéries non-légionelles utilisées..... 67

Tableau 3 : Listes des amorces définies pour ces travaux..... 84

Tableau 4 : Absorbance à 595 nm après coloration par le bleu d'Alcian de l'eau minérale blanc, du surnageant de culture de légionelles PA et PC. 113

Tableau 5 : Structures et activités relatives des homosérines lactones acylées et homocystèines thiolactones acylées sur la production de violacéine par C. violaceum CV026 en milieu gélosé. 121

Introduction générale

Deux des axes majeurs d'étude du MDE, laboratoire de Microbiologie De l'Eau, sont l'étude de l'interaction entre l'hôte amibien et son parasite bactérien, *Legionella pneumophila*, mais également l'étude des biofilms de *L. pneumophila*. Les légionelles, bactéries d'origine hydro-tellurique, se retrouvent essentiellement dans des milieux aquatiques naturels (lacs, rivières,…). Lorsque les conditions sont réunies, elles colonisent les réseaux d'eaux artificiels comme les systèmes d'eaux sanitaires, les tours aéro-réfrigérantes, etc. C'est à partir de ces systèmes qu'elles ont la possibilité de contaminer des personnes via l'inhalation de microgouttelettes d'eau contaminée. Les légionelles constituent l'agent d'une pneumopathie sévère, pouvant entraîner la mort, connue sous le nom de Légionellose. L'élimination de ces bactéries dans les réseaux d'eaux par des traitements classiques est peu efficace, car elles ont la capacité de coloniser les biofilms pré-établis dans ces réseaux.

A l'heure actuelle, les biofilms deviennent un problème sociétal, le nombre annuel de publications portant sur ces communautés de microorganismes est passé de 300 à 1200 entre 2000 et 2006. Si les biofilms font autant parler d'eux, c'est à la fois pour les dégradations qu'ils entrainent par bio-corrosion que pour les risques sanitaires qu'ils représentent. En effet, les biofilms constituent un réservoir de pathogènes non négligeable. Les biofilms forment un biotope à part en perpétuelle évolution. Ces structures présentent une grande plasticité conférant ainsi à ses occupants une résistance accrue rendant les moyens de lutte antimicrobienne classiquement utilisés peu efficaces. Les biofilms résultent de la collaboration de consortium coordonnés au moyen d'un système de communication appelé Quorum Sensing, mais également un lieu permettant un transfert horizontal de matériel génétique.

Les légionelles, bactéries intracellulaires facultatives, sont également retrouvées au sein des amibes contaminant les réseaux d'eaux. Ces protozoaires sont infectés par les légionelles lorsqu'ils « broutent » les biofilms. Une fois phagocytées, les légionelles détournent la machinerie cellulaire amibienne afin de se multiplier. Ce mode de réplication semble être la principale voie de multiplication des légionelles dans l'environnement. Les amibes constituent ainsi un réservoir potentiel d'infection et offrent également aux légionelles un abri contre les différents traitements mis en œuvre dans les réseaux d'eaux. Bien que les mécanismes d'infection et de réplication de *Legionella* au sein des amibes commencent à être connus, l'implantation et le développement de biofilms par les légionelles restent peu étudiés, alors que ces deux biotopes semblent étroitement liés.

Au regard de l'ensemble de ces données, il nous est apparu intéressant d'étudier l'implantation et le développement de légionelles dans les biofilms, notamment après leur passage dans les amibes, pour cela deux axes de recherches ont été développés dans ce travail :

- Le premier concerne l'étude de l'implantation de légionelles issues de culture classique, d'amibes ou de protozoaires ciliés au sein d'un biofilm constitué d'un consortium type « réseaux d'eaux sanitaires », ainsi que le développement de ces mêmes légionelles seules en biofilm.

- Le second axe porte sur la recherche et l'étude de facteurs favorisant la mise en place de ces mécanismes de développement de biofilms.

Dans une perspective à moyen terme, une étude comparative transcriptomique et protèomique des légionelles issues des différentes conditions a été initiée.

Introduction Bibliographique

Chapitre I : *Legionella*

A) Historique

La découverte du genre *Legionella* est due à un évènement tragique. En juillet 1976, à Philadelphie se déroule le 56ème congrès annuel des légionnaires à l'hôtel Bellevue-Straford au cours duquel 182 vétérans contractent une pneumonie. Parmi ces 182 délégués, 29 meurent des suites de cette pneumonie sévère. Après avoir écarté la possibilité d'une intoxication alimentaire, il a été conclu que le germe responsable de cette maladie a été transmis par les systèmes de climatisation de l'hôtel (Fraser et al., 1977). Cette maladie est appelée Légionellose en hommage aux vétérans décédés. Cette bactérie avait déjà causé des cas semblables 2 ans auparavant dans le même hôtel, mais les symptômes des 11 clients atteints sont passés inaperçus (New York Times).

Il faudra attendre un an, pour que J. McDade et C. Shepard isolent le pathogène responsable de cette maladie grâce à l'utilisation d'un protocole de recherche des *Rickettsia* faisant intervenir un hôte animal (le cobaye) (McDade et al., 1977). La bactérie responsable de la Légionellose fut alors nommée *Legionella pneumophila*.

En réalité, ce germe avait été isolé pour la première fois en 1943 par Tatlock puis par Jackson en 1947 mais était alors considéré comme faisant partie des bactéries de type *Rickettsia* (agent responsable du typhus) (Fields et al., 2002).

B) Taxonomie

Le genre *Legionella* est le seul membre de la famille des *Legionellaceae*. Cette famille appartient à l'ordre des *Legionellales* contenu dans la subdivision II des *Gamma Proteobacteria* (Fraser et al., 1977; Benson and Fields, 1998; Diederen, 2008).

Phylogénétiquement, l'espèce la plus proche des *Legionellaceae* est *Coxiella burnettii*, l'agent responsable de la fièvre Q (Adeleke et al., 1996; Swanson and Hammer, 2000).

Le nombre d'espèces découvertes de *Legionella* ne cesse de croitre. A l'heure actuelle, il existe 58 espèces comprenant au moins 70 sérogroupes (Fields et al., 2002; Campocasso et al., 2012; Pearce et al., 2012; Yang et al., 2012).

Il existe 15 sérogroupes de *Legionella pneumophila* et 2 pour *L. bozemanii*, *L. longbeachae*, *L. feeleii*, *L. hackeliae*, *L. sainthelensi*, *L spiritensis*, *L. erythra*, et *L. quinlivanii* (Benson and Fields, 1998; Helbig et al., 2007).

Quelques espèces sont incapables de croitre en milieu de culture spécifique pour légionelles. Elles ont été isolées et conservées par coculture de la bactérie chez leurs hôtes, des amibes. Ces bactéries sont nommées *Legionella*-Like Amoebal Pathogens (LLAP) (Adeleke et al., 1996).

Actuellement, on dénombre 7 souches de LLAPs (Adeleke et al., 2001). La souche LLAP 3, *L. lytica*, a été isolée à partir des expectorations d'un patient atteint de pneumonie, après enrichissement en amibes et est considérée comme pathogène pour l'Homme (Rowbotham, 1983, 1998). D'autres souches LLAPs sont sans doute pathogènes, mais le confirmer reste difficile car elles ne peuvent pas être détectées pas les techniques conventionnelles appliquées aux légionelles.

C) Caractéristiques

1) Morphologie

Les légionelles sont des bacilles à Gram négatif, non sporulés et non capsulés. Leur taille varie de 0,3 à 0,5 µm de large par 1 à 3 µm de long (Rodgers et al., 1980). Une forme filamenteuse peut être observée, qui peut mesurer de 10 à 20 µm (figure 1A). On peut également observer des pili en surface (Rodgers et al., 1980).

Ces bactéries sont mobiles (sauf *L. oakridgensis*) grâce à un ou une paire de flagelles disposés en position polaire ou dans certains cas en position latérale (Benson and Fields, 1998). Le flagelle mesure jusqu'à 8 µm de long et 14 à 20 nm d'épaisseur (Figure 1B) (Rodgers et al., 1980).

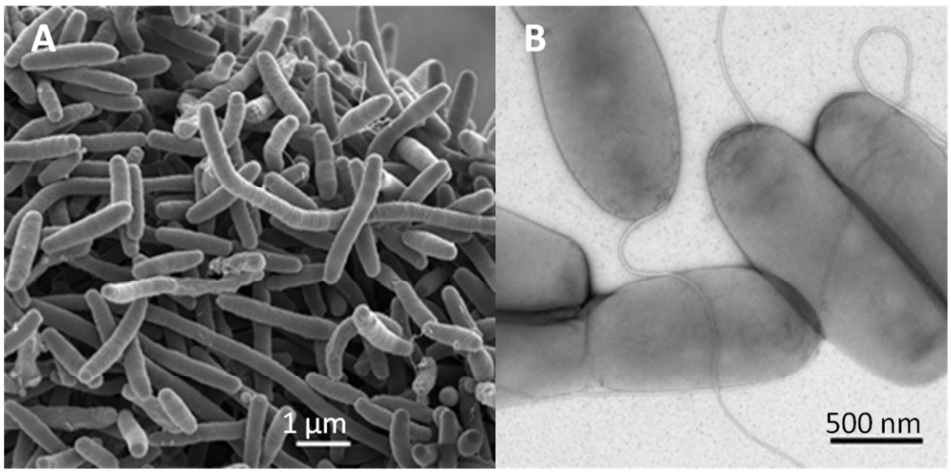


***Figure 1**: Cliché de microscopie électronique de* **Legionella pneumophila** *d'après Norbert Bannert.*
A) Cliché de légionelles issues de culture liquide, B) présence en position polaire d'un flagelle.

2) Biochimie

Les données biochimiques concernant les légionelles, hors *L. pneumophila*, sont limitées. Ces bactéries sont aérobies strictes, catalase positive. La plupart des espèces produisent une beta-lactamase et hydrolysent la gélatine (Cianciotto, 2001). Elles sont urèases négatives, nitrates réductase négatives, variables pour le test oxydase suivant les espèces et aucun cas d'auto fluorescence n'a été rencontré. L'enveloppe des légionelles est une exception au sein des Gram négatifs car très hydrophobe, riche en acides gras ramifiés et en ubiquinones (Moss et al., 1977; Moss and Dees, 1979a, b). *L. pneumophila* utilise les acides aminés comme source de carbone et d'énergie alors qu'elle ne fermente pas et n'oxyde pas les glucides (Garrity et al., 1982). La formulation d'un milieu chimiquement défini a permis de mettre en avant une auxotrophie pour la thréonine, la cystéine et la sérine (Pine et al., 1979; Warren and Miller, 1979; George et al., 1980).

Dans le même temps, il a été démontré que le glutamate constitue sa principale source d'énergie (Weiss and Westfall, 1984) alors que le glucose n'a pas d'impact sur la croissance de la bactérie (Pine et al., 1979; Warren and Miller, 1979). Quelques études démontrent que le glucose est métabolisé par la voie Entner-Doudoroff (ED) ou/et la voie des pentoses phosphates (Tesh and Miller, 1983; Tesh et al., 1983; Weiss and Westfall, 1984). Les gènes impliqués dans la voie ED sont surexprimés chez les bactéries en co-culture avec des amibes (Bruggemann et al., 2006a; Bruggemann et al., 2006b). L'équipe de Harada, en 2010, a démontré que le glucose est métabolisé principalement par la voie ED et que les gènes des

enzymes de cette voie sont impliqués dans la multiplication intracellulaire (Harada et al., 2010).

Les légionelles sont cultivées en milieu liquide BYE : Buffered Yeast Extractcomposé d'extrait de levure et tamponné avec de l'ACES, soit en milieu gélosé BCYE : Buffered Charcoal Yeast Extract auquel est ajouté du charbon actif pour éliminer les toxines formées au cours de la stérilisation. Ces milieux sont complémentés avec de la cystéine sauf pour *L. oakridgensis* et *L. spiritensis* (Fields et al., 1993). Afin de stimuler la croissance, l'ACES peut être remplacé par de l'alpha-cétoglutarate (Edelstein, 1981). Le milieu GVPC, constitué de BCYE et additionné de glycine, vancomycine, polymyxine B et de cycloheximide, est utilisé pour l'isolement et la culture des *Legionella* dans les eaux et autres prélèvements susceptibles de la contenir (Dennis et al., 1984).

Les légionelles sont isolées dans des environnements dont la température est comprise entre 5 et 63°C et un pH compris entre 5,0 et 9,2 (Fliermans et al., 1981; Ohno et al., 2003). En utilisant des techniques de détection basées sur la PCR, Sheehan et son équipe, en 2005, ont détecté la présence de légionelles dans un environnement extrêmement acide (pH 2,7) (Sheehan et al., 2005). Les conditions optimales de croissance sont une température de 35°C à pH 6,9 avec un apport de 2,5% de CO_2 (Feeley et al., 1979; Fields et al., 2002; Diederen, 2008).

3) Légionellose

Legionella est l'agent étiologique de la Légionellose qui peut se manifester sous deux formes. La première est une pneumonie sévère appelée la maladie du légionnaire, qui peut entrainer une issue fatale dans 20% des cas (Diederen, 2008). L'infection est contractée par inhalation de « particules infectieuses », constituées de microgouttelettes d'eau contenant des légionelles seules ou/et contenues dans des vésicules amibiennes de taille inférieure à 8 µm (Berk et al., 1998). La Légionellose est une maladie émergente du 20ème siècle. Dans la nature, les cas d'infection par les légionelles sont extrêmement rares. L'émergence de cette maladie est essentiellement due à la modernisation via l'utilisation massive des systèmes de climatisation et à un vieillissement des systèmes de distribution de l'eau (Katz and Hammel, 1987; McIntyre et al., 1991). Les tours aéro-réfrigérantes, les douches, les climatiseurs et les spas constituent les principales sources d'infections chez l'Homme (Breiman et al., 1990). Les réseaux d'eaux domestiques constituent la principale source de l'infection humaine,

information confortée par l'absence de contamination inter-humaine (Abu Kwaik et al., 1998; Ferhat et al., 2009)

La durée d'incubation varie de deux à dix jours. Dans un premier temps les symptômes sont similaires à ceux de la grippe : fièvre élevée, toux sèche, fatigue, douleurs musculaires, maux de têtes et troubles digestifs puis la maladie peut évoluer jusqu'à une insuffisance respiratoire (Tsai et al., 1979). Le diagnostic peut être réalisé par la recherche d'antigènes retrouvés dans environ 90% des cas d'infection par *L. pneumophila*, plus particulièrement du sérogroupe 1, responsable de 84% des cas dans le monde (Marston et al., 1997; Muder and Yu, 2002; Yu, 2002; Yu et al., 2002). L'exception est l'Australie, où *L. longbeachae* est l'agent prédominant de l'infection (Asare and Abu Kwaik, 2007; Cazalet et al., 2010).

La seconde pathologie, la fièvre de Pontiac, est une forme bénigne qui induit également les premiers symptômes grippaux mais guérit spontanément au bout de 5 jours. Généralement, cette forme de maladie passe inaperçue (Glick et al., 1978).

En France, les cas de Légionellose sont soumis à une déclaration obligatoire par les médecins depuis 1987. Le nombre de cas de Légionellose a augmenté en France jusqu'en 2005 et est resté stable depuis (Figure 2), et le taux d'incidence de la légionellose est l'un des plus élevés d'Europe (2 cas pour 100 000 habitants). Les hommes sont généralement plus susceptibles de contracter la maladie (sex ratio homme/femme de 2,9). Les facteurs aggravants sont le tabagisme, le diabète et l'immunodépression (Institut de Veille Sanitaire).

La cible infectieuse privilégiée des légionelles est l'épithélium pulmonaire, les alvéoles ainsi que les macrophages qui y sont associés (Gao and Abu Kwaik, 1999a, b; Gao et al., 1999; Alli et al., 2000). Au sein des macrophages, *L. pneumophila* phagocytée se multiplie en détournant la machinerie cellulaire de son hôte à son profit.

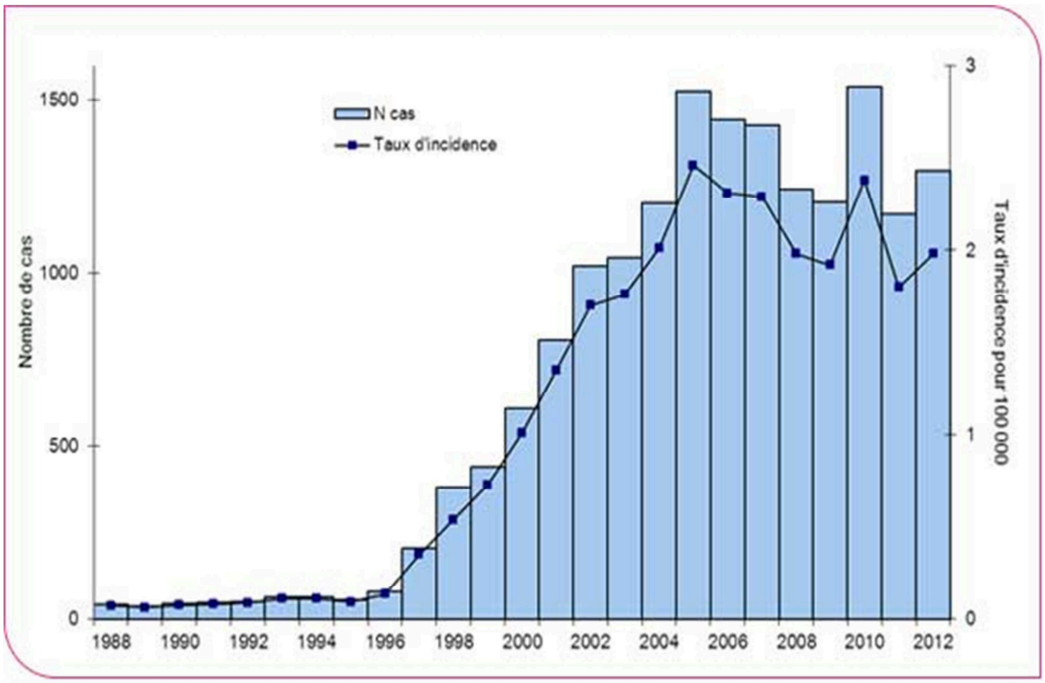


Figure 2: ***Evolution du nombre de cas et du taux annuel d'incidence des cas notifiés de légionellose en France, 1988-2012d'après l'INVS.***

D) Cycle de vie

L'eau est le principal réservoir de *Legionellae*, ubiquitaire dans les systèmes aquatiques naturels (rivières, lacs, eaux stagnantes) (Fliermans et al., 1981). Les légionelles sont détectées dans 40% des environnements aquatiques par culture et dans plus de 80% des cas par PCR. La seule exception, *L. longbeachae*, est fréquemment isolée d'échantillons de sol (Ruehlemann and Crawford, 1996). Le transfert des milieux aqueux naturels aux réseaux anthropiques est favorisé quand la température de l'eau est supérieure à celle de l'air ambiant par le biais de la colonisation de biofilms pré-éxistants (Rogers et al., 1994b, a). Dans ces environnements, les légionelles sont soumises à la prédation des protozoaires qui se nourrissent en broutant les biofilms. Ces bactéries pathogènes ont un mode de vie parasitaire, et elles infectent plusieurs espèces d'amibes libres et de protozoaires ciliés colonisant les milieux hydriques et artificiels. Cette réplication intracellulaire semble être le principal mode de multiplication des légionelles (Declerck et al., 2005; Declerck et al., 2007a, b) (Figure 3). Les protozoaires fournissent une protection physique et chimique aux légionelles et jouent ainsi un rôle majeur dans la transmission de la maladie (Abu Kwaik et al., 1998).

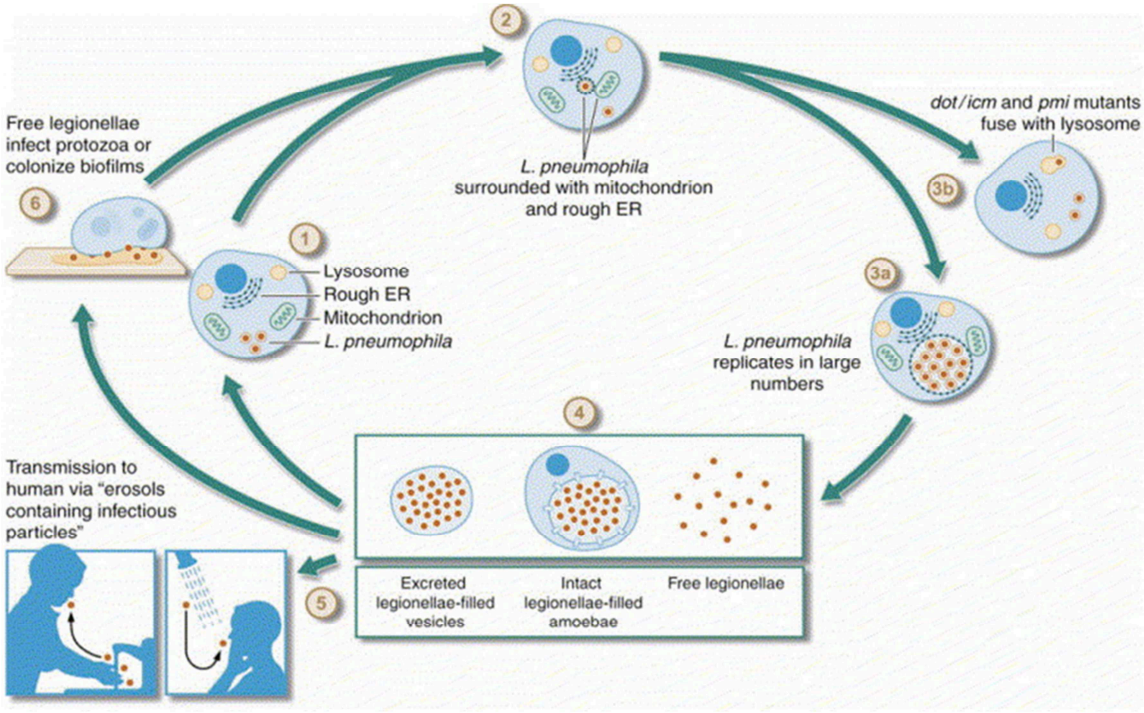


***Figure 3:* Schéma du cycle de vie de L. pneumophila avec les amibes.**
1) L. pneumophila *provenant de biofilms ou en suspension, infecte les amibes. 2) Après internalisation,* L. pneumophila *réside dans une vacuole et recrute des organites cellulaires de l'hôte, tels que les mitochondries et le RER et inhibe la fusion avec les lysosomes. 3b) Les mutants Dot/Icm ne peuvent inhiber cette fusion. 3a)* L. pneumophila *se réplique dans les vacuoles en très grand nombre. 4) La particule infectieuse n'est pas connue, mais peut inclure des vésicules remplies de légionelles, des amibes vivantes remplies de légionelles, ou des légionelles libres. 5) L'infection se contracte via l'inhalation de microgouttelettes d'eaux contaminées. 6) Les légionelles s'échappent de leurs hôtes et peuvent survivre en suspension pendant de longues périodes, parasiter des amibes ou coloniser des biofilms. D'après Molmeret et al, 2005.*

Chapitre II : Interactions Amibes / Légionelles

A) Les amibes

1) Généralités

Les amibes sont des organismes eucaryotes unicellulaires appartenant au groupe des protozoaires. Elles sont mobiles et se nourrissent par phagocytose d'autres micro-organismes. Les amibes parasitaires, à la différence des amibes libres, nécessitent pour leur survie la présence d'un hôte (Schuster and Visvesvara, 2004a, b). Les amibes libres sont classées dans l'embranchement des *Amoebozoa* des protozoaires (Greub and Raoult, 2004). Il existe plus de 11 000 espèces d'amibes, parmi elles, seules quelques unes sont pathogènes pour l'Homme.

2) Ecologie

Les amibes libres sont ubiquitaires, elles sont retrouvées dans l'air, les sols, les eaux naturelles et les systèmes anthropiques (Rohr et al., 1998; Horn et al., 2000; Greub et al., 2004; Greub and Raoult, 2004). Ces protozoaires sont impliqués dans la régulation des populations microbiennes, jouant ainsi le rôle de prédateur dans les écosystèmes qu'ils colonisent (Weekers et al., 1993; Hoffmann and Michel, 2001). Les amibes sont mobiles, privilégiant les déplacements sur les surfaces. Les biofilms, composés d'organismes sessiles, représentent donc pour elles une cible de choix (Huws et al., 2005; Pickup et al., 2007). L'équipe de Huws a démontré qu'*Acanthamoeba. Castellanii* est capable de digérer 90 bactéries sessiles/amibe/heure (Huws et al., 2005).

3) Morphologie

Les amibes libres ont une taille variable de quelques dizaines de micromètres à plus d'une centaine. Ces micro-organismes présentent deux stades de développement : le trophozoïte, la forme végétative, et le kyste, la forme de résistance (Figure 4). Quelques amibes, comme *Naegleria* spp se rencontrent également sous une forme flagellée. D'autres comme *Mayorella* et *Amoeba*, sont des espèces qui ne forment pas de kystes (Page, 1976).

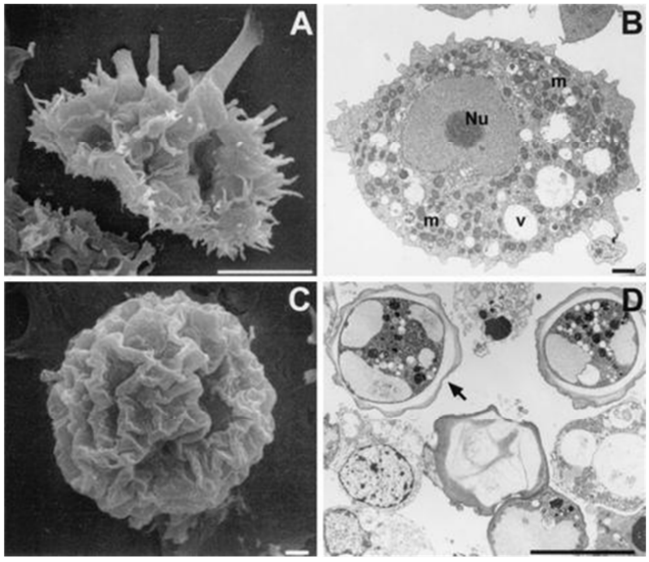


Figure 4: ***Observation en microscopie électronique à balayage (A et C) et à transmission (B et D) des différentes formes d'*****Acanthamoeba spp.**
*(A) Trophozoite d'*A. polyphaga *(B) Trophozoite d'*A. castellanii *montrant le noyau central (Nu), les mitochondries (m) et les vacuoles cytoplasmiques (v); (C) forme kystique d'*A. polyphaga*; (D) kyste à double paroi d'*A. castellanii*. Barres d'échelles, 10 µm (A et D) et1 µm (B et C). D'après Marciano-Gabral et Gabral, 2003.*

Le trophozoïte est la forme métaboliquement active et se multiplie par division binaire. L'un des genres les plus étudiés, *Acanthamoeba*, présente une taille variable entre 25 et 40 µm. La capture de nourriture se fait par émission de pseudopodes et par phagocytose ou par formation de « food-cup » (Figure 5) et ingestion de particules organiques. Les « Food-cup » sont des structures temporaires formées à la surface des amibes permettant l'ingestion de bactéries, levures ou autres cellules (Pettit et al., 1996). En général, les amibes sont mononuclées, mais maintenues en culture classique, il est commun d'observer des cellules multinucléées.

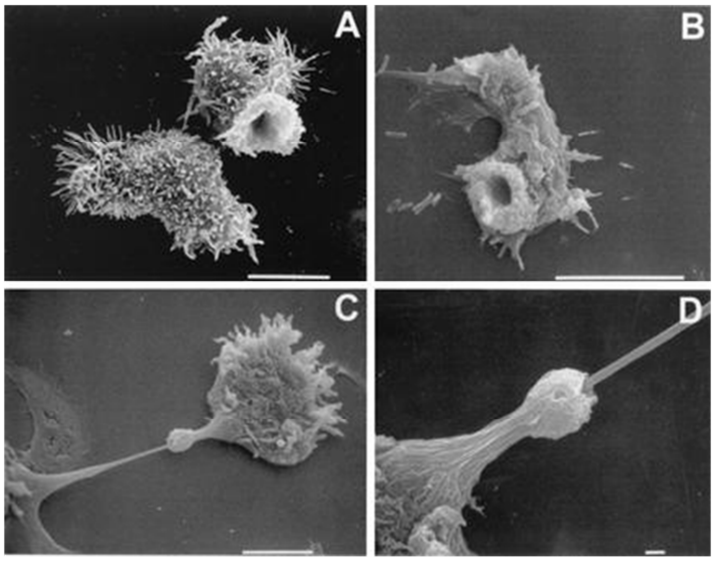


***Figure 5:*Observation en microscopie électronique de trophozoites ayant formé en surface des Food-Cup.**
*(A)Food cup à la surface d'*A. culbertsoni. *(B) Food cup à la surface d'*A. astronyxis *utilisé pour ingérer une bactérie. (C) Food cup à la surface d'*A. castellanii *en train d'ingérer une cellule nerveuse de culture. (D) Zoom sur le cliché C afin de visualiser en détail la structure du Food-Cup. Barres d'échelles 10 µm (A à C), et 1 µm (D). D'après Marciano-Gabral et Gabral, 2003.*

Le déplacement passe par la formation de pseudopodes hyalins et permet un mouvement lent (Preston and King, 1984). *A. castellanii* a été très utilisé pour étudier les mécanismes moléculaires de polymérisation de l'actine (Kaiser and Pollard, 1996; Ostap and Pollard, 1996; Kong and Pollard, 2002).Chez les *Acanthamoeba*, on peut également observer à la surface du trophozoïte des structures épineuses appelées acanthopodes (Figure 6).

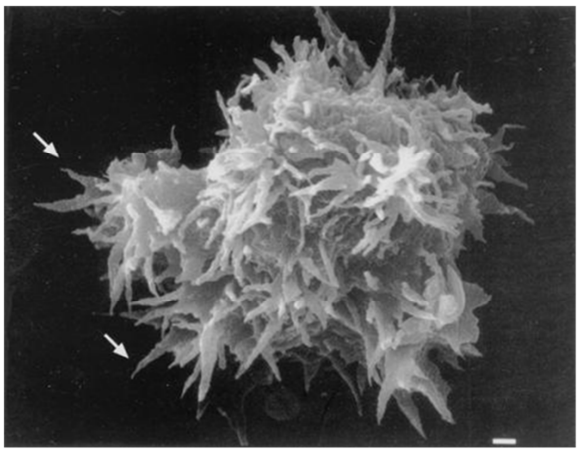


***Figure 6 :* Observation en microscopie électronique d'un trophozoite d'Acanthamoeba.**
Les structures épineuses visibles en surface sont appelés acanthopodes (flèches). Barre d'échelle, 1 µm. D'après Marciano-Gabral et Gabral 2003.

Les kystes ont généralement deux parois, l'ectocyste et l'endocyste mesurant entre 13 et 20 µm. Une troisième paroi, le mésocyste, est présente chez quelques espèces. Les kystes

sont résistants aux biocides, au chlore et aux antibiotiques et sont capables de survivre à des températures basses (0-2°C) (Sanden et al., 1992; Rohr et al., 1998). Des conditions environnementales défavorables, une absence de source nutritive, sont des facteurs favorisant le passage à la forme kystique, permettant ainsi aux amibes de survivre jusqu'à plusieurs années (24 ans pour *Acanthamoeba*) en état de dormance (Mazur and Hadas, 1994).

4) Pathogènicité

Les amibes libres sont responsables d'un petit nombre d'infections chez l'Homme, notamment au niveau du système nerveux central. Ces pathologies sont difficiles à diagnostiquer et lourdes, considérant le développement rapide de l'infection, la multi-résistance des amibes aux agents antimicrobiens et leur capacité de s'enkyster (Thomas et al., 2010). Ces maladies touchent particulièrement les personnes immunodéprimées et fragiles, quelques cas ont été recensés chez des personnes saines (Visvesvara et al., 2007). Plusieurs espèces d'amibes sont pathogènes, responsables de méningo-encéphalites amibiennes primitives, de kératites amibiennes et d'encéphalites granulomateuses amibiennes (Schuster and Visvesvara, 2004a, b, c; Visvesvara et al., 2007).

Le principal mode de contamination est le contact avec de l'eau contaminée (Centeno *et al.*, 1996; Hoffmann and Michel, 2001; Scat et al., 1995; Visvesvara et al, 2007), notamment lors du nettoyage de lentilles de contact avec de l'eau du robinet contaminée.

B) Interaction amibes/ légionelles

1) Amoeba Resistant Bacteria (ARB)

Les amibes en phagocytant les bactéries, les champignons et les algues participent au maintien et à la régulation des populations microbiennes. Sous cette pression de sélection, quelques micro-organismes ont développé des mécanismes de résistance.

Une stratégie adoptée consiste à éviter ou à devenir résistant à la prédation. Les amibes, peuvent phagocyter uniquement des petites proies. Les bactéries, en adoptant un morphotype différent, plus indigeste, comme une forme filamenteuse ou des microcolonies, ne peuvent pas être phagocytées par les protozoaires (Gonzalez et al., 1990; Simek and

Chrzanowski, 1992). Les bactéries peuvent également modifier la composition biochimique de leur cellule, les paramètres de surface ou produire des métabolites secondaires toxiques pour l'amibe une fois internalisés. L'un des plus étudiés, est la violacéine produite par *Chromobacterium* et *Janthinobacterium*. Une fois les bactéries internalisées, la violacéine va induire la lyse de l'amibe après 60 à 120 min (Matz et al., 2004). Les bactéries qui ont une mobilité élevée (> 45 µm/s) ont la capacité de fuir et d'échapper à la prédation des amibes (Matz and Jurgens, 2005), ce qui augmente leur survie par 4 contrairement à des cellules fixées ou peu mobiles (< 25 µm/s).

Une autre stratégie consiste à résister à la phagocytose, c'est-à-dire que les micro-organismes sont non internalisés ou qu'ils sont capables de survivre, de se répliquer et de sortir des amibes après internalisation. Ces organismes sont nommés ARB (Amoeba Resistant Bacteria) et correspondent à des virus, des bactéries et des champignons (Greub and Raoult, 2004). Certains sont des intracellulaires obligatoires comme *Coxiella burnetii* ou facultatifs comme *Listeria monocytogenes* et beaucoup d'entre eux sont pathogènes pour l'Homme (Horn et al., 2000; Greub and Raoult, 2004; Molmeret et al., 2005).

Les amibes constituent alors de véritables « Chevaux de Troie », assurant la protection chimique et physique des pathogènes face aux contraintes de l'environnement et aux moyens de luttes classiques. Les amibes participent ainsi, à la propagation de pathogènes au sein des réseaux d'eaux et des systèmes de climatisation (Figure 7) (Brown and Barker, 1999; Molmeret et al., 2005). Les ARB se répliquent au sein de l'amibe puis lysent la cellule amibienne, se retrouvant ainsi disséminés dans l'environnement (Greub and Raoult, 2004). L'un des exemples les plus étudiés jusqu'à présent, est le cas de *L. pneumophila*.

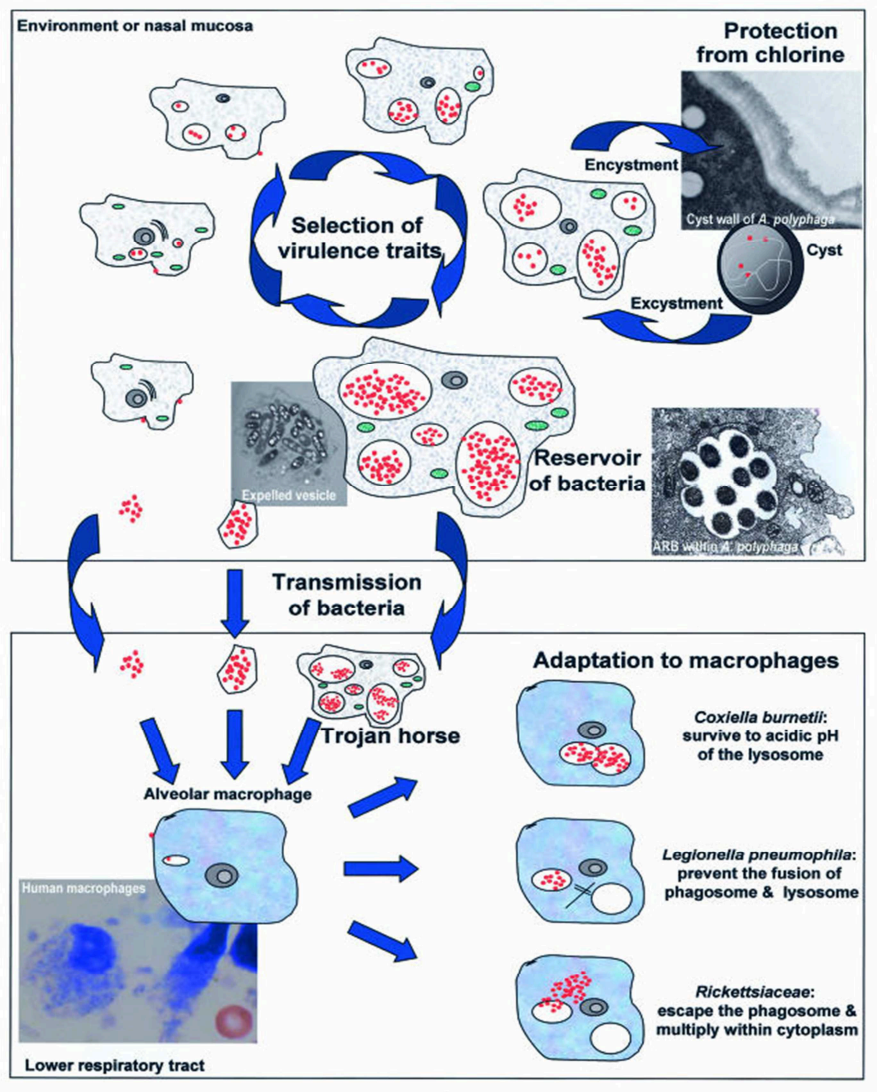


Figure 7: ***Les amibes libres sont des réservoirs de bactéries intra-cellulaires, de véritables « Chevaux de Troie » pour la transmission des maladies et une pré-adaptation à l'infection de macrophages.***
Les bactéries sont représentées en rouge, les amibes en gris et leurs mitochondries en vert. En haut, le cycle des ARB au sein de l'amibe et au sein de l'environnement nasal. En bas, les ARB dans le tractus respiratoire, durant le cycle intra-amibien, les amibes permettent une sélection des traits de virulence. De plus, les vacuoles représentent un important réservoir de bactéries qui peuvent être libérées sous une forme libre, à l'intérieure de vésicules ou persistantes au sein de l'amibe. La capacité d'infection des macrophages a sans doute été acquise lors de la co-évolution avec les protozoaires ou avec des eucaryotes primitifs. D'après Greub et Raoult, 2004.

2) Legionella pneumophila *et les amibes*

a) Interaction

Rowbotham fut le premier à décrire la capacité de *L. pneumophila* à se répliquer chez les amibes (Rowbotham, 1980, 1983) et à suggérer que les amibes libres pouvaient être un réservoir pour les légionelles. Quatorze espèces d'amibes, notamment *Hartmanella* et

Acanthamoeba, les deux genres les plus retrouvés dans l'eau de réseaux, et deux espèces de protozoaires ciliés peuvent être parasités par des légionelles (Molmeret et al., 2005). Cette prolifération est facilitée par une température supérieure à 37°C, ce qui augmente les chances de dissémination de la Légionellose (Fields et al., 2002; Ohno et al., 2008). Lors de conditions défavorables, les amibes libres s'enkystent, les légionelles intracellulaires sont capables de survivre dans cette forme de résistance (Kilvington and Price, 1990; Ohno et al., 2008). Les amibes enkystées sont très résistantes et contribuent donc à la résistance de *L. pneumophila* aux agents chimiques et physiques (Abu Kwaik et al., 1998). Des légionelles et des amibes ont été isolées de la même source d'infection durant des épidémies de Légionellose (Fields et al., 1990). La relation entre les légionelles et les amibes joue donc un rôle crucial dans l'écologie et la pathogènicité de la bactérie.

b) Cycle intracellulaire (Figure 8)

L. pneumophila est généralement internalisée par les amibes par phagocytose mais d'autres systèmes sont possibles, tous faisant intervenir des récepteurs spécifiques Gal/Gal-NAC (Venkataraman et al., 1997; Venkataraman et al., 1998). Après internalisation, la multiplication est possible uniquement au sein de la forme active, trophozoïte, dans un corps appelé « *Legionella*-Containing Vacuole » (LCV) (Alli et al., 2000; Molmeret et al., 2004b, a). Ces LCV sont ensuite libérées permettant l'infection d'autres hôtes. Une fois internalisée par les amibes ou les macrophages, la bactérie s'échappe de la voie classique de dégradation par inhibition du recrutement des lysosomes. La LCV recrute ensuite, à sa surface les organites de la cellule, mitochondries, ribosomes et de petites vésicules (Isberg et al., 2009). Ce recrutement commence dès l'internalisation et dure seulement quelques minutes (Bitar et al., 2004). Les vésicules du Reticulum Endoplasmique (RE), et de l'appareil de Golgi sont captés par la LCV et la composition de la membrane de la vacuole se modifie et s'apparente à celle du RE (Segal et al., 1999; Segal and Shuman, 1999; Isberg et al., 2009). La LCV se retrouve décorée par des protéines polyubiquitinylées recrutées par les effecteurs AnkB sécrétés par les légionelles. Ce recrutement a lieu, aussi bien chez les amibes que chez les macrophages et une multiplication rapide commence (Dorer et al., 2006; Price et al., 2009; Lomma et al., 2010). Les légionelles s'échappent de l'hôte soit par lyse soit par excrétion de la LCV, après un ou deux cycles de multiplication, phénomène induit par la raréfaction des

nutriments chez l'hôte (Molmeret et al., 2004b, a; Molmeret et al., 2005; Molmeret et al., 2010).

Cette stratégie utilisée par *L. pneumophila* est dépendante du système Dot/Icm, un système de sécrétion de type IV (Segal et al., 1998; Segal and Shuman, 1998b, a; Vogel et al., 1998; Isberg et al., 2009) qui injecte environ 300 effecteurs dans la cellule hôte, soit environ 10% des protéines encodées par le génome de *L. pneumophila* (Luo, 2011; Zhu et al., 2011; Al-Quadan et al., 2012; Luo, 2012). La capacité à parasiter les macrophages est la conséquence de la capacité des légionelles à se répliquer au sein de nombreuses espèces de protozoaires (Molmeret et al., 2005; Al-Quadan et al., 2012). Ceci est sans doute dû à l'acquisition de gènes eucaryotes par transferts horizontaux durant une co-évolution avec les amibes ; et l'adaptation à la vie intracellulaire avec des hôtes eucaryotes primitifs notamment via l'acquisition de gènes codant des protéines à domaine ANK (Fields et al., 1990; Steinert et al., 1997; Al-Quadan et al., 2012).

L. pneumophila est naturellement compétente et peut donc capter de l'ADN présent dans l'environnement ou/et peut échanger de l'ADN avec des bactéries par conjugaison (Vogel et al., 1996; Segal and Shuman, 1998b; Stone and Kwaik, 1999). Le milieu intracellulaire des amibes constitue donc un environnement de choix pour effectuer des conjugaisons avec d'autres bactéries intracellulaires ou récupérer de l'ADN exogène issu de bactéries lysées par l'amibe.

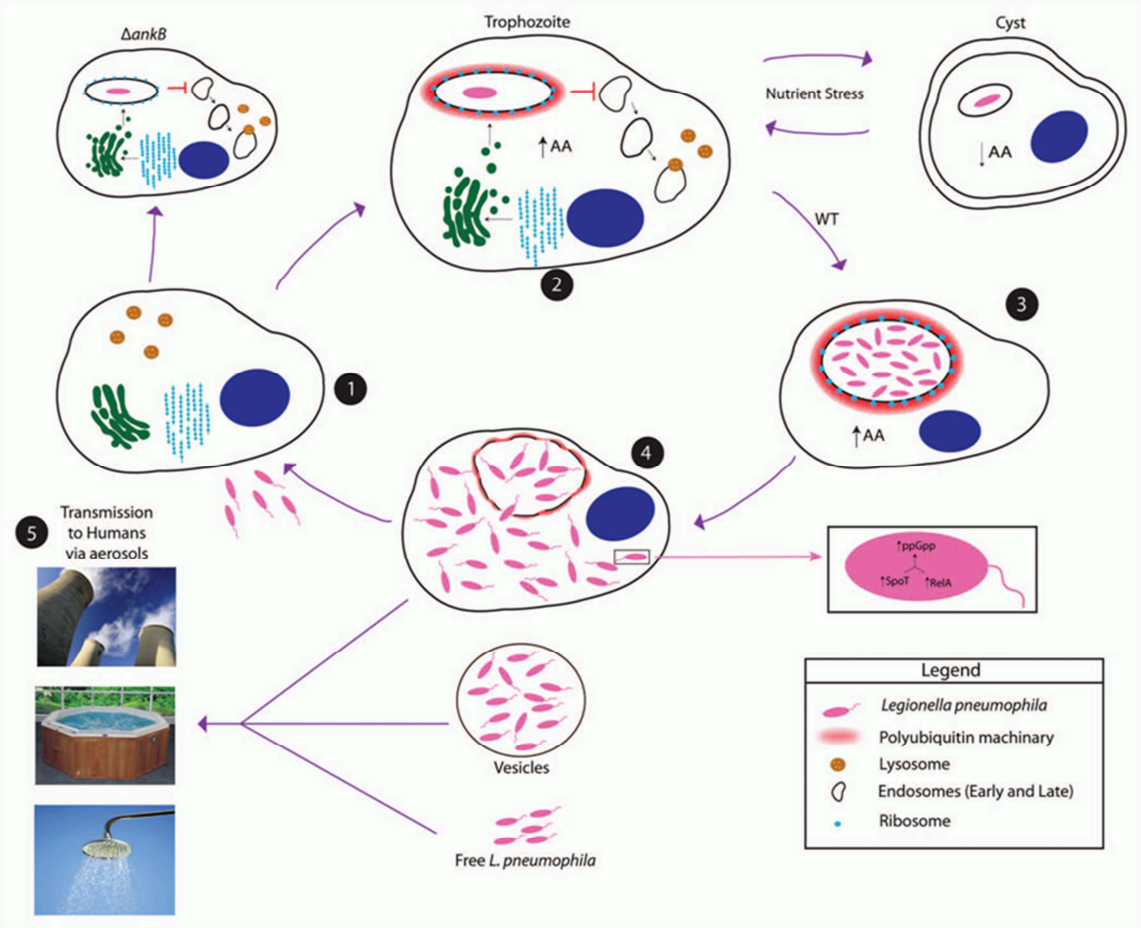


Figure 8: ***Schéma du cycle intra-cellulaire de*** **L. pneumophila.**
1) La forme flagellée de L. pneumophila *est internalisée par les amibes. 2) Le LCV s'échappe de la voie de dégradation lysosomale par inhibition du recrutement des lysosomes. La LCV recrute des éléments cellulaires de l'hôte notamment à l'aide de l'effecteur AnkB. Un mutant déficient pour AnkB sera incapable d'inhiber ce recrutement et sera donc phagocyté. 3) Dans des conditions défavorables, par exemple un stress nutritif, l'amibe s'enkyste et la réplication intracellulaire ne peut avoir lieu. D'après Richards et al, 2013.*

c) Légionelles post-amibes

Les légionelles libérées des amibes semblent moins sensibles aux conditions environnementales comparées à celles issues de cultures classiques (Barker et al., 1992; Barker et al., 1993; Barker and Brown, 1995; Barker et al., 1995; Kwaik and Harb, 1999). Une résistance accrue aux antibiotiques, aux agents chimiques est observée chez celles-ci mais également une modification de leur composition en acide gras, du profil protéique, une taille inférieure, et l'apparition d'une mobilité via la production d'un flagelle. Il a également été démontré une augmentation de la capacité à infecter les amibes et les macrophages (Cirillo et al., 1994; Steinert et al., 1997; Cirillo et al., 1999; Molmeret et al., 2005; Garcia et al., 2007). Ces modifications sont dues au cycle de vie biphasique de *L. pneumophila* caractérisé

par des variations importantes du transcriptome induisant des changements phénotypiques majeurs (Bruggemann et al., 2006a; Bruggemann et al., 2006b; Faucher et al., 2011). Cette transition est modulée par un très grand nombre de facteurs (Molofsky and Swanson, 2004; Rasis and Segal, 2009). L'un des facteurs clés, est le 3'5'-bispyrophosphate (ppGpp) synthétisé par SpoT, également appelée « alarmone bactérienne » (Molofsky and Swanson, 2004; Rasis and Segal, 2009; Sahr et al., 2009). Une diminution de la concentration en acides aminés induit l'expression de RelA, une autre synthase de l'alarmone. De plus, la LCV, est résistante à la congélation et à la sonication et les légionelles présentes dans ces vésicules sont très résistantes aux biocides (Berk et al., 1998).

De nombreuses méthodes sont employées pour éliminer les légionelles des environnements aquatiques, avec une efficacité relativement faible. A l'heure actuelle, les recherches sont orientées afin de trouver des stratégies de lutte agissant à la fois sur la bactérie et son hôte amibien (Abu Kwaik et al., 1998; Molmeret et al., 2005; Garcia et al., 2007; Al-Khodor et al., 2008).

Chapitre III : Les biofilms

A) Généralités

Le terme biofilm a été créé et défini pour la première fois en 1978 par J.W Costerton (Costerton et al., 1978) et a beaucoup évolué au cours de ces dernières années. Ce terme désigne des communautés de micro-organismes caractérisées par l'adhésion de cellules au substrat de manière irréversible et les unes aux autres grâce à une matrice produite par les membres de cette communauté présentant un phénotype différent de leurs formes libres (Donlan and Costerton, 2002) (Figure 9). Les micro-organismes de ces communautés fixées différent énormément de leur forme planctonique (Costerton et al., 1978). Le biofilm est un système biologique complexe, structuré et dynamique. Ce mode de persistance constitue la forme d'existence microbienne la plus répandue dans la nature (Baillie and Douglas, 1999).

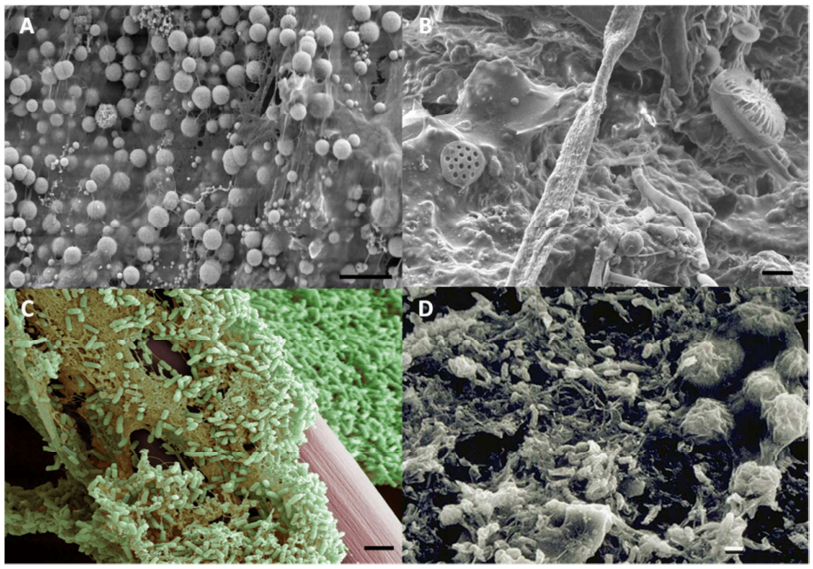


***Figure 9:* Cliché de microscopie électronique de biofilms issus A) de réseaux d'eau B) de climatiseurs C) sur microfibre ou D) pluri-espèces.**
La barre d'échelle correspond à 2 µm. D'après ASM MicrobelLibrary.org.

Les biofilms peuvent prendre la forme de simples tours ou de champignons. Les modèles mathématiques ont démontré que ces formes confèrent la meilleure diffusion possible des nutriments à travers toute la communauté. Cette structure est composée de micro-colonies empaquetées dans une matrice et, elles sont délimitées par des canaux d'eaux. Ces derniers constituent un système circulatoire primaire permettant la circulation des nutriments,

de l'oxygène et l'évacuation des déchets (Lawrence et al., 1991; McLean et al., 1991; Stoodley et al., 1994). Il a été démontré que ces canaux ont un diamètre supérieur à 5 µm (Stoodley et al., 1994). L'architecture du biofilm est dépendante des micro-organismes qui le composent et est contrôlée par des gènes spécifiques. *Serratia liquefaciens* MG1, par exemple, développe des biofilms en formant des tiges verticales de cellules ressemblant à des rosettes de bactéries reliées entre elles par des longues chaînes de cellules (Labbate et al., 2004).

La matrice des biofilms est composée de Substances Polymériques Extracellulaires (SPE) (Figure 10). Les SPE peuvent être composées de polysaccharides, de protéines, d'acides nucléiques, de glycoprotéines et de phospholipides (Sutherland, 2001b, a; Branda et al., 2005). La plupart des bactéries produisent des polysaccharides constitués de carbohydrates neutres (majoritairement des hexoses et dans quelques cas des pentoses) et d'acides uroniques (alginate). Ces carbohydrates peuvent être substitués par des esters d'acétate, des pyruvates, des succinates ou des formates (Dols-Lafargue et al., 2001b, a; Sutherland, 2001b, a). Les exopolysaccharides sont soit des homopolysaccharides (D-Glucose ou L-Fructose), soit des hétéropolysaccharides. Ces exopolymères servent à la fois à piéger les nutriments mais également à diminuer la diffusion de biocides (Murga et al., 2001).

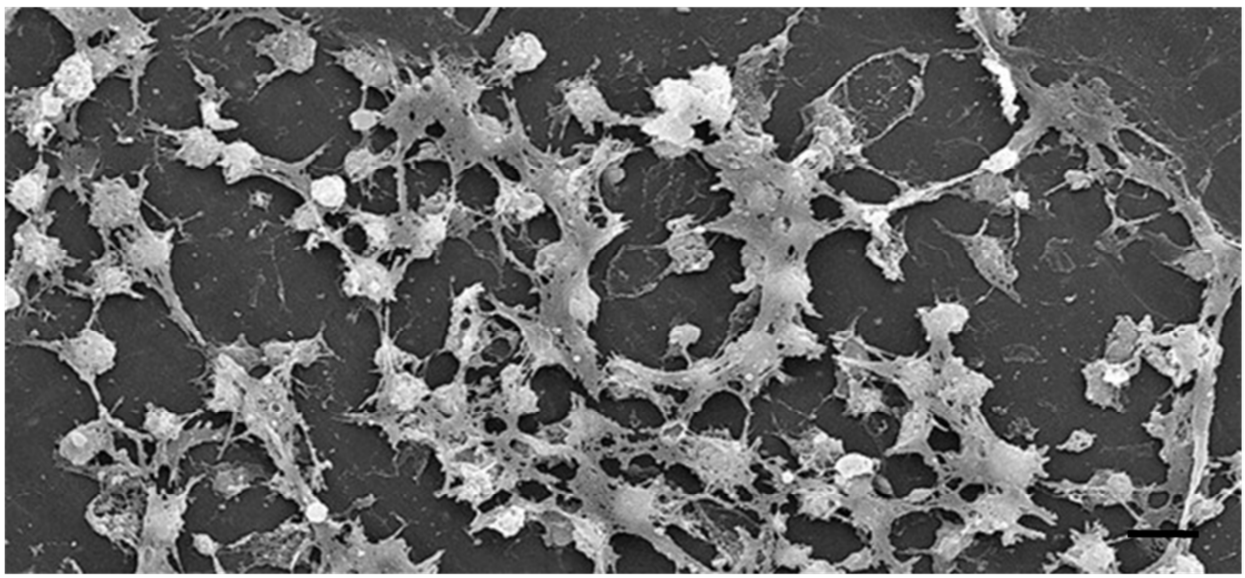


Figure 10: ***Cliché de microscopie électronique de biofilm formé par des micro-colonies de*** **Staphylococcus aureus** ***empaquetés dans une matrice exopolysaccharidique.***
La barre d'échelle correspond à 2 µm. D'après Janice Carr, 2005.

Les biofilms constituent un lieu d'échange, en effet, ils constituent un habitat où les occupants sont proches, entre 4 et 10 µm de distance et à une densité élevée, ce qui donne des conditions favorables à des échanges génétiques (Sorensen et al, 2005). Les éléments transférés peuvent être des plasmides conjugatifs, des transposons ou des bactériophages (Koonin et al, 2001). Thitiwat et Satoshi ont démontré en 2008, qu'*E. coli* est capable de former des connections entre toutes les cellules via des pili pendant l'établissement d'un biofilm. Des études récentes ont permis de mettre en évidence l'existence de structures proches des pili, appelées « nanowires », permettant la distribution de l'énergie à travers tout le biofilm. Ces structures peuvent mesurer plus de 80 µm (Figure 11) (Gorby et al, 2006).

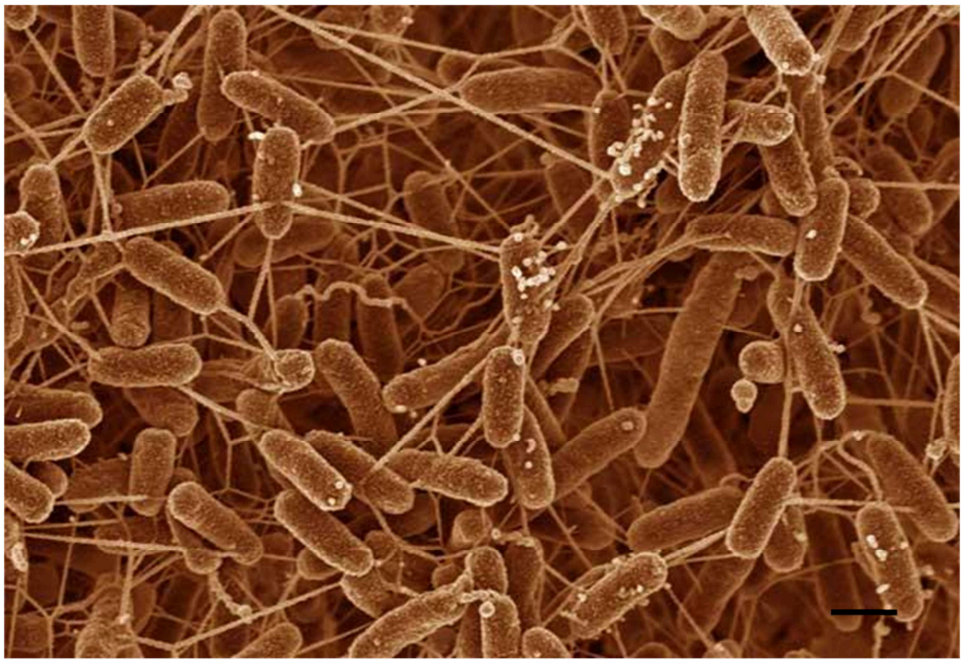


Figure 11: ***Cliché de microscopie électronique de nanowires de*** **Shewanella oneidensis.**
La barre d'échelle correspond à 2 µm. D'après Rizlan Bencheikh and Bruce Are, 2006.

B) Formation d'un biofilm

La formation d'un biofilm se déroule en 5 étapes (Figure 12). La première, l'adhésion des cellules, des colonisateurs primaires, nécessite que les cellules se fixent à la surface du support par les forces de Van Der Waal ou en utilisant les fimbriae ou les pili recouvrant la cellule. La deuxième étape, la colonisation, correspond à la multiplication cellulaire et à la production de la matrice par les cellules adhérées, qui deviennent fixées de manière

irréversible à leur support. D'autres micro-organismes peuvent venir se fixer, s'implanter sur ce proto-biofilm. On parle alors de colonisateurs secondaires (Watnick et Kolter, 2000). La troisième étape est le développement de l'architecture du biofilm. L'avant dernière étape, la maturation, correspond à une intensification de la croissance cellulaire et de la production d'exopolymères. Enfin, lors de la dispersion (étape 5), les bactéries sont relarguées dans l'environnement via l'action d'enzymes spécifiques qui dégradent les exopolymères. Les cellules libres peuvent alors, établir de nouveaux biofilm afin de coloniser de plus grandes surfaces (Stodley et al, 2002).

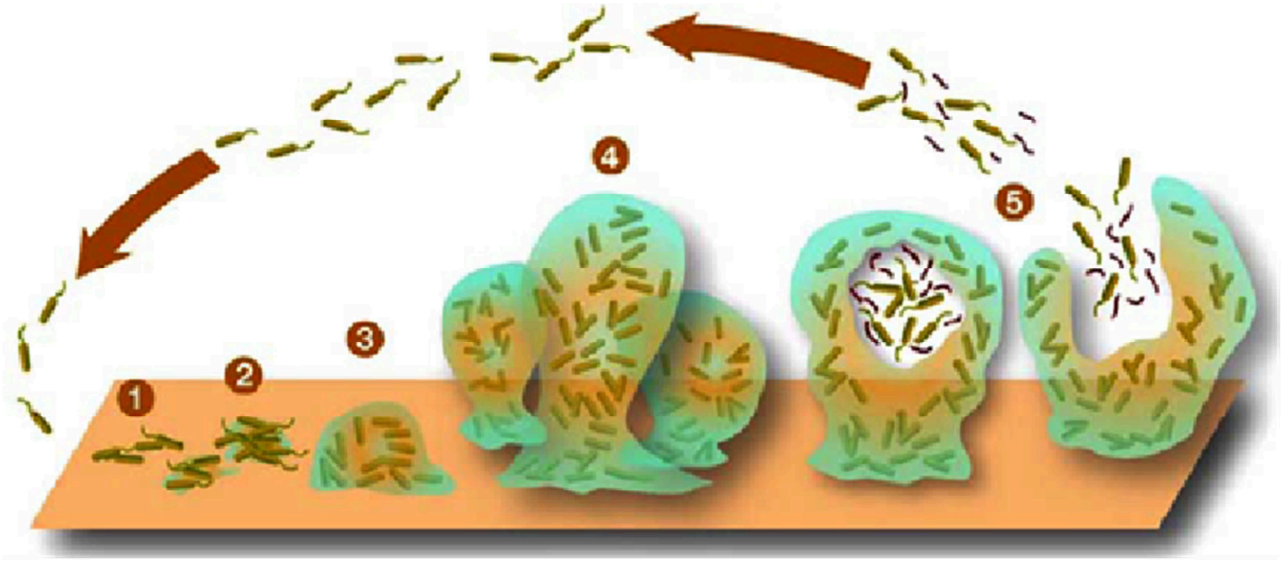


Figure 12: ***Le cycle de vie d'un biofilm en 5 étapes: 1) Adhésion des cellules ,2) Colonisation, 3) Développement, 4) Maturation et 5) Dispersion.***
(http://www.advancedhealing.com/dr-ettingers-biofilm-protocol-for-lyme-and-gut-pathogens/)

C) Interaction légionelles/biofilm

Dans des conditions de laboratoire, la culture pure de *L. pneumophila* est fastidieuse et elle nécessite l'apport de fer et de nombreux acides aminés dont la cystéine (George et al., 1980; Edelstein, 1982; Pine et al., 1984). *L. pneumophila* est détectée dans les environnements aquatiques malgré la faible concentration en nutriment (Declerck et al., 2007b). Cette bactérie est donc capable d'obtenir les nutriments nécessaires à sa survie, via les micro-organismes présents dans le biofilm.

1) Adhésion

De nombreux micro-organismes pathogènes comme *Pseudomonas aeruginosa* ou *Vibrio cholerae* sont capables de former des biofilms mono-espèces (Nesper et al., 2001; Whiteley et al., 2001). Dans le cas de *L. pneumophila*, de tels biofilms sont obtenus dans des conditions expérimentales nécessitant l'utilisation de milieux spécialement définis pour la croissance des légionelles (Mampel et al., 2006; Piao et al., 2006; Pecastaings et al., 2010). Il a été démontré que *L. pneumophila* est capable de développer des biofilms sur des surfaces en verre, polystyrène et polypropylène sous condition statique dans du BYE à 25, 37 et 42°C (Piao et al., 2006). La température a une incidence significative sur la structure et la taille du biofilm formé. A 25°C, les biofilms formés par les légionelles présentent typiquement, des structures en formes de tours ou de champignons parcourues par des canaux. Alors qu'à 37 et 42°C, la structure globale est proche d'un tapis cellulaire avec une absence de canaux. Le biofilm obtenu à 37°C est également plus épais, régulier et avec une densité beaucoup plus élevée. *L. pneumophila*, à ces températures, présente une morphologie filamenteuse, multinucléée mais non cloisonnée.

Dans leur étude, Mampel et ses collègues en 2006 ont démontré que la formation d'un biofilm par *Legionella* en milieu riche et à 30°C est uniquement due à l'adhésion de cellules planctoniques plutôt qu'à la multiplication des bactéries fixées. Peu de médiateurs de la formation des biofilms ont été découverts, on peut citer FliA (Mampel et al., 2006), un système de transport de protéine TatB et TatC (De Buck et al., 2005) et le c-di-GMP (Carlson et al., 2010). La « *Legionella*-Collagen Like » (Lcl) protéine, une adhésine liant les glycosaminoglycanes (GAG), spécifique de l'espèce L. *pneumophila* a été récemment découverte (Duncan et al., 2011). Cette adhésine est impliquée dans l'adhésion aux cellules épithéliales et dans la formation des biofilms. *L. pneumophila* exprime cette protéine pour initier l'adhésion à une surface mais également pour les interactions cellulaires. L'expression de cette adhésine varie entre la phase de croissance et durant la phase de formation de biofilm, où elle est environ 5 fois plus transcrite. Au niveau de la cellule, la Lcl est exprimée de manière hétérogène et en agrégats (Figure 13) (Mallegol et al., 2012).

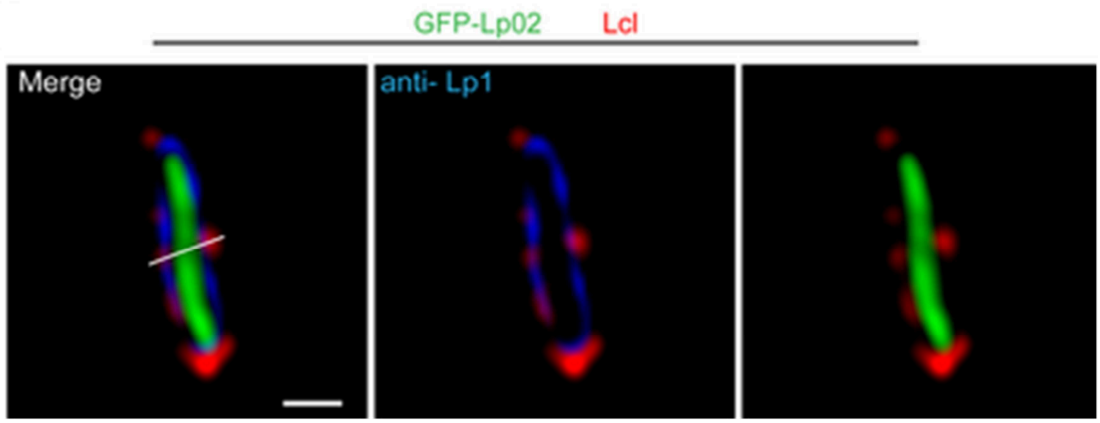


Figure 13: ***La Lcl est exprimée à la surface de la cellule de* L. pneumophila *et montre une distribution en agrégats.***
Co-localisation en microscopie confocale des Lcl (rouge) à la surface, de la membrane par anticorps (bleu) et de la cellule par expression de la GFP (vert). La barre d'échelle correspond à 0,5 µm. D'après Mallegol et al, 2012.

L. pneumophila, comme de nombreuses bactéries pathogènes à Gram négatif, a une absolue nécessité de posséder des pili de type IV et du système de sécrétion de type II pour établir un biofilm et pour permettre sa maturation (Moorthy and Watnick, 2004; Giltner et al., 2006; Lucas et al., 2006).

2) Colonisation

Les légionelles ont un rôle de colonisateur secondaire, c'est-à-dire qu'elles sont capables de coloniser un biofilm pré-établi et donc de s'associer à d'autres micro-organismes afin de survivre. Mampel et ses collègues (2006) ont observé l'adhésion de *L. pneumophila* à des biofilms mono-espèces formés par *Empedobacter breve*, *Microbacterium spp*, et *Acinetobacter baumanii* (Mampel et al., 2006). Au contraire, *L. pneumophila* ne semble pas s'implanter dans des biofilms mono-espèce composés de *Pseudomonas spp*, *Corynebactium glutamicum* ou *Klebsiella pneumoniae*, ceci suggère un antagonisme à l'adhésion de *L. pneumophila*. Dans une autre étude, il a également été démontré que *Sphingomonas spp* et *Acidovorax spp* ont cette même activité antagoniste vis-à-vis de *L. pneumophila* (Giao et al., 2011).

Dans la nature, les biofilms sont composés de communautés complexes. En utilisant des conditions expérimentales proches des réseaux d'eaux pour développer des biofilms multi-espèces, il a été démontré que dans ces conditions, *L. pneumophila* colonise rapidement les biofilms (Murga et al., 2001; Vervaeren et al., 2006; Declerck et al., 2007b). Cette

implantation peut se faire en moins de deux heures (Declerck et al., 2007a, b). Dans la même optique de recherche, Stojek et Dutkiewicz (Stojek and Dutkiewicz, 2011) se sont intéressés à la coexistence des légionelles avec d'autres bactéries à Gram négatif dans les réseaux d'eau urbains et ruraux. Leurs résultats démontrent qu'en cas d'absence de légionelles, *Enterobacter spp*, *Serratia spp*, *Aeromonas spp* et *Vibrio spp* sont retrouvés de manière significative en plus grand nombre, mettant en avant un antagonisme de ces souches vis-à-vis de l'implantation de *Legionella*. A l'inverse, *Klebsiella spp*, *Salmonella spp*, *Flavobacterium breve* et *Xanthomonas spp* sont retrouvées en plus grand nombre en cas de présence de légionelles. De plus, ces résultats démontrent la coexistence entre *Legionella* et *Pseudomonas aeruginosa* dans les réseaux d'eaux. L'activité antagoniste peut être due en partie, à la production de bactériocines par les bactéries à Gram négatif et à Gram positif. *Pseudomonas fluorescens* SSD, un producteur de ce genre de peptides, inhibe la formation de biofilm de *L. pneumophila* ainsi que sa capacité à les coloniser (Guerrieri et al., 2008).

3) Développement du biofilm

Afin de devenir membres à part entière de la communauté, les bactéries fixées doivent se différencier en bactéries sessiles, ce qui implique une modulation de l'expression d'un grand nombre de gènes (Watnick and Kolter, 2000). Dans le cas de *Pseudomonas aeruginosa*, 22 % de ses gènes sont sur-exprimés dans l'état de biofilm et 16 % sont sous-exprimés. Une étude au laboratoire (Hindre et al., 2008), a permis la première analyse du transcriptome de *L. pneumophila* en biofilm mono-espèce. Ce travail révèle une différence d'expression des gènes spécifiques à l'état biofilm, 2.3 % (69 gènes) des hypothétiques 2932 gènes du génome ont une expression modulée d'un facteur 2 par rapport à la condition témoin. Parmi ces 69 gènes, 52 sont sur-exprimés et 17 sont sous-exprimés.

Les microcolonies des biofilms sont empaquetées dans une matrice extracellulaire qui renforce la structure du biofilm. A l'heure actuelle, une seule étude, réalisée par Piao et ses collègues (Piao et al., 2006), suggère que *L. pneumophila* est capable de produire des SPE.

4) Maturation

L'environnement du biofilm confère à ses occupants une association mutuellement profitable pour obtenir ce qui est nécessaire à chacun pour croitre (Watnick and Kolter, 2000).

La survie et la croissance des micro-organismes pathogènes sont souvent caractérisées par une auxotrophie importante qui peut être compensée par l'association et les interactions métaboliques entre les différents membres du biofilm (Donlan, 2002). La première étude qui a démontré que *Legionella* est capable de croître sur les extracellulaires d'autres bactéries a été réalisée par Tison et ses collègues en 1980 (Tison et al., 1980). Ainsi dans des conditions de laboratoire, *Legionella* est capable de croitre en association avec *Fisherella spp* (une cyanobactérie). La croissance de *L. pneumophila* dépend alors de l'activité photosynthétique de cyanobactéries, plus précisément des produits libérés par ces organismes. Des résultats similaires ont été obtenus avec *Scenedesmus spp*, *Chlorella spp* et *Gleocystis spp* (Hume R.D., 1984). Des bactéries hétérotrophes semblent également capables d'apporter les nutriments nécessaires à la croissance de *L. pneumophila*. Parmi ces bactéries, on trouve *Flavobacterium breve*, *Pseudomonas spp*, *Alcaligenes spp* et *Acinetobacter spp* (Wadowsky and Yee, 1983; Stout et al., 1985).

En plus de ce commensalisme nutritionnel, *L. pneumophila* a la capacité d'obtenir des sources de carbone et d'énergie à partir de matières en décomposition ou de cellules mortes. Cette matière organique peut être issue des mesures de traitements de l'eau (van der Kooij et al., 2005) ou du biofilm lui-même. En effet, environ 50 % des cellules qui le composent sont mortes (Tresse et al., 2003). Des travaux récents ont démontré que *L. pneumophila* est capable de nécrotrophie (Temmerman et al., 2006). Il a été clairement établi que les légionelles sont capables de consommer et de croitre sur des bactéries à Gram négatif mortes comme *Pseudomonas putida*, *Escherichia coli* et avec du lysat d'amibe d'*A. castellanii*.

L'un des principaux moteurs de l'évolution est la compétition pour l'accès ou l'utilisation de sources d'énergie. Les biofilms constituent un environnement suffisant pour la croissance de *L. pneumophila* mais il permet également une croissance rapide de bactéries qui ont un temps de génération faible comme *E. coli* ou *P. aeruginosa*. En formant des filaments multi-nucléés et non-cloisonnés, *L. pneumophila* a développé une stratégie permettant de rentrer en compétition avec des bactéries à croissance rapide pour l'acquisition des ressources disponibles (Piao et al., 2006). Dans des conditions favorables, de disponibilité des nutriments, les filaments de légionelles peuvent se cloisonner donnant rapidement naissance à un grand nombre de cellules filles.

5) Dispersion

La dispersion des bactéries est une part intégrante de la dynamique des biofilms (Stoodley et al., 2001a; Stoodley et al., 2001c; Stoodley et al., 2001b). Les bactéries peuvent se détacher et se disperser soit par libération des cellules en cours de croissance, induites par une carence nutritionnelle ou par Quorum Sensing, soit par libération d'agrégats sous l'effet du flux (Donlan, 2002). Le détachement par le flux peut être discriminé en 2 mécanismes distincts : l'érosion et la desquamation. Le premier, l'érosion est un détachement continu de cellules seules et de petites portions du biofilm. Par opposition, la desquamation est induite par des processus inconnus et conduit à un détachement rapide et massif du biofilm (Storey et al., 2004b). Une érosion en continu de *L. pneumophila* à partir des biofilms a été démontrée dans un pilote à flux laminaire (Storey et al., 2004b). Avec un flux plus important, on peut observer un phénomène de desquamation, c'est-à-dire que plus de 90% des légionelles sont détachées du substrat. Ce genre de phénomène peut entrainer la libération d'un grand nombre de légionelles voire être à l'origine de doses infectieuses pouvant provoquer une Légionellose (Storey et al., 2004a; Storey et al., 2004b).

La mise en place de l'architecture du biofilm, les échanges métaboliques et le détachement des cellules sont des mécanismes complexes qui nécessitent une coordination croisée de la part des membres des biofilms. Cette coordination peut être obtenue par un système de communication appelé Quorum Sensing.

Chapitre IV : Quorum Sensing

A) Généralités

Les processus bactériens comme la formation de biofilms, la sécrétion de facteurs de virulence, la bio-luminescence, la production d'antibiotiques, la sporulation et la capacité d'assimiler l'ADN exogène sont souvent cruciaux pour la survie. Toutefois, ces mécanismes ne peuvent s'exercer au niveau d'une cellule isolée. A l'heure actuelle, nous savons que ces processus sont coordonnés au niveau d'une population par un mécanisme de régulation global lié à la densité cellulaire et appelé Quorum Sensing (QS). Ce mécanisme permet de synchroniser l'expression des gènes en réponse à la densité cellulaire et à la diversité des espèces. Le QS induit le passage des bactéries entre deux états d'expression génique distincts. Un premier état d'expression génique est adopté en cas de Faible Densité Cellulaire (FDC), par une cellule seule ou un petit nombre d'individus et l'autre, à l'inverse, est exprimé en cas de Haute Densité Cellulaire (HDC) (Parsek and Greenberg, 2005; Waters and Bassler, 2005; Williams, 2007; Novick and Geisinger, 2008).

1) Le principe

Malgré la diversité des systèmes de Quorum Sensing, il existe 3 caractéristiques fondamentales de ces systèmes. Tout d'abord il y a synthèse par les bactéries de molécules de faible poids moléculaire appelées auto-inducteurs. Ces molécules doivent ensuite, être diffusées passivement ou via une sécrétion active en dehors de la cellule. Ceci implique que la concentration extracellulaire de ces molécules est directement proportionnelle à la densité cellulaire du milieu. Enfin, quand la concentration en auto-inducteur est au-dessus de la valeur seuil, ils se lient à des récepteurs spécifiques et, via une cascade de signalisation, régulent l'expression de certains gènes. Cela permet aux populations bactériennes de fonctionner à l'unisson et de coopérer de manière à agir comme une seule et unique entité formant ainsi un pseudo « super-organisme ». L'étude de ces systèmes a permis de révéler des mécanismes moléculaires fondamentaux tels que la biosynthèse de petites molécules, la détection et la transduction du signal, le contrôle post-transcriptionnel des ARNm via des ARNs et la régulation transcriptionnelle des gènes (Miller et al., 2002; Henke and Bassler, 2004a, b;

Waters and Bassler, 2006; Higgins et al., 2007; Tu and Bassler, 2007; Pompeani et al., 2008). De plus, l'étude des similarités et des différences entre les différents systèmes décrits a permis de mettre en évidence que malgré la diversité des systèmes de QS, ils agissent tous par modulation de l'expression génique.

2) Les différents systèmes de Quorum Sensing

De nombreuses études ont permis de mettre en évidence qu'il existe un grand nombre de molécules signal du QS de natures chimiques distinctes. Chez les bactéries à Gram négatif, on retrouve en majorité des N-AcylHomosérine Lactones (AHL), connues aussi sous le nom d'Auto-Inducteurs-1 (AI-1). On trouve également chez ces bactéries à Gram négatif le système lié à la production d'Auto-Inducteur-3 (AI-3), de structure inconnue, notamment chez les *Escherischia coli* EntéroHémorragiques (ECEH). Chez les bactéries à Gram positif, les molécules signal sont essentiellement de nature peptidique et appelés Auto-Inducteurs Polypeptidiques (AIP). Il existe d'autres auto-inducteurs qui sont des 2-alkyl-4-quinolones, des γ-butyrolactones, des furanones, des acides gras, des esters méthyliques d'acides gras et des dérivés de 4,5-dihydroxy-2,36pentadione (DPD) (Winzer et al., 2002a; Sperandio et al., 2003; Winzer et al., 2003; Vendeville et al., 2005; Williams, 2007; Williams et al., 2007). Le système de QS basé sur les AutoInducteurs-2 (AI-2) de type furanones, est retrouvé à la fois chez les bactéries à Gram négatif et à Gram positif (Winzer et al., 2002b; Winzer et al., 2002a, 2003; Vendeville et al., 2005) alors que les peptides cycliques ou modifiés, les γ-butyrolactones sont trouvés uniquement chez les bactéries à Gram positif comme les Streptocoques, les Staphylocoques et les Streptomycètes. Yim et ses collègues (2006) ont suggéré qu'un grand nombre de métabolites extracellulaires, incluant ceux ayant une activité antibiotique, ont potentiellement un rôle de molécule signal (Yim, 2007).

Tout comme pour reconnaitre un système de QS, il existe trois caractéristiques spécifiques pour reconnaitre un auto-inducteur. En premier lieu, cette molécule doit être accumulée dans le milieu extracellulaire durant une phase de croissance spécifique, ou sous certaines conditions physiologiques, ou en réponse à des changements spécifiques des conditions environnementales. Ensuite, cet auto-inducteur doit être reconnu par un récepteur spécifique à la surface de la cellule ou dans le cytoplasme. Enfin, la fixation à ce récepteur doit entrainer une réponse cellulaire qui s'étend au-delà du changement physiologique

nécessaire pour métaboliser ou détoxifier la molécule (Winzer et al., 2002b; Winzer et al., 2002a).

a) Quorum Sensing chez les bactéries à Gram négatif

Le système d'Auto-Inducteur-1 (AI-1)

Les AcylHomosérines Lactones (AHL) constituent la principale classe d'auto-inducteurs utilisés par les bactéries à Gram négatif (protéobactèries) pour la communication intra-espèce. Les AHL sont constituées d'une HomoSérine Lactone sur laquelle est fixée par liaison amide une chaine carbonée allant de 4 à 18 carbones de longueur (Fuqua et al., 2001). Ces chaines latérales peuvent présenter des modifications en position C3, ou des doubles liaisons (Figure 14).

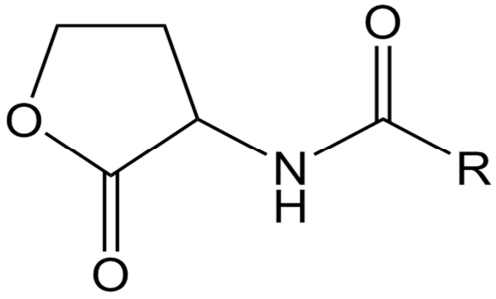


***Figure 14:** Schéma représentant la structure de base des AHL où R correspond à la chaîne latérale variable.*

La première AHL et son mode d'action ont été décrits chez *Vibrio fisheri*, une bactérie bioluminescente qui colonise l'organe luminescent du calmar sépiolode hawaiien *Euprymna scolopes* (Ruby, 1996). L'environnement au sein de l'organe luminescent permet à la bactérie de croitre et donc d'augmenter sa densité. Une fois le seuil de population atteint, le QS se met en place, permettant l'expression de l'opéron de la luciférase. Le calmar hôte utilise la lumière produite par la bactérie pour s'illuminer, ce qui constitue une stratégie contre les prédateurs effrayés par la lumière (Ruby, 1996). Afin d'expliquer le mécanisme de communication dépendant des AHL, *Vibrio fischeri* nous servira de modèle.

LuxI et LuxR, sont deux protéines essentielles pour le contrôle du QS de la bioluminescence chez *Vibrio fisheri* (Figure 15).

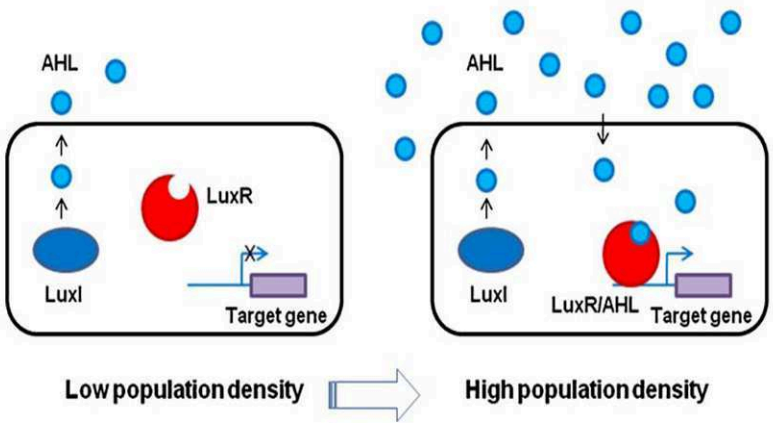


***Figure 15:* Quorum Sensing AHL-dépendant chez V. fischeri.**
Les AHL sont produits par des auto-inducteurs synthases de la famille LuxI. A faible densité de population, la concentration en AHL est faible et le récepteur LuxR, instable, est rapidement dégradé. Quand la concentration des AHL atteint une valeur seuil, une liaison s'effectue ente la molécule signal et le récepteur LuxR. Le complexe LuxR/AHL ainsi activé module l'expression de gènes cibles. D'après Swati Choudhary et Claudia Schmidt-Dannert, 2010 (Choudhary and Schmidt-Dannert, 2010).

LuxI est la synthase de l'auto-inducteur, la N-3-(oxo-hexanoyl)-homosérine lactone (OHHL) (Engebrecht and Silverman, 1984; Schaefer et al., 1996). Cette enzyme catalyse la réaction d'acylation et de lactonisation entre la S-AdenosylMéthionine (SAM) et l'Hexanoyl-ACP (More et al., 1996; Schaefer et al., 1996). Après sa synthèse, la OHHL diffuse en dehors de la cellule et sa concentration augmente au fur et à mesure que la population cellulaire augmente (Kaplan and Greenberg, 1985). LuxR est le récepteur cytoplasmique de l'OHHL et l'activateur transcriptionnel de l'opéron de la luciférase, *luxICDABE* (Engebrecht et al., 1983; Engebrecht and Silverman, 1984). Sans l'auto-inducteur, LuxR est instable et rapidement dégradé. A l'inverse, lorsque l'OHHL s'accumule, elle se lie à LuxR et ce complexe LuxR/AHL reconnait une séquence consensus (lux box) située en amont de l'opéron *luxICDABE* et active son expression (Stevens et al., 1994). Les gènes *luxAB* codent pour la luciférase et *luxCDE* encodent le complexe réductase des acides gras, qui produit et recycle le substrat aldéhydique de la luciférase (Meighen, 1991). De plus, une boucle d'auto-induction se met en place car l'expression de *luxI* est aussi activée par le complexe LuxR-AHL. C'est pour cela que ces molécules signal sont appelées auto-inducteurs. Cette boucle de rétroaction positive permet de saturer l'environnement en OHHL. Ceci améliore la synchronisation de la population cellulaire pour passer de l'état d'expression génique de FDC à l'état de HDC via le QS. C'est-à-dire que la saturation en auto-inducteur permet d'activer et

de déclencher les mécanismes de réponse liés à une très forte population bactérienne par l'ensemble de la communauté.

Le système de régulation LuxI/LuxR de *V. fisheri* est considéré comme un paradigme pour le contrôle de l'expression génique via le QS chez les bactéries à Gram négatif (Engebrecht et al., 1983).

Des homologues des gènes *lux*I et *lux*R ont été identifiés dans un grand nombre de génome (plus de 100 parmi les génomes disponibles dans les bases de données). La mise en place d'une boucle de rétroaction positive est presque systématique dans les systèmes de QS utilisant les AHL (Engebrecht et al., 1985; Fuqua and Winans, 1994; Seed et al., 1995; Case et al., 2008). Parmi les systèmes de QS utilisant les AHL les plus étudiés, on peut citer le double système LasI/LasR-RhlI/RhlR qui contrôle l'expression des facteurs de virulence et de formation du biofilm chez *Pseudomonas aeruginosa* (Passador et al., 1993; Pearson et al., 1994; Pearson et al., 1995; Winson et al., 1995), le système TraI/TraR d'*Agrobacterium tumefaciens* qui régule le transfert du plasmide oncogène Ti à la plante hôte (Piper et al., 1993; Fuqua and Winans, 1994; Hwang et al., 1995) et le système EsaI/EsaR qui contrôle la production d'exopolysaccharide, l'adhésion et la colonisation de la plante par *Pantoea stewartii* (Beck von Bodman and Farrand, 1995; von Bodman et al., 1998). Ce dernier système présente une particularité liée à la protéine de régulation EsaR. En effet, sans ligand, celle-ci se lie à l'ADN et réprime la transcription des gènes contrôlés. A l'inverse, une fois l'auto-inducteur lié, le complexe est libéré de l'ADN et les gènes sont exprimés (Minogue et al., 2002; von Bodman et al., 2003).

Les molécules auto-inductrices sont généralement uniques dans le sens qu'une AHL particulière est détectée seulement par les espèces qui la produisent. Ce qui suggère que les systèmes de QS liés à ces molécules servent en majorité aux communications cellulaires intra-espèce. La spécificité de ces systèmes est attribuée au fait que la protéine LuxR-like reconnaît un ligand AHL particulier (Zhu and Winans, 1999, 2001; Schuster et al., 2004b; Schuster et al., 2004a; Urbanowski et al., 2004).

L'analyse biochimique des protéines LuxR-like a conduit à la description de trois classes de récepteurs (Schuster, 2008). La première classe (LasR par exemple) nécessite une AHL pour adopter sa conformation fonctionnelle afin de se lier à l'ADN, et fixe de manière

irréversible son ligand via une affinité très spécifique. La deuxième classe de récepteurs (LuxR par exemple) nécessite aussi une AHL pour adopter sa conformation fonctionnelle mais la fixation du ligand est réversible. La dernière classe (EsaR par exemple) ne nécessite pas d'AHL pour se lier à l'ADN et fixe réversiblement son ligand. L'absolue nécessité de présence des AHL pour les récepteurs LuxR-like des classes 1 et 2, pour l'obtention de leur conformation fonctionnelle suggère que ces récepteurs ne sont pas sensibles aux augmentations soudaines de concentration d'AHL dans l'environnement car la formation de complexes entre ces deux molécules est un processus relativement lent (Schuster, 2008). Il est en outre suggéré que l'affinité du ligand pour son récepteur est l'un des mécanismes mis en place pour s'adapter aux variations de concentration d'AHL. TraR, par exemple, est un récepteur de classe 1 qui reste actif pendant une longue période même quand l'AHL spécifique est éliminée du milieu (Luo et al., 2003b; Luo et al., 2003a), alors que LuxR, un récepteur de classe 2, est inactivé seulement quelques minutes après disparition de l'auto-inducteur du milieu (Kaplan and Greenberg, 1985).

Les structures de deux AHL synthases ont été caractérisées, LasI de *Pseudomonas aeruginosa* qui synthétise la N-3-oxo-dodecanoyl HomoSérine Lactone (OdDHL) et EsaI de *Pseudomonas stewartii* qui synthétise l'OHHL (Anthony et al., 2002; Gould et al., 2004a; Gould et al., 2004b). La comparaison des deux structures a permis de mettre en évidence que les domaines actifs, qui comprennent 74 acides aminés, sont très similaires alors que ces deux enzymes synthétisent deux AHL différentes (Anthony et al., 2002; Gould et al., 2004a; Gould et al., 2004b). Cependant, les sites de liaison des chaînes acyles diffèrent considérablement entre ces deux molécules. Le site de reconnaissance d'EsaI est inclus dans une cavité (Anthony et al., 2002) alors que le site de liaison au substrat de LasI est un tunnel allongé (Gould et al., 2004a; Gould et al., 2004b). Ces différences structurales suggèrent que EsaI peut uniquement utiliser des acyles à chaines courtes, à l'inverse, LasI n'a pas de restriction stérique sur la longueur de la chaine acyle (Anthony et al., 2002; Gould et al., 2004a; Gould et al., 2004b). Le mécanisme par lequel LasI sélectionne le substrat approprié n'est pas encore élucidé. Une hypothèse est que les acyles dont la chaine est supérieure à 12 carbones sont utilisés par la cellule pour d'autres processus comme la biosynthèse des lipopolysaccharides, ce qui en limite la disponibilité pour LasI (Gould et al., 2004a; Gould et al., 2004b). Tout comme LasI et EsaI, un grand nombre de LuxI-like utilisent le panel des acides gras intracellulaires comme source de substrat pour la synthèse des AHL.

Une exception est le système RpaI/RpaR nouvellement découvert, appartenant à la bactérie photosynthétique *Rodopseudomonas palustris*. Dans ce cas, l'auto-inducteur, la p-coumaroyl-HSL, est synthétisé à partir de l'acide coumarique obtenu de l'environnement extracellulaire (Schaefer et al., 2008). Le p-coumarate est le produit majoritaire de la dégradation de la lignine, il est suggéré que la p-coumaroyl-HSL est utilisée à la fois comme signal intra-espèce mais aussi entre les bactéries et les plantes (Schaefer et al., 2008).

Dans certains cas, la signalisation induite par l'AHL est transduite par une protéine senseur histidine kinase transmembranaire (Milton, 2006).

Le système d'AutoInducteur-3 (AI-3)

Les travaux de Sperandio et ses collègues en 2003, ont démontré l'existence d'un autre système de QS, le système AI-3 chez les *Escherischia coli* EntéroHémorragiques (ECEH) (Sperandio et al., 2003). Ces bactéries sont responsables d'infections gastriques sévères et de formation de lésions sur les cellules épithéliales intestinales appelées lésions d'attachement-effacement. Ces lésions, via la destruction des microvillosités, entrainent le réarrangement du cytosquelette de la cellule hôte afin de former des structures en piédestal capables d'accueillir individuellement les bactéries (Kaper et al., 2004). Les AI-3, dont la structure reste indéterminée à l'heure actuelle, sont impliqués dans la régulation de l'expression des facteurs de virulence notamment la mobilité et le système de sécrétion de type III responsable de l'injection des effecteurs de virulence directement dans la cellule hôte. Les gènes responsables de ces effecteurs sont présents dans un ilot de pathogènicité nommé LEE (Locus of Enterocyte Effacement).

L'adrénaline et la noradrénaline, des hormones de stress endocriniennes retrouvées chez les mammifères, peuvent remplacer AI-3 dans l'activation de l'expression des gènes de virulence chez les ECEH et l'action de ces trois molécules signal peut être bloquée par des antagonistes des récepteurs α et β adrénergiques (Sperandio et al., 2003). Ces bactéries n'expriment pas de récepteurs homologues aux récepteurs adrénergiques mammaliens. Ces signaux sont perçus par un récepteur histidine kinase, QseC (Clarke et al., 2006; Reading et al., 2009). Après détection d'un signal, QseC s'autophosphoryle puis transfère ce groupement phosphate aux régulateurs QseB, QseF et KdpE. A leur tour, ces régulateurs activent des

cascades de régulation complexes induisant l'expression des gènes de virulence (Clarke and Sperandio, 2005a, c, b) (Figure 16).

Des homologues de QseC ont été retrouvés chez 25 espèces différentes de bactéries (Rasko et al., 2008). La distribution de ce type de récepteur peut jouer un rôle majeur dans la colonisation ou/et la virulence avec une forte concentration de nor/adrénaline. Tout comme AI-3, l'adrénaline et la noradrénaline interagissent avec le même récepteur bactérien, AI-3 semble donc partager quelques éléments structuraux avec ces 2 catécholamines. On ignore si les AI-3 peuvent se lier à des récepteurs adrénergiques et altérer les fonctions de régulation des mammifères.

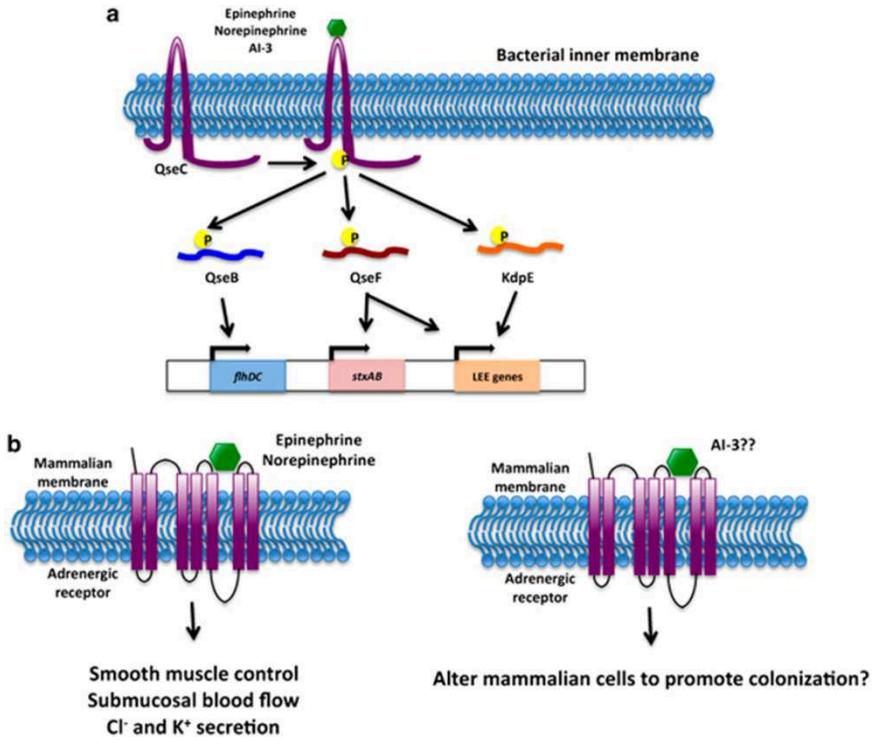


Figure 16: ***Reconnaissance de la noradrénaline, l'adrénaline et AI-3 par l'histidine kinase QseC.***
L'activation de Qsec induit son autophosphorylation, ce qui permet le transfert de ce groupement phosphate aux régulateurs QseB, QseF et KdpE. Ces régulateurs ainsi activés vont moduler l'expression génique (a). L'adrénaline et la noradrénaline se lient aux récepteurs adrénergiques et jouent un rôle dans le contrôle des muscles lisses, du flux sanguin et du relargage de chlore et de potassium (b).

b) Quorum Sensing chez les bactéries à Gram positif

Le système d'AutoInducteur Polypeptidique (AIP)

Les bactéries à Gram positif utilisent en majorité des peptides modifiés comme auto-inducteurs afin de contrôler l'expression des gènes (Havarstein et al., 1995; Ji et al., 1995; Solomon JM, 1996). Les membranes biologiques sont imperméables à ces peptides. La sécrétion des molécules de QS est effectuée par des transporteurs spécifiques. Les modifications post-traductionnelles apportées aux peptides néo-synthétisés sont souvent associées à la sécrétion (Magnuson et al., 1994; Havarstein et al., 1995; Solomon JM, 1996; Ji et al., 1997). Une différence majeure entre les systèmes de QS basés sur les AHL et ceux utilisant les peptides concerne la localisation des récepteurs. Alors que les récepteurs des systèmes de type LuxR-like sont en majorité cytoplasmiques, les senseurs des AIP sont liés à la membrane. Ces récepteurs, également appelés systèmes à deux composants, transduisent le signal via une cascade de phosphorylation (Hoch, 1995; Simon MI, 2007).

Un système à deux composants classique est composé d'un récepteur histidine kinase membranaire et d'un régulateur cytoplasmique ayant la fonction de régulateur transcriptionnel (Hoch, 1995; Inouye and Nakamura, 2003; Simon MI, 2007). La liaison du peptide au récepteur histidine kinase stimule son activité intrinsèque d'autophosphorylation. Il en résulte la phosphorylation, à l'aide de l'ATP, d'un résidu histidine. Ce groupement phosphate est ensuite transféré à un résidu aspartate conservé du régulateur. Le régulateur phosphorylé va alors se lier à l'ADN pour moduler l'expression de gènes. En général, les gènes codant le précurseur de l'auto-inducteur, le récepteur histidine kinase et le régulateur transcriptionnel forment un opéron dont l'expression est induite par le QS (Ji et al., 1995; Peterson et al., 2000) (Figure 17).

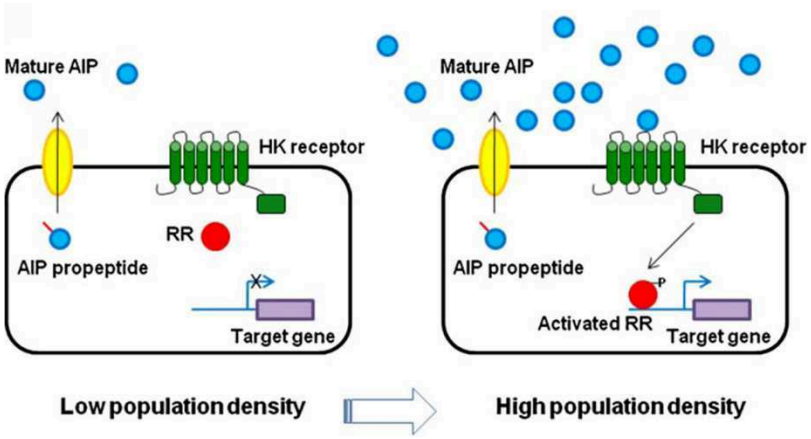


***Figure 17:* Principe du QS basé sur les AIP.**
Les AIP sont produits à partir de peptides immatures (Propeptides), qui sont ensuite modifiés avant la sécrétion par des transporteurs spécialisés. A haute concentration, les AIP se fixent aux récepteurs transmembranaires histidine kinases, qui à leur tour activent les régulateurs transcriptionnels. D'après Swati Choudhary et Claudia Schmidt-Dannert (Choudhary and Schmidt-Dannert, 2010).

Comme décrit pour les systèmes de QS utilisant les AHL, cette configuration produit une boucle de rétroaction positive et accélère la transition de l'état d'expression génique FDC à l'état de HDC. Le système ComD/ComE de *Steptococcus pneumoniae* qui stimule la compétence naturelle de cette bactérie(Pestova et al., 1996), le système AgrC/AgrA de *Staphylococcus aureus* qui contrôle les effecteurs de virulence (Ji et al., 1995) et le système ComP/ComA de *Bacillus subtilis* qui contrôle la compétence naturelle et la sporulation (Magnuson et al., 1994) sont des exemples de système de QS basés sur les oligopeptides. Chaque espèce de bactéries à Gram positif est capable de produire un peptide auto-inducteur avec une séquence unique, ce qui permet d'avoir un signal intra-espèce (Magnuson et al., 1994; Pestova et al., 1996; Novick and Geisinger, 2008).

c) Le système ubiquitaire Auto-Inducteur-2 (AI-2)

Il existe un système de QS très largement répandu au sein des bactéries, partagé à la fois par de nombreuses bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Ce système utilise des molécules signal qui sont des dérivés de la S-Adénosyl-Méthionine (SAM) comme le sont les AI-1.Un des sous-produits de la SAM, la S-Ribosyl-L-Homocystèine (SRH) est clivée en homocystèine et en 4,5-Dihydroxy-2,3-PentaDione (DPD). Le DPD se cyclise spontanément en réagissant avec du borate, donnant alors des dérivés furanones (Miller ST, 2004). LuxS, l'enzyme responsable de cette conversion a été découverte à l'origine chez l'organisme *Vibrio*

harveyi chez qui AI-2 est impliqué dans la régulation de la bioluminescence. Des homologues du gène *luxS* ont été identifiés chez plus de 70 espèces différentes de bactéries (Schauder et al., 2001; Winzer et al., 2002b; Xavier and Bassler, 2003; Sun, 2004; Vendeville et al., 2005). Le clivage de SRH par LuxS est une part intégrant d'une voie métabolique, le métabolisme de la méthionine, qui sert à recycler l'homocystèine issue de la SAM pour maintenir une biosynthèse de méthionine. La modification de LuxS peut entrainer, selon l'organisme, une atténuation du QS ou/et du métabolisme (Winzer et al., 2002a; Xavier and Bassler, 2003; Vendeville et al., 2005; Hardie and Heurlier, 2008).

Deux systèmes différents de reconnaissance des AI-2 ont été décrits. Le premier, décrit chez *Vibrio harveyi*, utilise comme molécule signal, le diester furanosyl borate, un des seuls composés organiques décrits contenant du bore. Dans ce système, AI-2 se lie dans le périplasme à un récepteur spécifique, LuxP. Le complexe AI-2/LuxP réagit ensuite avec le récepteur kinase LuxQ, ce qui déclenche une cascade de phosphorylation qui va inhiber la répression exercée par le régulateur LuxO sur la production de la luciférase et donc la bioluminescence. Chez les souches pathogènes de *Vibrio cholerae*, LuxO inhibe la production du régulateur transcriptionnel HapR à FDC, ce qui empêche l'expression d'effecteurs de virulence (Zhu et al., 2002) (Figure 18).

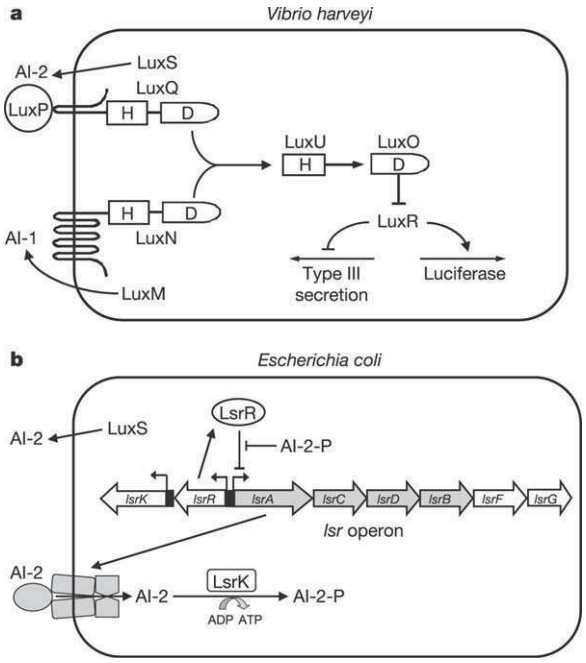


***Figure 18:* Schéma illustrant le quorum Sensing chez Vibrio harveyi.**
AI-1 et AI-2 sont détectés, respectivement, par LuxN et Lux PQ. L'information est transduite par phosphorylation (a).Quorum Sensing de type AI-2 chez E. coli (b).

Chez la souche *V. cholerae* El Tor, 23 gènes régulés par le facteur transcriptionnel HapR ont été identifiés. Parmi ces gènes, on trouve des protéines à domaine HD-GYP, des phosphodiestèrases qui dégradent le GMP cyclique dimèrique (di-GMPc), un messager secondaire intracellulaire (Hammer and Bassler, 2009). Le di-GMPc est impliqué dans la synthèse des exopolysaccharides et dans la formation des biofilms chez de nombreuses bactéries (Boyd and O'Toole, 2012).

Un autre système de reconnaissance d'un AI-2 est présent chez *Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium*. Ces bactéries importent leur AI-2 par un mécanisme similaire à la capture du ribose par le système *rbs* via une haute affinité pour ce sucre et sa phosphorylation (Taga et al., 2001). Le système Lsr, homologue du système rbs, se distingue du système LuxP/LuxS, par le fait que ce système est régulé par LuxS, qui induit le transport de l'AI-2 dans le cytoplasme de la cellule. Le processus commence par la reconnaissance de la molécule signal, la (2*R*,4*S*)-2-méthyl-2,3,3,4-tétrahydroxytétrahydrofurane (*R*-THMF), par le récepteur périplasmique LsrB qui se lie avec cette molécule. Une fois la liaison effectuée avec le transporteur, LsrABC, le transfert de l'AI-2 dans le cytoplasme est effectué. AI-2 est ensuite phosphorylé par LsrK. Ainsi phosphorylé, cette molécule signal va réagir avec le répresseur transcriptionnel LsrR qui réprime l'expression de l'opéron *lsr* (Taga et al., 2001) (Figure 18). Il semble que la forme phosphorylée de l'AI-2 régule également d'autres opérons (Taga et al., 2001).

Le système LuxS/AI-2 a été détecté chez un grand nombre de bactéries à Gram positif et à Gram négatif, ce qui indique que le système AI-2 permet la communication entre un grand nombre d'espèces (Xavier and Bassler, 2003). Les communautés microbiennes sont souvent de nature complexe, ce système de QS peut être utilisé afin de coordonner la formation du biofilm entre différents genres bactériens.

Le rôle du système AI-2 dans la pathogènicité des bactéries autres que *Vibrio spp* est mal connu. Des études portant sur des mutants LuxS-like chez des ECEH ont démontré une diminution de l'expression des pili et du système de sécrétion de type III. Il a de plus été démontré que l'AI-2 phosphorylé ou non ne peut agir seul sur l'expression des gènes (Sperandio et al., 1999; Sperandio, 2001; Sperandio et al., 2001).

3) Communication entre les différents domaines

Les bactéries représentent la forme de vie la plus abondante sur Terre et en tant que telles, elles ont un impact sur les habitats et les modes de vie des autres organismes vivants. Des millénaires de co-évolution entre pro et eucaryotes ont stimulé le développement de communications et de signaux entre les représentants des différents domaines permettant ainsi le développement de relations de parasitisme, de commensalisme ou de symbiose. Les membres de chaque domaine produisent des molécules similaires à des hormones responsables de la communication cellulaire. Ceci est fondamental pour concevoir que les membres de n'importe quel domaine sont capables de répondre à des signaux produits par ceux des autres domaines (Fox, 2004; Rumbaugh, 2007). Les auto-inducteurs bactériens ne sont pas limités au seul rôle de communication inter et intra-espèces chez les bactéries, ils peuvent également modifier le comportement des organismes eucaryotes. Mais les eucaryotes peuvent également manipuler les signaux et les comportements bactériens par mimétisme moléculaire en utilisant des cytokines, des hormones ou des neurotransmetteurs. Les auto-inducteurs peuvent être perturbés voire dégradés par des enzymes ou par l'action de molécules antagonistes qui bloquent le QS. (Bauer and Mathesius, 2004; Rasmussen and Givskov, 2006b, a; Kendall and Sperandio, 2007; Williams, 2007).

Il existe toute sorte d'interactions entre les procaryotes et les eucaryotes. Parmi les symbioses les mieux caractérisées, on trouve les bactéroides, des bactéries présentes au sein de nodules racinaires qui permettent la fixation du N_2 (Gonzalez and Marketon, 2003).

Chez les mammifères, il y a plus de bactéries commensales que de cellules de l'hôte. Chez les humains, la symbiose qui existe entre l'homme et sa microflore commensale est essentielle pour l'assimilation des nutriments et pour le développement du système immunitaire inné (Hooper and Gordon, 2001; Hughes and Sperandio, 2008). A l'heure actuelle, il y a peu de preuves directes d'interactions coopératives. Fujiya et ses collègues, (2007) ont démontré que des cellules épithéliales $Caco_2$ exposées à des surnageants de cultures de bactéries probiotiques (bactéries utilisées dans les compléments alimentaires connues pour avoir des effets bénéfiques dans le traitement préventif d'un grand nombre de maladies, (Hong et al., 2005)) comme *Bacillus subtilis,* induisent l'expression de la protéine de protection cellulaire Hsp27 (Heat shock protein) (Fujiya et al., 2007). La surexpression de Hsp27 est liée à la présence de peptides signaux de QS et cette induction confère une protection vis-à-vis de

bactéries pathogènes au niveau intestinal, ce qui assure à la bactérie probiotique un environnement stable riche en nutriments.

Il a récemment été démontré que les AHL miment des signaux eucaryotes ayant des effets négatifs sur la croissance de lignées cellulaires cancéreuses. La thymidylate synthase (TS) joue un rôle clé dans la synthèse de l'ADN via la production d'un précurseur de la thymidine triphosphate. Le 5-fluorouracil est un inhibiteur de cette enzyme et est utilisé depuis des décennies pour traiter des tumeurs (Curreri and Ansfield, 1958; Curreri et al., 1958). Il existe des résistances à ce composé liées à la surexpression de la TS. L'expression et le fonctionnement de la TS sont affectés par *rTS*, qui code pour un ARN antisens et pour deux sous-unités protéiques, rTSα et β (Dolnick, 1993; Dolnick and Wu, 1993; Dolnick and Black, 1996; Dolnick et al., 1996). Les AHL perturbent l'activité de la TS, effet qui semble dû à une similarité structurale avec rTSβ issu du métabolisme de la S-adénosylméthionine (Dolnick, 2005). L'étude de Dolnick et ses collègues (2005) a démontré qu'en présence d'OdDHL produite par *P. aeruginosa*, la croissance de cellules de cancer colorectal (H630) est diminuée de 50%. De plus, cet auto-inducteur semble augmenter l'efficacité du 5-fluorouracil et du Taxol, ce qui met en avant le potentiel thérapeutique des molécules de QS (Dolnick et al., 2005). Un criblage des AHL a mis en évidence que cet effet requiert la longue chaine acyle de la OdDHL avec la substitution 3-oxo pour avoir une activité maximum (Oliver et al., 2009).

De plus, il a été démontré que ce même auto-inducteur prévient l'invasion et la destruction du tissu pancréatique par les monocytes dans le cas de diabète de type I chez les souris (Pritchard et al., 2005), suggérant l'utilisation possible de ces molécules dans le traitement de cette maladie auto immune. L'OdDHL produite par *P. aeruginosa*, responsable d'infections pulmonaires, permet à l'origine l'expression des effecteurs de virulence par la bactérie et la modification de la réponse inflammatoire et immunitaire de l'hôte (Hooi et al., 2004; Cooley et al., 2008).

B) Le Quorum Sensing chez *Legionella*

Les bactéries à Gram négatif utilisent en majorité un système de QS basé sur les AHL ou leurs dérivés accompagné d'une communication inter-espèces via les AI-2.

Chez *Legionella pneumophila*, un seul et unique système a été découvert (Figure 19). Le fonctionnement et les mécanismes de ce système de QS sont similaires à ceux décrits chez

Vibrio cholerae. Cette communication est basée sur des molécules assimilées aux AI-1, qui ne sont pas des AHL mais des α-HydroxyCètones (AHC) (Tiaden et al., 2007; Spirig et al., 2008).

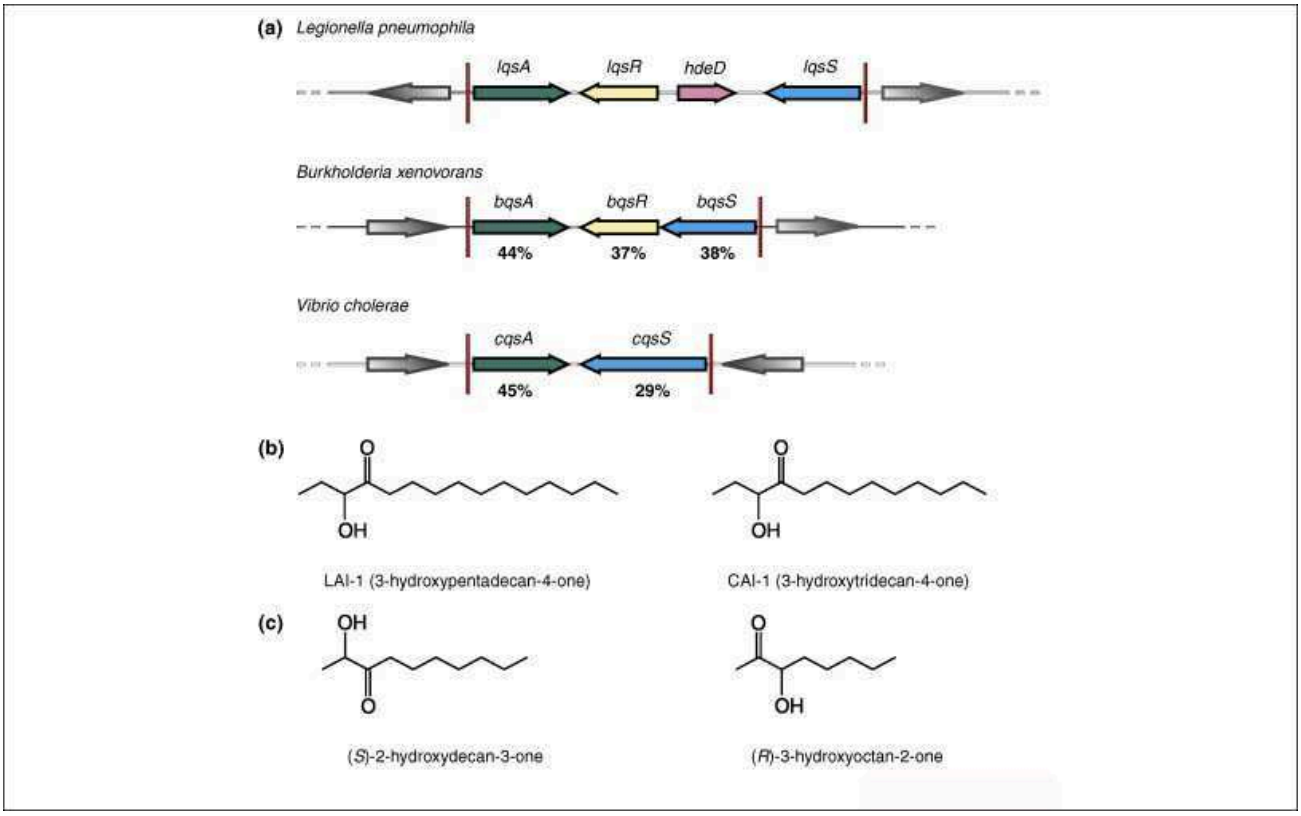


Figure 19:* Groupe de gènes de *Quorum sensing* lqs, bqs, cqs, *molécules AHC et phéromones d'insectes similaire aux AHC.
Alignement des groupe de gènes homologues de Quorum Sensing de L. pneumophila *(lqs),* Bukholderia xenovorans *(bqs) et* V. cholerae *(cqs). Le pourcentage d'homologie des différentes protéines avec celles de* L. pneumophila *est indiqué. lqsA et lqsS sont transcrit de manière opposée (a). Structures des molécules de signalisation LAI-1 et CAI-1, des α-hydroxycètones produites par* L. pneumophila *et* V. cholerae *respectivement (b). Phéromones d'insecte (c) ressemblant à LAI-1 et CAI-1. D'après Tiaden et al, 2010.*

Les éléments génétiques codant les protéines responsables de cette communication sont contenus dans un groupe de gènes appelé *lqs* pour *Legionella* Quorum Sensing. Parmi ces gènes, on trouve *lqsA*, qui code pour la synthase de l'auto-inducteur de *Legionella* (LAI-1), la 3-hydroxypentadecan-4-one (Figure 19). Les gènes *lqsS* et *lqsR* codent respectivement, pour le récepteur kinase et le régulateur de la réponse au QS. Le gène *hdeD* code pour une protéine similaire à une protéine d'*E. coli* dont la fonction n'est pas connue. Ces 4 gènes sont transcrits de manière divergente à partir de promoteurs individuels (Sahr et al., 2012).

1) LqsA : la synthase de LAI-1

Le gène *lqsA* est retrouvé chez toutes les *L. pneumophila* dont le génome est séquencé et quelques isolats cliniques et environnementaux (Cazalet et al., 2004; Chien et al., 2004; Glockner et al., 2008; Spirig et al., 2008). Le gène *lqsA* n'a pas pu être détecté par PCR chez les autres souches et est absent du génome de *L. longbeachae* (Cazalet et al., 2010)qui ne possède aucun des gènes du groupe *lqs*.

La synthase LqsA présente 45% d'homologie avec CqsA, la synthase présente chez *V. cholerae* (Tiaden et al., 2007) nécessaire à la synthèse de CAI-1 (Figure 19). Les résidus de lysine, Lys 236 (CqsA) ou Lys 258 (LqsA), sont capables de lier de façon covalente la co-enzyme pyridoxal-5'-phosphate (Spirig et al., 2008; Jahan et al., 2009; Kelly et al., 2009). Un mutant du gène *cqsA* peut être partiellement complémenté par le gène *lqsA*, ce qui indique une similarité fonctionnelle entre ces synthases (Spirig et al., 2008).

LqsA produit une molécule signal diffusible et volatile qui peut être purifiée par expression hétérologue chez *E. coli* (Miller et al., 2002; Spirig et al., 2008). Cette méthode a permis de produire de grandes quantités de LAI-1, ce qui a permis l'identification de la molécule (Higgins et al., 2007; Spirig et al., 2008). C'est le second composé biologique 3-hydroxy-4-cétone identifié, le premier étant CAI-1.

D'autres AHC à courtes chaines (de 6 carbones à 10 carbones) sont utilisées comme phéromones chez des insectes (Higgins et al., 2007) (Figure 19).

Un mutant délété du gène *lqsA* présente uniquement un léger défaut d'infection d'hôtes par rapport à la souche sauvage. Ce mutant ne présente pas de modification de la formation de biofilm et la production de filaments extracellulaires (Tiaden et al., 2010). Ces études démontrent que LAI-1 induit la virulence chez *L. pneumophila* alors que chez *V. cholerae*, CAI-1 la réprime (Miller et al., 2002; Higgins et al., 2007).

2) LqsS : le récepteur histidine kinase

Le ou les ligands activant LqsS de *L. pneumophila* sont actuellement inconnus. Mais la proximité physique de *lqsS* et *lqsA* dans tous les génomes séquencés à ce jour ainsi que les données du transcriptome suggèrent que LqsS et LqsA participent au même circuit de régulation et que LAI-1 est un ligand pour LqsS (Cazalet et al., 2004; Chien et al., 2004; Glockner et al., 2008; Tiaden et al., 2010). LqsS reconnait vraisemblablement des ligands

AHC et la transduction du signal se fait par un système à deux composants. La liaison de la molécule signal au récepteur (senseur) s'effectue via des domaines formés par six hélices transmembranaires. LqsS ne possède pas de domaine aspartate receveur, il fait donc partie de la classe I des récepteurs histidines kinases. Une fois LqsR activé, sa partie C-terminale s'autophosphoryle et peut directement ou indirectement, transférer le radical phosphate au domaine aspartate-récepteur du régulateur LqsR ou à d'autres régulateurs encore inconnus (Figure 20).

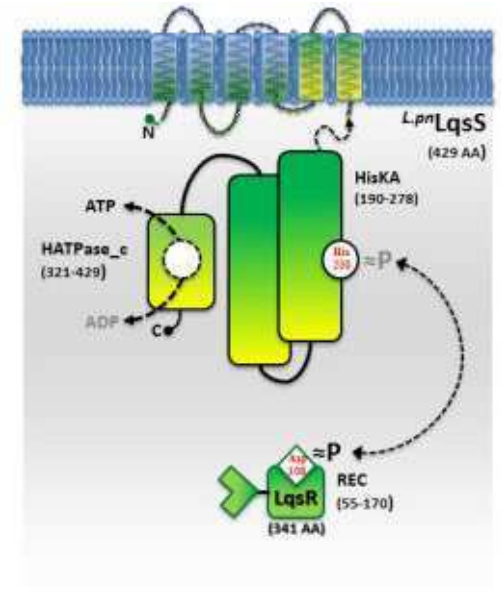


Figure 20: ***Le récepteur LqsS de*** **Legionella pneumophila.**
Le récepteur LqsS (classe I) de Legionella pneumophila *présente en C-terminal un domaine histidine kinase, qui est autophosphorylé après liaison de l'AHC. Ce domaine transfère directement ou indirectement le groupement phosphate sur l'aspartate receveur de LqsR ou d'autres régulateurs. D'après Tiaden et al, 2012.*

Le mutant de *L. pneumophila* délété pour le gène *lqsS* est incapable d'infecter des hôtes. De plus, ce mutant, présente une sensibilité réduite au NaCl et une réduction de la production de filaments extracellulaires (Tiaden et al., 2010).

3) LqsR : le régulateur transcriptionnel

Les signaux AHC sont liés chez *Legionella* aux systèmes de régulation de la phase stationnaire via LqsR. La production de LqsR nécessite RpoS, et dépend, dans une moindre proportion du régulateur LetA (Tiaden et al., 2007). De plus, LqsR est régulé au niveau post-transcriptionnel par les ARN antisens Rsm YZ et CsrA (Sahr et al., 2009). LqsR présente au

niveau N-terminal, un domaine aspartate-receveur conservé alors que la partie C-terminale ne présente aucune homologie avec des domaines connus (Figure 20). LqsR semble donc être le premier membre d'une nouvelle famille de régulateurs. Un mutant, délété du gène *lqsR*, entre en phase exponentielle avec une période de latence plus importante que la souche sauvage et n'exprime pas les caractères de la forme transmissive. De plus, ce mutant est plus résistant au NaCl, moins bien internalisé et se réplique plus faiblement chez les amibes et les macrophages. Il semble également moins toxique et moins apte à former des LCV chez ses hôtes. Ce mutant présente en outre un défaut de sédimentation et de production de filaments extracellulaires (Tiaden et al., 2010). Une souche pour qui le groupe de gènes *lqs* a été supprimé (*lqsA-lqsR-hdeD-lqsS*), présente une forme filamenteuse en phase stationnaire et est incapable de parasiter ses hôtes eucaryotes (Tiaden et al., 2008). Les effets des mutations sont plus marqués chez le mutant de tous les gènes *lqs* que pour le seul *lqsR*, ce qui suggère que ces gènes agissent de façon synergique.

La surexpression de LqsR retarde aussi l'entrée en phase exponentielle et la bactérie présente une forme filamenteuse. Alors que la surexpression de LqsA chez un mutant de *Legionella* dépourvu des gènes *lqsS* et *lqsR*, entraine une virulence égale à celle de la souche sauvage. Ces résultats suggèrent qu'il existe une redondance des systèmes de réponse à LAI-1 pour moduler l'expression des effecteurs de virulence, de sédimentation et de production d'exopolymères (Tiaden et al., 2010).

4) La protèine HdeD

Chez *E. coli*, la protéine membranaire HdeD, est encodée dans un ilot jouant un rôle dans la résistance à l'acidité (Mates et al., 2007; Tiaden et al., 2007). La fonction de HdeD chez *L. pneumophila* est inconnue, le gène codant cette protéine interrompt la convergence de transcription des gènes *lqsS* et *lqsR* (Tiaden et al., 2007). Par conséquent, il est possible que *lqsS* et *lqsR* soient issus d'un grand gène unique ancestral qui a été divisé par le gène *hdeD* lors d'événements de recombinaison.

5) La modulation génique par le système lqs

Des gènes similaires à *lqsA*, *lqsS* et *lqsR*, responsables de la communication chez *L. pneumophila* sont retrouvés chez un grand nombre de bactéries environnementales comme

Nitrococcus mobilis, *Burkholdheria xenovorans* et *Polaromonas spp* (Tiaden et al., 2007; Spirig et al., 2008; Tiaden et al., 2008; Tiaden et al., 2010). Il semble que les AHC sont utilisées comme mode de communication principal chez les membres des familles *Legionellaceae* (*Legionella* spp), *Vibrionaceae* (*Vibrio* spp, *Photobacterium* spp), *Bukholderiaceae* (*Burkholderia* spp, *Cupravidus* spp) et Chlorobiaceae (*Chlorobium* spp, *Prostheochloris* spp). A l'heure actuelle, les données sont insuffisantes pour savoir si ce système permet une communication intra-espèce et également inter-espèce et si les AHC sont reconnues par d'autres bactéries (Tiaden et al., 2007).

Le système *lqs* permet d'activer l'expression de gènes durant la phase stationnaire ou en HDC, permettant ainsi l'expression d'effecteurs de virulence, de motilité et de résistance aux stress (Figure 21).

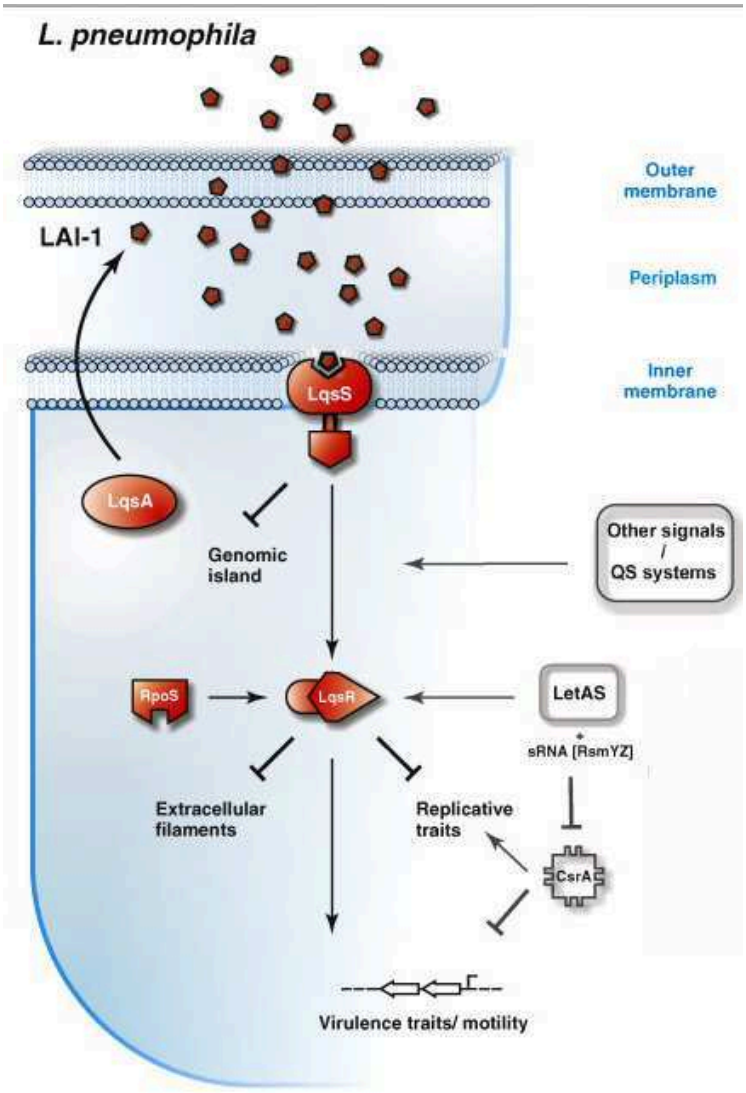


Figure 21: ***Le système de régulation par les AHC chez*** **Legionella pneumophila.**
Le système de régulation à AHC est lié à la phase stationnaire et comprend la synthase de l'auto-inducteur LAI-1, LqsA, le récepteur histidine kinase, LqsS et le régulateur de réponse, LqsR. D'après Tiaden et al, 2010.

Afin de déterminer quels gènes sont régulés par le système *lqs*, Tiaden et ses collègues ont réalisé des comparaisons d'expression de transcrits entre la souche sauvage de *L. pneumophila* en phase stationnaire (référence), des mutants délétés pour chacun des gènes *lqs* (*lqsA*, *lqsS* ou *lqsR*) et pour le groupe entier et pour une souche surexprimant LqsA (Tiaden et al., 2007; Tiaden et al., 2008; Tiaden et al., 2010). Ces travaux ont révélé que l'absence du groupe de gènes *lqs*, ou dans une moindre mesure, la suppression de *lqsS* et de *lqsR*, modifie l'expression des gènes impliqués dans la virulence, la mobilité et dans la croissance de la bactérie. De plus, LqsS et LqsR jouent un rôle important dans la transition de la forme réplicative à la forme transmissive.

La suppression de *lqsS* modifie l'expression d'environ 300 gènes. En absence de *lqsS*, les gènes codant des substrats du système Dot/Icm, des régulateurs transcriptionnels et des composants des pili sont sous-exprimés. Fait intéressant, 52 des gènes surexprimés en l'absence de *lqsS* sont présents dans une zone du génome de 133 kb contenant la plupart des gènes codant des effecteurs de virulence. Cette région est surnommée « ilot de pathogènicité ». La surexpression de LqsA induit l'expression de 19 gènes voisins de cette région, ce qui suggère que LqsA et LqsR régulent la même voie. Cette région de 133 kb encadrée par des éléments de transposition, a un taux de Guanine et de Cytosine supérieur à celui du reste du génome (Tiaden et al., 2010). Ces éléments semblent suggérer que cette région a été acquise par transfert horizontal (Dobrindt et al., 2004). L'absence de LqsR ne modifie pas la régulation des gènes de cette zone, ce qui laisse supposer que LqsR et LqsS régulent des voies distinctes.

6) LqsT : un nouveau récepteur de QS

Dans une précédente étude, Tiaden et ses collègues (2010), ont montré qu'une surexpression de LqsA restaure le phénotype sauvage chez un mutant délété de *lqsS*, suggérant l'existence d'un autre récepteur kinase (Tiaden et al., 2010). Celui-ci a été mis en évidence très récemment par la même équipe, et nommé LqsT (Kessler et al., 2013) (Figure 22).

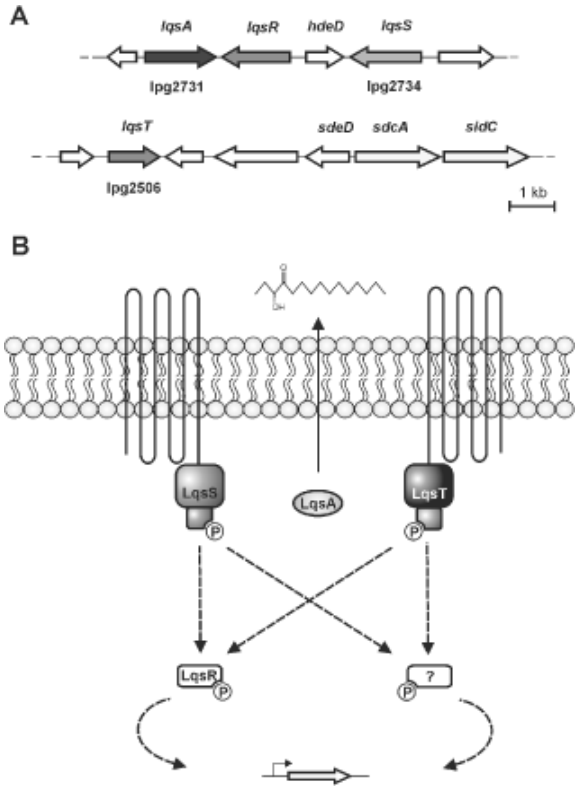


Figure 22: ***Le groupe de gènes* lqs *et le système de QS basé sur LAI-1.***
Carte du groupe de gènes lqs (lpg2731-2734) et lqsT (lpg2506) chez Legionella pneumophila*. Le groupement lqs comprend le gène codant pour l'auto-inducteur synthase, lqsA, pour le récepteur histidine kinase, lqsS, pour une protéine de fonction inconnue hdeD et pour le régulateur transcriptionnel, lqsR. Le gène du récepteur kinase « orphelin » LqsT est situé à proximité des gènes des effecteurs SdeD, SdcA et SidC (A). Schéma du système de régulation via le Quorum Sensing chez* L. pneumophila*. L'a-hydroxycétone (AHC) de signalisation, la 3-hydroxypentadecane-4-one, LAI-1, est produite par LqsA et détectée par les récepteurs kinases LqsS et LqsT, qui transmettent le signal au régulateur LqsR ou/et à d'autres régulateurs de réponse. Les flèches en pointillés indiquent les hypothétiques interactions. D'après Kessler et al, 2013.*

Dans cette étude, un mutant délété des gènes *lqsS* et *lqsT* a été réalisé, celui-ci présente une résistance au NaCl et le phénotype sauvage ne peut être restauré par la surexpression de LqsA. Le phénotype de ce mutant peut être restauré par l'addition d'un plasmide contenant *lqsS* ou *lqsT*. Ces résultats suggèrent qu'il existe seulement deux récepteurs à LAI-1 et qu'ils sont redondants. La présence de deux récepteurs à une AHC est unique parmi les organismes utilisant ce système. LqsT présente 31% d'homologie avec LqsS, une structure semblable et un même mode de fonctionnement. Les mutants pour chacun des gènes histidines kinases (*lqsS* ou *lqsT*) présente le même phénotype mais a une intensité différente, ce qui suggère l'existence de plusieurs régulateurs (Kessler et al., 2013). La délétion de *lqsT* entraine l'inhibition de l'expression de 105 gènes, alors que 90 % de ces gènes (95) sont surexprimés par la délétion de l*qsS*. LqsT et LqsS apparaissent comme des senseurs antagonistes, ce qui est

une première dans les mécanismes de QS. Ces deux récepteurs sont exprimés pendant la phase stationnaire. Un homologue de LqsT, nommé BaeS, est codé par toutes les *Legionella* spp notamment chez *L. longbeachae* NSW150, D-4968 (71% d'homologie) mais aussi chez les LLAPs, *L. dumoffii* et *L. drancourtii* (58% d'homologie). Cette découverte permet d'émettre l'hypothèse que LqsT ou son homologue sont utilisés pour la communication inter-espèces et qu'il a été acquis par transfert horizontal entre bactéries intracellulaires (Tiaden et al., 2008; Tiaden et al., 2010; Kessler et al., 2013).

Legionella ne semble posséder qu'un seul système de QS alors que les *Vibrio* spp possèdent 2 ou 3 systèmes de communications dont les AHC (Miller et al., 2002; Henke and Bassler, 2004a).

Matériels et Méthodes

A) Souches et conditions de cultures

1) Souches et plasmides

a) Légionelles

Les différentes espèces et souches de légionelles employées sont listées dans le tableau 1. La souche de référence utilisée dans notre étude est *L. pneumophila* sérogroupe 1 Lens HL 0350 5056, à l'origine, en 2003, d'une épidémie dans la région de Lens (France), pour laquelle 90 cas ont été déclarés dont 17 se sont révélés mortels.

Les plasmides utilisés sont PSW001 et pMMB207-KM14-GFPc (MDE) codant pour des protéines fluorescentes, respectivement la DsRed et la GFP mut2, ainsi qu'un gène de résistance pour le chloramphénicol.

***Tableau 1*: Liste des souches et des espèces de légionelles utilisées.**

Souches	Références[a]
Legionella pneumophila Lens HL 0350 5056	CNRL
Legionella pneumophila Lens HL 0350 5056 + PSW001	Cette étude
Legionella pneumophila Lens HL 0350 5056 + pMMB207-KM14-GFPc	Cette étude
Legionella pneumophila Paris LG03	MDE
Legionella pneumophila Paris LG03 + pMMB207-KM14-GFPc	MDE
Legionella pneumophila Corby	MDE
Legionella pneumophila Chicago ATCC 32215	MDE
Legionella pneumophila Bloodmington ATCC 33155	MDE
Legionella oakridgensis ATCC 33761	MDE
Legionella anisa HL 0308 4009	MDE
Legionella longbeachae ATCC 33484	MDE

[a] : CNRL = Centre National de Référence des Légionelles, MDE = équipe de Microbiologie de l'Eau de l'UMR7267.

b) Bactéries non-légionelles

Les autres bactéries utilisées dans ce travail sont listées dans le tableau 2.

***Tableau 2*: Liste des bactéries non-légionelles utilisées.**

Souches	Références[a]
Aeromonas hydrophila LMG 2844	Library of Microbiology Universiteit Gent
Escherichia coli LMG 2092	Library of Microbiology Universiteit Gent
Flavobacterium breve LMG 4011	Library of Microbiology Universiteit Gent
Pseudomonas aeruginosa LMG 1242	Library of Microbiology Universiteit Gent
Chromobacterium violaceum CV026	Dr Amy Pham, Australie, Université de South Wales
Escherichia coli XL1Blue + PSW001	MDE
Escherichia coli XL1Blue + pMMB207-KM14-GFPc	MDE

[a] : MDE = équipe de Microbiologie de l'Eau de l'UMR7267.

c) Amibe

La souche d'amibe ayant servi pour cette étude est la souche environnementale *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30254.

d) Cilié

Le protozoaire cilié employé est la souche environnementale *Tetrahymena tropicalis* fournie par le Pr. R. Garduno (Department of Microbiology and Immunology, Dalhousie University, Halifax, Canada).

2) Conditions de culture

a) Légionelles

Les légionelles sont cultivées à 37°C en milieu liquide BYE (*Buffered Yeast Extract*) ou sur milieu gélosé BCYE (*Buffered Charcoal Yeast Extract*). Le milieu BYE est composé, pour 1 litre, de 5 g d'ACES, de 10 g d'extrait de levure puis est équilibré avec du KOH 10 N à pH 6,9. Après stérilisation par filtration à 0,22 µm, le milieu est complémenté avec de la L-cystéine filtrée à 0,4 g/L (concentration finale) et du pyrophosphate de fer filtré à 0,25 g/L (concentration finale).

Le BCYE est préparé, à partir de BYE non filtré, par ajout de charbon actif à 2 g/l, afin d'éliminer les toxines produites lors de l'autoclavage, et d'agar à 15 g/L. Le milieu est autoclavé à 120°C pendant 15 minutes puis complémenté avec de la L-cystéine et du pyrophosphate de fer comme indiqué précédemment. Quand cela est nécessaire, du chloramphénicol est ajouté à la concentration finale de 10 µg/mL en milieu solide et 5 µg/mL en milieu liquide.

Un mélange de Glycine, Vancomycine, Polymyxine b et de Cylcloheximide est ajouté au milieu BCYE afin d'obtenir le milieu GVPC (Oxoid). Cette gélose sélective pour *Legionella* est destinée au dénombrement, à l'isolement et à la culture des espèces de *Legionella* dans les eaux et les autres prélèvements susceptibles d'en contenir.

Ces bactéries sont conservées en glycérol à 30 % à -20°C pour une utilisation courante et à -80°C pour une conservation à long terme.

b) Non-légionelles

Les souches d'*Escherichia coli* XL1 Blue sont cultivées en erlenmeyer d'1 litre dans 200 mL de milieu LB (Lysogeny Broth*)* liquide sous agitation à 200 rpm pendant 24 heures à 37°C. L'inoculation du milieu est effectuée à partir de colonies isolées sur LB gélosé. La culture est réalisée en présence de chloramphénicol à 10 µg/mL en milieu solide et à 5 µg/mL en milieu liquide. Le milieu LB est composé de 10 g/L de peptone, de 5 g/L d'extrait de levure et de 5 g/L de NaCl. Il est autoclavé 15 min à 120°C avant utilisation.

Les 4 souches obtenues à partir de la collection LMG (Tableau 2), *Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Flavobacterium breve*, sont cultivées en milieu BHI (Brain Heart Infusion) liquide pendant 24 heures à partir de colonies isolées issues d'une préculture sur milieu BHI solide. Lors de la préparation des milieux solides, 15 g/L d'agar sont ajoutés. Les souches *E. coli* et *P.aeruginosa* sont incubées à 37°C sous agitation à 200 rpm en tubes de 50 mL avec 10 mL de milieu. *A. hydrophila* et *F. breve* sont cultivées à 30°C sans agitation en tube de 50 mL dans 10 mL de milieu.

Chromobacterium violaceum CV026 est cultivé en milieu liquide sans agitation à 30°C. Ce milieu est composé de 10 g/L de tryptone et 5 g/L d'extrait de levure, 15 g/L d'agar sont ajoutés en cas de préparation de milieu solide. Il est stérilisé par autoclavage 20 min à 120°C.

Ces bactéries sont conservées en glycérol à 30 % à -20°C pour une utilisation courante et à -80°C pour une conservation à long terme.

c) Amibes

La culture est réalisée à 25°C à l'obscurité dans des flasques de 75 cm² (Nunc) et de 500 cm² (Nunc) traitées pour la culture cellulaire contenant respectivement, 15 mL et 200 mL de milieu PYG. Le PYG est composé de tampon amibe dans lequel, 20 g/L de protéose peptone et 1 g/L d'extrait de levure sont ajoutés. Le tampon amibe est composé de 1 g/L de citrate de sodium, de 10 mL/L d'une solution 0,4 M de $MgSO_4$, 10 mL/L d'une solution 0,25 M de Na_2HPO_4, 8 mL/L d'une solution 0,05 M de $CaCl_2$ et 10 mL/L d'une solution 0,25 M de KH_2PO_4. Avant autoclavage de 20 minutes à 120°C, le pH est ajusté à 6,5 avec du NaOH 1 M. Le milieu est conservé à 4°C à l'obscurité. Avant utilisation, 10 mL/L de $(NH_4)2FEII(SO_4)^2$ 5 mM stérile et pour le PYG, en plus, sont ajoutés 50 mL de Glucose à 2 M stérile ainsi que de la Gentamycine et de la Kanamycine à 25 µg/mL finale.

d) Ciliés

La culture de *Tetrahymena tropicalis* est réalisée dans le milieu PCB (Plate Count Broth) composé de 5 g/L d'extrait de levure, de 10 g/L de tryptone et de 2 g/L de glucose dans des tubes de 50 mL. Le pH du milieu est ajusté à 7 avec du KOH 1 M puis autoclavé 30 minutes à 120°C. 10 µL d'une culture de *T. tropicalis* sont transférés dans 5 mL de PCB

stérile. Les ciliés sont mis à incuber 2 jours à l'obscurité à 30°C, puis un volume de milieu est ajouté. Cette étape est répétée 3 fois afin d'obtenir un volume utile de 40 mL.

La conservation à long terme se fait dans des tubes contenant un milieu de culture gélosé « Biphasic Medium » sur lequel de l'eau ultrapure (MilliQ) est ajoutée pour laisser diffuser lentement le milieu nutritif afin de minimiser la vitesse de croissance du protozoaire. Ce milieu est composé de 8 g/L de dextrine, de 5 g/L d'extrait de levure, de 0,6 g/L d'acétate de sodium trihydraté, de 0,6 g/L de concentré de foie, de 3 g/L de bacto casitone, de 2 g/L d'acides casaminés et de 16 g/L d'agar. Le pH est ensuite ajusté à 7,3 avec du KOH 1 M puis le milieu est autoclavé 30 minutes à 120°C. La culture est conservée à 18°C à l'obscurité.

e) Légionelles Post-Culture (PC)

Les légionelles sont cultivées de manière à produire des cellules non filamenteuses. Elles sont obtenues d'après le protocole du CNRL de Lyon modifié (Koubar et al., 2011; Koubar et al., 2013). Une boite de BCYE est ensemencée avec des légionelles conservées à -20°C, et incubée 3 jours à 37°C. Ensuite, 3 colonies sont resuspendues ensemble dans 5 ml de BYE et incubées à 37°C pendant 3 jours dans un tube de 50 mL. Des boites de BCYE sont ensemencées à raison de 100 µL de préculture par milieu gélosé. Après 48 heures d'incubation à 37°C, le tapis bactérien est repris dans 10 mL d'eau minérale (Eau Evian) stérile. Cette suspension est utilisée pour inoculer un erlenmeyer de 500 mL contenant 90 mL de BYE à 10% dans l'eau minérale stérile. Après 12 heures à 37°C sous agitation (150 rpm), la suspension est centrifugée 10 minutes à 4 500 g à 25°C. Le surnageant est éliminé et le culot est lavé 2 fois avec de l'eau minérale stérile. Le culot est repris à l'eau minérale stérile avec le volume adéquat pour ajuster la concentration mesurée à DO 600 nm aux exigences de la manipulation.

Ces légionelles non filamenteuses sont nommées « Post-Culture » (PC). L'absence de débris et l'émission de fluorescence par les bactéries sont vérifiées par microscopie à épifluorescence.

f) Légionelles Post-*Acanthamoeba* (PA)

Le milieu de culture est renouvelé 48 heures avant récupération des amibes. Le tapis cellulaire est ensuite lavé avec du tampon amibe afin d'éliminer les kystes. Les amibes sont

ensuite mises en supension en ajoutant 10 mL de tampon amibe et en tapant fortement la flasque sur une surface solide. Les amibes sont ensuite centrifugées à 500 g pendant 15 minutes à 25°C. Le surnageant est éliminé et le culot lavé deux fois avec du tampon amibe. Les cellules sont dénombrées à l'aide d'une cellule Fast-Read. Puis la concentration est ajustée à 1.10^6 amibes/mL dans du tampon amibe contenant 2,5 % de PYG afin de limiter le phénomène d'enkystement. Dans une flasque de 25 cm² sont déposés 10 mL de cette suspension.

En parallèle, une suspension de légionelles PC à 1.10^7bactéries/mL est réalisée. Afin d'obtenir une MOI (Multiplicity Of Infection) de 0,1 (10 amibes pour 1 légionelle), chaque flasque contenant la suspension d'amibes est ensemencée avec 100 µL de cette suspension et incubée à 30°C à l'obscurité.

Après 96 heures d'incubation, l'ensemble des cellules est récupéré en tapant la flasque puis la suspension est centrifugée à 10 000 g pendant 10 minutes. Le surnageant est récupéré et stocké à -80°C. Il constitue le Surnageant d'infection des amibes (S).

Le culot cellulaire est lavé 2 fois avec de l'eau minérale stérile et centrifugé à 4 500 g pendant 10 minutes à 25°C. Le culot est resuspendu dans de l'eau minérale stérile et centrifugé à 500 g pendant 1 minute pour éliminer les amibes et les débris cellulaires. Le culot obtenu est conservé pour obtenir des légionelles Intra-*Acanthamoeba*. Le surnageant, contenant les légionelles Post-*Acanthamoeba* (PA) est récupéré et centrifugé à 4 500 g pendant 10 minutes à 25°C. Le surnageant est éliminé et les bactéries sont lavées 2 fois à l'eau minérale stérile. Le culot est finalement repris dans de l'eau minérale avec le volume adéquat pour obtenir la concentration nécessaire à la manipulation.
L'absence de débris et l'émission de la fluorescence des bactéries sont vérifiées par microscopie à épifluorescence.

g) Légionelles Intra-*Acanthamoeba* (IA)

Les légionelles Intra-*Acanthamoeba* (IA) sont préparées à partir du culot obtenu 96 heures après infection des amibes avec des légionelles PC. Le culot est repris avec 1 mL d'eau minérale stérile et transféré dans un tube à vis contenant 500 mg de billes de verre de 150-200 µm de diamètre. Les tubes sont placés dans un appareil Fast-Prep (MP) à une vitesse de 6.0

pendant 30 secondes afin de lyser les amibes permettant ainsi de libérer les légionelles Intra-*Acanthamoeba*. La suspension est ensuite diluée avec 9 mL d'eau minérale et centrifugée à 500 g pendant 1 min à 25°C. Le surnageant est transféré dans un nouveau tube et à nouveau centrifugé à 4 500 g pendant 10 minutes à 25°C. Le culot est récupéré et lavé 2 fois avec de l'eau minérale stérile par centrifugation à 4 500 g pendant 10 minutes à 25°C. Le surnageant est éliminé et le culot est repris dans de l'eau minérale dans le volume adéquat pour obtenir la concentration nécessaire à la manipulation.

L'absence de débris et l'émission de la fluorescence sont vérifiées par microscopie à épifluorescence.

h) Légionelles Post-*Tetrahymena* (PT)

L'ingestion des légionelles par les *Tetrahymena tropicalis* est favorisée en remplaçant le milieu de culture PCB par du tampon pauvre, le « Osterhout's Buffer ». Ce tampon est composé de 40 mL/L d'Osterhout's Solution 100x et de 0,121 g/L de Tris Base. Le pH est ajusté à pH 7,0 avec du KOH 1 M avant autoclavage 30 minutes à 120°C. La Osterhout's Solution 100x est constitué de 10,5 g/L de NaCl, 0,23 g/L de KCl, 0,1 g de $CaCl_2$, 0,4 g/L de $MgSO_4 : 7H_2O$ et 0,85 g/L de $MgCl_2 : 6H_2O$. Le milieu de culture contenant *Tetrahymena* est centrifugé à 500 g pendant 10 minutes à 25°C. Le milieu PCB doit être remplacé progressivement par du Osterhout's Buffer avec des pourcentages croissants de 20, 40, 60, 80 et 100%. Entre chaque changement, les *Tetrahymena* sont placées à l'obscurité pendant 10 minutes pour permettre aux ciliés de s'adapter à ces nouvelles conditions. Quand le milieu de culture est entièrement remplacé, les protozoaires sont dénombrés. La quantification des protozoaires ciliés, immobilisés au préalable par un traitement au Lugol (1 µL d'une solution à 2 % pour 1 mL de suspension et incubé 10 minutes), est effectuée à l'aide d'une lame Fast-Read et d'un microscope photonique. La concentration de *Tetrahymena* est ensuite ajustée avec de l'Osterhout's Buffer à 1.10^5 cellules/mL.

Dans une flasque de 25 cm² sont transférés 10 mL de cette suspension. En parallèle, une suspension de légionelles PC est préparée à une concentration de 1.10^{10} bactéries/mL. Les *Tetrahymena* sont mis en contact avec les légionelles selon une MOI de 1000 (1 *Tetrahymena* pour 1 000 *Legionella*). La suspension est ensuite incubée à 30°C à l'obscurité.

Après 72 heures d'incubation, la majorité des légionelles a été expulsée des ciliés sous forme de vésicules ou « pellets ».

Afin de séparer les vésicules des *Tetrahymena*, la suspension est centrifugée 10 minutes à 500 g à 25°C. Le tube est ensuite placé à l'obscurité pendant 20 minutes afin que les *Tetrahymena* se déplacent du culot au surnageant. Le surnageant est ensuite éliminé et remplacé par du Osterhout's Buffer. Cette étape est répétée autant de fois que nécessaire afin d'éliminer les *Tetrahymena*. L'absence de protozoaires est vérifiée par observation en microscopie photonique après traitement au Lugol.

Les vésicules isolées sont resuspendues dans de l'eau minérale stérile. Les légionelles intra-vésiculaires sont libérées par passages répétés de la suspension au travers d'une aiguille de 27 gauge. Ces passages créent une force mécanique qui fragmente les vésicules et libère les légionelles. Ces bactéries sont centrifugées à 4 500 g pendant 10 min à 25°C et lavées deux fois avec de l'eau minérale stérile. Le surnageant est éliminé et le culot est repris dans de l'eau minérale dans le volume adéquat pour obtenir la concentration nécessaire à la manipulation. Ces légionelles sont nommées Post-*Tetrahymena* (PT).

L'absence de débris et l'émission de la fluorescence sont vérifiées par microscopie à épifluorescence.

i) Légionelles Post-Culture traitées avec du Surnageant Post-*Acanthamoeba* (PC+Sur-PA)

Dans un tube de 15 mL, 1.10^9 légionelles PC sont centrifugées à 4 500 g pendant 10 min à 25°C. Le surnageant est éliminé et remplacé par 1 mL de Sur-PA thermostaté à 30°C. Les cellules sont ensuite incubées à 30°C pendant 24 heures. Ce temps écoulé, la suspension est centrifugée à 4 500 g pendant 10 minutes à 25°C puis lavée deux fois avec de l'eau minérale stérile. Le surnageant est éliminé et le culot est repris dans de l'eau minérale dans le volume adéquat pour obtenir la concentration nécessaire à la manipulation. Ces légionelles sont désignées par légionelles Post-Culture traitées avec du Surnageant Post-*Acanthamoeba* (PC+Sur-PA).

L'absence de débris et l'émission de la fluorescence sont vérifiées par microscopie à épifluorescence.

j) Légionelles Post-Culture traitées en contact avec du lysat d'*Acanthamoeba* (PC+Ac)

Le milieu de culture des amibes est renouvelé 96 heures avant récupération. Les amibes sont décrochées en tapant fortement la flasque sur une surface solide. Les amibes sont ensuite centrifugées à 500 g pendant 15 minutes à 25°C. Le surnageant est éliminé. Le culot est lavé deux fois avec du tampon amibe puis stocké à -20°C jusqu'à utilisation.

Le culot est repris dans 10 mL d'eau ultrapure et soumis à des chocs thermiques successifs à -70 et 37°C. Afin de parfaire la lyse, la suspension est ensuite placée dans un bain à sonication à puissance maximale pendant 15 minutes.

Les débris sont éliminés par centrifugation pendant 20 minutes à 10 000 g à 4°C. Le lysat d'amibes ainsi obtenu est conservé à -20°C.

Dans un tube de 15 mL, 1.10^9 légionelles PC sont centrifugées 10 min à 4 500 g à 25°C. Le surnageant est éliminé et remplacé par 1 mL de lysat d'amibes filtré avec un filtre en PES de 0,2 µm. Les cellules sont ensuite incubées à 30°C pendant 24 heures. Ce temps écoulé, la suspension est centrifugée à 4 500 g pendant 10 minutes à 25°C puis lavée deux fois avec de l'eau minérale stérile. Le culot est repris dans de l'eau minérale avec le volume adéquat pour obtenir la concentration nécessaire à la manipulation. Les légionelles obtenues correspondent aux légionelles PC traitées avec du lysat d'*Acanthamoeba* (PC+Ac).L'absence de débris et la fluorescence sont vérifiées par microscopie à épifluorescence.

k) Vérification des cultures de légionelles

A chaque étape, pour toutes les cultures de légionelles réalisées, l'absence de contamination est effectuée par cultures en parallèle sur BHI et sur GVPC à 37°C. Les colonies issues de la croissance sur GVPC sont contrôlées à l'aide d'un test d'agglutination intitulé « Legionella pneumophila sérogroupe 1 Latex Agglutination Kit ». Le test est réalisé selon les instructions du fournisseur (Oxoid).

B) Biofilm

1) Dosage colorimétrique

a) Développement des biofilms

Les biofilms sont réalisés en microplaque 96 puits à fond plat traitées pour la culture cellulaire. Chaque condition est réalisée en 8 réplicats suivant les conditions d'expérimentation. Une suspension bactérienne est réalisée dans de l'eau minérale stérile à une DO_{600} = 1,0. Les puits de la première colonne sont uniquement complétés avec 200 µL d'eau minérale stérile. Cette série de puits sert de blanc pour éliminer l'éventuel bruit de fond et permet d'éviter l'évaporation. La seconde colonne est systématiquement remplie de 150 µL d'une suspension de légionelles PC auxquelles sont ajoutés 50 µL d'eau minérale stérile. Cet ensemble de puits sert de référence pour normaliser l'ensemble des résultats afin de les comparer entre eux. Dans tous les autres puits sont déposés 150 µL de suspension bactérienne auxquels sont ajoutés 50 µL d'une solution à tester ou d'eau minérale stérile. Dans le cas où il est nécessaire d'ajouter un volume d'une solution à tester supérieur à 50 µL, la concentration de la suspension est augmentée afin que le volume final dans tous les puits soit rigoureusement égal à 200 µL. Le but étant de ne pas introduire un biais lié à la sédimentation. Les puits sont homogénéisés et la plaque incubée 24 heures à 37°C sans agitation.

b) Dosage au Cristal Violet

Après incubation, l'eau minérale et les cellules non-adhérées sont éliminées par aspiration et les puits rincés avec 200 µL d'eau minérale stérile. Les bactéries adhérées sont incubées avec 100 µL de Cristal Violet (CV) (Figure 23) à 0,3 % pendant 15 minutes à température ambiante. Le surnageant est éliminé et les puits sont lavés trois fois avec 200 µL d'eau minérale stérile. Le CV fixé est ensuite solubilisé avec 100 µL d'éthanol 99% sous agitation à 200 rpm pendant 15 min à température ambiante. La microplaque est ensuite centrifugée à 200 g pendant 10 min et les surnageants transférés dans une nouvelle microplaque. Cette étape a pour but d'éliminer les débris cellulaires ou/et les bactéries qui créent un biais à la lecture optique via la turbidité qu'ils apportent. L'absorbance à 595 nm est mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaque (Sunrise, TECAN). La moyenne des mesures de

8 réplicats est déterminée après avoir préalablement soustrait le bruit de fond (colonne n°1). Un rapport est ensuite effectué par rapport à l'absorbance de la référence (colonne n°2) afin de normaliser les résultats pour pouvoir les comparer entre eux.

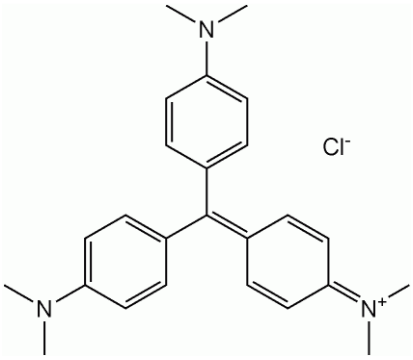


***Figure 23*: Structure du Cristal Violet.**

c) Dosage au Bleu d'Alcian

Après incubation des bactéries, le surnageant est éliminé et remplacé dans chaque puits par 40 µL de Bleu d'Alcian (BA) à 0,1% (Figure 24). La microplaque est ensuite incubée 15 minutes à 37°C. Le BA non fixé est éliminé et les puits sont lavés 3 fois avec 200 µL d'eau minérale. Le BA fixé est solubilisé avec 100 µL d'acide acétique à 33 % sous agitation pendant 15 min à 200 rpm à température ambiante. Les étapes suivantes sont identiques à celles décrites pour le dosage au CV (voir ci-dessus).

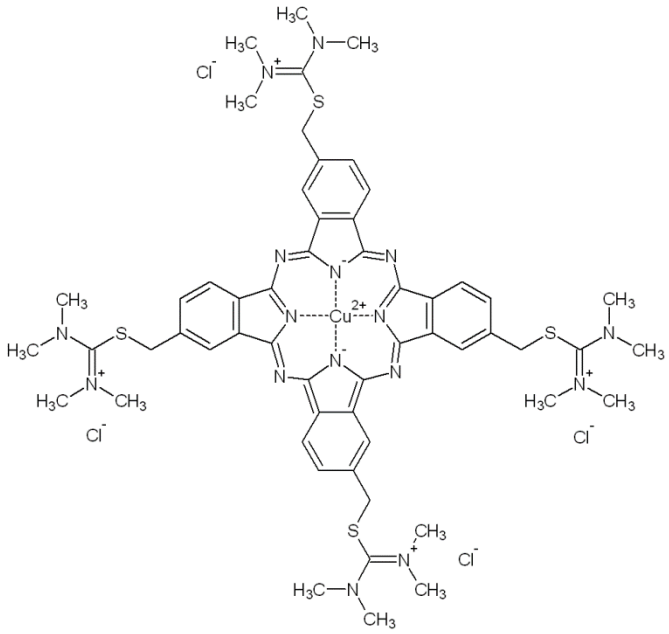


***Figure 24*: Structure du Bleu d'Alcian.**

2) *Extraction des ExoPolySaccharides (EPS)*

a) Développement des biofilms

Dans une flasque de 75 cm² traitée pour la culture cellulaire, 24 mL d'eau minérale stériles ont déposés et inoculés avec 1 mL d'une suspension de *L. pneumophila* Lens à1.10^{10} bactéries/mL. Les bactéries sont ensuite incubées 7 jours à 37°C sans agitation.

b) Extraction des EPS

L'ensemble des EPS des bactéries est divisé en 3 fractions. La première est constituée d'EPS libres dans le milieu, elle est qualifiée de fraction colloïdale. La seconde comprend des EPS liés de manière réversible aux bactéries et est nommée fraction liée. La dernière, appelée fraction résiduelle, n'est pas extractible et correspond aux EPS liés de manière irréversible aux bactéries.

La fraction colloïdale est obtenue en centrifugeant, à 10 000 g pendant 30 minutes à 4°C, le surnageant des biofilms en faisant attention de ne pas décrocher les cellules. Cette centrifugation permet d'éliminer les débris et les cellules non fixées. Le surnageant constituant la fraction colloïdale, est récupéré puis lyophilisé et stocké à -20°C.

Ensuite, 20 mL d'eau minérale stérile sont ajoutés dans la flasque. Le biofilm est décroché en tapant fortement la flasque sur un support solide puis la surface interne de la flasque est grattée avec un « cell scraper ». La suspension est ensuite transférée dans un Falcon puis soniquée 4 fois pendant 1 minute à 20 % de la puissance maximale (Bioblock Scientific 86480). Le contenu est alors transféré dans un erlenmeyer contenant 5 g de billes Dowex Na^+ préalablement lavées avec du PBS. L'ensemble est ensuite incubé à 4°C à l'obscurité pendant 4 heures sous agitation magnétique à 500 rpm. Cette étape permet « d'arracher » les EPS grâce aux billes chargées qui vont se lier aux cellules à la place des EPS. Après incubation, la suspension est centrifugée à 10 000 g pendant 30 min à 4°C. La fraction liée contenue dans le surnageant est récupérée puis lyophilisée et stockée à -20°C jusqu'à utilisation.

Le culot constitue la fraction résiduelle, il est conservé à -20°C.

3) Cinétique de croissance et de multiplication

a) Dénombrement par culture

Une microplaque 12 puits, traitée pour la culture cellulaire dans laquelle 1,9 mL d'eau minérale stérile est ajouté par puits, est inoculée avec 1.10^6 de légionelles de manière à obtenir un volume final de 2 mL. Une plaque est réalisée pour chacun des temps de dénombrement choisis afin de ne pas perturber la formation des biofilms entre chaque mesure. Les plaques sont mises à incuber à 37°C sans agitation. Lors du dénombrement, le surnageant est éliminé et le puits est lavé deux fois avec de l'eau minérale stérile. Ensuite 1 mL d'eau minérale est ajouté et les cellules sont décollées par grattage avec un cell scraper. La suspension est transférée dans un Eppendorf puis soniquée 3 fois 1 minute à 40 %. Des dilutions sérielles sont effectuées jusqu'à la dilution 10^{-4}avec de l'eau minérale stérile. Les dilutions 10^0 à 10^{-4}sont étalées en duplicat sur BCYE et incubées à 37°C pendant 72 heures. Enfin, les colonies sont dénombrées. Une moyenne est effectuée pour chaque temps et chaque condition. Le pourcentage de colonies présentes est calculé par rapport au nombre de légionelles inoculées, contrôlé par dénombrement sur BCYE.

b) Dénombrement par fluorescence

Dans une microplaque 96 puits à fond noir, traitée pour la culture cellulaire, est déposé en en 4 réplicats une gamme étalon allant de 5.10^6 à 1.10^9 *L. pneumophila* Lens codant pour la GFP. Les suspensions sont réalisées dans de l'eau minérale stérile. Les plaques sont incubées à l'obscurité à 37°C. A différents temps, le surnageant de 4 puits est éliminé puis est lavé 2 fois avec de l'eau minérale stérile. Chaque puits est rempli avec 200 µL d'eau minérale stérile et la plaque est remise à incuber à 37°C. Ensuite, la plaque est lue avec un lecteur de fluorescence (Tristar II, Berthold). La quantité des cellules présentes à chaque temps est déterminée à l'aide de la courbe étalon.

C) Microscopie

1) Microscopie à épifluorescence

a) Fixation

Les cellules à observer sont fixées sur un filtre de polycarbonate de 0,22 µm par filtration. Le filtre est déposé sur une lame de verre, puis il est recouvert par une lamelle. Le filtre est scellé entre les deux lames avec de la paraffine.

b) Observation

Les lames sont observées à l'aide d'un microscope à épifluorescence (Olympus) alimenté par une lampe à mercure. Les filtres FITC et Cy3 sont utilisés pour photographier les échantillons à l'objectif x100 sous immersion.

2) *Microscopie à illumination structurée*

a) Formation du biofilm multi-espèces

Les biofilms sont réalisés dans des plaques 12 puits à fond en verre adaptées pour la microscopie confocale. Dans chacun des puits, 2 mL de BHI dilué au 1/100ème avec de l'eau minérale sont déposés. Les puits sont inoculés avec 5.10^6 bactéries de chacune des 4 souches issues de préculture d'une nuit en BHI. Les plaques sont incubées 15 jours à 37°C avec un renouvellement du milieu tous les 4 jours. Le milieu est ensuite éliminé et remplacé par 2 mL d'eau minérale stérile. Les biofilms sont alors inoculés avec 1.10^7 légionelles et les plaques sont incubées à 37°C.

b) Marquage

Les puits sont lavés avec de l'eau minérale afin d'éliminer les légionelles non adhérées. Afin de marquer la matrice exopolysaccharidique, de l'AlexaFluor 350 Lectin conjugate (Invitrogen) est ajouté selon les recommandations du fournisseur. Le Draq 5 (Biostatus), si nécessaire, est utilisé selon les recommandations du fournisseur afin de marquer toutes les bactéries

c) Observation et traitement des images

Les observations ont été réalisées avec le microscope à épifluorescence Axio Observer A1 (Zeiss) équipé d'un Apotome. Ce module permet une illumination structurée. Le microscope est équipé d'une lampe au mercure et des filtres spécifiques pour DAPI (Zeiss Filter Set 49), FITC (Zeiss Filter Set 44), Cy3 (Zeiss Filter Set 43) et Cy5 (Zeiss Filter Set 50). L'objectif Plan Neofluar 63x a été utilisé avec de l'huile à immersion 1,25 (Zeiss).Les images ont été prises en utilisant le logiciel AxioVision et traitées avec le logiciel Zen et Imasis7.3.2.

D) Techniques de biologie moléculaire

1) Extraction d'ADN

a) Extraction d'ADN génomique

L'ADN génomique est extrait avec le kit High Pure PCR Template Preparation Kit de Roche selon les recommandations du fournisseur.

b) Extraction d'ADN plasmidique

L'ADN plasmidique est extrait à partir de 4 mL d'une culture âgée de 24 heures avec le kit Nucleospin Plasmid de Macherey-Nagel selon les recommandations du fournisseur.

c) Gel d'ADN

Les électrophorèses analytiques d'acides nucléiques ont été réalisées en gel d'agarose en tampon Tris-Borate EDTA (Tris 100 mM, acide borique 90 mM, 1 mM EDTA, pH 8,4 ; TBE). La concentration d'agarose est de 0.9%. La migration est réalisée en présence de Midori Green Advance à 2 µL/50 mL à 8V/cm pendant 35min. Le marqueur de tailles linéaires utilisé provient de Promega : 1 kb DNA ladder. Après migration, les acides nucléiques sont visualisés par exposition aux rayons ultra violets à 312nm.

2) Extraction d'ARN

a) Extraction des ARN totaux

Toutes les solutions sont préparées avec de l'eau traitée au diéthylpyrocarbonate (DEPC) qui est un inhibiteur des ARNases. Le DEPC est ajouté à une concentration finale de 0,1 %. La solution est homogénéisée et incubée une nuit à 37°C avant d'être autoclavée à 120°C pendant 20 minutes. Un culot cellulaire de DO_{600} = 2 est lavé avec de l'eau ultrapure DEPC à 5 000 g pendant 5 min à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot est repris dans 400 µL d'eau ultrapure DEPC avec 60 µL d'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA) à 0,5

M. La suspension est transférée dans un tube à bouchon à vis contenant 500 mg de billes de verre de 120-200 µm de diamètre préalablement lavées avec de l'eau ultrapure DEPC et 500 µL de phénol acide à pH 4,5. Dans un Fast-Prep, les échantillons sont soumis à 4 cycles de 30 secondes à une vitesse de 6,0. Entre chaque cycle, les échantillons sont incubés sur glace pendant 5 minutes. Après centrifugation pendant 5 minutes à 12 000 g, le surnageant est transféré dans un nouveau tube stérile. Ensuite, 1 mL de Trizol est introduit, mélangé doucement et l'échantillon et incubé pendant 10 minutes à température ambiante. Un mélange de 100 µL de chloroforme et d'alcool isoamylique (24/1) est ajouté à l'échantillon puis homogénéisé vigoureusement avant d'être centrifugé 5 minutes à 12 000 g. Le surnageant est à nouveau transféré dans un nouveau tube et lavé 2 fois avec 200 µL du mélange chloroforme et alcool isoamylique. Après avoir récupéré le surnageant, 500 µL d'isopropanol sont ajoutés et après homogénéisation, l'échantillon est incubé 1 heure sur glace. Une fois centrifugé 15 minutes à 12 000 g à 4°C, le culot est séché sous hotte à température ambiante pendant 15 minutes. Après solubilisation dans 50 µL d'eau ultrapure DEPC, 5 µL d'acétate de sodium à 3 M de pH 5,2, 150 µL d'éthanol absolu sont ajoutés et l'échantillon est incubé à -20°C pendant 12 heures. Le tube est alors centrifugé à 12 000 g pendant 20 minutes à 4°C et le culot est lavé avec de l'éthanol froid. Une fois centrifugé 5 minutes à 12 000 g à 4°C, le culot est séché sous hotte pendant 15 minutes. Les ARN extraits sont repris dans 35 µL d'eau ultrapure DEPC et la qualité est vérifiée par migration électrophorètique sur gel d'agarose et par mesure de l'absorbance à 280, 260 et 230 nm (Pour des ARN purs, le rapport $A_{260/280}$ = 2 et le rapport $A_{260/230}$ = 2,3).

b) Gel d'ARN

L'intégrité des ARN est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,2 % contenant 10 % de tampon MOPS 10X à pH 7,0 et 10 % de formaldéhyde. Le tampon MOPS 10X est composé de 11,22 g/L d'acétate de sodium, 6,3 g/L d'EDTA et 69,6 g/L de MOPS. Dans un tube à bouchon vissé sont mélangés 5 µg d'ARN (5µL), 7 µL de tampon ARN (6,5 % de tampon MOPS 10X, 23 % de formaldéhyde et 70,5 % de formamide déionisé) et 1 µL de bromure d'éthidium à 25 ng/µL puis incubés 10 minutes à 70°C. L'échantillon est mis sur glace durant 5 minutes et mélangé à 2 µL de tampon de charge (glycérol50%, Bleu de Bromophénol 0,015%,). Enfin, les échantillons (15 µl final) sont déposés sur gel et la

migration s'effectue pendant 45 minutes à 90 Volts dans du tampon MOPS 1X. Les bandes d'ARN sont visualisées sous UV.

3) Transformation des bactéries

a) Préparation de bactéries électrocompétentes

Une culture de *L. pneumophila* Lens est préparée en étalant 100 µL d'une suspension de légionelles non filamenteuses sur gélose BCYE. Après 48 heures d'incubation à 37°C, les cellules se trouvent en phase exponentielle de croissance. Les bactéries sont récupérées et mises en suspension dans 40 mL de glycérol 10 % à 4°C. La préparation est centrifugée à 5 500 g pendant 15 minutes à 4°C et le surnageant est éliminé. Le culot est lavé à nouveau 3 fois en divisant par deux le volume utilisé pour le lavage. Cette étape permet d'éliminer les molécules et les sels afin d'éviter toute interférence possible lors du choc électrique de l'électroporation. Le culot bactérien est ensuite remis en suspension dans un volume adéquat de glycérol10% à 4°C afin d'avoir une DO_{600} = 200. La suspension est aliquotée en fractions de 50µL et stockée à -80 °C.

b) Electroporation

Une fraction de 50 µl de *L. pneumophila* Lens compétentes est mélangée avec 2 µl d'ADN plasmidique à 0,5 µg/µL dans une cuve d'électroporation froide. La préparation est incubée 2 minutes dans la glace pour une meilleure homogénéisation puis est ensuite électroporée (MicroPulser™, BioRad) grâce à un choc électrique de 2,5 kV. Immédiatement après, 950 µl de milieu BYE complémenté avec de la cystéine et du pyrophosphate de fer sont ajoutés dans la cuve. Les bactéries sont étalées sur gélose BCYE contenant du Chloramphénicol à 10 µg/mL après 1 heure d'incubation à 37°C sans agitation.

4) Réaction de Polymérisation en Chaine (PCR)

Les réactions de PCR sont réalisées en thermocycleur *Eppendorf* 96 puits vapo-protect. Les amorces ont été dessinées à l'aide du logiciel CloneManager et synthétisées par

Eurogentec (Tableau 3). Les PCR sont réalisées dans un volume réactionnel de 20 µl contenant 2 µL tampon spécifique de la *Taq* DNA Polymérase (1x), du $MgCl_2$ à 1.5 mM, les dNTP à 0,2 mM, les amorces à 625 nM, 1 unité de *Taq* DNA polymérase (Promega). La matrice ADN utilisée est préalablement précipitée à l'aide d'éthanol et de glycogène pour éliminer toutes traces de solvant ou de sel. Les réactions de PCR comprennent une étape de dénaturation initiale de 5 minutes à 94°C, puis 30 cycles de 30 secondes de dénaturation à 94°C, 30 secondes d'hybridation des amorces à 60°C et 1,5 minutes d'élongation à 72°C, suivie d'une incubation de 7 min à 72°C pour compléter l'élongation des fragments PCR.

Tableau 3* : *Listes des amorces définies pour ces travaux.

Nom	Séquence	Tm	Taille attendue du fragment
lqsA forward	AATCCTGGCAAGGGAAACAC	62	870 pb
lqsA reverse	AACACGGCTCCAAAGATGTC	62	
lqsR forward	CGTATTGCAGCTGGATGAGG	62	805 pb
lqsR reverse	GGCAGGAACCAAACAATTCG	62	
lqsS forward	CTGGTTGCCTCAGCCTTATG	62	1 120 pb
lqsS reverse	AGCGTATTCGCCCTCTTTAG	61	
lqsT forward	GATGCAAGCCACCAAATCAC	62	572 pb
lqsT reverse	GCAAGCGGCGTTCTTAAATC	62	

5) Réaction de Polymérisation en Chaine quantitative (PCR-q)

Les PCR-q ont été réalisées avec des amorces spécifiques du gène *mip* (mipA1, mipA2 décrites par (Jonas et al., 1995)), en utilisant le kit Light Cycler FastStart DNA Master SybrGreenI et le Light Cycler 32 puits selon les recommandations du fournisseur.

E) Techniques de biochimie

1) Extraction à l'acétate d'éthyle

Le surnageant de légionelles PA est soumis à une extraction avec de l'acétate d'éthyle acidifié avec 0,1 % d'acide acétique glacial. Le solvant est ajouté dans la proportion de 3

volumes pour 1 volume à extraire dans un erlenmeyer. Le mélange est ensuite soumis à une agitation magnétique à 500 rpm pendant 4 heures à 4°C dans l'obscurité. La phase organique est récupérée après passage dans une ampoule à décanter puis évaporée sous vide à 30°C. L'extrait obtenu est conservé à -80°C jusqu'à utilisation.

2) Extraction en Phase Solide

Le broyat d'amibe filtré est chargé sur une cartouche C18 d'extraction en phase solide (Sep-Pak plus, Waters). La cartouche est lavée, au préalable, avec 10 mL d'éthanol 95%, puis 5 ml d'acétonitrile et équilibrée avec 10 ml d'eau ultrapure. L'élution est réalisée avec 5 mL de solution contenant 20 mM d'acétate d'ammonium et respectivement 0, 10, 20, 40, 80 et 100% d'acétonitrile. Les fractions obtenues sont lyophilisées.

3) Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance (HPLC)

La séparation des constituants d'un échantillon est effectuée sur une chaîne HPLC DIONEX, constituée d'une pompe DIONEX, P680 HPLC pump, Ultimate 3 000 Pump) et d'un détecteur UV Visible (DIONEX, Ultimate Variable Wavelength Detector) permettant l'enregistrement de l'absorption à 205, 220 et 280 nm des composés séparés par la colonne. Le système est piloté et les données enregistrées et traitées avec le logiciel Chroméléon. L'échantillon est analysé sur une colonne C18 de phase inverse (4,6 x 250 mm, Dionex).

Le solvant A est constitué de 95 % d'eau ultrapure, de 5 % d'acétonitrile (ACN) contenant 0,1 % d'acide TriFluoroAcétique (TFA). Le solvant B est composé de 95 % d'ACN, de 5 % d'eau ultrapure contenant 0,07 % de TFA. L'élution a été réalisée à un débit de 0,8 mL/min, après 5 minutes à 0 % de solvant B en gradient linéaire jusqu'à 100 % en 35 minutes suivi d'un plateau à 100% de B pendant 5 minutes.

4) Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

L'analyse par chromatographie sur couche mince (CCM) a été réalisée sur des plaques de silice 60 F_{254} (Merck). Les plaques sont lavées 3 fois avec de l'acétate d'éthyle ou du méthanol et séchées sous hotte avant utilisation. Elles sont ensuite mises à migrer sans dépôt pendant 1,5 heure.

Après séchage sous hotte, 15 µL d'échantillon sont déposés sur la plaque ainsi que 5 µL d'une solution à 1 µg/mL de OdDHL comme standard. La migration est effectuée avec de l'acétate d'éthyle ou du méthanol jusqu'à que le front de migration atteigne les ¾ de la plaque. Les solutés sont révélés par UV.

Les zones d'intérêts sont grattées et les fractions éluées de la silice avec de l'éthanol ou de l'acétate d'éthyle par 2 élutions successives de 0,5 mL puis conservées jusqu'à utilisation à -80°C.

F) Protèomique

1) Extraction des protéines totales

Un culot de cellules correspondant à une suspension de DO_{600} = 10 est lavé avec 5 mL de NaCl à 0,9% puis avec 2 fois 5 mL de tampon de lavage composé de 40 mM de Tris/HCL à pH 8,0, de 10 mM d'EDTA et un cocktail d'inhibiteurs de protéases (complete mini, Roche). Après centrifugation à 10 000 g pendant 10 minutes à 4°C, le culot est repris avec 1 mL de tampon de lavage. La suspension est soumise à 3 cycles de congélation à -80°C et décongélation à 37°C. Après transfert dans un tube à vis contenant 500 mg de billes de verre de 120-200 µm, 3 cycles de 30 s à une vitesse de 6.0 au FastPrep sont effectués. Le lysat est ensuite centrifugé à 13 000 g pendant 30 minutes à 4°C et le surnageant est conservé. Après traitement aux endonucléases (RNase I et DNase I), la concentration en protéines est estimée à l'aide du test de Bradford pour être ajustée à 1 mg/mL puis la solution est stockée à -80°C.

G) Détection de Quorum Sensing : Test de production/ inhibition de la violacéine

1) En milieu solide

Du milieu gélosé défini pour *C. violaceum* CV026 est inoculé à 20% avec une préculture de 24 heures. Ensuite, selon le test réalisé, de l'OHHL (0,21 nM) est ajouté ou non et la gélose est coulée en boite de Pétri ou sur des plaques de CCM. Un inhibiteur (OdDHL à 4,5 nM) est ajouté selon le test réalisé. Dans les boites de Pétri, des puits de 6 mm de diamètre sont remplis avec les composés à tester et les standards. La gélose inoculée est incubée 24 heures à 30°C avant d'être photographiée.

2) Test de volatilité

Afin de déterminer si le composé testé est volatil, une plaque est remplie comme précédemment avec 150 µL de culture de *C. violaceum*, à l'exception de 4 puits situés au centre de la plaque. Une solution du composé à tester est déposée dans ces puits (150 µL par puits). Chaque condition nécessite deux plaques, une première pour tester l'action du composé sur la production de la violacéine par *C. violaceum*. La seconde, sans ajout d'inducteur, afin d'observer l'effet du composé sur la croissance de *C. violaceum*. Après 36 heures d'incubation à 30°C, les plaques sont photographiées sur fond blanc.

Résultats et Discussion

Partie I : Colonisation et développement de biofilms par les Légionelles

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la capacité de colonisation des biofilms par les légionelles dans des systèmes mimant au plus proche les réseaux d'eaux.

A) Colonisation de biofilms pré-établis par *Legionella pneumophila*

1) Conditions de développement des biofilms

Afin de pouvoir localiser les légionelles au sein du biofilm, il était important de disposer d'outils fluorescents. Afin de créer ces outils, *L. pneumophila* Lens a été transformée avec deux plasmides différents, le PSW0001 (MDE) codant pour la protéine DsRed et le plasmide pMMB207-KM14-GFPc (MDE) encodant la GFPmut2 présentant une fluorescence plus importante que la protéine GFP originale. Le développement de deux souches émettrices de fluorescences différentes permet de comparer sur une même expérience de bactéries issues d'origines différentes. Une cinétique de croissance a été réalisée pour ces deux transformants afin de vérifier que l'addition de gènes en *trans* ne perturbe pas leur croissance. Des essais, restés infructueux, ont été réalisés afin d'insérer ces gènes dans le chromosome bactérien par recombinaison homologue sans modifier le phénotype de la souche acceptrice. Ces mutants permettraient un maintien de la fluorescence sans pression sélective contrairement aux plasmides. Cependant, il est connu que la souche Lens est très peu réceptive à ce genre de manipulation (Charpentier et al., 2011; Buchrieser and Charpentier, 2013).

Les conditions de formation des biofilms, système dynamique, statique ou semi statique ont été évaluées. La sélection a été effectuée en fonction des exigences de la microscopie. En effet en microscopie à illumination, il est nécessaire pour une observation optimale d'avoir une épaisseur de verre comprise entre 0,16 et 0,19 mm. Des essais préliminaires avec les différents matériels commerciaux, nous ont conduits à développer notre propre équipement afin de correspondre au mieux à nos exigences. Au final, un système semi-statique a été développé dans des microplaques à fond de verre non traité.

Il fallait également concevoir un système proche des réseaux d'eaux sanitaires, pour cela, un milieu pauvre en éléments nutritifs était indispensable. Lors de leurs travaux au laboratoire, Koubar et ses collègues en 2013, ont démontré la persistance des légionelles et leur capacité à s'accrocher aux surfaces en verre dans de l'eau minérale (Koubar et al., 2013), ce qui nous a incité à choisir ce milieu pour développer nos biofilms

Les travaux de Declerck et ses collègues, nous ont conduit à sélectionner un consortium représentatif de la flore des biofilms des réseaux d'eau (Declerck et al., 2007a, b). Il est composé de 4 espèces bactériennes : *Pseudomonas aeruginosa*, *Empedobacter brevis*, *Escherichia coli* et *Aeromonas hydrophila*. L'ensemble de ces souches ont été utilisées pour former un biofilm dans un milieu de culture fortement dilué avec de l'eau minérale afin d'obtenir un biofilm complexe mature et d'une densité adaptée à l'observation. Le milieu est renouvelé tout les 4 jours pendant 15 jours, puis le milieu est enlevé et les puits lavés avant d'inoculer les légionelles.

Les légionelles testées différent par leur mode de multiplication ou par le passage à travers un hôte. Des légionelles non filamenteuses issues d'une culture « classique » constituent la condition de référence et sont nommées « Post-Culture » (PC). Des légionelles s'étant multipliées en amibes constituent les « Post-*Acanthamoeba* » (PA). Enfin, les légionelles obtenues après passage au travers des protozoaires ciliés, *Tetrahymena tropicalis* constituent les « Post-*Tetrahymena* » (PT).

Avant inoculation des légionelles, le milieu est remplacé par de l'eau minérale pour effectuer un « choc nutritif ». Ce choc rend le biofilm plus enclin à accepter de nouveaux membres, des organismes métaboliquement plus aptes aux nouvelles conditions et pouvant produire des métabolites secondaires avantageux pour les autres membres du consortium (Cheng and Costerton, 1986).

B) Localisation des légionelles après implantation

Un suivi est effectué toutes les 24 heures pendant 7 jours sur chacune des légionelles issues de cultures différentes. Quelque soit le type de légionelles inoculées, il y a colonisation des biofilms par les légionelles tout au long de cette période comme on peut l'observer sur la

Figure 25. De plus, quelle que soit l'origine des légionelles, elles sont toutes localisées en surface du biofilm prè-établi.

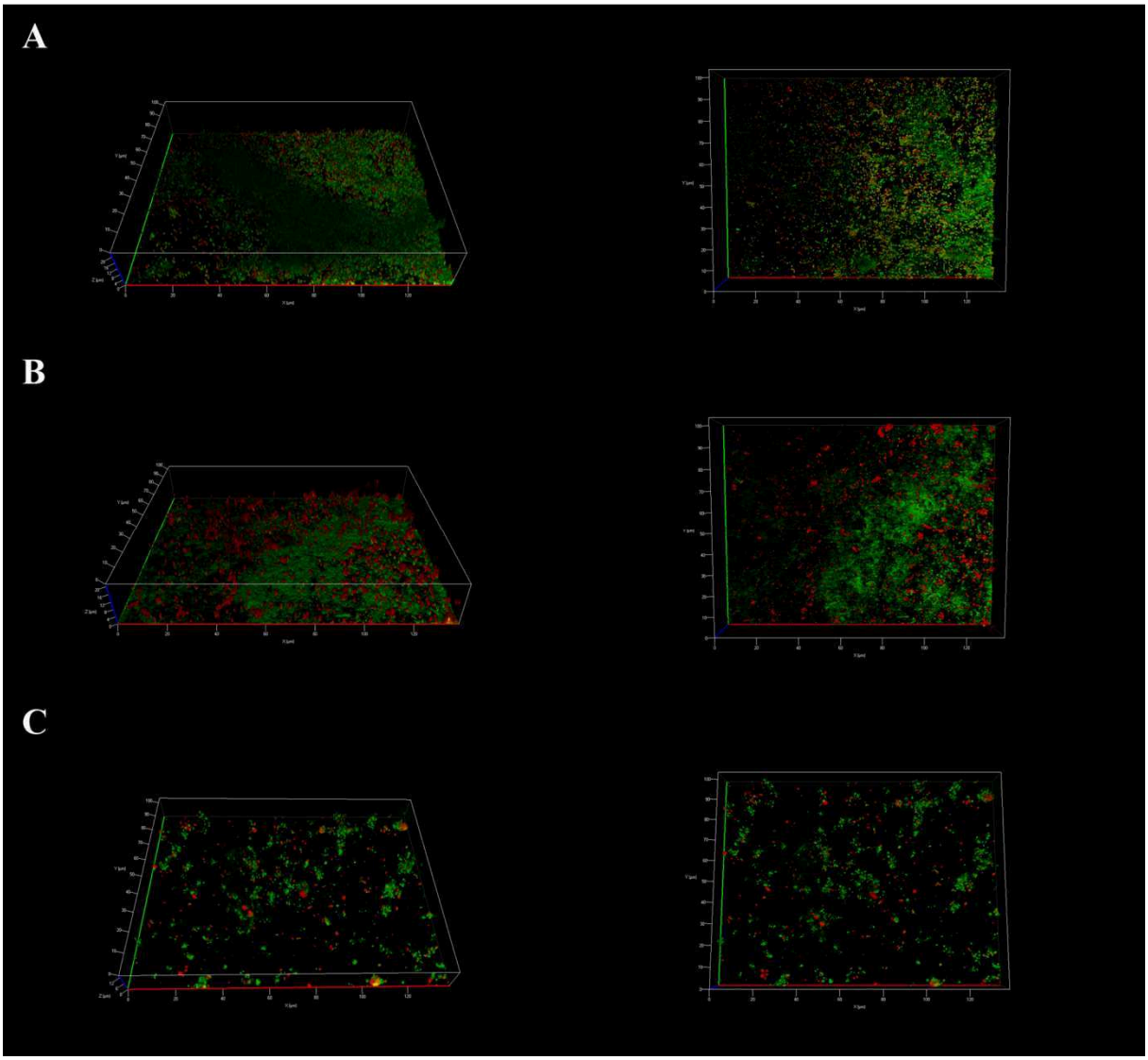


Figure 25: ***Reconstitution 3D de clichés de microscopie à illumination structurée à J7 de l'implantation de* L. pneumophila *Post-Culture (A), Post-*Acanthamoeba *(B) et Post-*Tetrahymena *(C) sur un biofilm pré-établi.***
Les légionelles apparaissent en rouge, les autres bactéries en vert et la barre d'échelle correspond à 20 µm. Figure représentative de 2 répétitions pour lesquelles 4 clichés ont été pris par échantillon.

Il n'y a pas de pénétration des légionelles en profondeur dans le biofilm entre le 1^{er}et le 7ème jour de colonisation. Cette localisation pouvant être spécifique à la souche *L. pneumophila* Lens utilisée, cette expérience a été répétée avec la souche Paris et a donné les mêmes résultats.

Cette localisation superficielle, de prime abord, apparait étrange car c'est au sein du biofilm que les micro-organismes sont protégés des agressions extérieures par la matrice. Il

est possible que cette localisation soit liée aux conditions de l'expérience car les biofilms sont observés après 7 jours seulement, une période plus importante est peut être nécessaire pour la pénétration ou le réaménagement du biofilm. De plus, les bactéries n'ont pas été soumises ici à un flux ou à l'action de protozoaires qui pourraient participer au réarrangement des biofilms. A l'inverse, on peut supposer que la présence des légionelles à la surface est un avantage majeur pour elles du fait qu'elles sont capables de nécrotrophie (Temmerman et al., 2006). En effet, plus de 50% des micro-organismes qui composent un biofilm sont morts et localisés en majorité, à sa périphérie (Auschill et al., 2001; Tresse et al., 2003). La localisation superficielle permettrait aux légionelles d'avoir accès aux nutriments nécessaires à leur croissance, notamment à de la L-cystéine et à des sources de fer.

Les amibes sont capables d'ingérer des proies de tailles réduites et de préférence sessiles. Elles sont incapables de phagocyter un biofilm entier, seulement des fragments de sa périphérie. La localisation des légionelles à la surface des biofilms pourrait donc faciliter leur absorption par les protozoaires et ainsi favoriser leur multiplication puis leur dissémination dans les réseaux d'eaux.

C) Rôle du consortium

Pour expliquer ces résultats de localisation, l'hypothèse d'un possible effet du consortium bactérien pré-établi a été émise car il a déjà été démontré que l'implantation de *Legionella* étant plus ou moins facile suivant les espèces qui composent le biofilm (Mampel et al., 2006). Ainsi, un des membres du biofilm utilisé ici pourrait avoir un effet antagoniste pour la pénétration des légionelles. Des expériences d'implantation de légionelles dans des biofilms mono-espèces ont donc été réalisées. Les résultats obtenus sont similaires à ceux obtenus avec le consortium entier quelle que soit l'espèce utilisée (Figure 26). L'ensemble de ces résultats semble suggérer que la localisation des légionelles à la surface des biofilms constitue une stratégie adaptative favorable à leur multiplication.

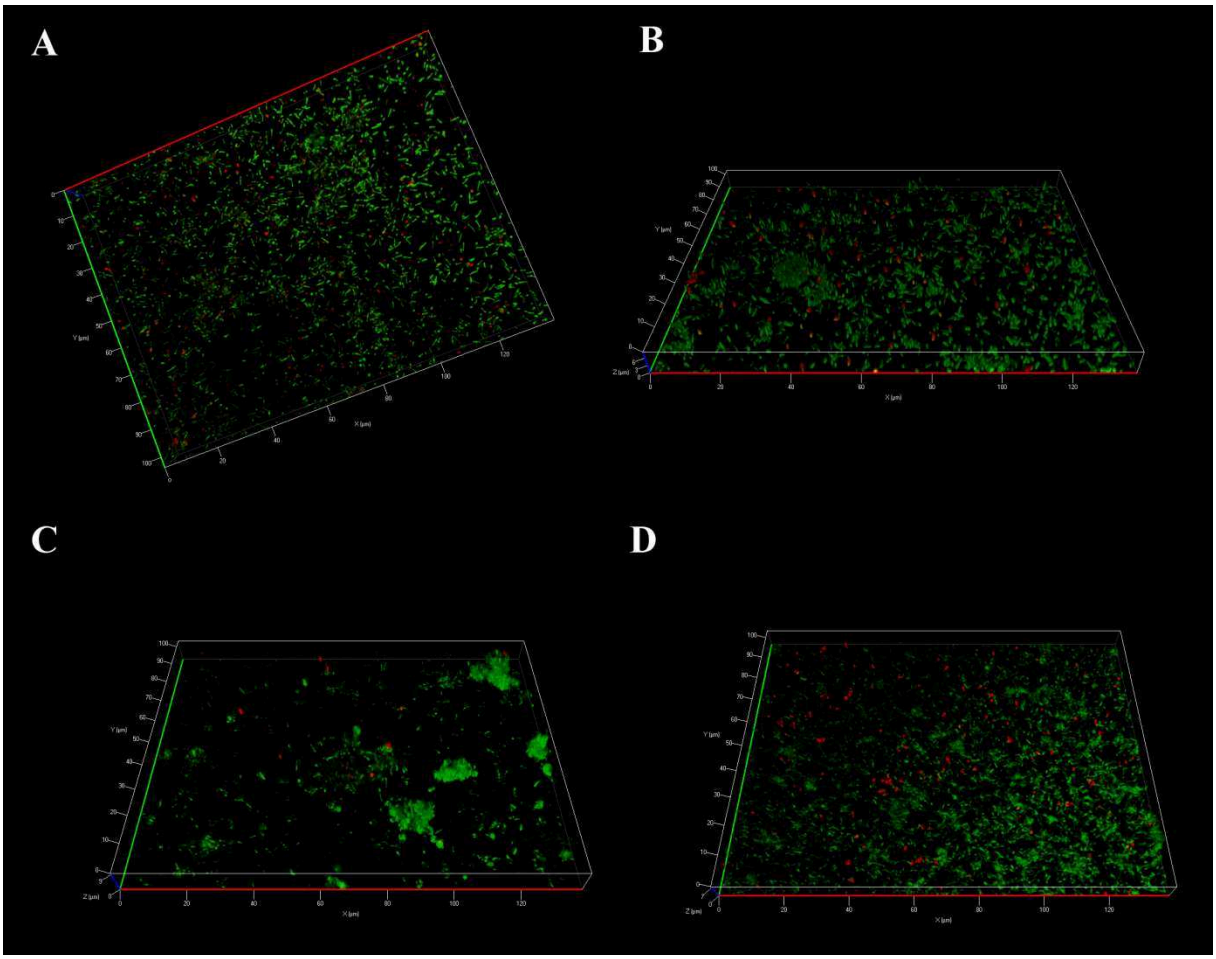


Figure 26: ***Reconstitution 3D de clichés de microscopie à illumination structurée à J7 de l'implantation de* L. pneumophila *Lens Post-Culture sur un biofilm mono-espèce composé de* P. aeruginosa *(A),* E. brevis *(B),* A. hydrophila *(C),* E. coli *(D).***
Les légionelles apparaissent en rouge et les autres bactéries en vert. Figure représentative de 2 répétitions pour laquelle 4 clichés ont été pris par échantillon.

D) Orientation de l'implantation de *L. pneumophila*

L'observation des coupes transversales permet de montrer une même orientation pour la majorité des légionelles. En effet, *L. pneumophila*, quelle que soit son origine apparait implanté selon son axe polaire (Figure 27).

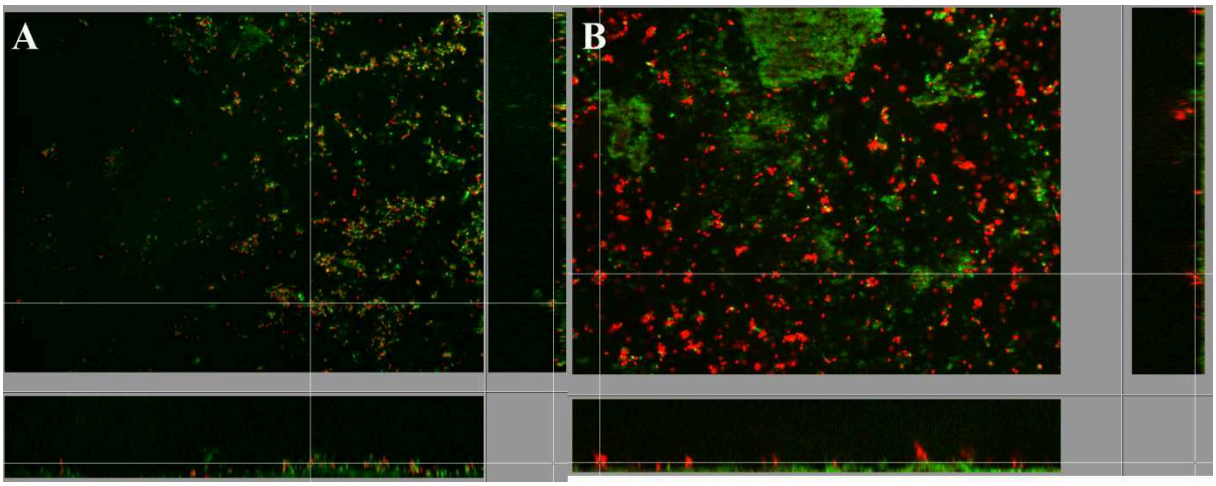


Figure 27 : ***Coupe orthogonale de l'implantation à J7 de* L. pneumophila *Lens A) Post-Culture B) Post-*Acanthamoeba *dans un biofilm maitrisé de souches issues de réseaux d'eaux.***
Représentées en rouge, les légionelles et en vert, les autres bactéries. Figure représentative de 2 répétitions pour lesquelles les 4 clichés ont été pris par échantillon.

Il est alors possible de proposer la participation pour cette adhésion de la protéine *Legionella* collagen like « Lcl ». D'après les travaux de Mallegol et ses collègues, cette protéine est répartie de manière hétérogène sous forme d'amas à la surface de la cellule notamment aux pôles et transcrite environ 5 fois plus lors de la formation de biofilm (Mallegol et al., 2012).

E) Développement de biofilm par *L. pneumophila*.

Le troisième résultat intéressant est la répartition des légionelles sur la surface de biofilm. En effet, les légionelles PT et PC apparaissent isolées et réparties de manière homogène à la surface du biofilm. A l'opposé, les légionelles PA sont réparties de manière hétérogène et forment des amas (Figure 27). Ces agrégats peuvent être dus à la libération de vésicules chargées de légionelles après infection des amibes, à la multiplication d'une bactérie initialement fixée ou à un regroupement de bactéries *in situ*.

1) Etat à la sortie des amibes

Afin de déterminer si ces agrégats sont liés à l'état des cellules à la sortie des amibes, des légionelles PA et PC ont été fixées sur des filtres en polycarbonate immédiatement après

leur obtention et observées en microscopie à épifluorescence afin de comparer leurs morphologies (Figure 28).

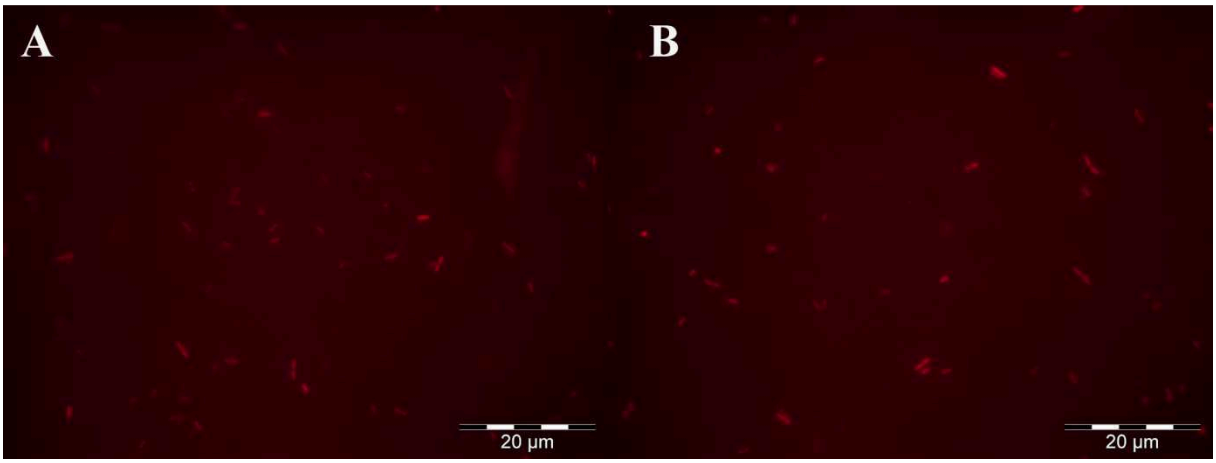


Figure 28: ***Observation en microscopie à épifluorescence de* L. pneumophila *Lens A) PC et B) PA.***
Les légionelles apparaissent en rouge. Figure représentative de 3 répétitions pour laquelle 3 clichés ont été pris par échantillon.

Quelle que soit l'origine des bactéries, les cellules apparaissent isolées. Quelques légionelles sont en train de se diviser, ce qui suggère que les bactéries sont en fin de phase de croissance exponentielle. Ces observations démontrent que les amas observés ne sont pas pré-établis dans les amibes mais se forment lors d'étapes ultérieures de formation de biofilm.

2) Développement de biofilms par les légionelles PA

Afin d'éliminer toute influence du consortium bactérien, les légionelles ont été directement déposées sur la surface de verre, sans biofilm préformé afin de vérifier si les différences observées entre PA et PC sont uniquement liées aux conditions de culture. Après 7 jours d'incubation, les échantillons ont été marqués et observés (Figure 29).

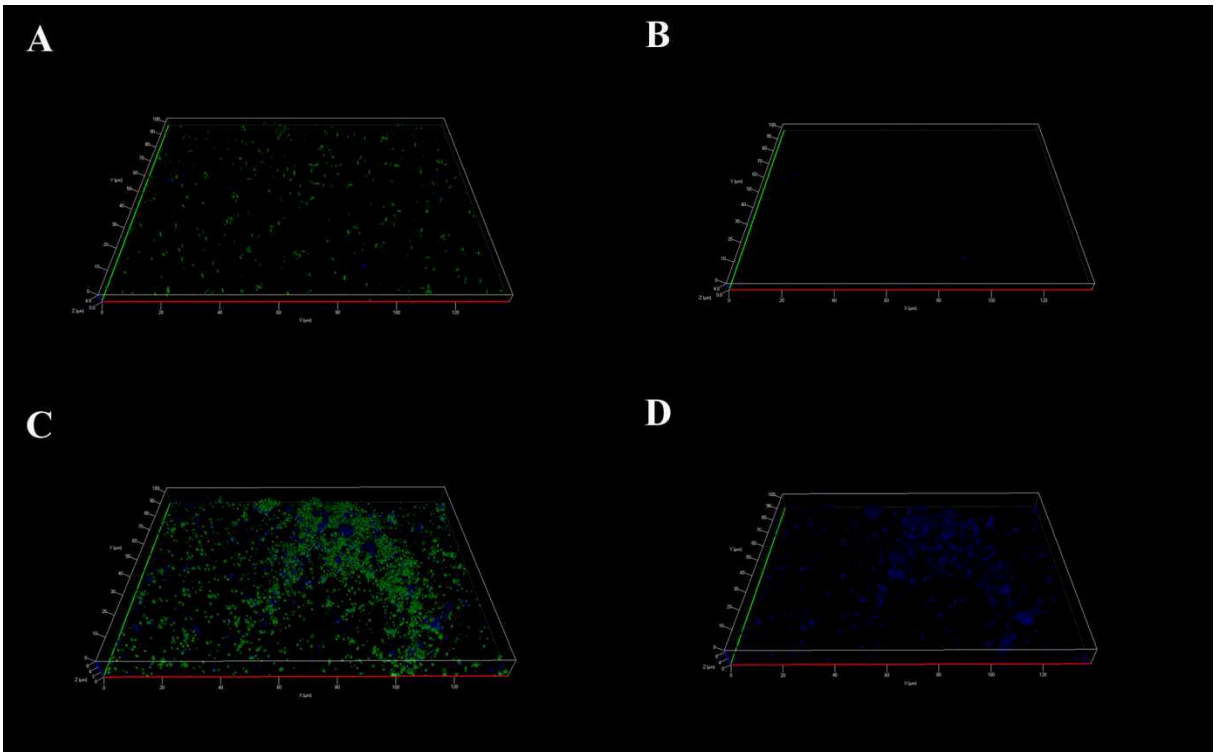


Figure 29: ***Reconstitution 3D de l'observation en microscopie à illumination structurée de l'implantation à J7 de* L. pneumophila *Lens A) Post-Culture C) Post-*Acanthamoeba *sur une surface en verre. En C) est uniquement présenté le marquage des sucres des légionelles B) PC et D) PA.***
Représentées en vert, les légionelles, en bleu, les sucres marqués et la barre d'échelle correspond à 10 µm. Figure représentative de 8 répétitions pour lesquelles 4 clichés ont été pris par échantillon.

L. pneumophila PC est répartie de manière homogène sur toute la surface et les cellules apparaissent isolées, alors que les bactéries issues d'amibes (PA) apparaissent sous la forme d'amas de cellules. Dans cette expérience, nous avons utilisé de la Concanavaline A, conjuguée à de l'Alexafluor qui permet de marquer spécifiquement une éventuelle matrice exopolysaccharidique du fait de son affinité pour le D-mannose ou le D-glucose. L'ajout de ce fluorochrome conjugué à la lectine permet de mettre en évidence qu'il y a que très peu ou pas de production d'exopolysaccharide par les PC, contrairement aux PA qui, elles sont entourées d'une quantité importante d'exopolysaccharides.

La différence de quantité observée pourrait être liée à une induction liée au passage dans les amibes ou simplement due à un retard de synthèse des polysaccharides par les PC. Afin de vérifier cette hypothèse, des légionelles PC ont été déposées sur verre et observées après 15 jours d'incubation. Les résultats obtenus sont similaires à ceux obtenus à 7 jours, c'est-à-dire que les cellules sont isolées et sécrètent peu ou pas d'exopolysaccharides (Figure 30).

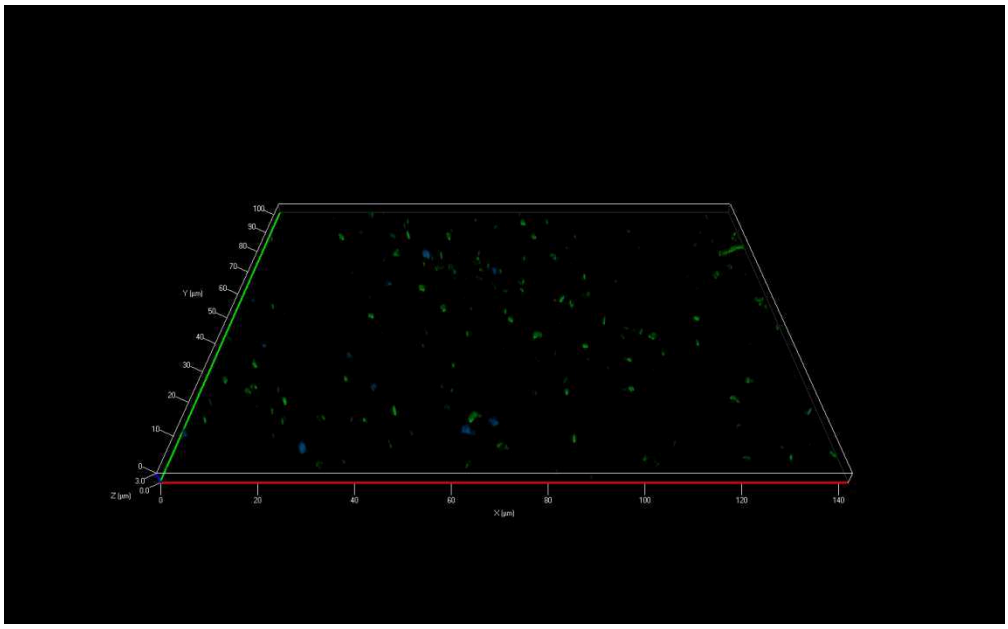


Figure 30 : ***Reconstitution 3D de l'observation en microscopie à illumination structurée de l'implantation à J15 de* L. pneumophila *Lens PC sur une surface en verre.***
Représentées en vert, les légionelles, en bleu, les sucres marqués. Figure représentative de 2 répétitions pour lesquelles 4 clichés ont été pris par échantillon.

L'ensemble de ces expériences suggère une meilleure adhésion des légionelles PA au support qui pourrait être liée à la production de polysaccharides. Cette présence de matrice indique que ces groupements de bactéries PA ne sont pas de simples amas mais constituent un biofilm. Piao et ses collègues ont émis l'hypothèse que *L. pneumophila* était capable de sécréter une matrice extracellulaire mais notre étude est la première à démontrer la production d'exopolysaccharides par les légionelles (Piao et al., 2006).

Les légionelles PA sont donc capables de former un biofilm dans de l'eau minérale en7 jours, contrairement aux bactéries PC. La seule différence entre ces deux types cellulaires est la multiplication au sein des amibes, nous pouvons donc supposer que la croissance en amibes induit la capacité de formation de biofilms chez les légionelles. De plus, des résultats identiques ont été obtenus avec l'ensemble des espèces et des souches de légionelles testées.

Il est à noter quel es légionelles issues de protozoaires ciliés présentent le même phénotype que les PC. Comme chez les amibes, les légionelles sont ingérées et non phagocytées par les ciliés mais, dans le cas de *Tetrahymena tropicalis*, elles ne se multiplient pas et sont rejetées sous forme regroupée (Koubar et al., 2011). Ces résultats permettent d'émettre 2 hypothèses ; la première est que la capacité de formation des biofilms est induite par les amibes et par production d'un facteur amibien, la deuxième, que ce phénomène d'induction est lié à la réplication au sein des amibes.

F) Développement de biofilm par regroupement

Nous venons de voir que les légionelles issues d'amibes sont capables de développer des biofilms à partir d'agrégats. L'origine de ces formations peut être due à la multiplication de légionelles après leur fixation au support ou bien à un regroupement de cellules planctoniques. Pour identifier le processus mis en jeu, nous avons imaginé une expérience dans laquelle des légionelles exprimant soit la GFP soit la DsRed ont été récupérées séparément en sortie d'amibes puis mélangées et déposées directement sur les surfaces en verre. Dans l'hypothèse d'une multiplication de bactéries sessiles, des agrégats ayant une couleur homogène doivent être observés et, à l'inverse, des amas cellulaires de couleurs hétérogènes doivent témoigner d'un processus de regroupement. Après 7 jours d'incubation, les agrégats observés (Figure 31) apparaissent composés des 2 types de légionelles, en jaune sur l'image, les légionelles co-localisées exprimant les deux types de protéine fluorescente, ce qui indique que les amas sont dus au regroupement de cellules.

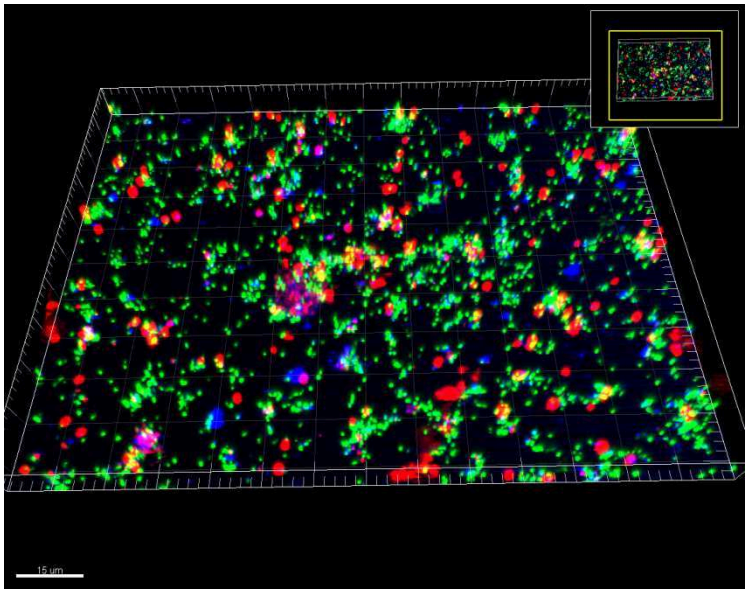


Figure 31: ***Reconstitution 3D de l'observation en microscopie à illumination structurée du mélange à J7 de* L. pneumophila *Lens PA sur une surface en verre.***
Représentées en vert, les bactéries PA exprimant la GFP et en rouge, les légionelles PA exprimant la Ds-Red, en bleu les sucres marqués et la barre d'échelle correspond à 10 µm. Figure représentative de 2 répétitions pour laquelle 4 clichés ont été pris par échantillon.

La même expérience a été réalisée avec des légionelles PC exprimant les deux fluorophores et mélangées. Les résultats obtenus sont similaires à ceux précédemment

obtenues pour les PC, des cellules isolées de différentes couleurs réparties sur la surface et une faible présence d'exopolysaccharides sont observables (Figure 32).

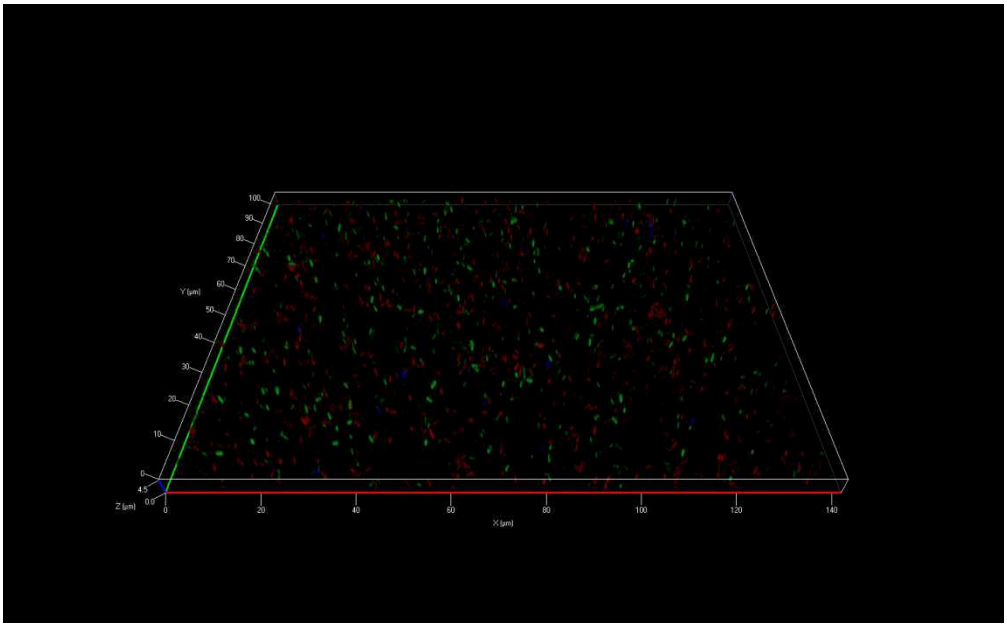


Figure 32: ***Reconstitution 3D de l'observation en microscopie à illumination structurée du mélange à J7 de* L. pneumophila *Lens PC sur une surface en verre.***
Représentées en vert, les bactéries PC exprimant la GFP et en rouge, les légionelles PC exprimant la Ds-Red, en bleu, les sucres marqués. Figure représentative de 2 répétitions pour lesquelles 4 clichés ont été pris pour chaque échantillon.

En parallèle, des PCR quantitatives ont été réalisées à J0 et à J7 sur l'ADN extrait de *L. pneumophila* PC et PA déposées sur support en verre. Cette quantification (Figure 33) confirme qu'il n'y a pas d'augmentation du nombre de légionelles dans nos conditions d'expériences entre le dépôt sur verre et l'observation à J7 pour les deux types de bactéries.

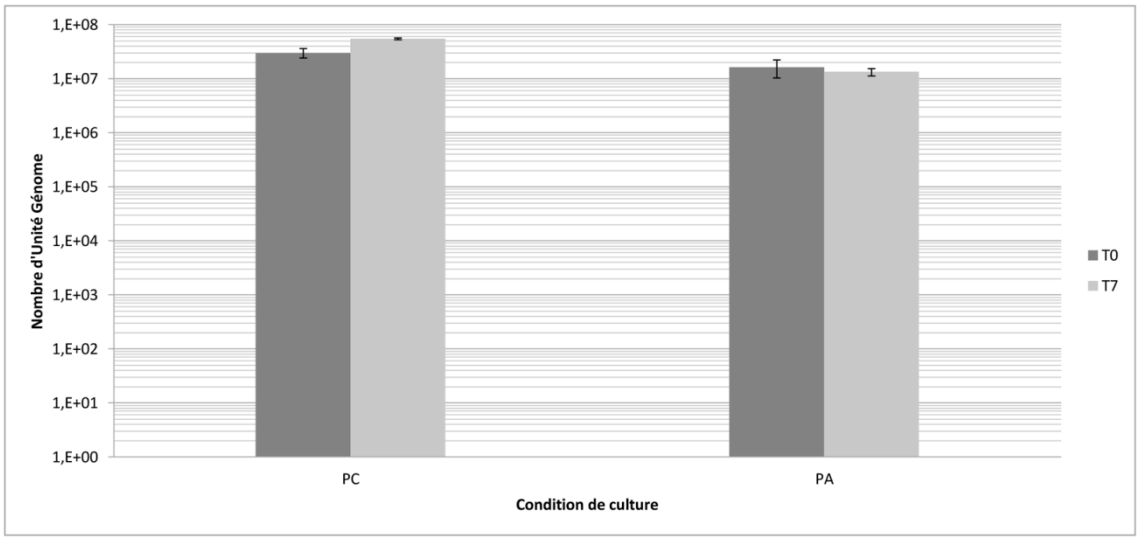


Figure 33: ***Histogramme présentant les résultats de PCR quantitative effectuées sur l'ADN extrait de légionelles PA et PC à T0 et à T7 jours.***
Les PCR quantitatives ont été répétées 2 fois sur 3 échantillons indépendants par condition.

Ces résultats confirment que la formation des biofilms par *L. pneumophila* est liée à un phénomène d'agrégation de cellules planctoniques et non à une multiplication de bactéries sessiles, comme l'a déjà proposé Mampel et ses collègues (Mampel et al., 2006).

G) Mise en évidence de chimiotactisme

Nous venons de démontrer que les biofilms formés dans nos conditions expérimentales sont dus à l'agrégation de cellules planctoniques mais ce processus pourrait être le résultat soit d'un dépôt aléatoire de couches successives de bactéries sur une surface ; soit d'un processus d'attraction exercé par les cellules fixées sur les cellules planctoniques. Dans le but de déterminer le mécanisme responsable des agrégats, nous avons mélangé des légionelles PA exprimant la Ds-Red et des légionelles PC exprimant la GFP avant de les déposer sur lame en verre. Des agrégats formés par des légionelles PA (en rouge) empaquetés dans une matrice d'exopolysaccharide (en bleu) et recouvertes de légionelles PC sont observables (Figure 34).

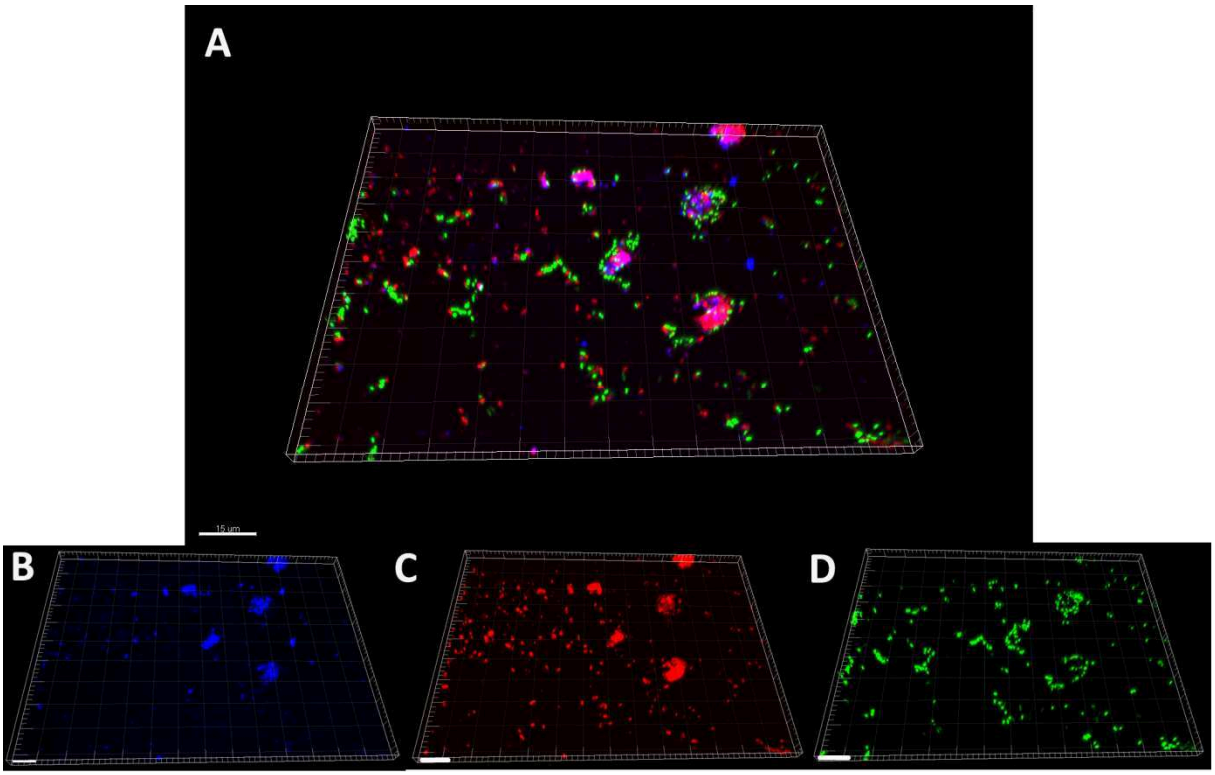


Figure 34: ***Reconstitution 3D de l'observation en microscopie à illumination structurée du mélange à J7 de* L. pneumophila *Lens PC (Vert) et PA (Rouge) sur une surface en verre (A).***
Respectivement en (B), (C) et (D), sont représentés uniquement les exopolysaccharides, les légionelles PA et les légionelles PC. Apparaissent en vert, les légionelles PC, en rouge, les légionelles PA, en bleu, les sucres marqués. Figure représentative de 2 répétitions pour lesquelles 4 clichés ont été pris pour chaque échantillon. La barre d'échelle correspond à 10 µm (A) et à 20 µM (B, C et D).

Ce résultat semble indiquer que les légionelles PA attirent les légionelles PC. La nature de ce phénomène serait donc moléculaire et diffusible dans le milieu. Ce chimiotactisme est sans doute lié à un facteur secrété uniquement par les légionelles PA. Les bactéries issues des amibes semblent également détecter ce signal plus rapidement car elles se regroupent et produisent des exopolysaccharides avant d'être rejointes par les légionelles PC. La capacité de synthèse de cet attracteur est donc apparemment liée à la multiplication dans les amibes.

Dans une seconde partie, nous avons étudié les facteurs responsables des différences observées entre les *L. pneumophila* PA d'une part et les PC d'autre part. Plus particulièrement, nous nous sommes intéressés à : la synthèse des exopolysaccharides, la vitesse d'implantation des bactéries, le chimiotactisme et le rôle des amibes dans le développement des biofilms.

Partie II : Mise en évidence des facteurs impliqués

A) Cinétique d'implantation et synthèse des exopolysaccharides de *L. pneumophila*

Nous avons pu observer précédemment que les *L. pneumophila* PA ont la capacité de former rapidement des biofilms contrairement aux cellules issues de culture classique. Afin de déterminer si cette capacité est due à un potentiel d'adhésion au support supérieur des PA ou à la synthèse d'exopolysaccharides, une série d'expériences a été réalisée.

1) Cinétique d'adhérence

Dans un premier temps, la cinétique d'adhérence des légionelles PC et PA a été déterminée dans de l'eau minérale sur une surface en polystyrène traitée pour la culture cellulaire. Les résultats ont été obtenus par dénombrement classique à différents temps, réalisé uniquement sur les cellules fixées (Figure 35).

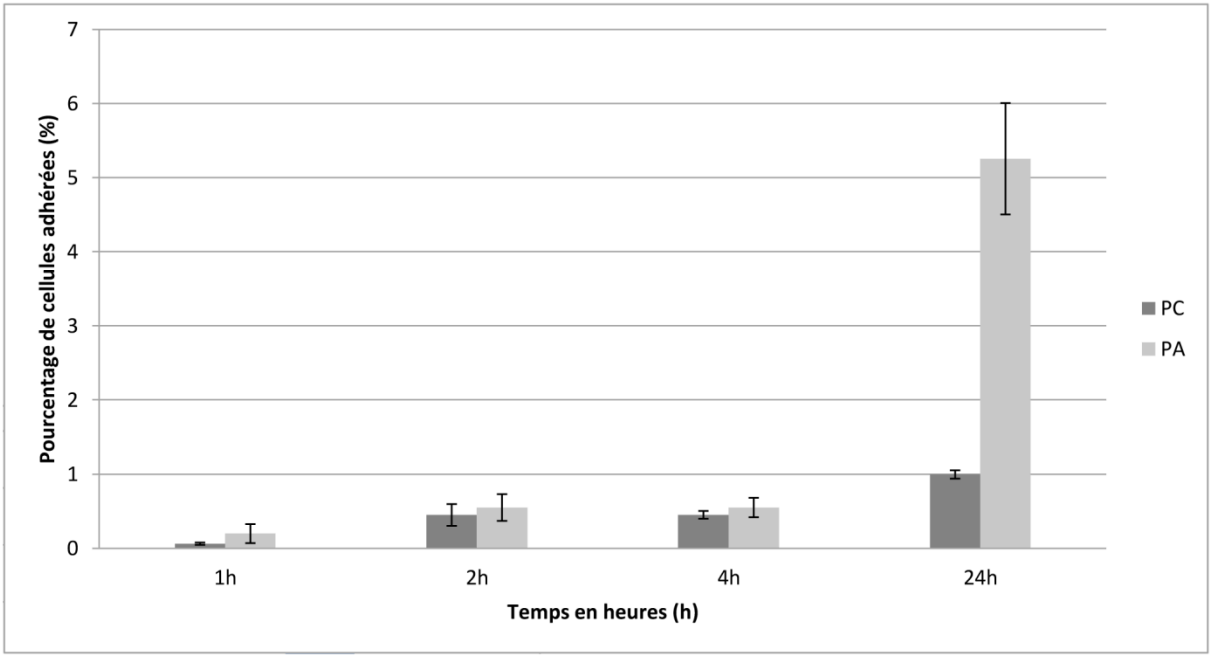


***Figure 35:* Histogramme présentant les résultats de dénombrements sur la cinétique d'implantation effectués sur L. pneumophila PA et PC.**
Les expériences ont été répétées 2 fois sur 3 échantillons indépendants par type cellulaire.

Une première constatation est que le nombre de cellules fixées est relativement faible par rapport à la quantité initiale de cellules déposées dans tous les cas. On observe également

que le nombre de légionelles PA et PC fixées est semblable après 4 heures, alors qu'à 24 heures, il y a environ 5 fois plus de PA adhérées que de PC. Or, si les légionelles PA avaient un potentiel d'adhérence supérieur à celles issues de culture, on observerait une différence de quantité de cellules fixées dès les premières mesures et cet écart se conserverait ou/et se creuserait avec le temps. Ici, ce n'est pas le cas, la différence n'apparait qu'après 24 heures, ce qui tend à démontrer que les bactéries issues de ces deux conditions de cultures ont la même capacité d'adhérence et la différence serait donc due à un ou des facteurs propres aux légionelles PA.

D'après les résultats obtenus, nous pouvons toute fois émettre l'hypothèse que les exopolysaccharides pourraient être l'un ou le facteur responsable de cet écart. En effet, ces macromolécules pourraient favoriser l'adhésion des Légionelles au substrat en offrant des motifs moléculaires ou une configuration spatiale facilitant l'adhésion des bactéries sur cette matrice.

Une autre mesure de cinétique a été réalisée par mesure de la fluorescence émise par *L. pneumophila* exprimant la GFP. Le principe de cette mesure repose sur la proportionnalité entre émission de fluorescence et concentration bactérienne. Donc, à partir d'une gamme étalon réalisée avec des concentrations cellulaires définies, il est possible de déterminer la quantité de bactéries fixées au support. Dans un premier temps, une gamme a été réalisée avec une quantité de cellules croissante allant de 1.10^2 à 1.10^9*L. pneumophila* GFP pour déterminer le seuil de détection de cette technique et en évaluer la faisabilité (Figure 36). La fluorescence des échantillons a été mesurée toutes les 24 heures pendant 10 jours afin de mettre en évidence une éventuelle variation au cours du temps.

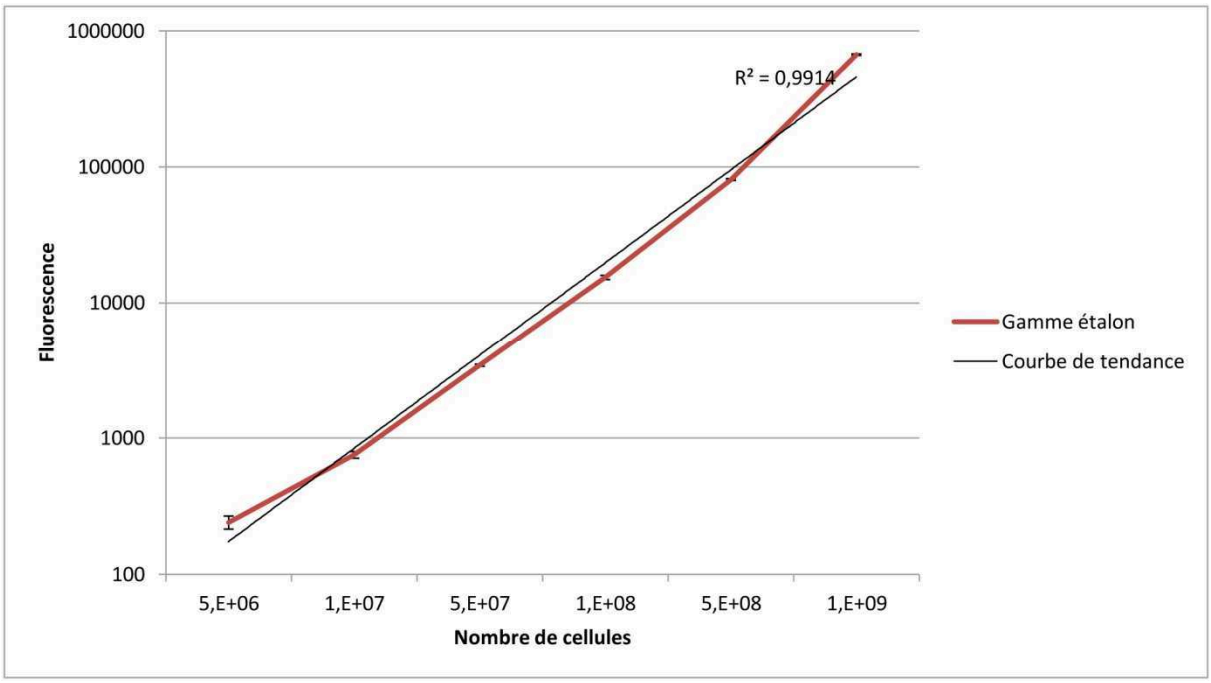


Figure 36: ***Courbe réalisée par mesure de la fluorescence émise à partir d'une gamme étalon de* L. pneumophila *exprimant la GFP.***
Les expériences ont été répétées 3 fois sur 6 réplicats par condition.

L'analyse des résultats a montré que en dessous de 5.10^6 cellules la courbe obtenue n'était pas linéaire (résultats non montrés) alors qu'au dessus de ce seuil la linéarité permet de déterminer des concentrations bactériennes (Figure 36). De plus, aucune variation de la fluorescence n'a été observée au cours de la période de 10 jours de mesures. Afin de pouvoir utiliser cette technique, en se basant sur les résultats préliminaires où l'on obtient au minimum 0,5 % de cellules fixées, il convient de partir avec une dose initiale de 1.10^9Légionelles par échantillon afin d'obtenir une dose quantifiable.

Les mesures de fluorescence ont été réalisées à des temps identiques à la précédente expérience de cinétique par dénombrement. Dans tous les cas il s'est avéré que les signaux étaient trop faibles pour être interprétés aux points 1 heure, 2 heures et 4 heures après dépôt sur les surfaces. La mesure effectuée à 24 heures montre, pour *L. pneumophila* PA, une fluorescence moyenne correspondant à $4,8.10^7$ cellules et pour les légionelles PC, un signal équivalent à $1,1.10^7$ bactéries. Donc ici, il apparait que 4,3 fois plus de *L. pneumophila* PA que de PC sont adhérées après 24 heures. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par dénombrement. Avec cette méthode, il a donc été mesuré que 4,36 fois plus de PA sont adhérées par rapport aux PC, ce qui est cohérent avec les résultats de dénombrement. Malgré

son manque de sensibilité, cette technique pourra être utilisée pour mesurer le nombre de cellules adhérées sur des temps supérieurs à 24 heures.

Ces deux expériences ont permis de mettre en évidence qu'un facteur spécifique aux légionelles PA joue un rôle important dans l'adhérence des cellules. Le décalage de nombre de cellules adhérées n'apparaissant qu'après 24 heures permet de penser que ce facteur favorisant l'adhérence des légionelles PA pourrait être sécrété par celles-ci.

B) Quantification des exopolysaccharides sécrétés

L'observation en microscopie en épifluorescence des biofilms ou des cellules adhérées est une technique longue et contraignante. Afin de pouvoir évaluer l'importance du biofilm rapidement, nous avons tout d'abord testé le cristal violet. Ce colorant, aussi appelé violet de gentiane, est surtout utilisé en microbiologie pour la coloration de Gram. Le dosage au cristal violet est également utilisé comme méthode indirecte pour quantifier les biofilms. Le marquage des cellules fixées (coloration) est suivi d'un lavage servant à éliminer le colorant en excès. Le cristal violet fixé par les bactéries est solubilisé en ajoutant de l'éthanol. Le dosage colorimétrique à 595 nm permet de déterminer la quantité de colorant solubilisé dont la concentration est proportionnelle au nombre de bactéries du biofilm. La sensibilité et la simplicité de cette méthode en ont fait une des plus utilisées pour la quantification des biofilms (Djordjevic et al., 2002; Jackson et al., 2002; Hindre et al., 2008).

Ce dosage a été réalisé sur des biofilms obtenus à partir de légionelles PC et PA (Figure 37).

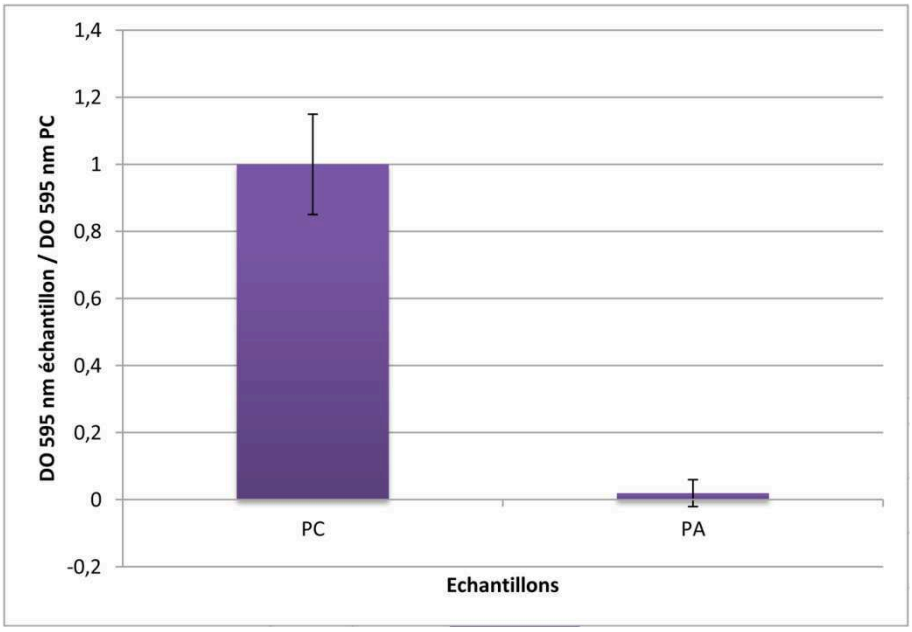


Figure 37 : ***Histogramme de l'intensité normalisée de la coloration au cristal violet déterminée à partir de biofilms de* L. pneumophila *PC et PA après 24 heures d'incubation.***
Les résultats sont normalisés par rapport à la référence : légionelles PC. L'expérience a été répétée 5 fois.

Les résultats obtenus (Figure 37) sont en contradiction avec les observations et les mesures précédentes. En effet, la coloration au cristal violet du biofilm de légionelles PA est environ 50 fois inférieure à celle déterminée pour le biofilm des Légionelles PC. Or, nous avons montré précédemment, par dénombrements et mesure de fluorescence, qu'il ya environ 5 fois plus de *L. pneumophila* PA que de PC fixées après 24 heures. Ce résultat pourrait indiquer que le cristal violet est incapable de colorer efficacement les cellules PA. Cette absence de coloration pourrait être liée à l'incapacité du colorant à traverser la matrice composée d'exopolysaccharides pour atteindre les cellules.

Nous avons alors décidé d'utiliser les exopolysaccharides comme indicateur de formation de biofilm. En effet, les observations microscopiques présentées précédemment ont montré qu'une différence majeure entre *L. pneumophila* PA et PC réside dans la quantité de polysaccharides présents dans leurs biofilms. Parmi les candidats potentiels pour cette mesure, le bleu d'Alcian a été sélectionné. Le bleu d'Alcian est principalement utilisé en histologie pour la préparation d'échantillons destinés à la microscopie photonique et électronique car sa structure lui permet de stabiliser et de conserver la structure des polysaccharides lors des différents traitements (Green and Pastewka, 1974; Matsumaru et al., 2011; Van Doren et al., 2011). La méthode de dosage développée consiste à incuber les biofilms avec le colorant dont l'excès est éliminé par lavage. Le bleu d'Alcian fixé est ensuite solubilisé en ajoutant de l'acide acétique à 33 %. Le dosage colorimétrique à 595nmpermet de déterminer la quantité

de bleu d'Alcian fixée et donc indirectement la quantité de polysaccharides du biofilm par référence à une courbe d'étalonnage.

L'avantage de cette méthode est de permettre le dosage du polysaccharide entier contrairement aux méthodes de dosage de sucres traditionnelles comme la méthode de Lowry qui nécessite une hydrolyse complète du polymère.

Une gamme étalon a donc été réalisée avec de la dextrine de concentration allant de 1 mg/mL à 20 mg/mL, les résultats obtenus sont représentés par la figure 38.

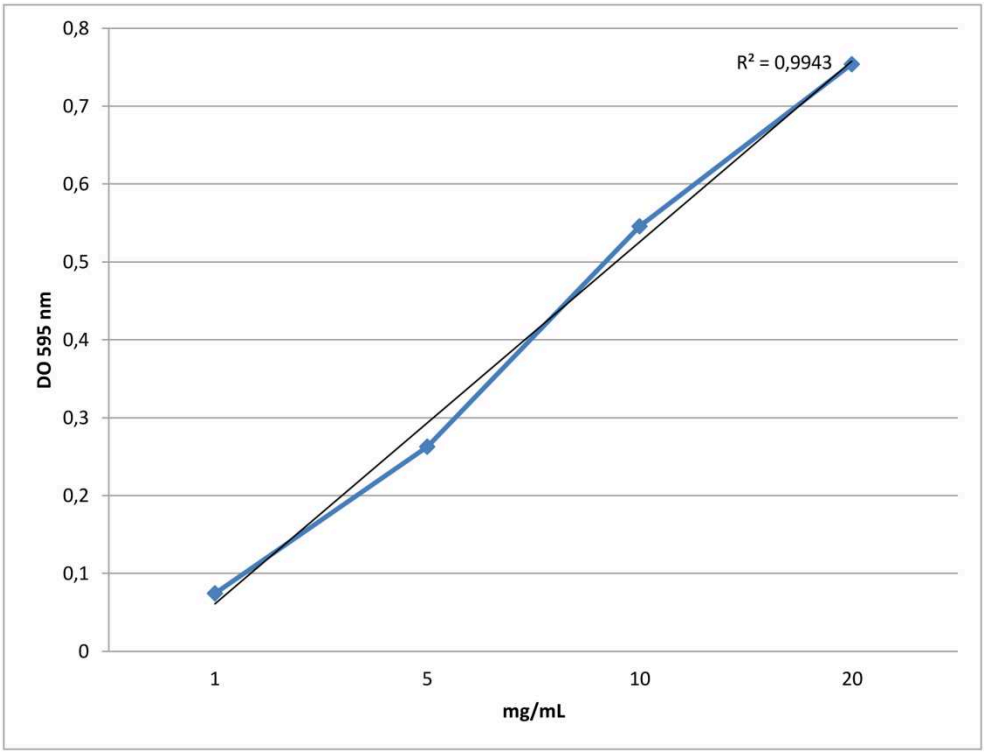


Figure 38: ***Courbe d'étalonnage réalisée avec des solutions de dextrine entre 1 et 20 mg/mL par coloration au bleu d'Alcian.***
Le taux de corrélation obtenu est de 0,9943 et l'expérience a été répétée 3 fois.

Le taux de corrélation, supérieur à 0,99, permet de valider l'utilisation de la dextrine comme référence pour estimer une quantité d'exopolysaccharides produite. Cependant, en toute rigueur il faudrait utiliser le polysaccharide produit par *L. pneumophila* Lens comme référence, et non la dextrine, car il est impossible pour l'instant de savoir si la réponse au colorant de ces deux polysaccharides est identique.

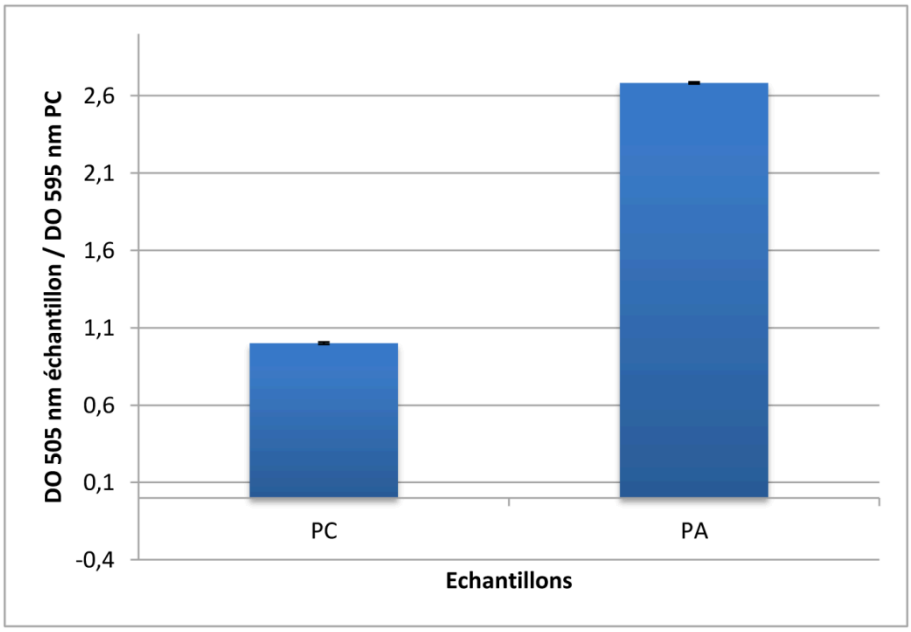


Figure 39: ***Histogramme de l'intensité normalisée de coloration au bleu d'Alcian réalisée sur les biofilms de* L. pneumophila *PC et PA après 24 heures d'incubation.***
Les résultats sont normalisés par rapport à la référence, les légionelles PC. L'expérience a été répétée 8 fois.

Ce dosage a été réalisé sur des biofilms formés avec des légionelles PA et PC. Les résultats obtenus (Figure 39), montrent que la coloration au bleu d'Alcian est presque 3 fois plus importante pour les biofilms formés avec les légionelles PA (2,7) que pour les biofilms des légionelles PC. En utilisant la gamme étalon (Figure 38) et la moyenne des valeurs d'absorbance obtenues (Figure 39), il est possible de calculer que la quantité de polysaccharides produits par des légionelles PC après 24 heures de fixation, est de 2,9 mg d'équivalent dextrine en moyenne alors qu'elle est de 7,7 mg pour les légionelles PA. Les résultats de cette expérience montrent un écart entre légionelles PA et PC plus faible mais vont dans le même sens que ceux obtenus lors des mesures d'adhérence précédentes. L'écart peut être dû au décalage temporel entre synthèse des exopolysaccharides et attachement des bactéries. En effet, un tel effet a été montré par Vandevivere and Kirchman (1993), concernant des biofilms de bactéries de rivières dont l'attachement stimule la production des EPS. Les expériences de cinétique ont montré que l'augmentation du nombre de légionelles PA adhérées par rapport aux PC apparait entre 4 et 24 heures, il est alors probable qu'après 24 heures les cellules nouvellement fixées n'ont pas eu le temps de produire des exopolysaccharides. Ces résultats valident l'utilisation de cette technique comme méthode rapide pour détecter la formation de biofilm par les légionelles.

De plus, ce résultat permet de suggérer que la différence d'adhérence des légionelles PA et PC est directement liée à la production d'exopolysaccharides qui permettraient de fixer durablement les cellules au support et favoriser l'adhésion de nouvelles bactéries au complexe en développement. En effet, ces exopolysaccharides pourraient à la fois faciliter l'adhérence et favoriser la cohésion entre les légionelles. Afin de vérifier cette hypothèse, il conviendra d'étudier en détail la structure de cette matrice. D'autre part, il est envisageable d'étudier l'adhésion des légionelles PC et PA en présence de différents polysaccharides de diverses origines. Ceci pourrait permettre de comprendre l'effet antagoniste de certaines souches vis-à-vis de l'implantation des légionelles dans les biofilms.

C) Analyse des exopolysaccharides

De manière à étudier la matrice du biofilm des Légionelles et plus particulièrement les exopolysaccharides qui la composent, nous avons adapté un protocole décrit pour l'extraction des SPE de biofilms marins (Wingender, 1999). Les biofilms sont composés de 3 types distincts d'exopolysaccharides. Le premier constitué d'exopolysaccharides en suspension dans le milieu proche du biofilm est appelé fraction colloïdale. Le second, la fraction liée, correspond aux exopolysaccharides liant les cellules les unes aux autres et formant la matrice du biofilm. Le dernier, la fraction résiduelle correspond aux exopolysaccharides ancrés solidement aux bactéries. Parmi les trois fractions, seules les deux premières sont extractibles, la troisième nécessite la lyse des cellules ce qui libère également les polysaccharides cellulaires.

Des biofilms de *L. pneumophila* ont été réalisés dans de l'eau minérale pendant 7 jours. L'utilisation de cette eau permet de favoriser l'adhésion des cellules au support et d'éviter la contamination de la fraction colloïdale par l'apport exopolysaccharides provenant d'un milieu de culture. Une centrifugation à 10 000 g pendant 30 minutes du surnageant dépourvu de cellules permet de collecter la fraction colloïdale. L'extraction de la fraction liée est basée sur l'utilisation de billes de résine échangeuse de cations, fortement acide. L'emploi de ces billes permet « d'arracher » les exopolysaccharides des cellules et de disloquer la matrice afin de récupérer ses différents constituants. Ces exopolysaccharides ont été préparés à partir de biofilms de *L. pneumophila* Lens PC, PA et PT.

Dans un premier temps les différentes fractions obtenues pour les trois types de légionelles ont été testées pour la présence de protéines (électrophorèses en gels d'acrylamide et dosage de Bradford) et d'ADN exogène (électrophorèses en gels d'agarose). Tous ces tests se sont révélés négatifs montrant que la matrice de ces biofilms est composée d'exopolysaccharides uniquement ou au moins très majoritairement.

Une analyse qualitative des monosaccharides composant les exopolysaccharides des différentes fractions a été réalisée. Après hydrolyse acide des polysaccharides les monosaccharides libérés ont été dérivés en alditols-acétates puis analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) (Mondamert et al., 2011). Les échantillons injectés en GC-MS ont été comparés à un mélange composé de ribose, rhamnose, fucose, arabinose, xylose, mannose, glucose et galactose. Les résultats obtenus pour les fractions colloïdales (Figure 40 A) et liées (Figure 40 B) des légionelles PC, PA et PT sont présentés dans la figure 40.

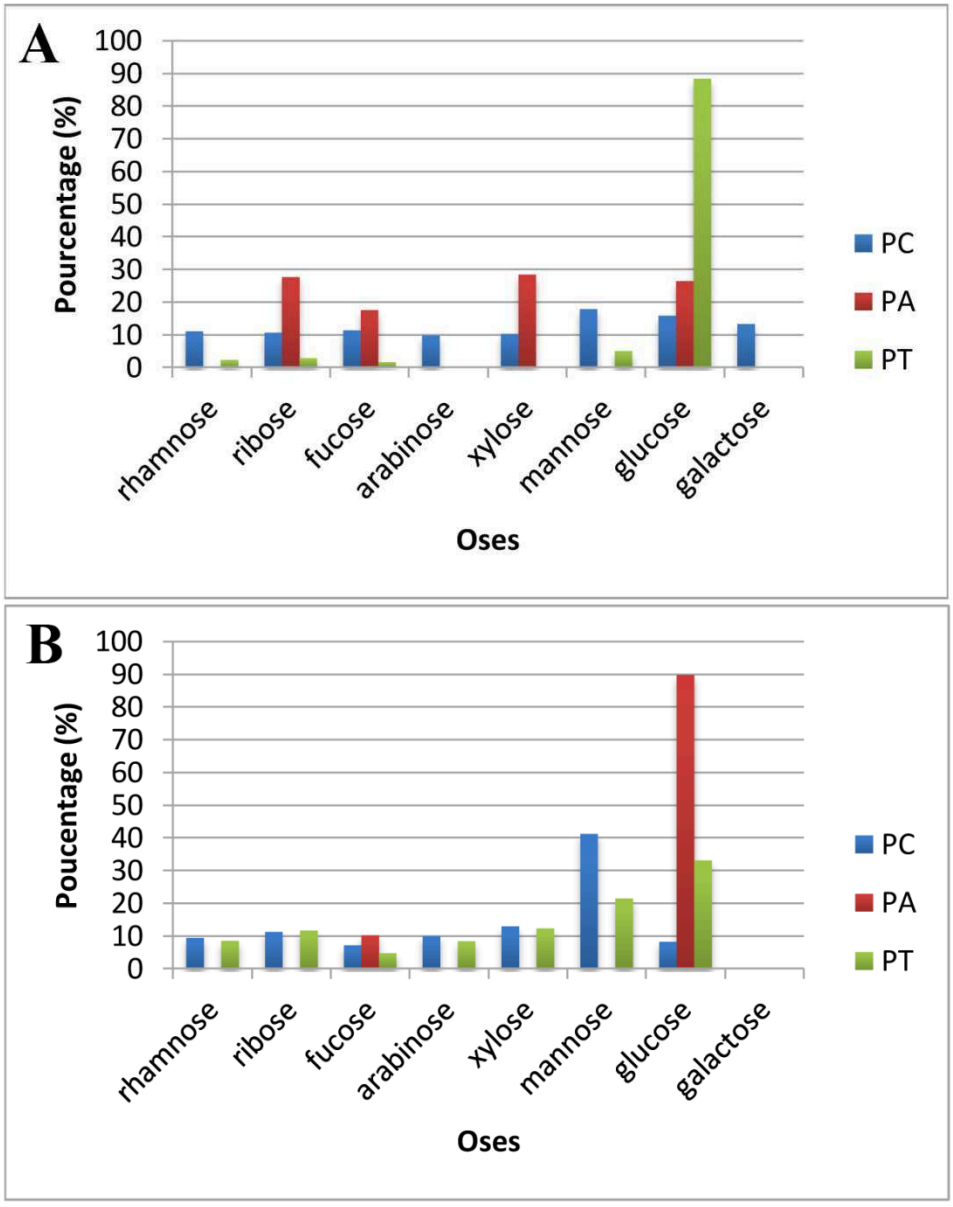


Figure 38: ***Composition en monosaccharides de la fraction colloïdale (A) et la fraction liée (B) de la matrice des biofilms formés par les légionelles PC, PA et PT.***
Cette expérience a été réalisée une fois.

Pour la fraction colloïdale des légionelles PC, on observe une composition variée, tous les sucres testés sont présents en quantité relatives comprises entre 10 et 20 %. Les légionelles PA montrent une fraction colloïdale composée de 4 oses : xylose (28,5 %), ribose (28 %), glucose (26,5 %) et fucose (17%). La fraction colloïdale des légionelles PT est quasi exclusivement composée de glucose (88 %) et de traces de mannose (5 %), ribose (3 %), rhamnose (2,5 %) et fucose (1,5 %). La comparaison de la composition en oses simples des fractions colloïdales des légionelles issues de culture PA, PC et PT tend à mettre en évidence une grande disparité en fonction de l'origine de culture de *L.pneumophila* Lens.

L'étude des fractions liées a permis de mettre en évidence que les légionelles PC produisent une matrice composée de mannose en majorité (41 %) mais également de xylose (13 %), ribose (11 %), arabinose (10 %), rhamnose (9,5 %), glucose (8,5 %) et fucose (7 %). Les légionelles PT produisent en majorité du glucose (33 %) et du mannose (21,5 %) mais également du xylose (13 %), du ribose (11,5 %), rhamnose (8 %), de l'arabinose (8,3 %) et du fucose (4,7 %). La fraction liée des légionelles PA est clairement différente puisque constituée presque exclusivement de glucose (90 %) et de fucose (10%). Le premier résultat de cette analyse de la matrice des biofilms est l'absence de galactose pour les biofilms produits par les trois types de légionelles. De plus, l'ose majoritaire est différent selon, les types de légionelles, le mannose pour PC, le glucose pour PA et les PT. L'observation du « profil osidique » de la matrice met en avant une caractéristique des polysaccharides des légionelles PA composés seulement de 2 oses alors que ceux des PC sont composés d'un grand nombre d'oses simples. Les polysaccharides des légionelles PT semblent présenter un profil intermédiaire entre ces 2 opposés. Les résultats de ce travail préliminaire sont confortés par les résultats de fixation du bleu d'Alcian et de la Concanavalin A qui se lient spécifiquement sur le mannose et le glucose.

Cette étude préliminaire met en avant une grande disparité dans la composition de la matrice du biofilm suivant la condition de multiplication de *L. pneumophila* Lens. Cependant, cette analyse induit une importante perte d'information liée à la réduction chimique des fonctions carboxyliques potentiellement présentes lors de la formation des alditols.

Dans l'optique d'obtenir à la fois la structure et la composition précise de ces exopolysaccharides, une collaboration a été initiée avec le Professeur Patrice Lerouge, spécialiste des polysaccharides, de l'université de Rouen.

D) Induction du phénotype biofilm par la molécule de Quorum Sensing inter-espèce

Dans le chapitre précédent, nous avons montré que les légionelles PA fixées au support attirent les légionelles PC et que ce phénomène serait de nature moléculaire et diffusible dans le milieu. Afin de décrypter ce phénomène d'attraction et le mécanisme mis en jeu, une série d'expériences ont été réalisées.

1) Détection de polysaccharides

Les résultats précédents indiquent que le chimiotactisme mis en évidence est probablement lié à un facteur secrété uniquement par les légionelles PA. De plus, il a été montré que ce phénomène est corrélé avec la présence accrue de polysaccharides au niveau desquels sont observés des agrégats bactériens. Afin de savoir si ces polysaccharides sont synthétisés par les bactéries ou relargués lors de la lyse des amibes, d'une part et si l'attraction et l'agrégation sont liées à la présence d'exopolysaccharides dans le milieu, un dosage au bleu d'Alcian a été réalisé sur le surnageant de culture de légionelles PA et PC avant inoculation sur plaque en verre. Les résultats sont présentés dans le tableau 4.

Tableau 4 : ***Absorbance à 595 nm après coloration par le bleu d'Alcian de l'eau minérale blanc, du surnageant de culture de légionelles PA et PC.***
Les résultats présentés sont des moyennes effectuées sur 6 échantillons indépendants pour chaque condition.

Echantillons	Absorbance à 595 nm
Blanc	0,100
Surnageant PA	0,156
Surnageant PC	0,145

Les absorbances observées pour les surnageants des légionelles PA et PC sont similaires et proches de celle du contrôle. Ceci indique que les quantités de polysaccharides dans ces suspensions sont faibles et que l'agrégation des légionelles PA n'est pas due à la présence spécifique de polysaccharides amibiens. De plus, ces résultats confirment que les exopolysaccharides observés après 7 jours d'incubation sur support sont sécrétés par *L. pneumophila* PA lors de la formation des biofilms.

2) Induction du phénotype biofilm par une molécule produite par les légionelles PA

Dans une seconde expérience, des légionelles PC ont été traitées soit avec le surnageant recueilli à partir d'une suspension de légionelles PA dans de l'eau minérale pendant 24 heures (Figure 41 A). Soit avec le surnageant d'infection des amibes, c'est-à-dire le milieu dans lesquelles légionelles se sont multipliées au sein des amibes dépourvu de cellules et débris (Figure 41 B). Les bactéries ont ensuite été déposées dans un puits à fond de verre et incubées 7 jours à 37°C (Figure 41).

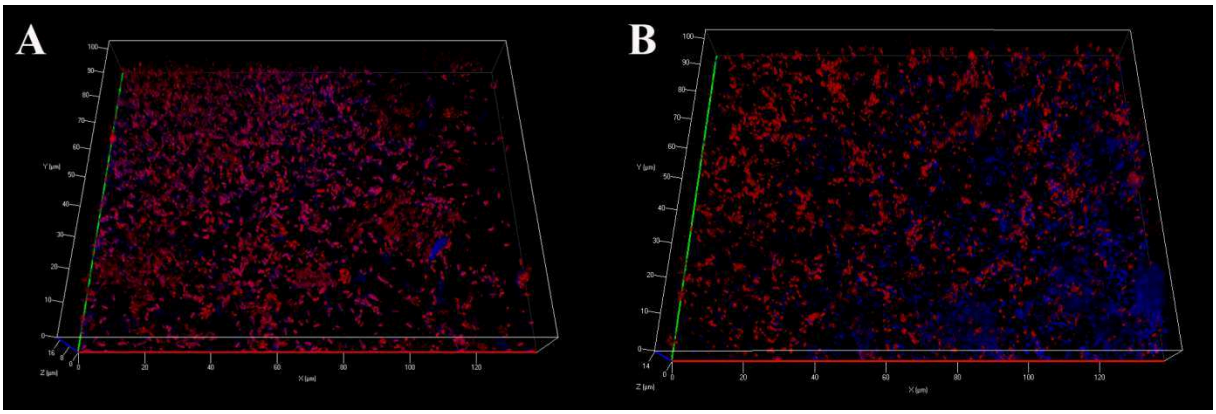


Figure 39: ***Reconstitution en 3D de l'observation en imagerie à illumination structurée de* L. pneumophila *PC incubées avec A) du surnageant d'une suspension de* L. pneumophila *PA de 24 heures en eau minérale ou avec B) du surnageant d'infection d'amibes.***
Représentées en rouge, les légionelles PC exprimant la Ds-Red et en bleu, les polysaccharides marqués. Figure représentative de 6 répétitions pour laquelle 4 clichés ont été pris pour chaque échantillon.

Des agrégats de légionelles sont observés quelque soit le surnageant testé. De plus, une grande quantité d'exopolysaccharides est observée pour les légionelles traitées avec le surnageant d'infection des amibes. Les légionelles PC traitées avec du surnageant de PA présentent donc un phénotype identique aux légionelles PA. Ces résultats montrent que les légionelles PA sécrètent un facteur moléculaire capable d'induire le phénotype "biofilm" chez des légionelles PC. De plus, on peut supposer que ce facteur induit la synthèse d'exopolysaccharides étant donné la quantité de ces macromolécules observée sur la figure 41. Il est également possible que le facteur ainsi mis en évidence soit le même que celui responsable du phénomène de chimiotactisme observé précédemment, puisqu'il entraine le regroupement des bactéries.

Afin de confirmer ces résultats, un dosage au bleu d'Alcian a été effectué sur *L. pneumophila* Lens PC traitées avec du surnageant de légionelles PA après 24 heures en incubation. Les données obtenues sont présentées dans la figure 42.

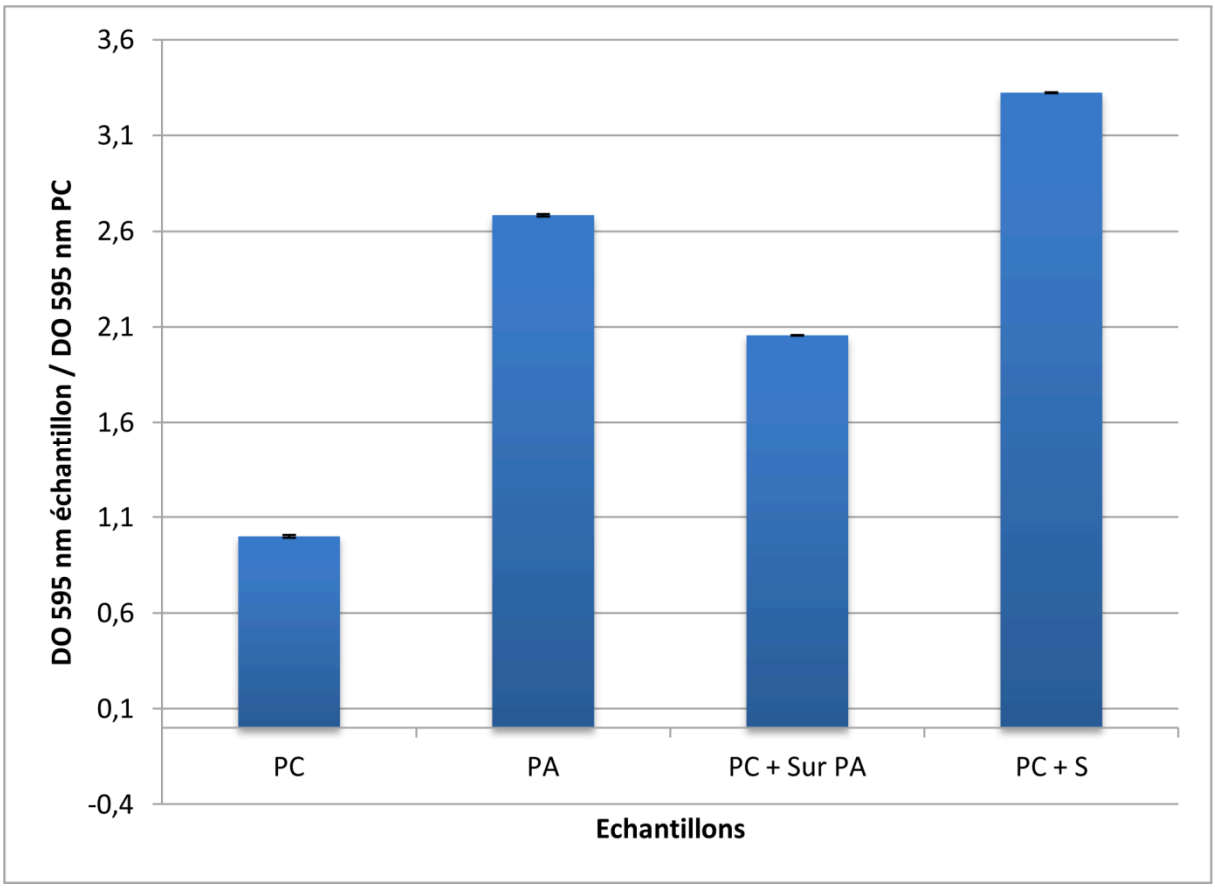


Figure 40: ***Intensités normalisées de coloration au bleu d'Alcian de biofilms de* L. pneumophila *PC, PA et PC traitées avec du surnageant de* L. pneumophila *PA (PC + Sur PA) ou avec du surnageant d'infection d'amibe (PC +S).***
Les résultats sont normalisés par rapport à la référence, légionelles PC. L'expérience a été répétée 8 fois.

La figure 42 montre que la quantité de polysaccharides des biofilms formés avec des légionelles traitées avec les deux surnageants, de légionelles PA et d'infection d'amibes est plus élevée que pour les PC et proche de celle obtenue pour les PA. Avec les légionelles PC traitées avec le surnageant de PA (2,05), le signal est environ un quart plus faible que pour les PA (2,63) alors que pour les légionelles PC traitées au surnageant d'infection d'amibes (3,32), il est supérieur d'un quart. Les différences rencontrées pourraient s'expliquer par le fait que la concentration de l'agent inducteur serait plus élevée dans le surnageant d'infection d'amibes car les légionelles y sont présentes depuis plus longtemps que dans l'eau minérale pour l'autre fraction testée. On peut aussi imaginer que des facteurs amibiens libérés lors de la lyse de celles-ci peuvent favoriser l'acquisition du phénotype biofilm. Toutefois, ces résultats confirment ceux obtenus en microscopie, c'est-à-dire que l'ajout des surnageants induit la formation d'agrégats et la synthèse de polysaccharides. Donc le phénotype biofilm est inductible.

1) Estimation de la durée de production de la molécule inductrice des légionelles.

Afin de déterminer si l'agent inducteur est produit de façon continue après libération des légionelles PA ou si cette production s'estompe avec le temps des légionelles PC ont été traitées avec du surnageant de légionelles PA conservées entre 1 et 20 jours. Pour tous les temps considérés, en pratique, toutes les 24 h pendant 7 jours, puis après 10, 15 et 20 jours, le surnageant de ces légionelles PA a été éliminé et remplacé par de l'eau minérale stérile. Ce surnageant est ensuite récupéré après 24 h d'incubation avant d'être ajouté à des légionelles PC. Celles-ci ont ensuite été déposées sur verre et incubées pendant 7 jours avant d'être analysées en microscopie en épifluorescence. Les résultats obtenus (Figure 43) montrent que légionelles PC présentent toujours le même phénotype que les légionelles PA lorsqu'elles sont traitées avec un surnageant de PA de 15 jours (Figure 43A). Ce n'est qu'avec le surnageant de 20 jours, que l'effet inducteur n'est plus observé. (Figure 43B). Avec le surnageant de 20 jours, la majorité des cellules sont isolées et non regroupées.

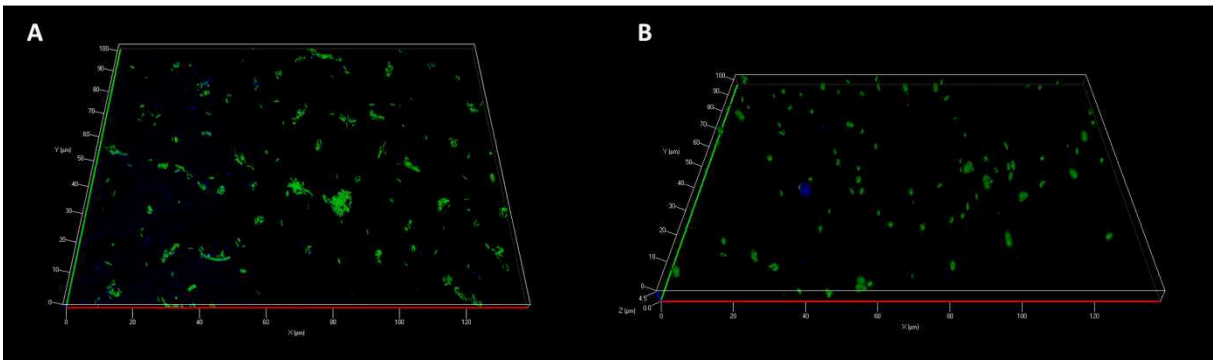


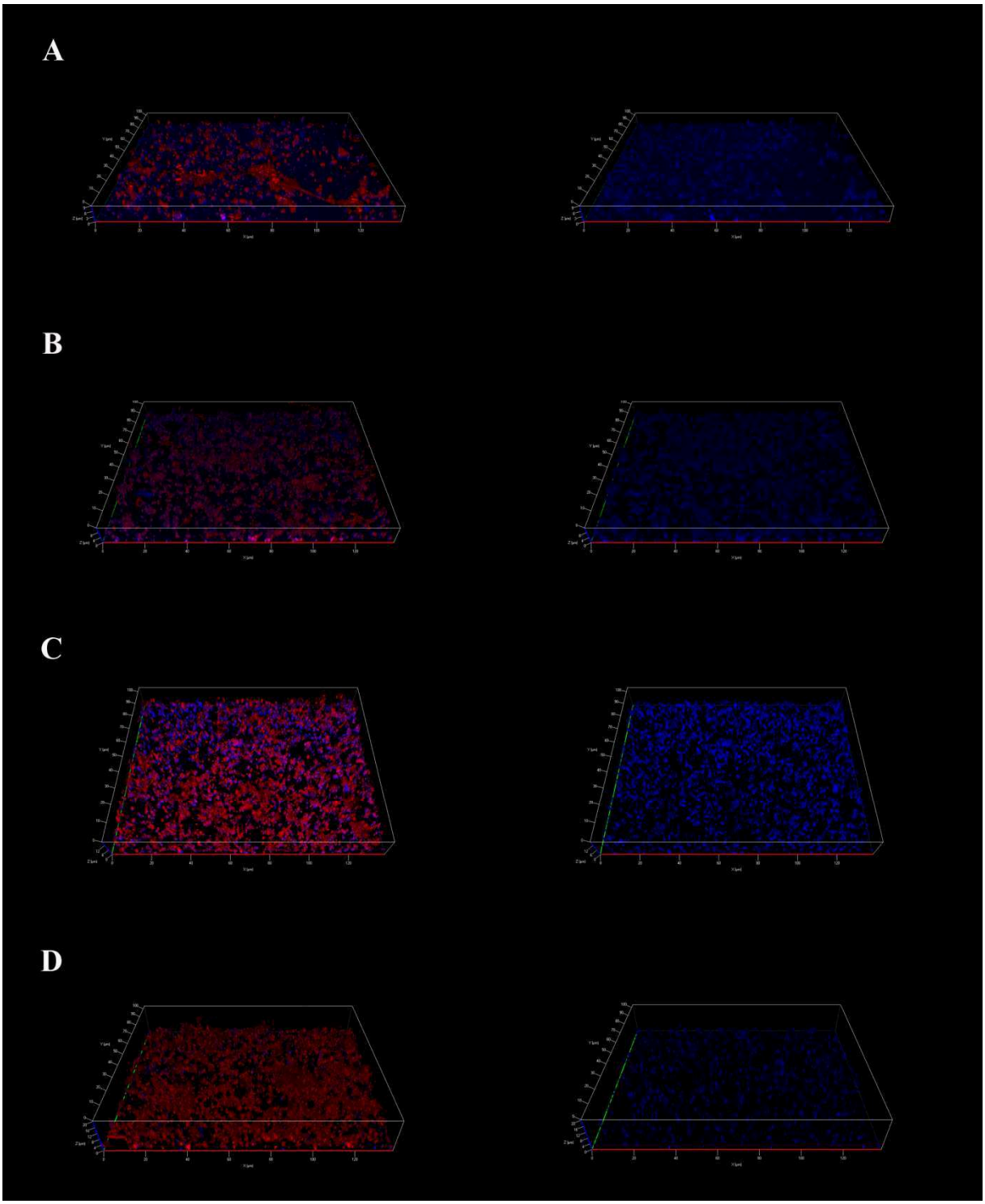
Figure 41: ***Reconstitution en 3D de l'observation en imagerie à illumination structurée de* L. pneumophila *Lens PC traitée avec du surnageant d'une suspension de* L. pneumophila *Lens PA après 15 jours (A) et 20 jours (B) d'incubation en eau minérale.***
Représentées en vert, les légionelles PC exprimant la GFP et en bleu, les sucres marqués. Figure représentative de 2 répétitions pour lesquelles 4 clichés ont été pris pour chaque échantillon.

Ces résultats montrent que *L. pneumophila* Lens sécrète un facteur qui induit le phénotype des légionelles PA et que ce facteur est produit pendant une durée comprise entre 15 et 20 jours. Ceci semble indiquer que ce mécanisme de communication est régulé. Cependant, cette perte d'activité inductrice peut être simplement liée à la raréfaction des nutriments et à une diminution des activités métaboliques de la bactérie.

L'ensemble de ces résultats semble démontrer que le système de communication/induction utilisée ici par *L. pneumophila* Lens apparait similaire à un système de type Quorum Sensing. De plus, la multiplication des légionelles au sein des amibes apparait comme l'évènement déclencheur de l'expression de ce phénomène d'induction.

2) Une communication inter-espèce

Nous avons montré que le surnageant de *L. pneumophila* Lens PA était capable d'induire un phénotype biofilm chez des légionelles PC de même souche. Afin de déterminer si ce phénomène d'induction est restreint à cette souche, à l'espèce pneumophila ou partagé par les autres légionelles, *L. pneumophila* Lens PC a été traitée avec du surnageant de *L. pneumophila* Bloodmington, Chicago et Corby ainsi que de *L. oakridgensis* et *L. longbeachae* PA.


A
B
C
D

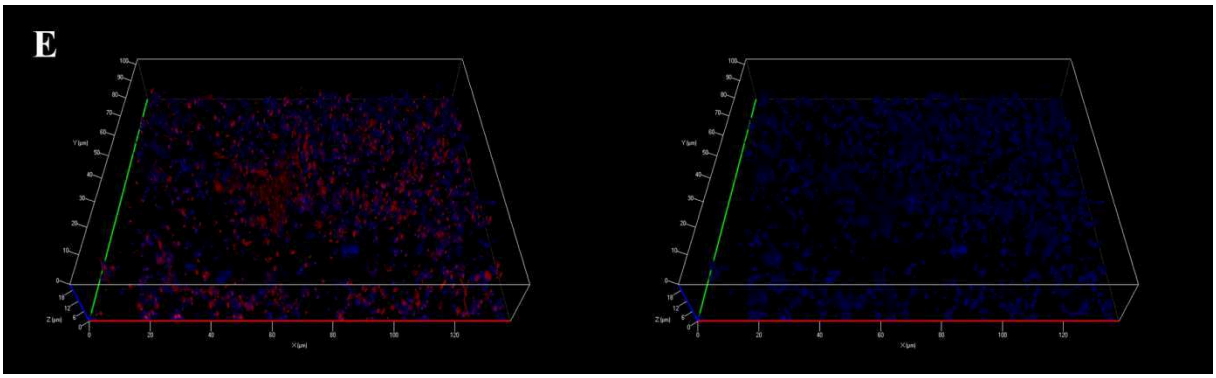


Figure 42 : ***Reconstitution en 3D de l'observation en imagerie à illumination structurée de* L. pneumophila *Lens PC avec du surnageant d'une suspension de* L. pneumophila *A) Bloodmington, B) Chicago, C) Corby, D)* L. oakridgensis *et E)* L. longbeachae *PA après incubation en eau minérale.***
Dans la colonne de gauche, sont représentées les légionelles et le marquage des sucres, et dans la colonne de droite, uniquement le marquage des sucres. Représenté en rouge, les légionelles PC exprimant la Ds-Red et en bleu, les sucres marqués. Figure représentative de 3 répétitions pour laquelle 3 clichés ont été pris pour chaque échantillon.

L. pneumophila Lens PC après traitement avec les différents surnageants forme des agrégats et produit des quantités importantes d'exopolysaccharides et cela, quelle que soit l'origine du surnageant utilisé (Figure 44). Par conséquent le facteur d'induction mis en évidence chez *L. pneumophila* Lens, ou un analogue fonctionnel, semble être commun aux légionelles au sens large même si toutes les espèces n'ont pas été testées. Ce signal a donc une activité inductrice à la fois intra et inter-espèces chez *Legionella*. Ces résultats sont en apparent désaccord avec les travaux de l'équipe d'Hilbi, qui ont suggéré que le système *lqs* (*Legionella* Quorum Sensing), dont LAI-1 est l'inducteur, est un système de communication strictement intra-espèce (Spirig et al., 2008; Tiaden et al., 2010). Nos résultats semblent donc indiquer que le facteur sécrété par les légionelles PA est distinct de LAI-1 ou que son activité s'exerce ici via d'autres mécanismes de transduction que ceux décrits par ces auteurs. Afin de trancher entre ces deux hypothèses nous avons entrepris de caractériser la molécule produite dans notre étude.

3) Un système Quorum Sensing de type AHL

Les inducteurs des systèmes de Quorum Sensing les plus fréquemment rencontrés, chez les bactéries à Gram négatif comme *Legionella*, sont des AHL. Afin de déterminer si l'inducteur produit par les légionelles PA appartient à cette famille de molécules, une bactérie a été utilisée comme biosenseur. Ce type d'organismes, aussi appelés biorévélateurs,

répondent à la présence d'un effecteur moléculaire par l'émission d'un signal quantifiable. Parmi les biosenseurs existants, nous avons choisi *Chromobacterium violaceum* CV026 (McClean et al., 1997; Fletcher et al., 2007; Steindler and Venturi, 2007; Kawaguchi et al., 2008).

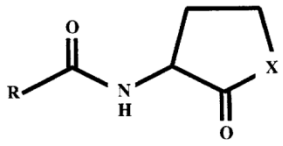
C. violaceum CV026 est un coccobacille à Gram négatif. Cette bactérie fait partie de la flore naturelle de l'eau et des sols des régions tropicales et sub-tropicales. *Chromobacterium* produit un grand nombre d'antibiotique tels que l'aérocyanidine, l'aérocavine, l'aztréoname et le plus étudié, la violacéine (R. J. Andersen, 1974; Parker et al., 1988; Duran and Menck, 2001). La violacéine présente des activités biologiques antiparasitaires et antitumorales qui pourraient lui conférer un intérêt thérapeutique (Dessaux et al., 2004). La production de ce pigment, également utilisé par certains artistes pour leurs peintures, est liée au mécanisme de Quorum Sensing.

Ce mécanisme de communication utilise des AI-1, les AHL. *Chromobacterium* synthétise de la N-Hexanoyl-Homosèrine Lactone (HHL) via un système homologue à LuxI/LuxR, le système CviI/CviR. CviI est l'enzyme responsable de la synthèse de l'auto-inducteur. A forte densité cellulaire, CviR, la protéine régulatrice, va former un complexe avec l'AHL qui va se fixer sur une séquence consensus, appelée *cvi box*, et induire l'expression de l'opéron composé des gènes *vioABCDE* (McClean et al., 1997; August et al., 2000; Antonio and Creczynski-Pasa, 2004; Chen et al., 2011). La présence des 5 gènes est nécessaire à la synthèse de la violacéine (Hoshino, 2011). Le mutant CV026 est délété du gène de la synthase de la HHL et donc ne peut pas auto-induire la production du pigment. Cependant, la production de violacéine peut être restaurée par apport extérieur de HHL.

Cette production de violacéine permet d'effectuer un test rapide de détection des AHL. Ainsi, les travaux de McClean et al ont démontré que ce mutant est sensible à une large gamme d'AHL et permet de plus de discriminer les AHL à longues chaines et à courtes chaines (McClean et al., 1997). En effet, la production de violacéine peut être induite par des AHL possédant des chaines latérales de 4 à 8 carbones avec des seuils de sensibilité variables (Tableau 5). A l'inverse, les AHL à longues chaines, de 10 à 14 carbones, sont incapables d'induire l'expression de la violacéine. Cependant, ces AHL à longue chaine carbonée ont la capacité d'inhiber l'induction de production de violacéine chez le mutant CV026 (Tableau 5). Cette inhibition est un mécanisme peu décrit mais les travaux de l'équipe de Morohoshi suggèrent l'existence d'un autre régulateur capable de fixer les AHL non inducteurs pour former un complexe qui serait capable de se lier à la séquence promotrice de l'opéron

vioABCDE (Morohoshi et al., 2010). Ce complexe entrerait alors en compétition avec le complexe CviR/AHL pour la fixation sur cette séquence. Selon le complexe majoritairement lié, il y aurait soit induction, soit inhibition de la synthèse de violacéine.

Tableau 5 : ***Structures et activités relatives des homosérines lactones acylées et homocystèines thiolactones acylées sur la production de violacéine par* C. violaceum *CV026 en milieu gélosé.***
D'après McClean et al, 1997.



R	X	Chemical name	Abbreviation	Amount applied (nmol)* Activation	Inhibition
$CH_3CH_2CH_2$	O	*N*-Butanoyl-L-homoserine lactone	BHL	0·9	NA
$CH_3CH_2CH_2$	S	*N*-Butanoyl-L-homocysteine thiolactone	BHT	1·7	NA
CH_3COCH_2	O	*N*-(3-Oxobutanoyl)-L-homoserine lactone	OBHL	3·5	NA
$PhCH_2COCH_2$	O	*N*-Benzoylacetyl-L-homoserine lactone	BAHL	1·53	NA
$CH_3(CH_2)_4$	O	*N*-Hexanoyl-L-homoserine lactone	HHL	0·03	NA
$CH_3(CH_2)_4$	S	*N*-Hexanoyl-L-homocysteine thiolactone	HHT	0·05	NA
$CH_3(CH_2)_2COCH_2$	O	*N*-(3-Oxohexanoyl)-L-homoserine lactone	OHHL	0·19	NA
$CH_3(CH_2)_2COCH_2$	O	*N*-(3-Oxohexanoyl)-D-homoserine lactone	(D)OHHL	12·0	NA
$CH_3(CH_2)_2COCH_2$	S	*N*-(3-Oxohexanoyl)-L-homocysteine thiolactone	OHHT	0·69	NA
$CH_3(CH_2)_6$	O	*N*-Octanoyl-L-homoserine lactone	OHL	0·22	NA
$CH_3(CH_2)_4COCH_2$	O	*N*-(3-Oxo-octanoyl)-L-homoserine lactone	OOHL	0·33	NA
$CH_3(CH_2)_8$	O	*N*-Decanoyl-L-homoserine lactone	DHL	NA	0·49
$CH_3(CH_2)_6COCH_2$	O	*N*-(3-Oxodecanoyl)-L-homoserine lactone	ODHL	NA	4·6
$CH_3(CH_2)_{10}$	O	*N*-Dodecanoyl-L-homoserine lactone	dDHL	NA	4·4
$CH_3(CH_2)_8COCH_2$	O	*N*-(3-Oxododecanoyl)-L-homoserine lactone	OdDHL	NA	4·2
$CH_3(CH_2)_{12}$	O	*N*-Tetradecanoyl-L-homoserine lactone	tDHL	NA	4·0
$CH_3(CH_2)_{10}COCH_2$	O	*N*-(3-Oxotetradecanoyl)-L-homoserine lactone	OtDHL	NA	3·8

*Amount of a given compound added to a well cut in the agar to either induce violacein production (activation) or inhibit HHL-mediated induction of violacein production (inhibition) in CV026. NA, No activity i.e. the compound is unable to either induce or to antagonize HHL-mediated induction of violacein in CV026.

Afin de déterminer si des AHL sont présentes dans le surnageant de légionelles PA et donc potentiellement à l'origine du phénotype« biofilm », *C. violaceum* CV026 a été inoculé dans une gélose nutritive sur laquelle ont été testés différents composés, un contrôle positif d'induction de la violacéine, N-3-oxohexanoyl-L-Homosèrine Lactone (OHHL), un contrôle positif d'inhibition, N-3-oxododecanoyl_L-Homosèrine Lactone (OdDHL) et le surnageant de légionelles PA. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 45.

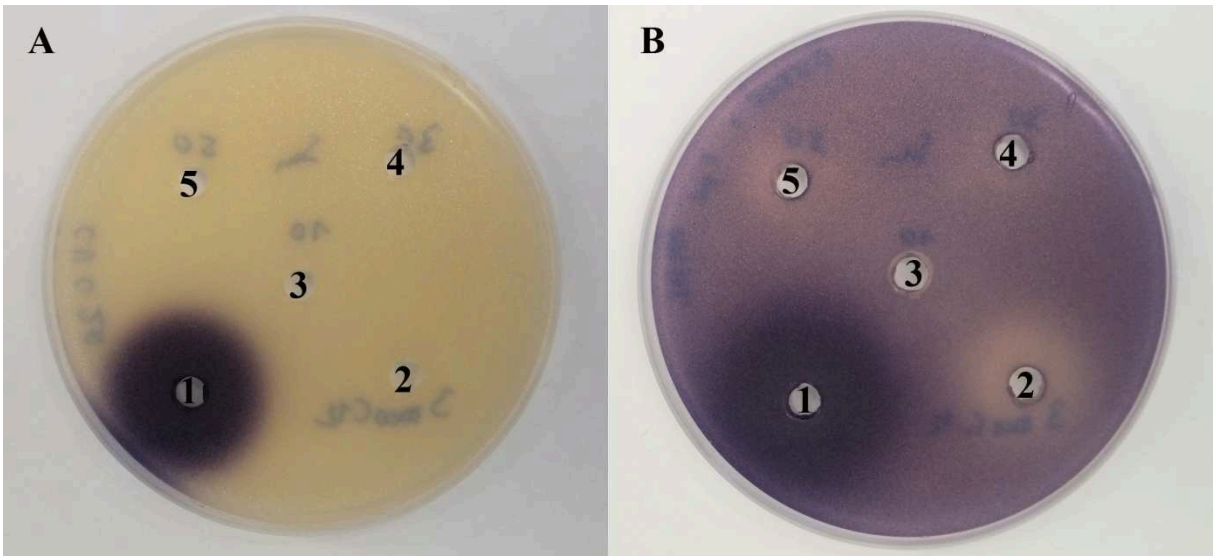


Figure 43 : ***Test d'induction (A) et d'inhibition (B) de production de la violacéine par C.*** **violaceum** ***CV026 traitée avec du surnageant de*** **L. pneumophila** ***PA en suspension dans de l'eau minérale depuis 24 heures.***
Dans le puits 1, une solution d'OHHL a été déposée, de l'OdDHL dans le puits 2, 10 µL de surnageant de PA dans le puits 3, 30 µL de surnageant de PA dans le puits 4, 50 µL de surnageant de PA dans le puits 5. Cette expérience a été répétée 4 fois avec 3 répétitions lors de chaque essai.

Le test d'induction (Figure 46A) démontre que le surnageant des légionelles PA n'induit pas l'expression de la violacéine contrairement au témoin positif, l'OHHL. Ceci montre que les légionelles ne produisent pas de molécules de type AHL à courtes chaines carbonées. Au contraire, dans le test d'inhibition (Figure 46B), un halo d'inhibition est visible autour des puits dans lesquels un volume de 30 µL et de 50 µL de surnageant de légionelles PA a été ajouté. Un halo d'inhibition est obtenu également avec le dépôt d'OdDHL. Ces résultats démontrent l'inhibition de la production de la violacéine par le surnageant de *L. pneumophila* PA, ce qui suggère la présence d'une molécule de type AHL à chaine longue. Le surnageant utilisé provient de légionelles PA qui ont été lavées plusieurs fois à la sortie d'amibes avant d'être mises en suspension dans de l'eau minérale, ce qui indique que les molécules de type AHL détectées sont bien produites par les légionelles PA. Le même test a été réalisé avec le surnageant de légionelles PC, mais aucun halo n'a été observé (résultat non montré), ce qui confirme que la synthèse de ce facteur est propre aux légionelles PA.

Ces résultats permettent d'émettre l'hypothèse que la molécule responsable de l'induction du phénotype biofilm chez *Legionella* pourrait être une AHL à longue chaine carbonée. Or, LAI-1 ; la molécule signal produite par *L. pneumophila* n'est pas une AHL mais une hydroxycétone essentiellement constituée d'une longue chaine carbonée (15 carbones)

(Figure 19) (Spirig et al., 2008). Elle pourrait éventuellement être à l'origine de l'inhibition de la production de la violacéine mise en évidence.

4) Un auto-inducteur diffèrent de LAI-1

Le système de communication *lqs* est codé par un groupe de gènes composés de *lqsA*, la synthase de LAI-1, *lqsS*, le senseur de LAI-1, *lqsR*, le régulateur du système *lqs* et d'un senseur orphelin, *lqsT* (Tiaden et al., 2007; Spirig et al., 2008; Tiaden et al., 2010; Kessler et al., 2013). Les conditions d'expression de ce système de Quorum Sensing sont encore inconnues mais il semble jouer un rôle important dans l'interaction avec les hôtes amibiens de *Legionella* (Tiaden et al., 2008).Il a été montré que le groupe de gène (*lqsA*, *lqsR* et *lqsS*) est absent chez *L. longbeachae*, l'espèce responsable de la majorité des cas de légionellose en Australie (Tiaden et al., 2007; Spirig et al., 2008; Tiaden et al., 2008; Tiaden et al., 2010; Kessler et al., 2013).

Or dans le paragraphe 4 précédent nous avons montré que les *L. longbeachae* PA produisent un facteur d'induction du phénotype biofilm puisque leur surnageant induit la formation d'agrégats bactériens et la synthèse d'exopolysaccharides chez *L. pneumophila* Lens PC. Ce phénomène semble donc lié à l'action d'une molécule distincte de LAI-1. Toutefois nous avons dans un premier temps vérifié que la souche de *L. longbeachae* à notre disposition était bien dépourvue des gènes *lqs*. Pour cela, amplifications PCR ont été réalisées sur l'ADN extrait de *L. pneumophila* (contrôle positif) et *L. longbeachae* avec des amorces spécifiques des gènes *lqs*. Les tailles attendues des produits PCR sont de 1 010 pb pour *lqsA*, 845 pb pour *lqsR*, 1 160 pb pour *lqsS*, et 612 pb pour *lqsT*. Après migration sur gel d'agarose, les résultats obtenus sont présentés sur la figure 46.

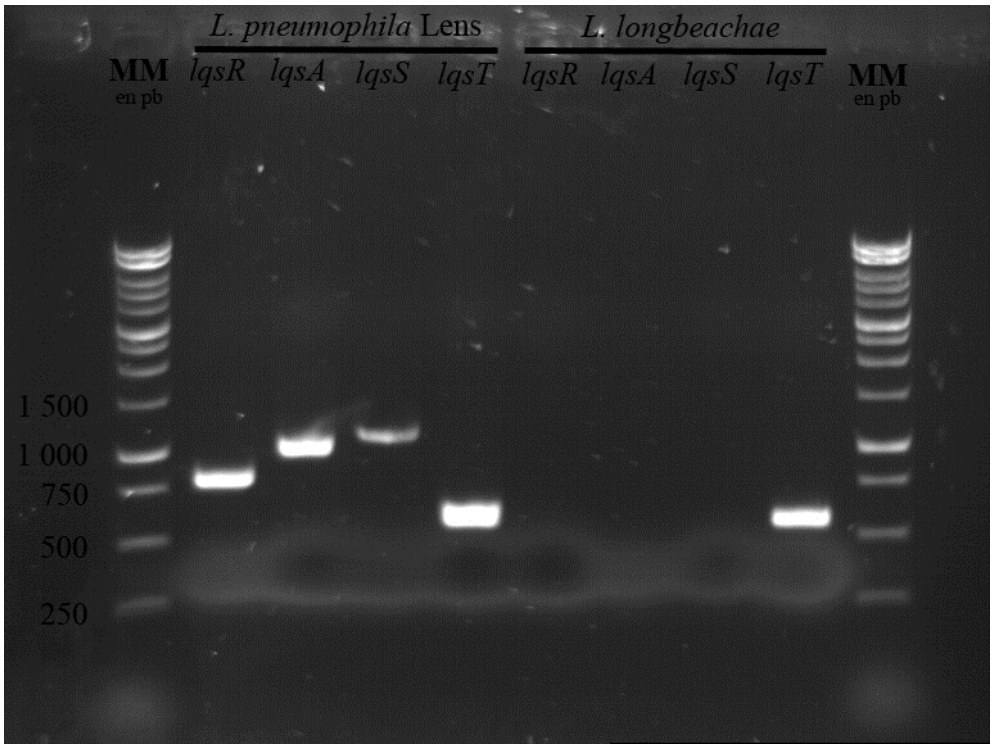


Figure 44: ***Photographie d'un gel d'agarose après migration des amplifications PCR effectuées sur les gènes lqsA, lqsR, lqsS et lqsT de* L. pneumophila *et* L. longbeachae.**
L'expérience a été répétée 3 fois sur 3 échantillons indépendants.

Les produits PCR obtenus présentent les tailles attendues. Chez *L .pneumophila*, les 4 gènes du système *lqs* ont été amplifiés, ce qui permet de valider de manière expérimentale les amorces utilisées. Chez *L. longbeachae*, on constate l'absence de bandes pour les gènes *lqsR, lqsA* et *lqsS*. En revanche, le gène *lqsT* est présent chez cette souche. Ces résultats confirment que la souche de *L. longbeachae* à notre disposition, est dépourvue des gènes *lqsA*, *lqsR* et *lqsS* comme montré précédemment (Cazalet et al., 2010). Ces auteurs ont également montré que chez *L. longbeachae*, le gène *lqsT* est présent dans le génome sous la forme d'un homologue appelé *baeS* et qui présente 71 % d'homologie avec le gène *lqsT* de *L. pneumophila*. De ces résultats il apparaît donc que l'espèce *L.longbeachae* ne possède pas le gène codant l'enzyme LqsA et donc est incapable de produire LAI-1. Donc, le facteur d'induction du phénotype biofilm sécrété par les légionelles PA n'est pas LAI-1.

Nous avons donc démontré l'existence d'un nouveau système de communication présent dans un grand nombre d'espèce de légionelles (*pneumophila, longbeachae, oakridgiensis*). Ce facteur exerce une activité intra et inter-espèce et semble apparenté aux molécules de type AHL à longue chaine.

La présence du gène codant le récepteur LqsT chez *Legionella longbeachae*, permet d'émettre l'hypothèse que ce récepteur pourrait percevoir la molécule signal du nouveau système que nous avons mis en évidence.

5) Utilisation du mécanisme de Quorum Quenching pour mettre en évidence un phénomène d'attraction.

Le Quorum Quenching est un mécanisme basé sur l'action de molécules inhibant ou perturbant le Quorum Sensing via la dégradation ou la rétention des auto-inducteurs. Ces molécules peuvent être des enzymes spécifiques dégradant les auto-inducteurs ou des molécules qui interagissent avec les auto-inducteurs et perturbent leur activité (Wu et al., 2004). Nous avons utilisé un Inhibiteur de Quorum Sensing, la baicalin hydrate qui cible les AI-1. Nous avons choisi cet IQS car il a été décrit comme perturbant l'action des AHL de *P. aeruginosa* et *Burkholderia cepacia*(Brackman et al., 2011; Christensen et al., 2012; Brackman and Coenye, 2013). Dans cette expérience, du surnageant de légionelles PA dans a été traité avec de la baicalin hydrate avant d'être mis en contact avec des légionelles PC (Figure 47).

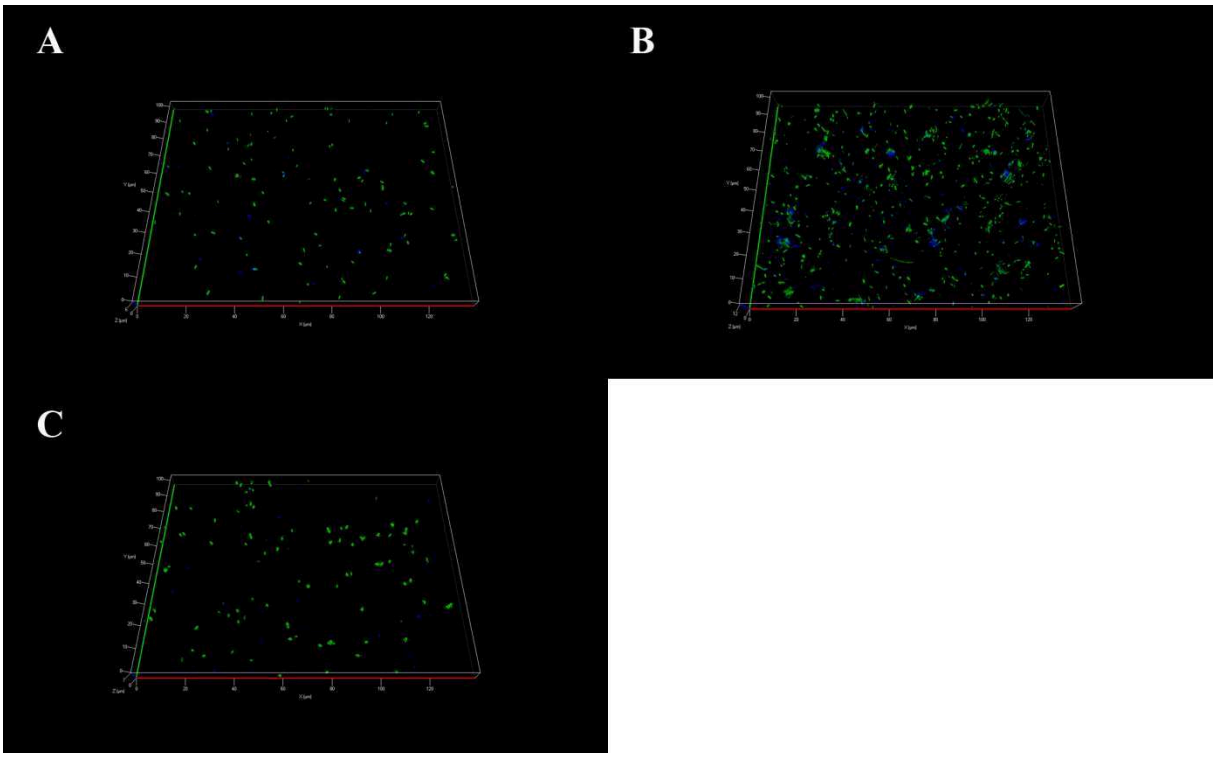


Figure 45: ***Reconstitution en 3D de l'observation en imagerie à illumination structurée de* L. pneumophila *PC (A) et* L. pneumophila *Lens PC mise en contact avec du surnageant de* L. pneumophila *PA traité(C) ou non (B) avec de la baicalin hydrate.***
Représentées en vert, les légionelles PC exprimant la GFP et en bleu, les sucres marqués. Figure représentative de 3 répétitions pour laquelle 3 clichés ont été pris pour chaque échantillon.

Lorsque le surnageant de légionelles PA est préalablement traité avec l'inhibiteur de Quorum Sensing, les légionelles apparaissent isolées et réparties de manière homogène sur toute la surface en verre et une faible quantité d'exopolysaccharides est détectée (Figure 47C) comme les légionelles PC non soumise au surnageant de légionelles PA (Figure 47A). Comme précédemment, l'addition de surnageant de légionelles PA induit le phénotype PA caractérisé par la formation d'agrégats et la synthèse d'exopolysaccharides (Figure 47B). Cela signifie que l'addition de baicalin hydrate inhibe l'induction de ce phénotype, ce qui confirme la sécrétion de molécule(s) signal de type AHL par les légionelles PA.

Dans une seconde expérience, des légionelles PA ontété traitées avec de la baicalin hydrate avant d'être inoculées sur le support en verre (Figure 48).

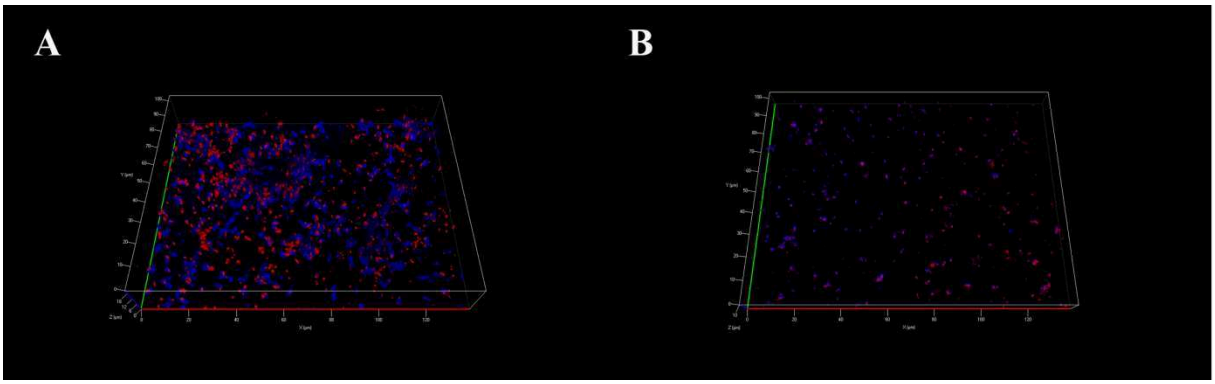


Figure 46: ***Reconstitution en 3D de l'observation en imagerie à illumination structurée de* L. pneumophila *Lens PA traitées (B) ou non (A) avec de la baicalin hydrate.***
Représentées en rouge, les légionelles PC exprimant la Ds-Red et en bleu, les sucres marqués. Figure représentative de 3 répétitions pour laquelle 3 clichés ont été pris pour chaque échantillon.

Lorsque les légionelles PA sont traitées avec l'inhibiteur des agrégats de *L. pneumophila* sont observables (Figure 48B) mais ils présentent une densité bactérienne plus faible et sont plus dispersé que ceux obtenus avec les légionelles PA non traitées (Figure 48A). De la même façon la matrice exopolysaccharidique est moins importante après traitement à la baicalin hydrate. Ce résultat confirme que la baicalin hydrate inhibe le regroupement bactérien et ainsi la formation d'agrégats de forte densité. A contrario cela indique que l'auto-inducteur sécrété par les légionelles PA favorise la formation d'agrégats denses via une attraction chimiotactique. Cela confirme l'hypothèse déjà posée précédemment que la molécule signal qui induit le phénotype biofilm chez les légionelles PC est également celle qui, par chimiotactisme favorise un regroupement des légionelles PC et PA.

L'ensemble de ces résultats ont permis de mettre en évidence qu'il existe une (ou des) molécule(s) de type AHL produite(s) par *Legionella*, lorsque celle ci s'est multipliée dans les amibes, responsable(s) de l'induction du phénotype PA et de l'agrégation des légionelles.

L'étape suivante de ce travail a naturellement été d'essayer de purifier la molécule signal afin d'en déterminer la structure.

6) Isolement et étude de la molécule auto-inductrice produite par les légionelles

a) Extraction de l'auto-inducteur

Dans un premier temps, le surnageant de légionelles PA contenant l'auto-inducteur a été soumis à une extraction en phase solide sur cartouche de phase inverse. Après chargement, la colonne est éluée avec un gradient croissant d'acétonitrile. Or, il a été démontré au laboratoire que *Legionella* est très sensible à l'acétonitrile. Afin d'éliminer ce solvant, les fractions récupérées ont été lyophilisées puis reprises dans de l'éthanol. En parallèle, en guise de contrôle, du surnageant a été directement lyophilisé et repris dans les mêmes conditions. Chacune des fractions obtenues, correspondant à des concentrations croissantes en acétonitrile a été testée pour l'induction de la production de polysaccharides par des légionelles PC en utilisant la méthode au bleu d'Alcian. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 49.

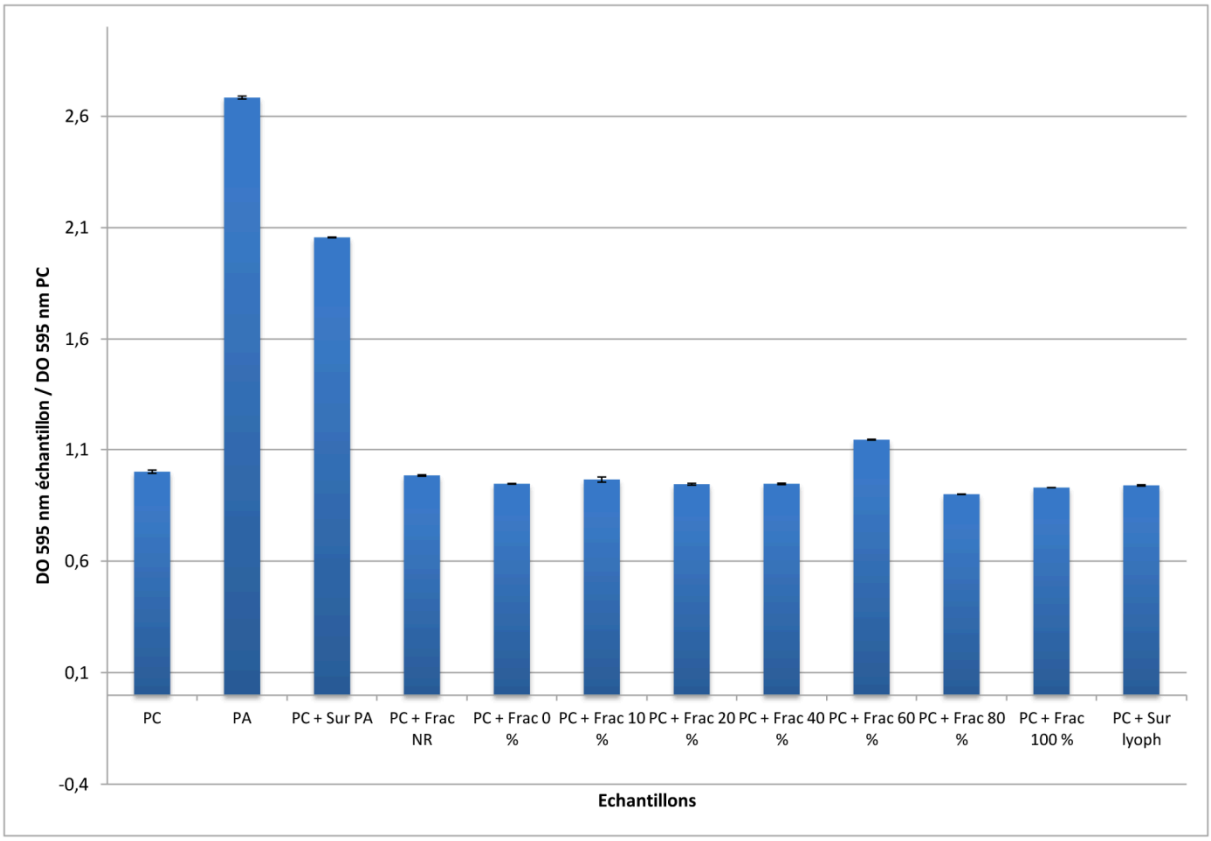


Figure 47: ***Intensités normalisées de coloration au bleu d'Alcian de biofilms de* L. pneumophila *PC traitée avec les différentes fractions d'extraction en phase solide et les différents contrôles.***
Les résultats sont normalisés par rapport à la référence, légionelles PC. L'expérience a été répétée 3 fois sur des échantillons différents.NR correspond à la fraction Non Retenue par la colonne.

On peut voir sur la figure 49 qu'aucune des fractions testées n'a permis d'induire la production de polysaccharide contrairement au surnageant de départ. Il semble que l'auto-inducteur ait été perdu au cours du processus de purification. A titre de contrôle, nous avons réalisé ce test avec du surnageant de légionelles PA lyophilisé puis resolubilisé. Il s'est avéré (figure 49) que ce surnageant avait perdu son activité. Ceci montre que l'auto-inducteur est soit perdu lors de la lyophilisation, donc que cette molécule est volatile soit qu'il n'est pas resolubilisé par l'éthanol. Cela nous a conduit à abandonner cette approche.

L'extraction des molécules de type AHL est classiquement réalisée, dans la littérature, par de l'acétate d'éthyle acidifié (Ahlgren et al., 2011; Wang et al., 2011). L'acidification permet une meilleure conservation sur le long terme des auto-inducteurs (Leadbetter and Greenberg, 2000). Cette extraction a donc été effectuée sur du surnageant de légionelles PA. Le solvant a ensuite été évaporé sous vide. Dans la littérature, la température utilisée pour l'évaporation est de 40°C mais l'auto-inducteur étant potentiellement volatile, elle a été

également réalisée à 30°C. Les échantillons ont ensuite été repris avec de l'eau minérale de manière à déposer l'équivalent de 150 µL de surnageant de légionelles PA d'origine sur des légionelles PC. Un test au bleu d'Alcian a ensuite été réalisé sur la fraction extraite (Figure 50).

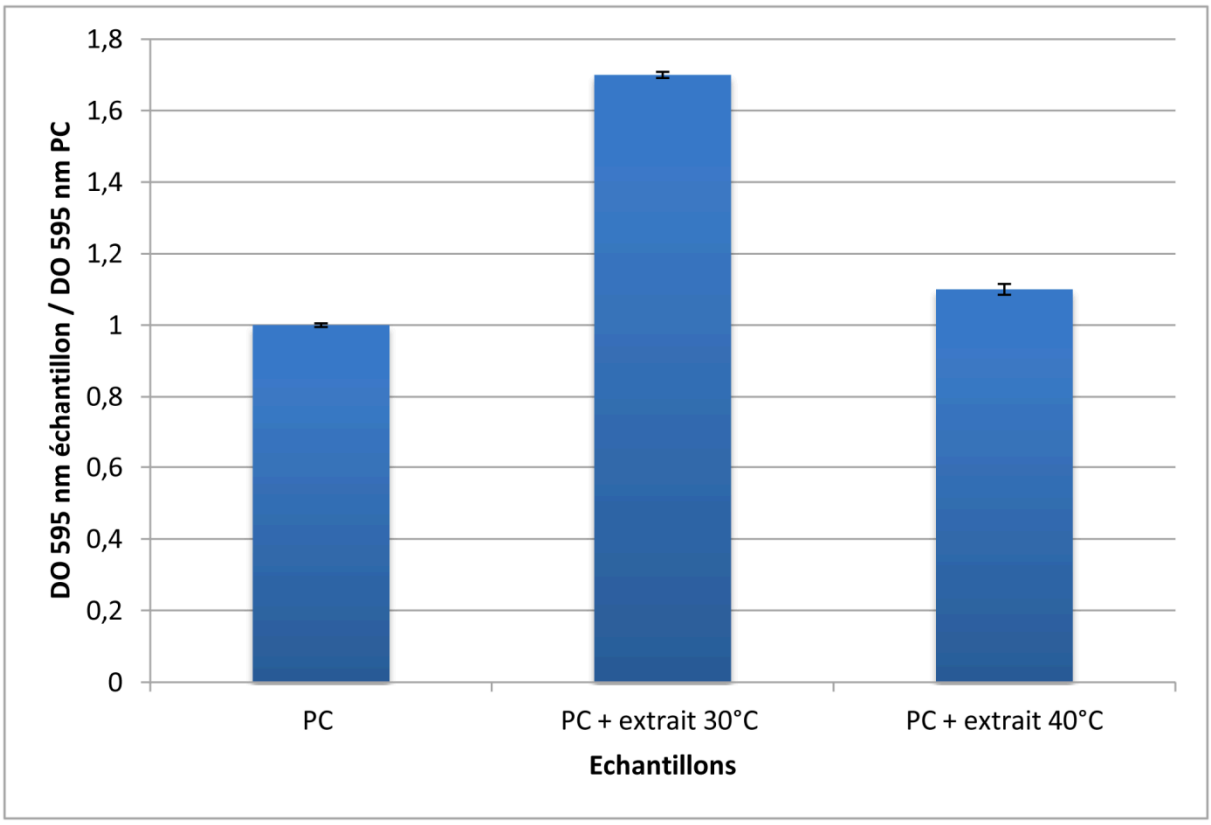


Figure 48: ***Intensités normalisées de coloration au bleu d'Alcian de biofilms de* L. pneumophila *PC traitées avec l'extrait acétate d'éthyle.***
Les résultats sont normalisés par rapport à la référence, légionelles PC.L'expérience a été répétée 3 fois sur des échantillons différents.

La quantité de polysaccharides produite par les légionelles PC traitées avec l'extrait évaporé à 30°C est supérieure de plus de 70 % à celle obtenue avec les légionelles PC non traitées. Ce résultat est similaire à celui observé lorsque les légionelles PC sont traitées avec du surnageant de légionelles PA (Figure 49). Ceci indique que cet extrait acétate d'éthyle contient l'auto-inducteur produit par les légionelles PA. Comme on peut le voir sur la figure 50, la quantité de polysaccharides synthétisée par les légionelles PC n'est pas augmentée lorsqu'elles sont traitées avec l'extrait évaporé à 40°C. Ce résultat permet de conclure que cette molécule est volatile ce qui explique la perte d'activité du surnageant lyophilisé.

b) Test de volatilité

Afin de vérifier le caractère volatile de cet auto-inducteur, un test de volatilité a été réalisé. Ce test repose sur le principe de l'inhibition de la production de violacéine. Du surnageant de légionelles PA (Figure 51A) a été déposé dans les 4 puits centraux d'une microplaque dont les autres puits ont été préalablement remplis avec une culture de *C. violaceum* CV026 activée par l'OHHL. La même expérience a été réalisée avec de l'extrait concentré 50 fois (Figure 51C) et un témoin (solvant dilué) (Figure 51B).

En parallèle, un test similaire a été réalisé mais sans activation de *C. violaceum* CV026 afin de contrôler l'impact des solutions testées sur sa croissance.

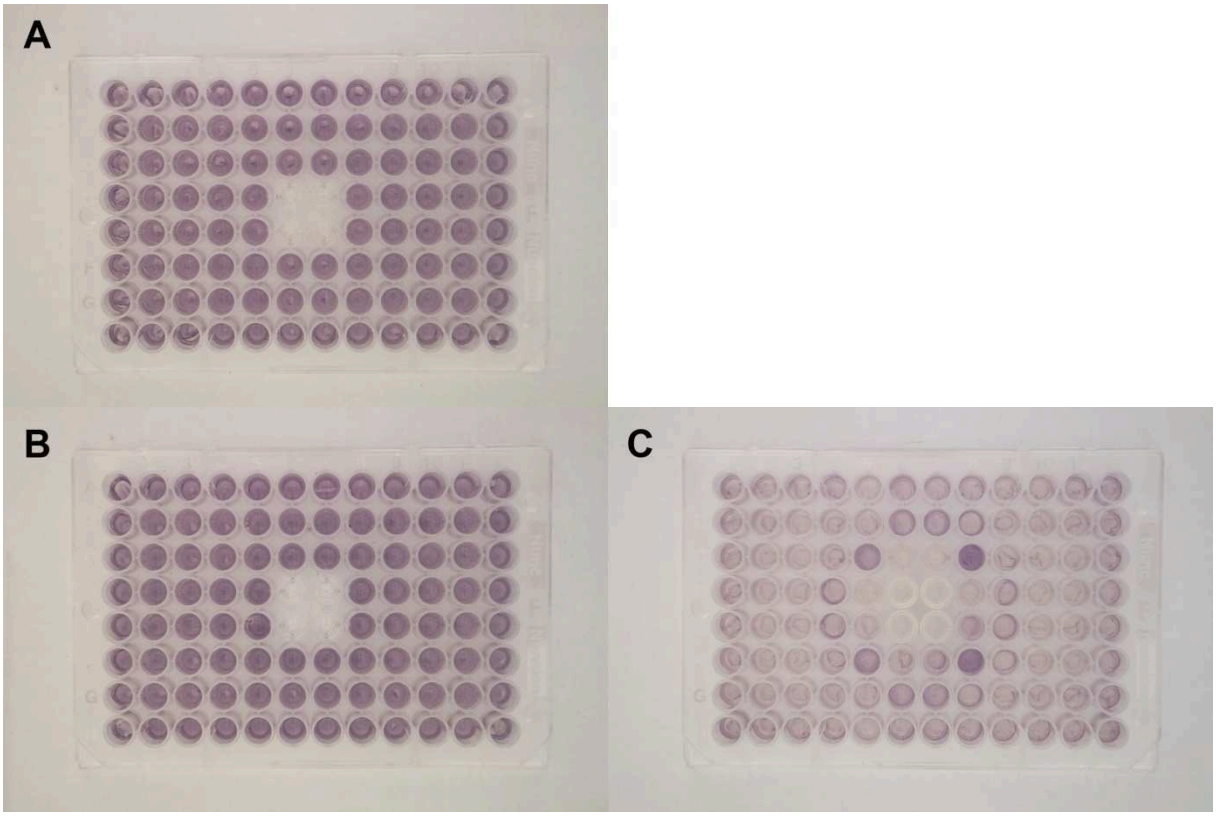


Figure 49: ***Photographies du test de volatilité par inhibition de production de la violacéine par CV026 par ajout de surnageant de* L. pneumophila *PA (A), solvant dilué (contrôle négatif) (B) et de surnageant de* L. pneumophila *PA concentré 50 fois (C).***
La figure D est un schéma représentatif des résultats obtenus avec le surnageant concentré. Il a été déposé un volume final de 200 µL pour chacune des conditions. Cette expérience a été répétée 2 fois.

On observe sur la figure 51Aque le surnageant non concentré n'a pas d'impact sur la croissance de *C. violaceum* CV026 et la production de violacéine qui est similaire à celle observée pour le témoin négatif (Figure 51B). En utilisant de l'extrait concentré 50 fois

(Figure 51C), une inhibition de la production de violacéine est observée. Ceci montre que l'inducteur présent dans l'extrait a diffusé dans la boite jusqu'aux différents puits. Cela confirme le caractère volatile de cet inducteur sécrété par les légionelles PA. Du fait de son caractère volatile potentiel, cet auto-inducteur, a été nommé Lvol.

Un groupe de puits dans lesquels la production de violacéine est plus faiblement inhibée est observable au voisinage proche des puits centraux. Ce résultat est surprenant car l'inhibition est apparente de part et d'autre. Il est possible que suivant la concentration de l'auto-inducteur, celui-ci puisse exercer une perturbation différente vis-à-vis de l'induction ou de l'inhibition de la synthèse de la violacéine.

c) Isolement de Lvol

Afin d'isoler une fraction contenant la molécule signal produite par les légionelles PA, les extraits acétate d'éthyle ont été analysés en chromatographie sur couche mince (CCM) avec un dépôt d'OdDHL comme standard. La migration a été effectuée avec un mélange acétate d'éthyle/méthanol, puis les plaques ont été observées sous UV et les tâches repérées. Afin de localiser la molécule inductrice qui inhibe la production de violacéine, la plaque de CCM a été recouverte par du milieu gélosé ensemencé avec *C. violaceum* CV026 induite par de l'OHHL.L'OdDHL sert de témoin positif pour l'inhibition de la production de la violacéine (Figure 52).

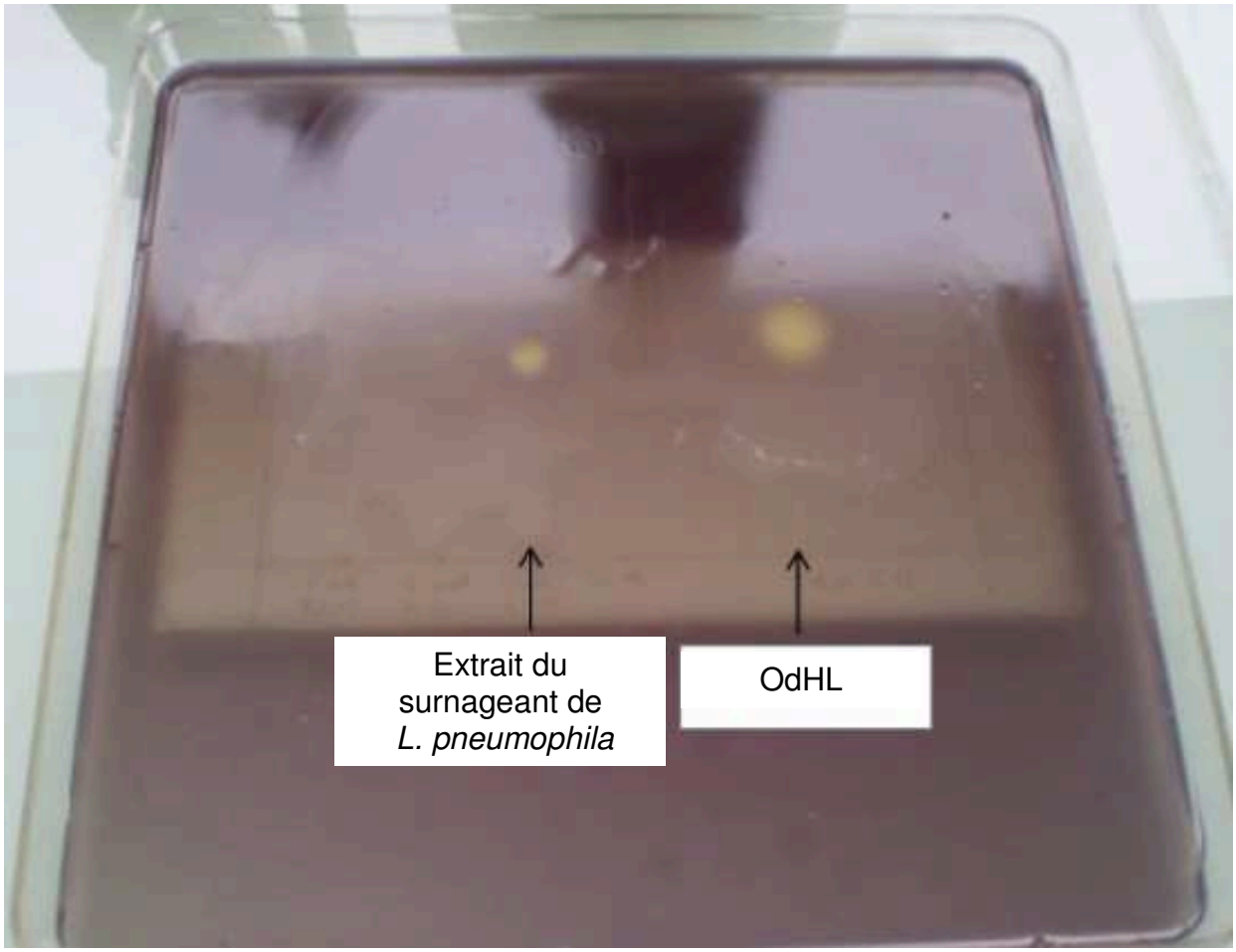


Figure 50: ***Photographies du test d'inhibition de production de violacéine par* C. violaceum *CV026 sur plaque de CCM après migration de l'extrait acétate d'éthyle du surnageant de légionelles PA.***
dépôts de15 µL d'acétate d'éthyle (contrôle négatif),15 µL d'extrait acétate d'éthyle et 5 µL d'une solution d'OdDHL (contrôle positif). Cette expérience a été répétée 3 fois.

Après 24 heures d'incubation, une zone d'inhibition est observée à hauteur de la tâche correspondant à l'OdDHL, confirmant la validité du test. Une inhibition de production de violacéine est également observable dans la ligne de dépôt de l'extrait acétate d'éthyle. Une seule tache d'inhibition est observée, ce qui pourrait indiquer qu'une seule molécule inhibitrice est présente. De plus, la zone d'inhibition de la violacéine ne correspond à aucune tache visualisée sous UV. Ce résultat permet de supposer que la molécule en question ne comporte pas de groupement aromatique.

Une expérience similaire a été réalisée avec des extraits réalisés sur les autres souches et espèces de légionelles précédemment testées. Le résultat de cette expérience montre la présence du même auto-inducteur chez toutes les espèces et souches testées. Il sera intéressant de purifier les inducteurs sécrétés par ces différentes légionelles afin de déterminer s'il s'agit d'un même composé. De même, il faudra tenter d'isoler une éventuelle molécule produite par

les légionelles PC traitées par du surnageant de PA pour déterminer si ces légionelles induites sont capables de sécréter ce facteur. Même si cela semble difficile il faudrait également essayer de déterminer si la production de ce facteur a lieu au sein des amibes (*Legionella* Intra-*Acanthamoeba*) et si il joue un rôle dans le mécanisme de sortie des amibes ou, si au contraire, ce facteur n'est exprimé qu'après la libération des légionelles dans le milieu.

Grâce à la zone d'inhibition, le rapport frontal (Rf) de la molécule inhibitrice de la production de violacéine a été déterminée. Une seconde plaque de CCM a été « grattée »au niveau du Rf correspondant à l'activité. La molécule a été éluée de la silice donnant la fraction 1. La ligne entre la fraction 1 et la zone de dépôt a été divisée en 10 surfaces de silice de tailles égales qui ont été récupérées par grattage. Chacune des fractions ainsi obtenues solubilisée dans l'éthanol a été ajoutée sur des légionelles PC et un test au bleu d'Alcian effectué (Figure 53).

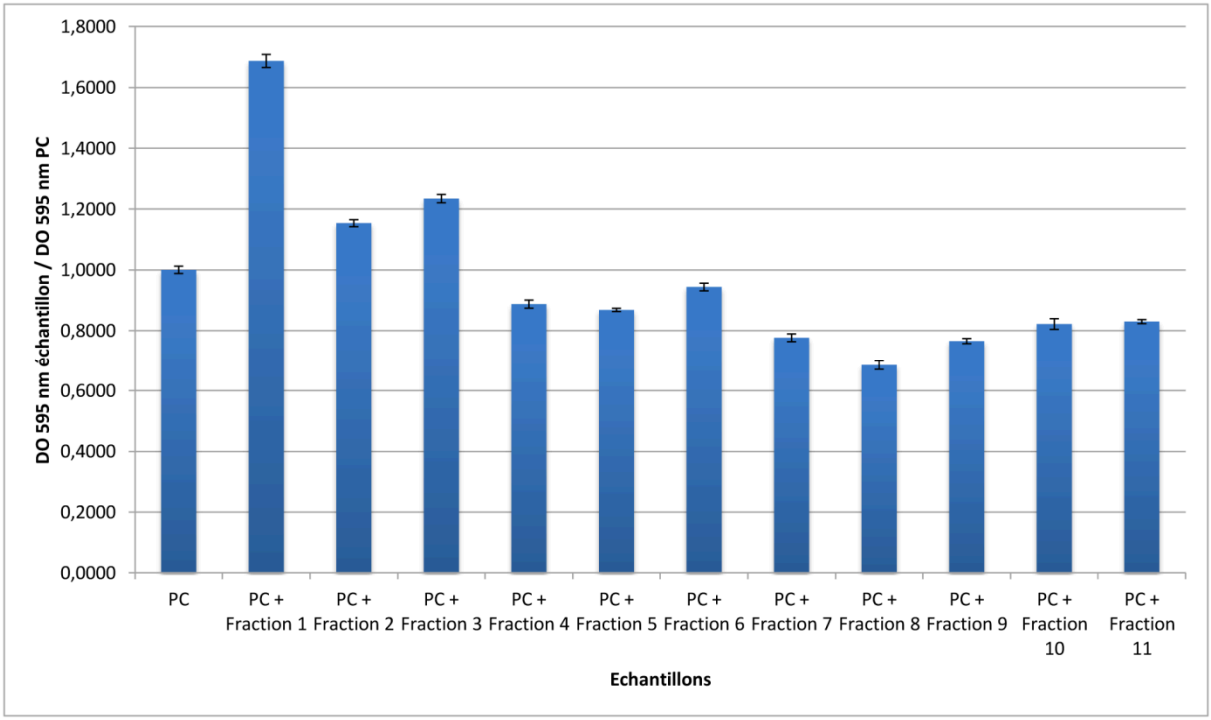


Figure 51: ***Intensités normalisées de coloration au bleu d'Alcian de biofilms de* L. pneumophila *PC traitées par les différentes fractions récupérées de la CCM.***
Les résultats sont normalisés par rapport à la référence, légionelles PC. L'expérience a été répétée 3 fois.

La plus grande quantité d'exopolysaccharides secrétés par les légionelles traitées est observée pour la fraction 1. D'autre part, une quantité 15 et 20 % supérieure à celle produite par les légionelles PC non traitées est observée pour les fractions 2 et 3 qui sont proches de la fraction 1. Ces deux fractions peuvent contenir des traces de la molécule inductrice à cause

de la « queue » de migration de la molécule présente dans la fraction 1. Ces résultats confirment que l'inhibition de la violacéine et l'induction du phénotype PA sont causées par la même molécule signal ou tout du moins est contenue dans la fraction 1.

d) Purification de Lvol

Afin de purifier cet inducteur, nous avons essayé de séparer les constituants de la fraction 1 et du surnageant de légionelles PA par Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC). L'analyse a été réalisée sur colonne de phase inverse (C18) éluée avec un gradient composé d'eau et d'acétonitrile.

L'ensemble des fractions collectées ont été extraites avec de l'acétate d'éthyle, séchées sous azote puis solubilisées dans de l'éthanol. Les échantillons ont ensuite été dilués et mis en contact avec des légionelles PC avant de procéder à une estimation de la production d'exopolysaccharides avec le bleu d'Alcian. Malheureusement aucune des fractions ainsi obtenues ne présente d'activité inductrice. Nous avons alors pris contact avec Eric Déziel, de l'institut Armand Frappier, un spécialiste de la purification des molécules signal impliquées dans le Quorum Sensing, et nous lui avons envoyé des extraits acétates d'éthyle qui sont en cours d'analyse.

E) Induction du phénotype biofilm par la molécule amibienne

Nous avons vu que la multiplication intra-amibienne déclenche le développement d'un phénotype particulier chez les légionelles qui se traduit par la formation d'agrégats, la capacité accrue à synthétiser des exopolysaccharides en réponse à la sécrétion d'un facteur capable d'induire ce phénotype chez des légionelles cultivées en milieu de culture. Ces bactéries ont donc été activées lors de la multiplication dans les amibes. Ce phénomène est-il dû à la détection par *Legionella* d'un composé présent chez les amibes qui déclenche cette induction ?

Afin de répondre à cette question, nous avons réalisé une série d'expériences pour tenter d'isoler un potentiel facteur amibien responsable de ce déclenchement.

1) Mise en évidence du rôle de l'amibe dans le déclenchement du phénotype biofilm

Dans un premier temps, nous avons tenté de déterminer si l'induction du phénotype biofilm chez les légionelles était due à une molécule sécrétée par les amibes ou à un composé intracellulaire. *L. pneumophila* Lens PC a donc été traitée soit avec du tampon amibe comme contrôle négatif, soit avec du surnageant d'*A.castellanii* mises en suspension dans du tampon amibe soit avec un broyat d'amibes . Les légionelles PC ont été incubées avec les différentes suspensions pendant 24 heures avant d'être déposées sur support en verre (Figure 54).

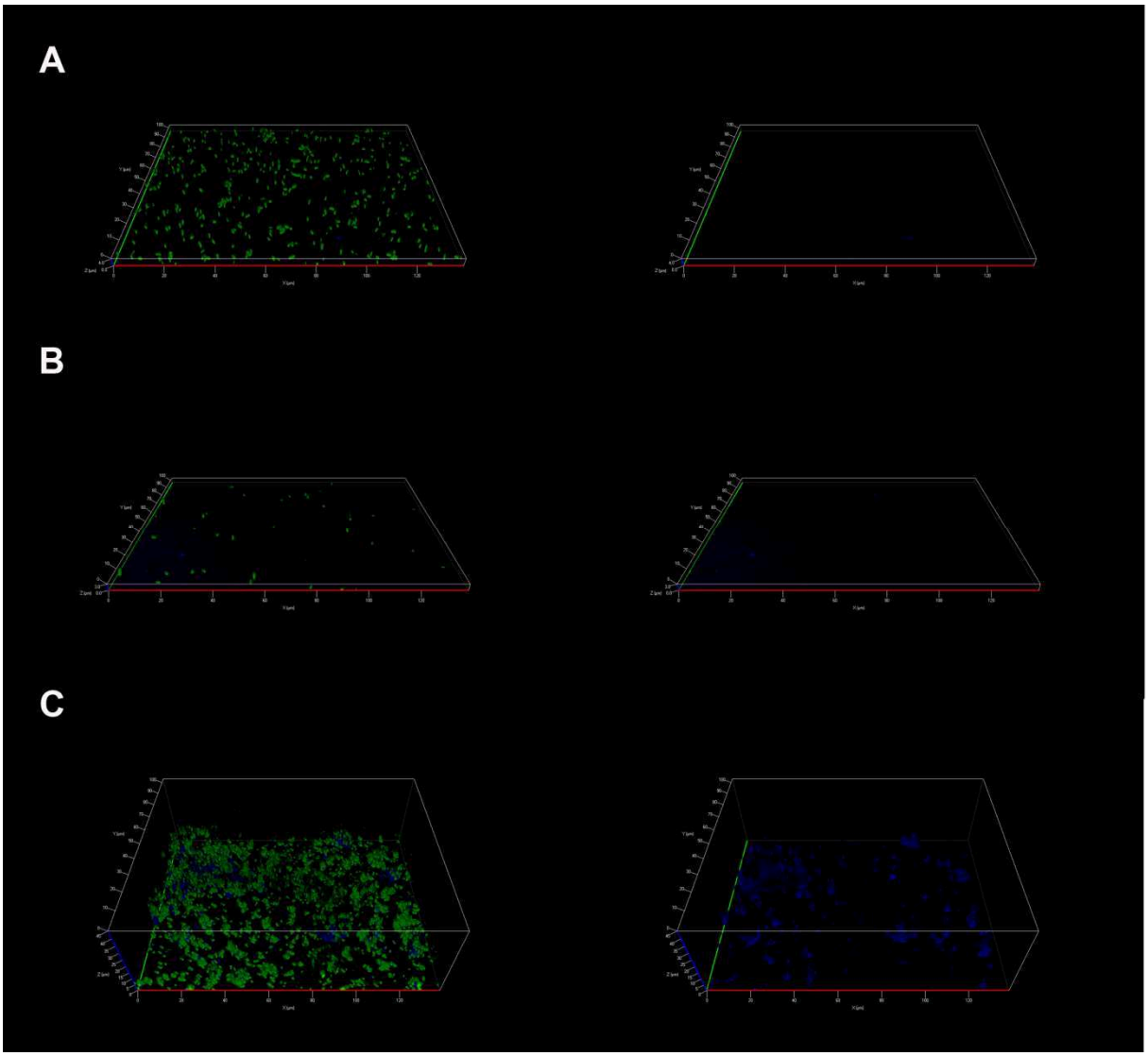
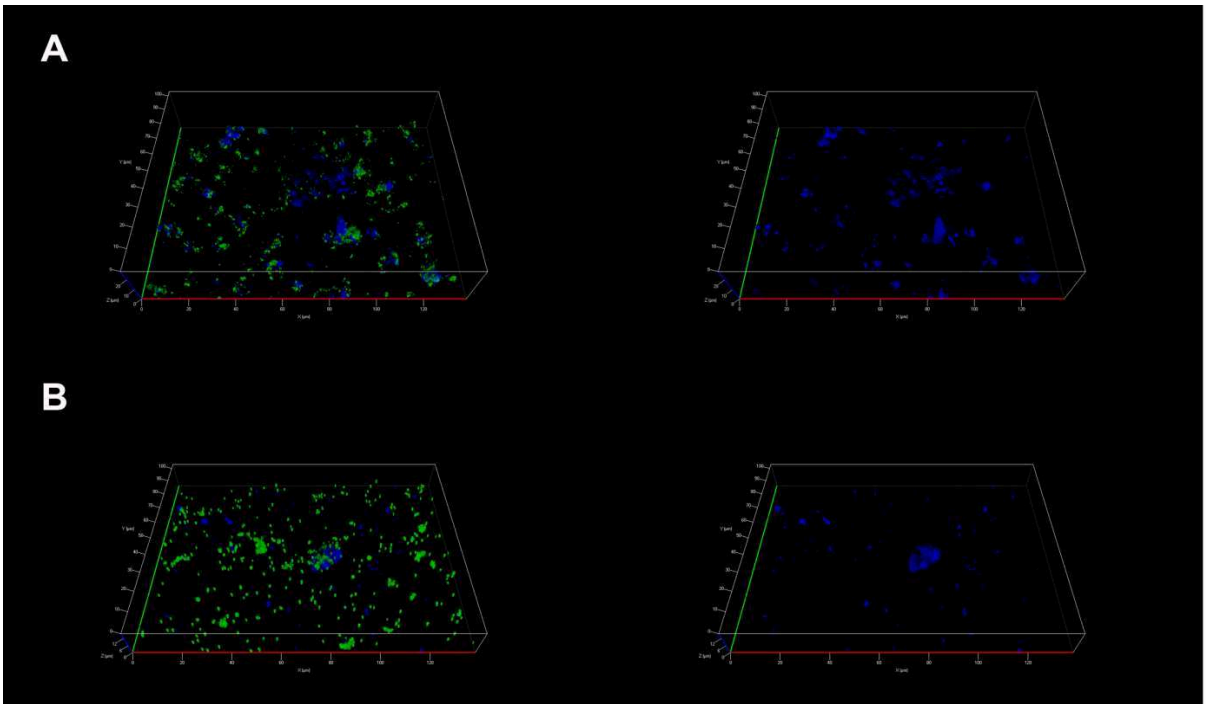


Figure 52:Reconstitution 3D de l'observation en microscopie à illumination structurée à J7 de* L. pneumophila *Lens PC traitée avec du tampon amibe (A), du surnageant d'amibe (B) ou avec du broyat d'amibe (C).
A droite, seuls les sucres sont représentés. Représentées en vert, les légionelles exprimant la GFP, en bleu, les sucres marqués. Figure représentative de 3 répétitions pour lesquelles 3 clichés ont été pris par échantillon.

Après une semaine d'incubation, les légionelles PC mises en contact avec du tampon amibe apparaissent isolées et réparties sur toute la surface avec une faible présence d'exopolysacharides. (Figure 54A) Ce phénotype est également observé pour les légionelles traitées avec du surnageant d'*A. castellanii* (Figure 54B). Ceci démontre que le potentiel composé déclencheur n'est pas sécrété dans le milieu. Des agrégats de légionelles et une grande quantité d'exopolysaccharides sont visibles pour *L. pneumophila* PC mises en contact avec du broyat d'amibe (Figure 54C). Cependant, la formation des agrégats peut être due à la présence d'une molécule déclencheuse de l'induction mais pourrait aussi être la conséquence de l'apport en nutriments que constitue ce broyat qui permettrait ainsi la croissance des légionelles. En effet, les travaux de Temmerman et collaborateurs ont mis en évidence la capacité des légionelles de croitre sur des amibes tuées par traitement thermique (Temmerman et al., 2006).

Quelques expériences ont été réalisées afin d'obtenir des éléments quant à l'origine et la nature du déclencheur. Ainsi, des légionelles PC ont été traitées avec du lysat d'*A. castellanii* ayant subi différents traitements physiques. Dans un premier temps, le lysat d'd'*A. castellanii* a été clarifié par centrifugation, afin d'éliminer toutes les débris membranaires. Ce surnageant a ensuite été filtré pour éliminer les derniers débris et les molécules non solubles. Puis, le filtrat a été chauffé 20 minutes à 60, 80 et 120°C avant d'être ajouté à une suspension de légionelles PC.



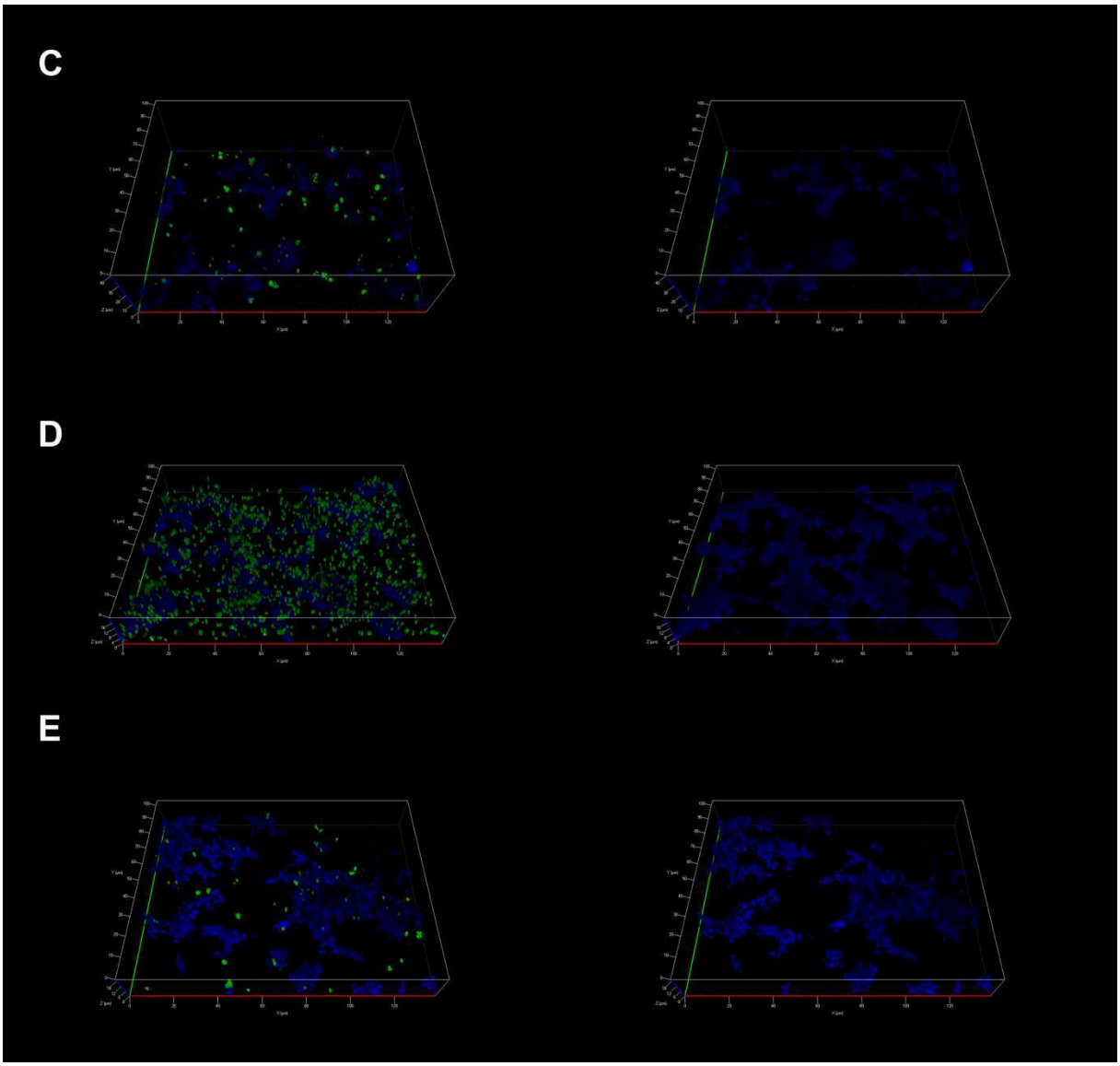


Figure 53: ***Reconstitution 3D de l'observation en microscopie à illumination structurée à J7 de* L. pneumophila *Lens PC traitée avec du lysat d'amibe clarifié (A), clarifié et filtré (B), clarifié et chauffé 20 min à 60°C (C), 80°C (D) ou 120°C (E).***
Représentées en vert, les légionelles exprimant la GFP, en bleu, les sucres marqués et la barre d'échelle correspond à 10 µm. Figure représentative de 4 répétitions pour lequel 3 clichés ont été pris par échantillon.

Dans tous les cas, des agrégats de légionelles empaquetés dans une matrice exopolysaccharidique sont visibles en microscopie en épifluorescence (Figure 55). Le phénotype biofilm est donc retrouvé quelque soit le traitement effectué sur le broyat d'amibe. Dans un premier temps, ces résultats nous indiquent que la molécule déclencheuse de l'induction n'est pas une protéine car malgré les différents traitements thermiques, l'activité inductrice est retrouvée. De plus, ce composé apparait différent de celui synthétisé par les légionelles PA car celui-ci est perdu à 40°C, si ces deux molécules étaient un seul et même

composé, il n'y aurait pas d'induction dès 60°C. L'ensemble de ces résultats nous permet d'affirmer que cette molécule est présente au sein des *A. castellanii* et différente de Lvol.

2) Isolement de la molécule amibienne

a) Extraction à l'acétate d'éthyle

Afin d'extraire le déclencheur, nous avons tout d'abord réalisé une extraction à l'acétate d'éthyle sur le lysat d'amibe. Les fractions aqueuse et organique ont été testées sur les légionelles par le test au bleu d'Alcian (Figure 56).

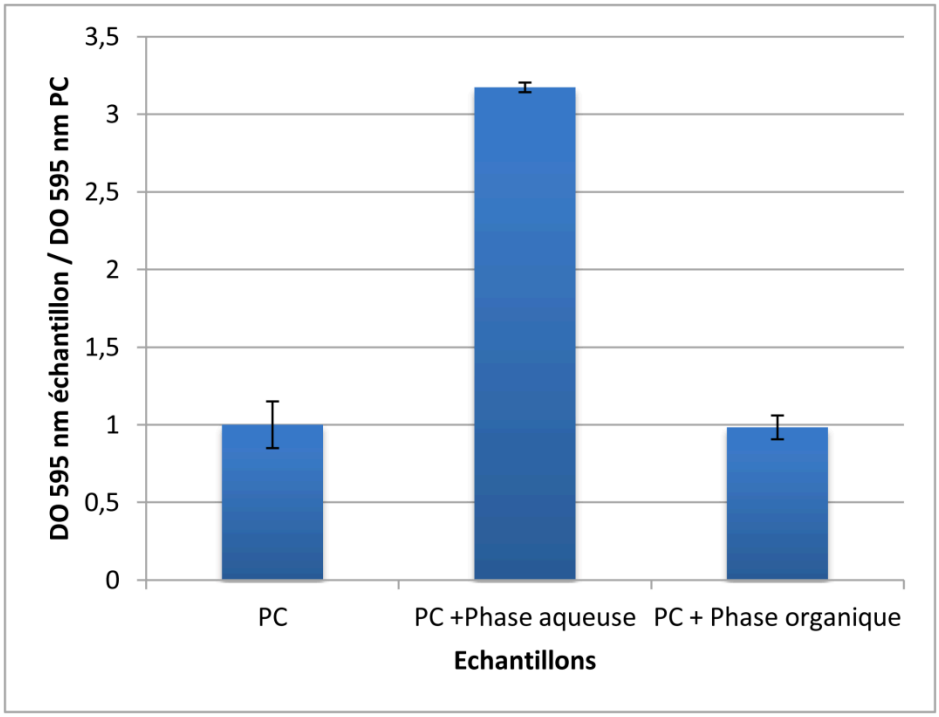


Figure 54: ***Intensités normalisées de coloration au bleu d'Alcian de biofilms de* L. pneumophila *PC traitées avec les phases de l'extraction au solvant organique du broyat d'amibes.***
Les résultats sont normalisés par rapport à la référence, légionelles PC. L'expérience a été répétée 3 fois.

Au vu de ces résultats, il apparait que la quantité d'exopolysaccharides sécrétés est plus importante dans la fraction aqueuse, ce qui signifie que la molécule inductrice n'a pas été extraite avec le solvant. Ce résultat confirme que la molécule inductrice provenant des amibes est différente de celle produite par les légionelles car Lvol est extractible à l'acétate d'éthyle.

b) Séparation en phase solide

En parallèle, nous avons tenté une extraction des composés de l'échantillon en phase solide sur cartouche C18. Chaque fraction, correspondant à une concentration croissante en acétonitrile, a été lyophilisée puis resolubilisée dans de l'eau minérale avant d'être mise en contact avec des légionelles PC.

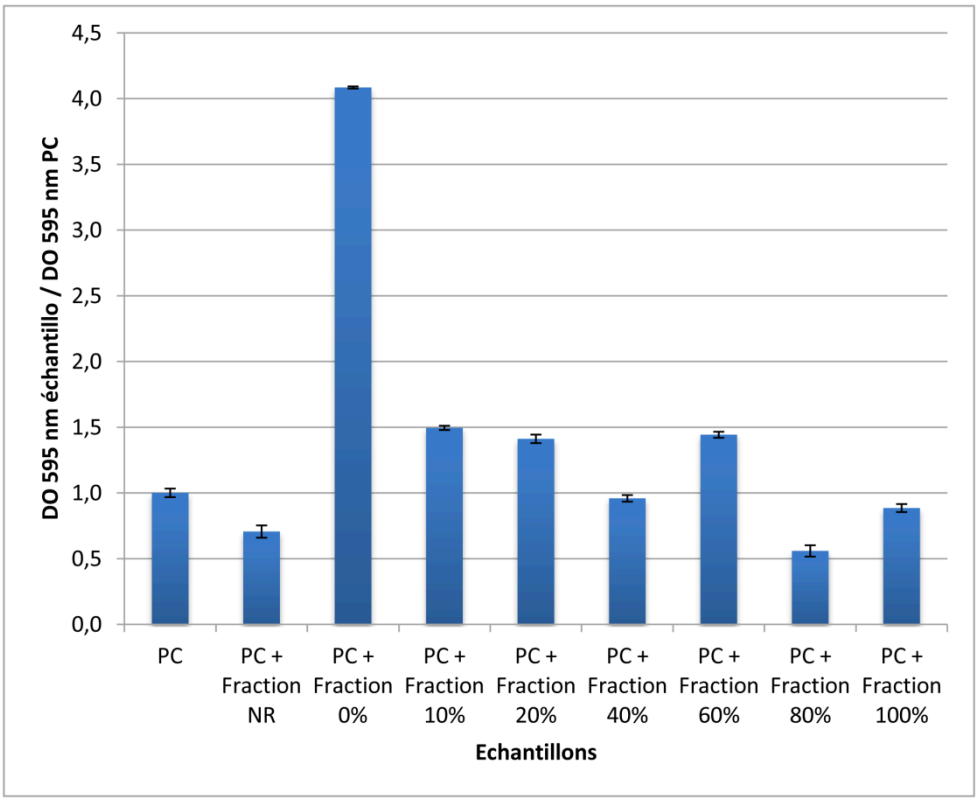


Figure 55: ***Intensités normalisées de coloration au bleu d'Alcian de biofilms de* L. pneumophila *PC traitées avec les fractions obtenues par extraction en phase solide resolubilisées dans de l'eau minérale***
Les résultats sont normalisés par rapport à la référence, légionelles PC. L'expérience a été répétée 3 fois.

Le dosage au bleu d'Alcian (Figure 57) montre que la plus grande quantité des exopolysaccharides est synthétisée lors de l'induction par la fraction 0%, environ 4 fois plus que pour les légionelles PC, ce qui signifie que la plus grande partie de la molécule déclencheuse ne s'accroche pas ou peu à la cartouche, témoignant d'un caractère plutôt hydrophile.

En parallèle, l'activité de cette fraction 0 %, a été testée par addition sur *L. pneumophila* PC et observation microscopique aprés7 jours (Figure 58).

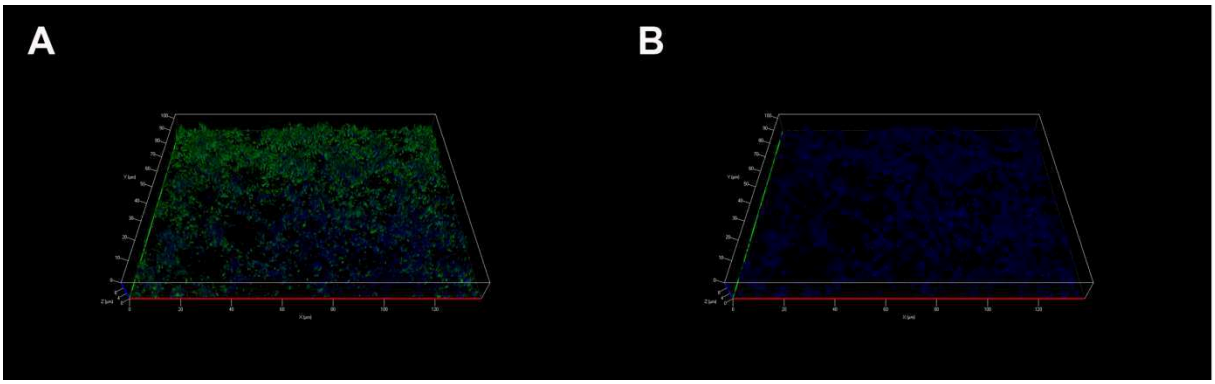


Figure 56 : ***Reconstitution 3D de l'observation en microscopie à illumination structurée à J7 de* L. pneumophila *Lens PC traitée avec la fraction 0 % (A).***
En (B), seuls les sucres sont présentés. Représentées en vert, les légionelles exprimant la GFP, en bleu, les sucres marqués. Figure représentative de 4 répétitions pour lequel 3 clichés ont été pris par échantillon.

De nombreux agrégats de légionelles sont visibles (Figure 58A), ainsi qu'une grande quantité d'exopolysaccharides (Figure 58B). Ces légionelles présentent un phénotype biofilm ce qui confirme que la fraction 0 % contient la molécule d'intérêt.

c) Séparation par HPLC

La fraction active a été analysée, à plusieurs reprises en HPLC sur colonne de phase inverse (C18). Malheureusement l'activité a toujours été retrouvée dans le pic injection.

Dans l'avenir il conviendra de tester des colonnes de phase directe pour l'extraction en phase solide puis en HPLC pour arriver à isoler la molécule active

F) Activation par nécrotrophie

Les travaux de Temmerman et son équipe en 2006, ont montré que les légionelles sont capables de croitre par nécrotrophie en utilisant des bactéries, des levures ou des amibes tuées par la chaleur (Temmerman et al., 2006). De manière à déterminer la présence éventuelle de déclencheurs de l'induction du phénotype biofilm chez les légionelles chez d'autres micro-organismes, des légionelles PC ont été traitées avec du broyat *d'E. coli* et de *S. cerevisiae*. Les légionelles ont ensuite été déposées sur un support en verre puis incubées une semaine avant d'être observées (Figure 59).

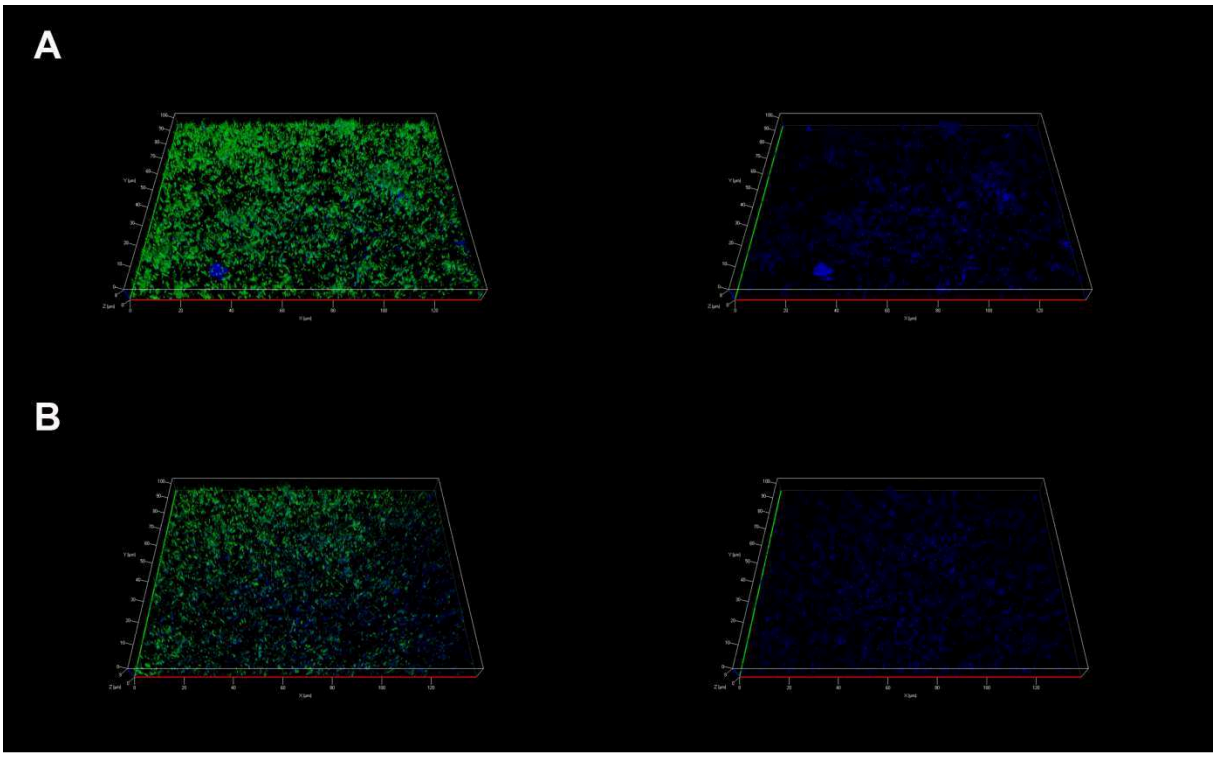


Figure 57: ***Reconstitution 3D de l'observation en microscopie à illumination structurée à J7 de* L. pneumophila *Lens Post-Culture mise en culture avec du broyat d'*E. coli *(A) ou avec du broyat de* S. cerevisiae *(B).***
Sur la colonne de droite, est représenté uniquement le marquage des sucres. Représentées en vert, les légionelles exprimant la GFP, en bleu, les sucres marqués. Figure représentative de 4 répétitions pour lequel 3 clichés ont été pris par échantillon.

Des agrégats de légionelles sont visibles associés à la présence d'une matrice exopolysaccharidique quelle que soit l'extrait testé. Ces résultats suggèrent l'existence d'une ou plusieurs molécules présentes chez ces micro-organismes capables d'induire le phénotype PA chez les légionelles PC. Mais cette induction est peut être due à la présence de nutriments permettant la croissance des légionelles et la synthèse des exopolysaccharides.

Un chauffage des broyats a permis de montrer que l'effet inducteur est neutralisé par traitement thermique. Ce résultat montre que le déclencheur si il existe est différent de celui détecté dans le broyat d'amibes.

Des tentatives d'isolement et de purification sont en cours par extraction en phase solide et HPLC pour tenter d'identifier la ou les molécules responsables de cette induction,de même qu'un test d'inhibition ou d'induction de la production de la violacéine par *C. violaceum* CV026 avec ces broyats.

Partie III : Etude transcriptomique et protèomique des légionelles issues des différentes conditions

Le phénotype biofilm induit par l'inducteur de légionelles PA ou le potentiel déclencheur amibien chez les légionelles PC est le résultat d'un phénomène complexe.Afin d'identifier les différents éléments participant à la mise en place de ce phénomène des études transcriptomique et protèomique ont été initiées.

A) Etude transcriptomique

Afin de réaliser une étude transcriptomique en utilisant des puces à ADN, des extractions d'ARN ont été réalisées sur *L. pneumophila* Lens. Afin de comparer les modifications transcriptionnelles, des extractions ont été réalisées sur des légionelles issues d'une multiplication en milieu classique : PC, en amibes : PA et des légionelles en cours de multiplication au sein d'amibes : IA. Les ARNm produits après addition de surnageant d'infection à des légionelles PC et l'ajout de broyat d'amibes filtré aux légionelles PC sont également testés. Les cellules ont été préalablement lysées par ajout d'EDTA et broyage mécanique. Les ARNm ont ensuite été précipités et lavés avant d'être repris dans de l'eau traitée contre les RNases. Les échantillons ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose afin de vérifier l'état des ARN (Figure 60).

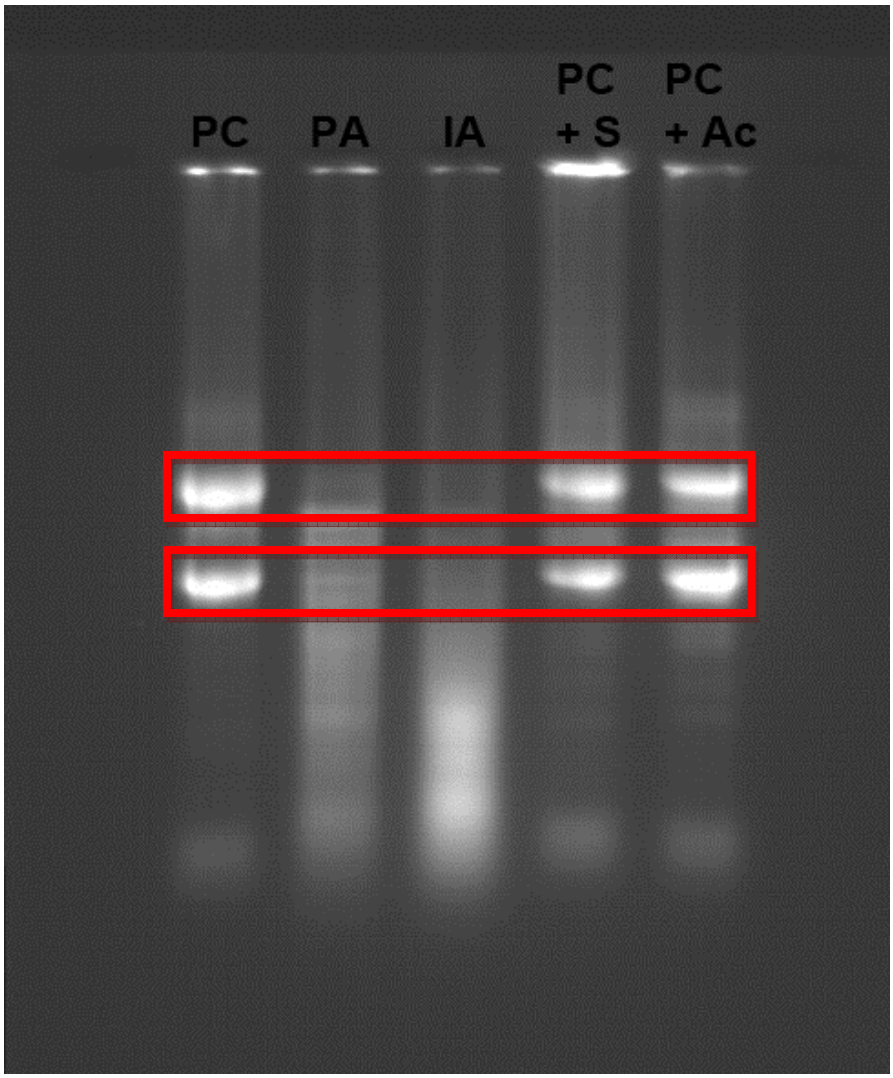


Figure 58: ***Photographie d'un gel d'agarose sous UV après migration des ARN extraits de* L. pneumophila *PC, PA, IA, PC + Surnageant de PA, PC +broyat d'amibes***
L'expérience a été répétée 5 fois sur 5 échantillons indépendants.

Les bandes observées sont distinctes et aucune trainée n'est observable, indiquant que les ARN ne sont pas dégradés. Cela signifie que ces ARN sont utilisables pour l'hybridation sur les puces à ADN. De plus, des bandes correspondant aux ARN ribosomiques de plus faibles intensité sont observées pour les ARN extraits de PA et IA que pour ceux des légionelles PC. La manipulation a été répétée 5 fois avec le même résultat. Ceci laisse supposer que dans nos conditions d'infection, il n'y a pas ou peu de transcription des gènes codant les ARN ribosomiques. Cela pourrait indiquer que lors de l'infection, les légionelles utilisent peut être les ribosomes amibiens pour la synthèse des protéines.

Les échantillons ont été confiés à Tobias Sahr de l'Institut Pasteur de l'équipe de Carmen Buchrieser du laboratoire de biologie des bactéries intracellulaires pour la réalisation des analyses transcriptomiques.

B) Etude protèomique

En parallèle, une étude protèomique, en collaboration avec Sylvie Chevalier du LMRM d'Evreux, est en cours de réalisation via la séparation des protéines en gel d'acrylamide bidimensionnel. A l'heure actuelle, les protéines totales ont été extraites à partir de culots de légionelles des différents types et vérifiées par électrophorèse sur gel d'acrylamide.

Conclusion générale et Perspectives

Les trois objectifs de cette étude étaient d'étudier, dans un premier temps, la colonisation de biofilms pré-existants, constitués d'un consortium type « réseaux d'eaux sanitaires » et la formation de biofilms mono-espèces par des légionelles issues de conditions de multiplication différentes. Dans un deuxième temps, la recherche et l'étude de facteurs favorisant la mise en place de ces biofilms. Dans un troisième temps, d'initier une approche comparative transcriptomique et protèomique des légionelles issues des différentes conditions de croissance.

Dans la première partie de notre étude, nous avons démontré que les légionelles quelles que soient leurs conditions de culture, sont localisées à la surface des biofilms, sans pénétration en profondeur. Cette localisation peut être due à l'absence de prédateurs amibiens qui jouent un rôle important dans l'organisation des biofilms. De plus, les biofilms ont été réalisés en conditions semi-statiques avec un consortium particulier. Il serait intéressant de suivre l'implantation des légionelles en utilisant d'autres consortiums ou directement des biofilms recueillis au sein de réseaux d'eaux, mais également en conditions dynamiques.

De plus, il a été observé que la majorité des légionelles qui avaient adhéré au biofilm ou au support présentaient une orientation verticale. Il serait intéressant de tenter de relier cette observation à l'intervention de molécules d'attache spécifiques comme notamment la *Legionella* collagen like (Lcl), une protéine impliqué dans l'adhésion chez *Legionella* (Duncan et al., 2011; Mallegol et al., 2012) afin de déterminer son rôle dans cette orientation. Cela pourrait être réalisé par des techniques de marquage, de mutagénèse dirigée, de fusion transcriptionnelle avec une protéine auto-fluorescente afin de montrer une différence de quantité de la protéine d'adhésion entre les différents types de légionelles ainsi que de déterminer sa localisation cellulaire.

Au cours de cette première partie, nous avons également mis en évidence 2 phénotypes différents de colonisation et de formation de biofilms. Les légionelles issues de culture classique, appelées Post-Culture (PC), présentent une répartition homogène à la surface du biofilm et du support et les cellules apparaissent isolées. De plus, une faible production de polysaccharides est alors détectée. Ce phénotype est également observé avec des légionelles qui ont effectué un passage au sein de protozoaires ciliés, *Tetrahymena tropicalis*. A l'inverse les légionelles s'étant multipliées au sein des amibes, appelées Post-*Acanthamoeba* (PA), forment des agrégats compacts composés d'un grand nombre de celluleset sont capables de synthétiser une grande quantité d'exopolysaccharides. Les cellules

regroupées sont ainsi empaquetées dans cette matrice glucidique. Il apparait donc que la différence de comportement dans la formation et le développement du biofilm est due à la multiplication des légionelles au sein d'amibes. Lors de cette étude, une seule espèce d'hôte amibien a été utilisée pour la multiplication des légionelles. Il serait intéressant d'essayer de déterminer si ce comportement est retrouvé avec d'autres espèces d'amibes classiquement retrouvées dans les réseaux d'eaux. De même, il conviendrait d'étudier le comportement des légionelles « non-libres », c'est-à-dire en cours de réplication au sein de l'amibe. De plus, dans l'optique de mieux appréhender le rôle éventuel du biofilm lors du développement de la légionellose, il serait intéressant de tester des légionelles s'étant multipliées dans des macrophages pour leur capacité à former du biofilm. De même il conviendrait de tester la virulence des différents types de légionelles, PC, PA, PC induites par du surnageant de PA et PC induites par du broyat d'amibes. En effet, il a été décrit que les légionelles en sortie d'amibes présentent une augmentation de leur capacité à infecter les amibes et les macrophages (Cirillo et al., 1994; Steinert et al., 1997; Cirillo et al., 1999; Molmeret et al., 2005; Garcia et al., 2007).

Dans cette partie, nous avons mis en évidence que la formation des agrégats par les légionelles PA est du à un mécanisme de regroupement lié à la synthèse d'une molécule à activité chimiotactique par les légionelles.

La seconde partie de ce travail a consisté à tenter d'identifier et de caractériser les facteurs responsables du phénotype observé pour les légionelles PA. Ce travail a permis de démontrer que la capacité d'adhésion des légionelles PC et PA est le même et donc que la différence dans la formation des agrégats par les légionelles PA est due à un facteur spécifique. L'observation du « profil osidique » de la matrice du biofilm a mis en avant une différence entre les polysaccharides des légionelles PA composés de 2 oses (glucose et fucose) et les PC composées d'un grand nombre d'oses simples Une analyse de la structure et de la composition de ces exopolysaccharides est en cours. Des observations en microscopie électronique à transmission et en microscopie à force atomique devront être effectuées afin de visualiser la structure interne et externe de la matrice, ainsi que la disposition des légionelles PA au sein de cette matrice.

En parallèle, l'étude de la production par les légionelles PA du composé permettant un chimiotactisme a été réalisée. Ce travail a mis en évidence l'existence d'un nouveau système

de communication de type Quorum Sensing intra et inter-espèces au sein du genre *Legionella*. Il a été démontré que cet auto-inducteur favorise le regroupement des légionelles et induit le phénotype biofilm notamment via l'activation de la synthèse d'exopolysaccharides.

De plus, les résultats de cette étude ont démontré que ce système de communication est diffèrent de celui déjà connu chez *Legionella*. Dans le premier système de Quorum Sensing décrit (*Legionella* quorum sensing (lqs)) deux récepteurs ont été découverts, LqS et LqsT (Tiaden et al., 2010; Kessler et al., 2013). Ce dernier étant isolé du groupe de gènes impliqués dans le système *lqs* et le seul gène de ce système retrouvé chez *L. longbeachae,* il semble intéressant d'essayer de déterminer son éventuel rôle dans le mécanisme de communication mis en évidence dans cette étude. La caractérisation de la molécule inductrice est en cours notamment au travers d'une collaboration avec un laboratoire Canadien.

Les expérimentations réalisées au laboratoire ont permis de mettre en évidence une molécule de type AHL à longue chaine. Ces résultats sont à conforter notamment via l'utilisation de lactonases ou d'AHL purifiées pour essayer d'induire le phénotype PA chez les légionelles. Il sera également possible de déterminer la quantité seuil de l'inducteur nécessaire à l'induction du phénotype en utilisant le dosage au bleu d'Alcian ainsi que les observations microscopiques Cet auto-inducteur pourra être testé sur différentes bactéries notamment sur l'inhibition de la production de violacéine par *C. violaceum* CV026 et sur *P. aeruginosa* afin de déterminer l'effet de cet inducteur à différentes concentrations. De plus, il sera également intéressant de déterminer si cet auto-inducteur a un impact sur la croissance de cellules cancéreuses comme l'OdDHL (Dolnick et al., 2005)

Un travail devra être effectué pour identifier les gènes responsables de cette communication notamment via la construction d'une banque de mutants de transposition. Les mutants qui ne présenteront pas de phénotype biofilm après traitement avec l'auto-inducteur purifié pourront être utilisés pour tester leur capacité à infecter les amibes afin de déterminer le rôle de ce système de communication dans l'interaction et la multiplication des légionelles avec les hôtes amibiens.

Un composé déclencheur de l'induction a également été mis en évidence chez les amibes. Cette molécule constitue sans doute le point de départ de la mise en place du système de communication. Ce déclencheur apparait différent de l'inducteur des légionelles par ses caractéristiques. Il sera nécessaire de déterminer sa structure avant d'étudier son mode d'action.

De plus, l'induction du phénotype biofilm a été observée lorsque des légionelles PC sont traitées avec du broyat de *E. coli* et *S. cerevisae* via l'action d'un facteur déclencheur, différent de celui présent chez les amibes, ou simplement grâce à la présence de nutriments .S'il s'agit d'un déclencheur, il devra être purifié et caractérisé de manière à déterminer son mode d'action et sa fonction dans la cellule.

La deuxième partie de ce travail à permis de montrer l'existence de facteurs importants dans l'établissement du phénotype biofilm notamment la synthèse d'exopolysaccharides, la production d'un auto-inducteur provenant d'un système de communication jusqu'alors non décrit, de même que l'induction de ce phénotype par le biais d'une molécule amibienne. Ces deux éléments inducteurs sont en cours de caractérisation.

La troisième partie, qui est en cours est la suite logique des deux premières parties et porte sur l'étude des modifications d'expression génétique afin de mettre en évidence les gènes impliqués dans le phénotype PA. De même que la modulation de l'expression des protéines chez les légionelles PC après traitement avec l'auto-inducteur produit par les légionelles PA et le déclencheur amibien est en cours d'analyse.

Une perspective à long terme, consiste à comprendre les cascades de régulation mises en jeu par ce système de communication ainsi que son éventuel impact sur la virulence des légionelles. Cela pourra être réalisé notamment par l'emploi de modèles*in vitro* comme les pneumocytes ou/et *in vivo*comme par exemple *Galleria mellonella,* une larve de papillon diurne mimant la défense immunitaire humaine, mais aussi, en utilisant de sondes spécifiques de l'état « induit » par la méthode de FISH sur des légionelles collectées de réseaux et de patients.

A très long terme, cette étude ouvre le champ à un mode de contrôle des légionelles via la perturbation de cette communication par Quorum Quenching afin de diminuer la formation et le développement de biofilm par les légionelles au sein des réseaux d'eau.

Publication

Intra-amoeba multiplication induces chemotaxis and biofilm colonization and formation for *Legionella*.

Renaud BIGOT[1], Joanne BERTAUX[2], Jacques FRERE[1], Jean-Marc BERJEAUD[1]*

[1]*Equipe Microbiologie de l'Eau, Ecologie & Biologie des Interactions, CNRS UMR 7267, Université de Poitiers, France*
[2]*Equipe Ecologie Evolution Symbiose, Ecologie & Biologie des Interactions, CNRS UMR 7267, Université de Poitiers, France*

* Corresponding author. Tel.: +33 5 49 45 40 06; fax: +33 5 49 45 35 03
E-mail address: jean-marc.berjeaud@univ-poitiers.fr (J-M Berjeaud)

Summary

Legionella pneumophila, a facultative intracellular bacterium, is the causative agent of legionellosis. In the environment this pathogenic bacterium colonizes the biofilms as well as amoebae, which provide a rich environment for the replication of *Legionella*. When seeded on pre-formed biofilms, *L. pneumophila* was able to establish and survive and was only found at the surface of the biofilms. Different phenotypes were observed when the *L. pneumophila,* used to implement pre-formed biofilms or to form mono-species biofilms, were cultivated in a laboratory culture broth or had grown intracellulary within the amoeba. Indeed, the bacteria, which developed within the amoeba, formed clusters when deposited on a solid surface. Moreover, our results demonstrate that multiplication inside the amoeba increased the capacity of *L. pneumophila* to produce polysaccharides and therefore enhanced its capacity to establish biofilms. Finally, it was shown that the clusters formed by *L. pneumophila* were probably related to the secretion of a chemotaxis molecular agent.

Introduction

Legionella is a facultative intracellular gram-negative bacteria found in natural freshwater environments as well as in man-made water systems (Steinert et al., 2002). *Legionella pneumophila* is the major agent of legionellosis, except in Australia, where *Legionella longbeachae* is the major causative agent (Asare and Abu Kwaik, 2007; Cazalet et al., 2010). The infection is due to multiplication within alveolar macrophages after inhalation by human of contaminated aerosols produced by many engineered water systems such as air

conditioning, cooling towers, hot water systems, whirlpools and spas, vegetable misters, shower heads and dental unit water lines (Bollin et al., 1985b; Bollin et al., 1985a; Bhopal, 1991; Atlas, 1999; Ewann and Hoffman, 2006).

The control of *L. pneumophil*a in water networks is principally based on decontamination processes. However, it is now well known that this bacterium resists to biocide treatments because of its sessile way of life into biofilms as well as its capacity of growth within amoeba (Kim et al., 2002; Thomas et al., 2004; Koubar et al., 2011).

Legionella spp. require supplementation in amino acids and therefore, have developed mechanisms to acquire these nutrients by residing in nutrient rich biofilms (Rogers and Keevil, 1992; Murga et al., 2001; Declerck et al., 2007b, a). *L. pneumophila* is able to survive and grow on dead biofilm-associated microbial cells such as heat-killed bacteria, amoebae and yeast (Temmerman et al., 2006). In *Legionella* monospecies biofilm development in rich nutrient medium, temperature has a role about thickness and structure (Piao et al., 2006). Biofilms constitute the major source of human contamination. Microbial formation of biofilm communities provides protection against physical or chemical agents. Thus, it was demonstrated by numerous studies (Murga et al., 2001; Vervaeren et al., 2006; Declerck et al., 2007a) that *L. pneumophila,* prepared from laboratory culture medium, is able to implement into a pre-formed biofilm for bacteria.

Amoeba such as *Acanthamoeba castellanii* and ciliate protozoan are able to graze biofilm material (Huws et al., 2005). In these environments, *Legionella* is a target of protozoan predation and has developed the capacity to parasitize and reside in 20 species of amoebae, three species of ciliated protozoa and one species of slime mould (Rowbotham, 1980;

Kikuhara et al., 1994; Hagele et al., 2000). Numerous studies show the necessity of the presence of protozoans for the survival and replication of *L. pneumophila* in aquatic environments (Murga et al., 2001; Kuiper et al., 2004). The study of Declerck et al, in 2007 (Declerck et al., 2007c), shows that *Acanthamoeba castellanii* is not only used for intracellular replication but as a transporter like a "Trojan horse" (Declerck et al., 2007b) and Neumeister et al (Neumeister et al., 2000) proved that intracellular replication in human monocytic leukocytes is enhanced after infection of *Acanthamoeba castellanii*. Free protozoa not only select virulence traits, but also facilitate the transmission of *Legionella* spp to humans within intact amoebae or expelled vesicles (Hilbi et al., 2011). The ability of *Legionella* spp to persist and colonize biofilm as well as parasitization of amoeba cells can be considered as a survival mechanism, but this can lead to severe consequences for human health.

With the current study, we provide information about the implementation of *Legionella* on static biofilms composed of non-*Legionella* bacteria similar to those present in aquatic systems. We compared the behavior of *Legionella* after culture in a usual medium, after infection of amoebae, or passage through ciliated protozoan in condition near to anthropogenic water networks.

Experimental Procedures

Strains and culture conditions

The *Legionella* strains used are *L. pneumophila* Lens (CIP 108286), a clinical isolate, Paris (LG03), an environmental isolate and *Legionella longbeachae* (ATCC 33484). The plasmid PSW001 or plasmid pMMB207-KM14-GFPc [26] encoding the protein DsRed and GFPMut2

were used to transform the bacteria. *Legionella* was grown in BYE medium (Buffered Yeast Extract) or BCYE (Buffered Charcoal Yeast Extract) at 37°C with chloramphenicol at 10 µg/mL when necessary. The experiments were made with *L. pneumophila* expressing GFP or Ds-red with similar results.

The pre-formed biofilms consisted of selected strains usually found in anthropogenic water networks [22]. Non-Legionella bacteria were *Aeromonas hydrophila* (Library of Microbiology Universiteit Gent, Belgium (LMG 2844)), *Escherichia coli* (LMG 2092), *Flavobacterium breve* (LMG 4011) and *Pseudomonas aeruginosa* (LMG 1242). These strains were grown in BHI (Brain Heart Infusion) at 37°C.

Acanthamoeba castellanii 30254 (Dupuy et al., 2011) was grown in medium PYG (Proteose Yeast Glucose) (Bellamy et al., 1992) at 25°C and *Tetrahymena tropicalis* was cultivated in PCB (Plate count Broth) at room temperature in the dark.

Preparation for the implementation of Legionella in the biofilm

The preparation described downhere were realized with the three *Legionella* strains cited previously.

"*Medium Grown (MG)* Legionella *non-filamentous condition*

Legionella grown in culture media produced numerous filamentous cells, often more than 40 µm long, which is not the case after their passage into amoebae or ciliates (data not shown). *Legionella* non-filamentous stationary phase form were grown according to the protocol of the CNRL Lyon (Koubar et al., 2011). Bacteria were then suspended in sterile mineral water (Evian). As it is well known that nutrient depletion induces the stationary

phase in *Legionella* (Molofsky and Swanson, 2004; Faulkner et al., 2008), under these conditions, these bacteria reached stationary form and were named "Medium Grown" bacteria. The fluorescence of strains was checked by epifluorescence microscopy.

"Amoeba Grown" (AG) Legionella

Amoeba, after 2 days of culture, were harvested and washed in amoeba buffer. *Acanthamoeba* were placed in contact with *Legionella* following a multiplicity of infection or MOI (Mutiplicity Of Infection) of 0.1 and incubated at 30 ° C. After 96 hours, *Legionella* were collected by centrifugation at 10 000 g for 10 minutes. The pellet was washed twice with filtered mineral water and was resuspended by vortex. After centrifugation, the preparation was allowed 10 min to precipitate and only the upper half of the volume was taken. The absence of amoeba and the fluorescence of *Legionella* were checked using an epifluorescence microscope. Under these conditions, these bacteria were designated "Amoeba Growing" (AG).

"Medium Growing Legionella *treated with AG supernatant (MG+ Sur AG)*

After 24 hours of incubation at 37°C, AG *Legionella* suspension was centrifuged 5 minutes at 10 000 g and the cell free supernatant was collected. Supernatant (1 mL) was added to a pellet of 1.10^8 MG cells. After incubation during 1 hour at 37°C, *Legionella* suspension was centrifuged at 4 500 g for 15 minutes and washed two times with mineral water. The fluorescence of *Legionella* was checked using an epifluorescence microscope. Under these conditions, these bacteria were designated "treated MG *Legionella*" (tMG).

"Ciliated Grown" (CG) Legionella

After 7 days of culture *of Tetrahymena tropicalis* the medium was gradually replaced between centrifugation by Osterhout's Tris buffer (Koubar et al., 2011). *Legionella* were added with MOI of 1000 bacteria for 1 protozoan. After 96 hours, the suspension was centrifuged and the medium discarded. Distilled water was added and left one night in the dark. The next day, water was eliminated. *Legionella* pellets were broken using syringes 27 and 22 gauges. Broken pellets and *Legionella* fluorescence were controlled by epifluorescence microscopy. Under these conditions, these bacteria and were designated "Ciliate Grown" (CG).

Alcian blue test

The wells of 6 well plates were filled with 2 ml of sterile mineral water. Each well was inoculated with 2.10^9 *Legionella* and incubated 24 hours at 37°C without agitation. The supernatant was removed and replaced by 1 mL of Alcian blue 8G (Sigma-Aldrich) at 0.1 % in distilled water. After 30 min incubation, each well was washed three times and 1 mL of 33 % acid acetic was added. Absorbance was measured at 595 nm.

Crystal Violet test

The first part of the test was performed like Alcian blue assay. The supernatant of the wells was removed and replaced by 1 mL of 0.3 % Crystal Violet (Sigma-Aldrich) in distilled water. After 15 min incubation, each well was washed three times with mineral water and 1 mL of absolute ethanol was added. Absorbance was then measured at 595 nm.

Legionella *transformation*

Legionella were grown on BCYE for 72 h and suspended by scrapping from the plates with 50 mL of sterile double distilled water. The cell suspension was centrifuged in a cold rotor (4°C) at 5 500g for 10 min. The supernatant was discarded and the pellet was washed three other times with half a volume of water each time. The final volume was added to make a concentration of 2.10^{11} cells/ mL. The bacteria suspension was dispensed into 50 µL and transferred to a cold electroporation cuvette. After addition of 200 µg of plasmid DNA, electroporation was performed using a Gene Pulser apparatus. One mL of BYE was added after the pulse and incubated at 37°C without agitation. After one hour, 100 µL of suspension were spread on BCYE plates containing chloramphenicol. Transformants were confirmed by the presence of plasmid DNA by electrophoresis on 0.4% agarose gels.

Microscopy

Development of biofilms

Biofilms were made in 12 well plates with glass bottom adapted for confocal microscopy. In each well, 2 mL of BHI diluted 1/100 with mineral water (to reach organic matter concentration equivalent to river water) were introduced. The wells were inoculated with 5.10^6 bacteria of each of the four non-*Legionella* strains from an overnight pre-culture. The plates were incubated for 15 days at 37°C with media changes every four days. The medium was then removed and replaced by 2 mL of filtered mineral water. Biofilms were then seeded with 1.10^7 *Legionella* cells of different types (MG, AG and CG) and the plates were incubated for 7 days at 37°C. The microscopic observations were realized every 24 hours.

Staining

The wells were washed with mineral water to eliminate non-adherent *Legionella*. To mark the exopolysaccharide matrix, Concanavalin A AlexaFluor 350 conjugate (Invitrogen) was added according to the manufacturer's recommendations and wells were incubated 20 minutes at 37°C and then washed with mineral water. Draq 5 (Biostatus) was added to stain all bacteria as recommended by the supplier.

Observation and processing

The observations were made with the epifluorescence microscope Axio Observer A1 (Zeiss) equipped with Apotome. This module allows structured illumination. The microscope is equipped with a mercury lamp and filters specific for DAPI (Zeiss Filter Set 49), FITC (Zeiss Filter Set 44), Cy3 (Zeiss Filter Set 43) and Cy5 (Zeiss Filter Set 50), and the Plan Neofluar 1.25 oil immersion objective (Zeiss). The images were taken using the AxioVision software and processed with the software Imasis7.4.1 and Zen (Zeiss).

PCR

DNA extractions were performed with the High Pure PCR Template Kit (Roche) according to the supplier's recommendations. Primers used were listed in Table 1. PCR conditions were as follows: an initial denaturation step of 94°C for 5 min and then 30 cycles of 94°C for 30 sec., primer annealing 60°C for 30 sec., and polymerase extension at 72°C for 60 sec.

Quantitative PCR

DNA extractions were performed with the High Pure PCR Template Kit (Roche) according to the supplier's recommendations. The qPCR were performed with primers specific for the *mip*

gene (mipA1, mipA2 described by Jonas et al (Jonas et al., 1995), with the Light Cycler FastStart DNA kit SybrGreen Master and Light Cycler 32 wells according to the manufacturer's recommendations.

Results

Implementation of* Legionella *on multi-species biofilms

It was shown earlier (Declerck et al., 2005) that *Legionella pneumophila* is able to colonize pre-formed biofilms consisting of the four aquatic bacteria *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*, *Flavobacterium breve* and *Pseudomonas aeruginosa*, generally present in the same aquatic environment as *L. pneumophila* (Murga et al., 2001; Declerck et al., 2005; Mampel et al., 2006; Vervaeren et al., 2006; Declerck et al., 2007b; Stojek and Dutkiewicz, 2011). Thus we prepared biofilms composed of these bacteria, on glass support fixed under 12 wells microplates and using a BHI medium diluted 100 times with Evian mineral water. Indeed, it was recently shown (Koubar et al., 2013) that the mineral composition of this water is particularly adapted for the biofilm formation by *L. pneumophila*. Every 4 days, medium was renewed. In all conditions tested, *Legionella* were described as highly mobile (Pruckler et al., 1995; Byrne and Swanson, 1998).

After 15 days, Ds-red fluorescent *L. pneumophila* Lens cells, prepared from BYE culture medium, named “Medium Grown” (MG) or after growing within *Acathamoeba castellanii*, “Amoeba Grown” (AG) or within ciliated protozoan, *Tetrahymena tropicalis*, "Ciliated Grown" (CG) were added to the pre-formed biofilms and medium was replaced by steril mineral water (Evian). Within one week, MG *L. pneumophila* established in the pre-formed biofilms as single cells, which were globally disseminated overall the surface of the non-

Legionella strains biofilm (figure 1A). Transversal imaging (Figure 2) demonstrated that none of the *L. pneumophila* cells were found inside the biofilm structure but were all situated at the surface of the biofilm. The same results were obtained with CG *L. pneumophila,* (Figure 1C). Likewise, AG *L. pneumophila* were found only on the surface of the biofilm (Figure 1B) and were never found deeper inside the structure. However, contrarily to the MG bacteria the AG *L. pneumophila* appeared aggregated instead of individual cells. The same results were obtained with *L. pneumophila* Paris and *L. longbeachae* (not shown).

When inoculated to monospecies biofilms pre-formed with each of the four non-*Legionella* strains, the MG and AG *L. pneumophila* had the same behavior as observed with multispecies biofilms, namely single cells for MG *Legionella* and clusters for AG *Legionella* (Figure 3). These results indicate that none of the four strains constituting the pre-formed biofilm could be specifically implicated in the establishment differences observed for the types of *L. pneumophila*.

Monospecies biofilm formation by *L. pneumophila*

In order to determine whether the observed phenotypes for *L. pneumophila* in biofilm depended on the existence of a pre-formed biofilm, both types of *L. pneumophila*, MG and AG, were directly inoculated on the glass surfaces fixed at the bottom of the wells of a microplate. The MG *L. pneumophila* cells (figure 4A) appeared dispersed on the glass surface and this biofilm was found very thin, about 8 µm, with large areas devoid of attached cells. On the contrary, the biofilm obtained from the AG *L. pneumophila* (figure 4B) appeared thicker and presented densely packed bacteria separated by open structures.

Moreover, while the polysaccharides were poorly detected in the MG *L. pneumophila* biofilm (figure 4A) this type of macromolecule appeared abundant in the AG *L. pneumophila* biofilm (in blue on figure 4B and 4C) and was preferentially detected around the clusters of bacteria.

In order to verify whether the observed polysaccharides were newly synthesized by *L. pneumophila* and did not originate from *A. castellanii,* the amount of polysaccharide was determined using Alcian Blue. The amount of polysaccharide was too low to be detected in the MG as well the AG *L. pneumophila* suspensions used to seed the microplate wells (2.10^9 cells), indicating that it was synthesized by bacteria during biofilm formation. Moreover, it was found that the amount of polysaccharide newly synthesized after one day was 2.78 times higher for the AG *L. pneumophila* than the MG *L. pneumophila* (Figure 5), which confirmed the microscopy analyses.

L. pneumophila *clusters origin*

We hypothesized that the bacterial clusters observed for AG *L. pneumophila* could be formed in the amoeba cell before the release of the bacteria in the medium or by aggregation only after the release of *L. pneumophila* in the very early step of the biofilm formation. The AG *L. pneumophila* suspension appeared only as isolated cells (figure 6). No bacterial clusters were observed in this experiment whatever the *L. pneumophila* strain, Lens (figure 4), Paris (not shown) or *L. longbeachae* (not shown). This indicates that the aggregation occurred after the release from amoeba.

In order to verify whether the clusters originated from an aggregation of bacteria or the multiplication from a single cell, GFP and Ds-Red expressing AG *L. pneumophila* were mixed before spreading on the glass surface. The resulting clusters (Figure 7) were constituted of

both types of cells, green and red, indicating that they came from an aggregation instead of cell division. Moreover, we observed a high quantity of yellow spots, corresponding to a co-localization of green and red cells. The same experiment, conducted with MG *L. pneumophila*, showed only isolated green and red cells homogenously distributed overall the glass surface (Figure 7).

Moreover, the non-multiplication of *L. pneumophila* was confirmed using a qPCR analysis since the number of MG a well as AG bacteria was similar, after one week biofilm development than in the initial suspension (figure 8). Declerck et al (2005) show that *L. pneumophila* increase in amoeba buffer, alone or with the same four non-*Legionella* strains, was only due to intracellular multiplication of the human pathogen (Declerck et al., 2005).

Taken together, these results suggest that the *L. pneumophila*, which multiplied within the amoeba, expressed, after their release in the environment, a molecular factor, which induced a mutual attraction of the bacteria.

Chemotaxis factor

In order to verify our chemotaxis hypothesis, GFP expressing MG *L. pneumophila* were added to Ds-Red expressing AG *L. pneumophila* before inoculating the glass surface. The observed clusters of bacteria (figure 9) were composed of AG *L. pneumophila*, in red, covered with MG *L. pneumophila*, in green. This result shows that the "chemotaxis" factor expressed by AG bacteria was able to attract the MG *L. pneumophila*. Interestingly it has to be noticed that these "hybrid" clusters were partially embedded in newly synthesized polysaccharides (in blue, figure 9).

To confirm the factor production, MG *Legionella pneumophila* Lens were treated with the supernatant of AG Legionella then inoculated into plates. After 7 days of incubation, *Legionella* aggregates were visible (Figure 10) with the presence of a large amount of exo-polyssacccharides. These *Legionella* acquired the same ability to develop a biofilm as AG *Legionella*, which suggests the latter secreted a compound that can induce an AG phenotype. Moreover, this result confirms that the observed exopolysaccharides were produced by *Legionella pneumophila* and not by amoeba.

These results suggest the implication of a system similar to quorum sensing. A *Legionella* quorum sensing system named *lqs* was described by Spirig et al (Spirig et al., 2008). It was shown that this system was absent from *Legionella longbeachae* (Mampel et al., 2006; Tiaden et al., 2007; Tiaden et al., 2008; Tiaden et al., 2010; Kessler et al., 2013). Firstly, a PCR analysis was performed to verify the presence of the different *lqs* genes in *Legionella pneumophila* Lens, used as a positive control and *Legionella longbeachae* (ATCC 33484) (Figure 11). The results of the amplification confirmed the absence of the *lqs*A, R and S from *Legionella longbeachae*. To determine whether the induction system detected here corresponds to *lqs* system, we performed an experiment in which MG *L. pneumophila* Lens were treated with the supernatant of AG *L. longbeachae*, then suspended in mineral water and deposited on glass plate. After 7 days of incubation, *Legionella* aggregates, similar to those obtained with *Legionella* AG, and presence of exo-polysaccharides were observed (Figure 10 B). Thus, despite the lack of *lqs* system in *L. longbeachae* including *lqsA*, coding the enzyme responsible for the synthesis of LAI-1 autoinducer, a biofilm phenotype was induced. These preliminary results suggest the existence of a different quorum sensing system in *Legionella* intra and inter-species.

Discussion

It was demonstrated by numerous studies (Murga et al., 2001; Vervaeren et al., 2006; Declerck et al., 2007a) that *L. pneumophila,* prepared from laboratory culture medium, is able to implement into a pre-formed biofilm for bacteria. In the first part of our study we showed that this implementation also occurred for *Legionella* cells released from ciliated protozoan or amoeba. And we also showed that the *Legionella* remained stable after seven days. This could indicate that the *Legionella* did not multiply in the biofilm, as it was previously proposed by Mampel and colleagues (Mampel et al., 2006) who related the *L. pneumophila* development in biofilm to the adhesion of planktonic bacteria rather than by clonal replication of sessile cells. This is consistent with the study of the *Legionella* monospecies biofilms of Pecastaings and collaborators (Pecastaings et al., 2010), who demonstrated that sessile *L. pneumophila* is able to grow in a minimum medium only when it is supplemented with iron and cysteine but not in an oligotrophic medium.

Whatever the origin of the bacteria, in our experiments, the *Legionella* cells appeared located on the surface of the pre-formed biofilm, which could be quite normal but also paradoxical, considering that the biofilm matrix protects the bacteria from external stresses. This superficial location could be related to our experimental conditions because observations were made only a week after seeding *Legionella*. It could be possible that the *Legionella* kinetic of penetration, or burying, into the biofilm matrix requires longer duration. However it could also be postulated that this superficial location on biofilm is advantageous regarding *Legionella*'s ability to grow on dead bacteria. Indeed, probably because of its requirement for L-cysteine, *Legionella* is capable of necrotrophic feeding, thus utilizing dead

bacteria, protozoans or other microflora for sustenance (Temmerman et al., 2006). In these cases, *Legionella pneumophila* is located on boundary layer of biofilm, an advantage for this fastidious organisms that permit to *Legionella* to have access at more nutrient (Nadell et al., 2013). Stress, like nutrient depletion as in our experiment, was described to promote acceptance and recruitment of new members in the biofilm (Cheng and Costerton, 1986; Besemer et al., 2007). In another way, it could be proposed that the *Legionella* located at the surface of the biofilm in order to be more accessible for amoeba grazing then subsequent intra-amoeba multiplication.

The other major observation we made in this study is the presence of aggregates, conjugated with the production of exopolysaccharides by the "Amoeba Grown" (AG) *Legionella* cells but not the "Medium Grown" (MG). Moreover, this behavior is not related to the origin of the strain because the results obtained with a clinical strain, *L. pneumophila* Lens, and strain originally isolated in the environment, *L. pneumophila* Paris, as well as *L. longbeachae* were the same.

At first we hypothesized that these bacterial aggregates corresponded to micro-colonies obtained consecutively to clonal multiplication of *L. pneumophila* after the initial adhesion on the glass surface or the pre-formed biofilm. We demonstrated that aggregation depends on the mutual attraction of the bacteria but only after they grew within amoeba. Moreover, this is clearly in relation with a multiplication phase, since after passage in *Tetrahymena tropicalis*, where no replication was observed, a phenotype similar to the MG *Legionella*, not AG, was obtained. It can be hypothesized that this gathering is related to the production of a

chemotaxis molecular agent specifically by the *Legionella* cells which grew in amoeba and after their release in the environment.

The target of this attraction could be bacterial cells themselves which could express both the chemotaxis factor and its putative specific sensor, the latter being induced by the factor acting as an inducer. In this case, we could postulate that the expression of the sensor was already induced for AG bacteria, which can rapidly gather whereas the MG *Legionella* expressed the sensor with delay when induced by the chemotaxis factor. This could then explain why the MG bacteria appeared to coat the surface of the AG clusters whereas we could imagine that the attraction of the MG bacteria to AG cells led to the formation of bi-colored aggregates, because both types of cells where mixed before deposition on glass surface. Moreover, the chemotataxis factor seems to be dependent of the intracellular replication as shown by its lack from CG *L. pneumophila*.

A *L. pneumophila* quorum sensing system involving an autoinducer, LqsA, and a sensor, LqsS, was previously described (Tiaden et al., 2008). However, the authors have demonstrated that the genes encoding such system are not present in the *L. longbeachae* genome (Spirig et al., 2008). Nevertheless, the ability to form biofilm acquired by *Legionella* after its intracellular growth was observed in our experiments with MG *L. pneumophila* Lens treated with supernatant of AG *Legionella longbeachae* which did not possess *lqs* genes. Thus, the chemotaxis factor is different than LAI-1. Nevertheless, with this study, we have demonstrated the existence of new quorum sensing system intra and inter-species.

Finally, it has to be noticed that the AG *L. pneumophila* expressed, when adhered, large amounts of polysaccharides. Moreover, because AG cells but not MG cells produced very

important amounts of such polysaccharides, this is again related to a passage within amoeba. In our opinion this phenomenon is developed by *Legionella* issued from the protozoan in order to rapidly protect themselves from external conditions. Indeed, when we first tried to quantify the *L. pneumophila* using classical crystal violet staining (not shown), these assays always gave negative results whereas qPCR as well as microscopy demonstrated the presence of a biofilm. We thus hypothesized that the polysaccharides in which the *Legionella* were embedded could trap the crystal violet which was not able to stain the bacterial cells. Structure of the exo-polysaccharide has to be characterized. However, because it was recognized by concanavalin A (Neu et al., 2002; Ibey et al., 2005) and Alcian Blue (Scott, 1996; Mead and Yutzey, 2009) it could be hypothesized that it is partly constituted of glucose and/or mannose residues.

To confirm the major importance of the *Legionella* exo-polysaccharide in the biofilm development it could be proposed to characterize it and after to search genes encoding potential glycosyl transferases which are involved in the production of such polymers by screening the genome of *L. pneumophila*. Moreover, it is important to isolate and characterize the causative agent of chemotaxis to study its role in the different stages of biofilm development and its hypothetical roles in intracellular replication stages or in virulence capacity.

To conclude, we have developed a biofilm model near to the water distribution system using Amoeba Grown *Legionella* which have higher ability to colonize or to develop biofilm in particular via exopolysaccharide secretion. We propose to encourage the use of this model

to test or develop disinfection process rather than conventional models using *Legionella* derived from culture medium.

References

1. Steinert M, Hentschel U, Hacker J (2002) Legionella pneumophila: an aquatic microbe goes astray. FEMS Microbiol Rev 26: 149-162.
2. Asare R, Abu Kwaik Y (2007) Early trafficking and intracellular replication of Legionella longbeachaea within an ER-derived late endosome-like phagosome. Cell Microbiol 9: 1571-1587.
3. Cazalet C, Gomez-Valero L, Rusniok C, Lomma M, Dervins-Ravault D, et al. (2010) Analysis of the Legionella longbeachae genome and transcriptome uncovers unique strategies to cause Legionnaires' disease. PLoS Genet 6: e1000851.
4. Atlas RM (1999) Legionella: from environmental habitats to disease pathology, detection and control. Environ Microbiol 1: 283-293.
5. Bhopal RS (1991) Surveillance of disease and information on laboratory request forms: the example of Legionnaires' disease. J Infect 22: 97-98.
6. Bollin GE, Plouffe JF, Para MF, Hackman B (1985) Aerosols containing Legionella pneumophila generated by shower heads and hot-water faucets. Appl Environ Microbiol 50: 1128-1131.
7. Bollin GE, Plouffe JF, Para MF, Prior RB (1985) Difference in virulence of environmental isolates of Legionella pneumophila. J Clin Microbiol 21: 674-677.
8. Ewann F, Hoffman PS (2006) Cysteine metabolism in Legionella pneumophila: characterization of an L-cystine-utilizing mutant. Appl Environ Microbiol 72: 3993-4000.
9. Kim BR, Anderson JE, Mueller SA, Gaines WA, Kendall AM (2002) Literature review--efficacy of various disinfectants against Legionella in water systems. Water Res 36: 4433-4444.
10. Koubar M, Rodier MH, Garduno RA, Frere J (2011) Passage through Tetrahymena tropicalis enhances the resistance to stress and the infectivity of Legionella pneumophila. FEMS Microbiol Lett 325: 10-15.
11. Thomas V, Bouchez T, Nicolas V, Robert S, Loret JF, et al. (2004) Amoebae in domestic water systems: resistance to disinfection treatments and implication in Legionella persistence. J Appl Microbiol 97: 950-963.
12. Declerck P, Behets J, van Hoef V, Ollevier F (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.
13. Declerck P, Behets J, van Hoef V, Ollevier F (2007) Replication of Legionella pneumophila in floating biofilms. Curr Microbiol 55: 435-440.

14. Murga R, Forster TS, Brown E, Pruckler JM, Fields BS, et al. (2001) Role of biofilms in the survival of Legionella pneumophila in a model potable-water system. Microbiology 147: 3121-3126.
15. Rogers J, Keevil CW (1992) Immunogold and fluorescein immunolabelling of Legionella pneumophila within an aquatic biofilm visualized by using episcopic differential interference contrast microscopy. Appl Environ Microbiol 58: 2326-2330.
16. Temmerman R, Vervaeren H, Noseda B, Boon N, Verstraete W (2006) Necrotrophic growth of Legionella pneumophila. Appl Environ Microbiol 72: 4323-4328.
17. Piao Z, Sze CC, Barysheva O, Iida K, Yoshida S (2006) Temperature-regulated formation of mycelial mat-like biofilms by Legionella pneumophila. Appl Environ Microbiol 72: 1613-1622.
18. Vervaeren H, Temmerman R, Devos L, Boon N, Verstraete W (2006) Introduction of a boost of Legionella pneumophila into a stagnant-water model by heat treatment. FEMS Microbiol Ecol 58: 583-592.
19. Huws SA, McBain AJ, Gilbert P (2005) Protozoan grazing and its impact upon population dynamics in biofilm communities. J Appl Microbiol 98: 238-244.
20. Hagele S, Kohler R, Merkert H, Schleicher M, Hacker J, et al. (2000) Dictyostelium discoideum: a new host model system for intracellular pathogens of the genus Legionella. Cell Microbiol 2: 165-171.
21. Kikuhara H, Ogawa M, Miyamoto H, Nikaido Y, Yoshida S (1994) Intracellular multiplication of Legionella pneumophila in Tetrahymena thermophila. J UOEH 16: 263-275.
22. Rowbotham TJ (1980) Preliminary report on the pathogenicity of Legionella pneumophila for freshwater and soil amoebae. J Clin Pathol 33: 1179-1183.
23. Kuiper MW, Wullings BA, Akkermans AD, Beumer RR, van der Kooij D (2004) Intracellular proliferation of Legionella pneumophila in Hartmannella vermiformis in aquatic biofilms grown on plasticized polyvinyl chloride. Appl Environ Microbiol 70: 6826-6833.
24. Declerck P, Behets J, De Keersmaecker B, Ollevier F (2007) Receptor-mediated uptake of Legionella pneumophila by Acanthamoeba castellanii and Naegleria lovaniensis. J Appl Microbiol 103: 2697-2703.
25. Neumeister B, Reiff G, Faigle M, Dietz K, Northoff H, et al. (2000) Influence of Acanthamoeba castellanii on intracellular growth of different Legionella species in human monocytes. Appl Environ Microbiol 66: 914-919.
26. Hilbi H, Hoffmann C, Harrison CF (2011) Legionella spp. outdoors: colonization, communication and persistence. Environ Microbiol Rep 3: 286-296.
27. Dupuy M, Mazoua S, Berne F, Bodet C, Garrec N, et al. (2011) Efficiency of water disinfectants against Legionella pneumophila and Acanthamoeba. Water Res 45: 1087-1094.
28. Bellamy W, Takase M, Wakabayashi H, Kawase K, Tomita M (1992) Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. J Appl Bacteriol 73: 472-479.

29. Faulkner G, Berk SG, Garduno E, Ortiz-Jimenez MA, Garduno RA (2008) Passage through Tetrahymena tropicalis triggers a rapid morphological differentiation in Legionella pneumophila. J Bacteriol 190: 7728-7738.
30. Molofsky AB, Swanson MS (2004) Differentiate to thrive: lessons from the Legionella pneumophila life cycle. Mol Microbiol 53: 29-40.
31. Jonas D, Rosenbaum A, Weyrich S, Bhakdi S (1995) Enzyme-linked immunoassay for detection of PCR-amplified DNA of legionellae in bronchoalveolar fluid. J Clin Microbiol 33: 1247-1252.
32. Declerck P, Behets J, Delaedt Y, Margineanu A, Lammertyn E, et al. (2005) Impact of non-Legionella bacteria on the uptake and intracellular replication of Legionella pneumophila in Acanthamoeba castellanii and Naegleria lovaniensis. Microb Ecol 50: 536-549.
33. Mampel J, Spirig T, Weber SS, Haagensen JA, Molin S, et al. (2006) Planktonic replication is essential for biofilm formation by Legionella pneumophila in a complex medium under static and dynamic flow conditions. Appl Environ Microbiol 72: 2885-2895.
34. Stojek NM, Dutkiewicz J (2011) Co-existence of Legionella and other Gram-negative bacteria in potable water from various rural and urban sources. Ann Agric Environ Med 18: 330-334.
35. Koubar M, Rodier MH, Frere J (2013) Involvement of minerals in adherence of Legionella pneumophila to surfaces. Curr Microbiol 66: 437-442.
36. Byrne B, Swanson MS (1998) Expression of Legionella pneumophila virulence traits in response to growth conditions. Infect Immun 66: 3029-3034.
37. Pruckler JM, Benson RF, Moyenuddin M, Martin WT, Fields BS (1995) Association of flagellum expression and intracellular growth of Legionella pneumophila. Infect Immun 63: 4928-4932.
38. Spirig T, Tiaden A, Kiefer P, Buchrieser C, Vorholt JA, et al. (2008) The Legionella autoinducer synthase LqsA produces an alpha-hydroxyketone signaling molecule. J Biol Chem 283: 18113-18123.
39. Kessler A, Schell U, Sahr T, Tiaden A, Harrison C, et al. (2013) The Legionella pneumophila orphan sensor kinase LqsT regulates competence and pathogen-host interactions as a component of the LAI-1 circuit. Environ Microbiol 15: 646-662.
40. Tiaden A, Spirig T, Carranza P, Bruggemann H, Riedel K, et al. (2008) Synergistic contribution of the Legionella pneumophila lqs genes to pathogen-host interactions. J Bacteriol 190: 7532-7547.
41. Tiaden A, Spirig T, Sahr T, Walti MA, Boucke K, et al. (2010) The autoinducer synthase LqsA and putative sensor kinase LqsS regulate phagocyte interactions, extracellular filaments and a genomic island of Legionella pneumophila. Environ Microbiol 12: 1243-1259.
42. Tiaden A, Spirig T, Weber SS, Bruggemann H, Bosshard R, et al. (2007) The Legionella pneumophila response regulator LqsR promotes host cell interactions as an element of the virulence regulatory network controlled by RpoS and LetA. Cell Microbiol 9: 2903-2920.

43. Pecastaings S, Berge M, Dubourg KM, Roques C (2010) Sessile Legionella pneumophila is able to grow on surfaces and generate structured monospecies biofilms. Biofouling 26: 809-819.
44. Nadell CD, Bucci V, Drescher K, Levin SA, Bassler BL, et al. (2013) Cutting through the complexity of cell collectives. Proc Biol Sci 280: 20122770.
45. Besemer K, Singer G, Limberger R, Chlup AK, Hochedlinger G, et al. (2007) Biophysical controls on community succession in stream biofilms. Appl Environ Microbiol 73: 4966-4974.
46. Cheng KJ, Costerton JW (1986) Microbial adhesion and colonization within the digestive tract. Soc Appl Bacteriol Symp Ser 13: 239-261.
47. Ibey BL, Beier HT, Rounds RM, Cote GL, Yadavalli VK, et al. (2005) Competitive binding assay for glucose based on glycodendrimer-fluorophore conjugates. Anal Chem 77: 7039-7046.
48. Neu TR, Kuhlicke U, Lawrence JR (2002) Assessment of fluorochromes for two-photon laser scanning microscopy of biofilms. Appl Environ Microbiol 68: 901-909.
49. Mead TJ, Yutzey KE (2009) Notch pathway regulation of chondrocyte differentiation and proliferation during appendicular and axial skeleton development. Proc Natl Acad Sci U S A 106: 14420-14425.
50. Scott JE (1996) Alcian blue. Now you see it, now you don't. Eur J Oral Sci 104: 2-9.

Figure legends

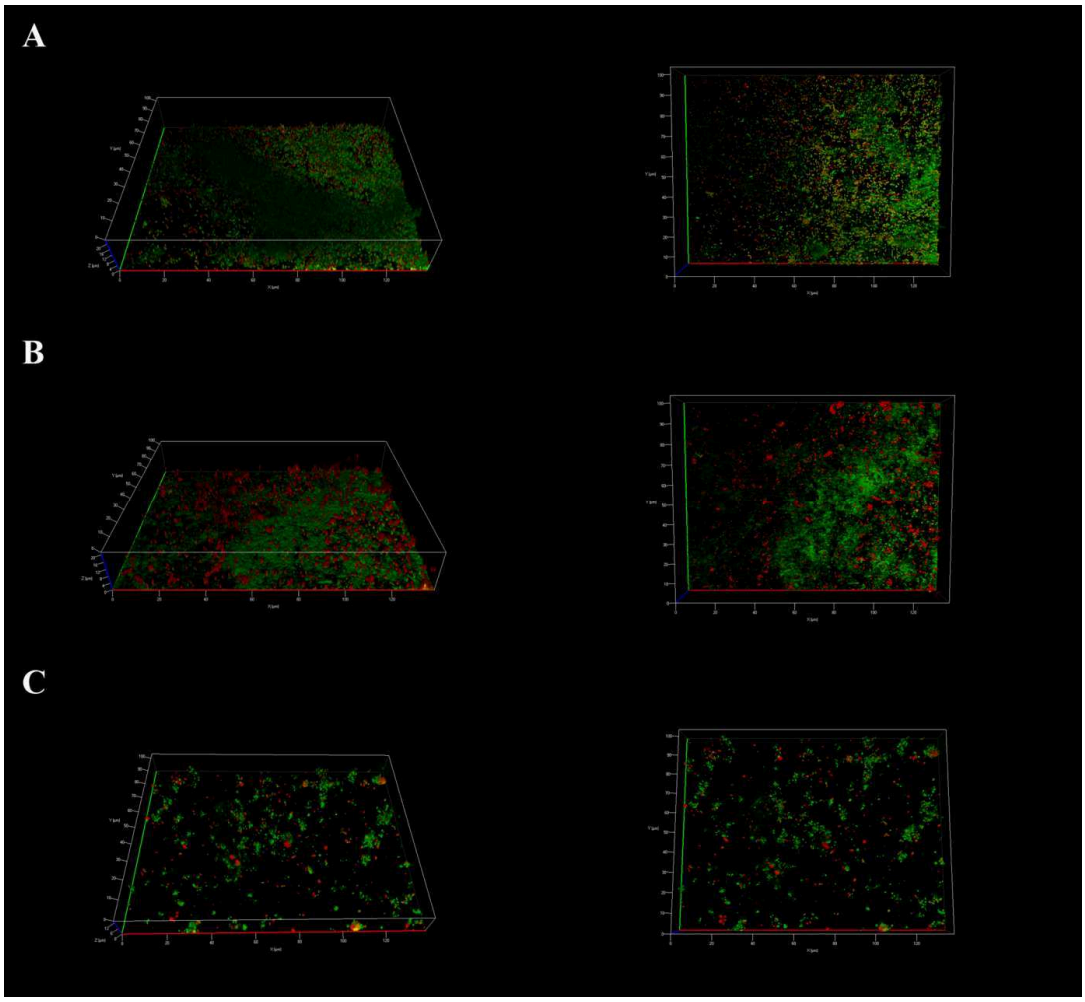


Figure 1: Apotome imaging, 7 days after establishment of *L. pneumophila* Lens A) MG, B) AG and C) CG, in biofilm pre-formed with four non-Legionella strains during 15 days from water networks. *L. pneumophila* expressing Ds-Red marker appears in red and non-*Legionella* bacteria, marked using Draq5 stain, in green. Pictures are representative of 3 independent experiments.

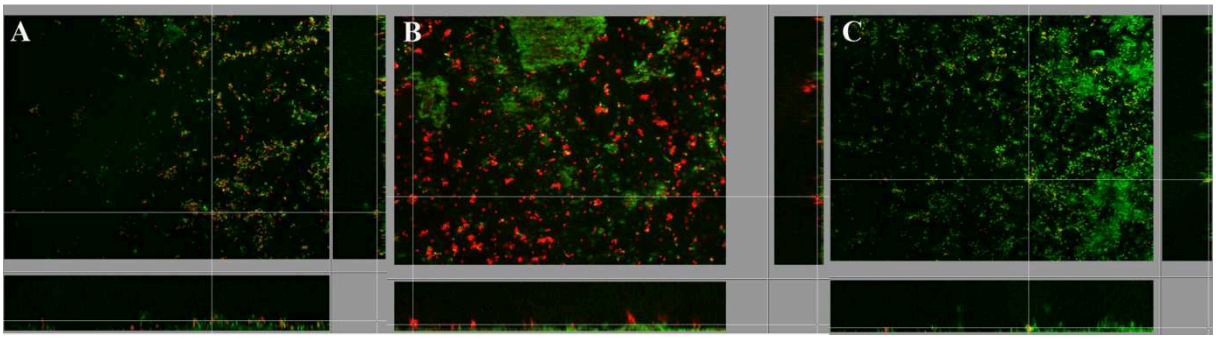


Figure 2: Orthogonal views of apotome imaging, 7 days after establishment of *L. pneumophila* Lens A) MG and B) AG, in biofilm pre-formed with four non-Legionella strains during 15 days from water networks. *L. pneumophila* expressing Ds-Red marker appears in red and non-*Legionella* bacteria, marked using Draq5 stain, in green.

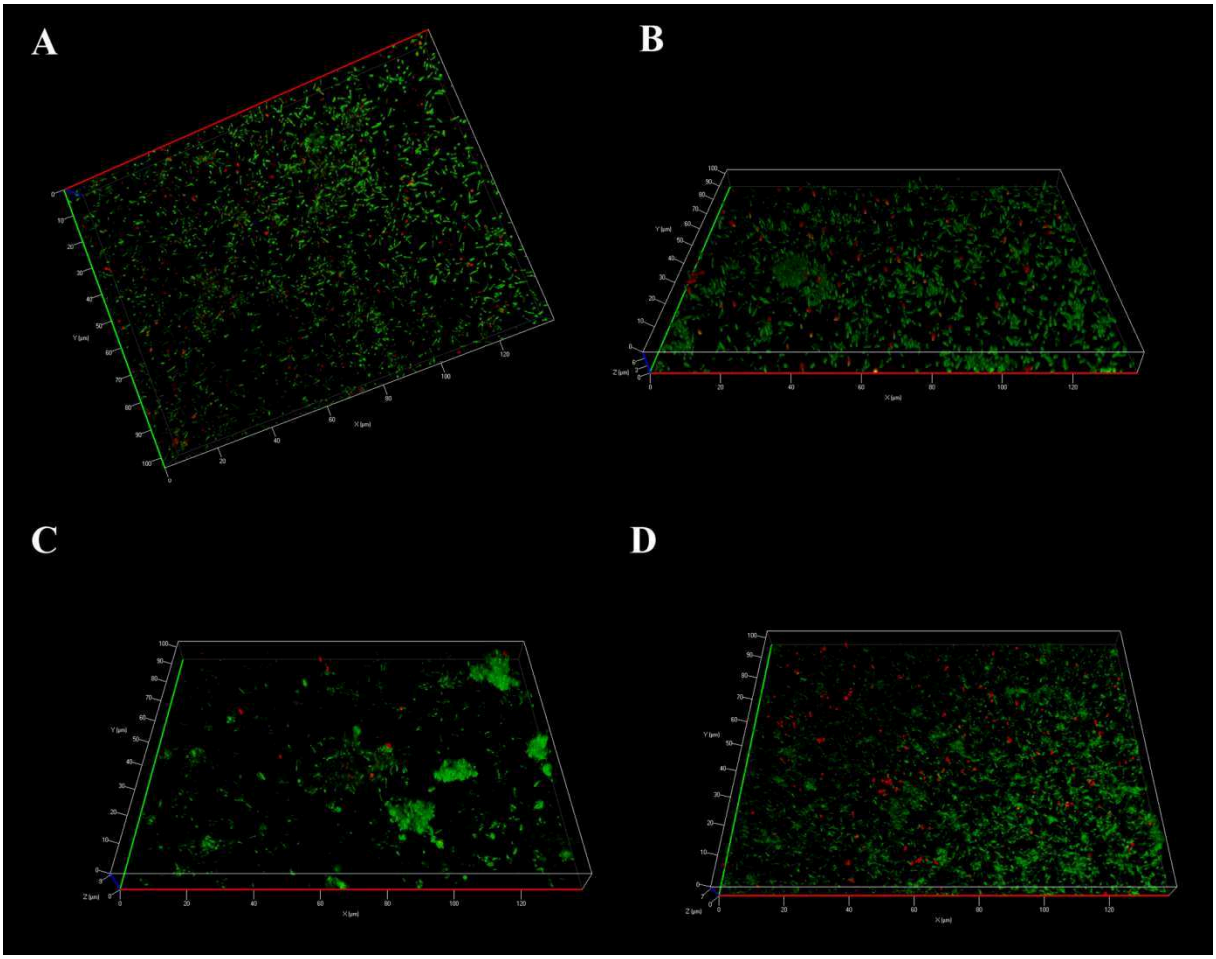


Figure 3: Apotome imaging, 7 days after establishment of *L. pneumophila* Lens MG, in biofilm pre-formed with each of the four non-Legionella strains during 15 days from water networks. Establishment in A) *Pseudomonas aeuginosa*, B) *Flavobacterium breve*, C) *Aeromonas hydrophila* and D) *Escherichia coli*. *L. pneumophila* expressing Ds-Red marker appears in red and non-*Legionella* bacteria, marked using Draq5 stain, in green.

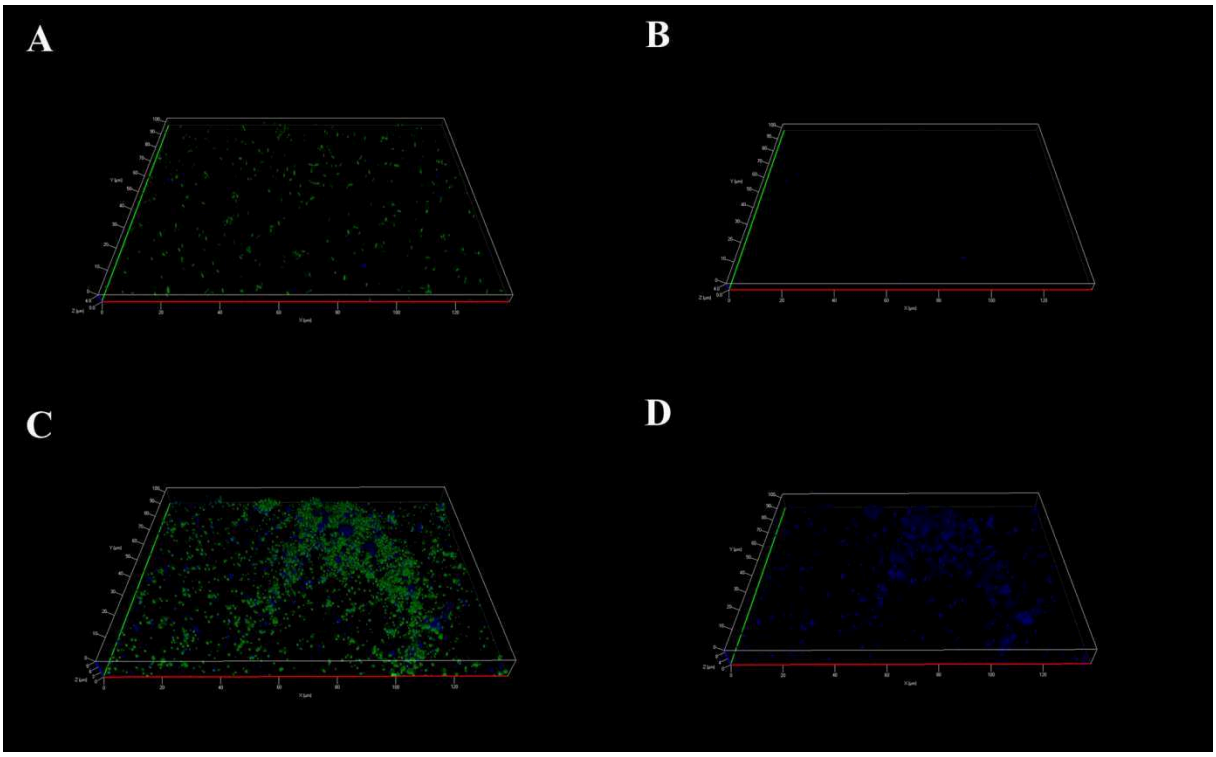


Figure 4: Apotome imaging after 7 days of biofilm development on a glass surface of *L. pneumophila* Lens A) MG C) AG and polysaccharides produced by B) MG and D) AG *L. pneumophila* Lens. *Legionella* are in green and polysaccharides in blue. Pictures are representative of 6 independent experiments.

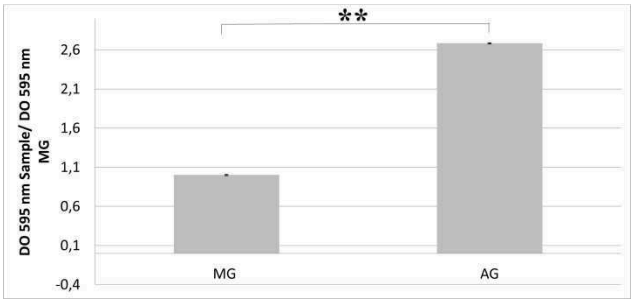


Figure 5: Alcian blue test results after 24 h incubation of 2.10^9 MG and AG *L. pneumophila* Lens in Evian mineral water. Error bars indicate standard deviation from six independent experiments. The p-value is less than 0,0001, this difference is considered to be extremely statistically significant.

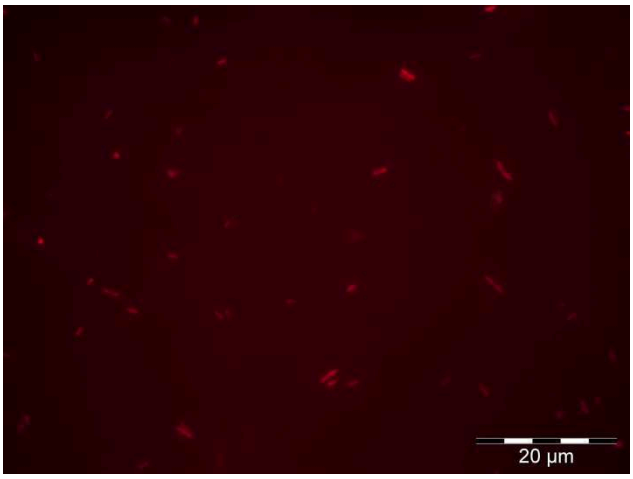


Figure 6: Epifluorescence microscopy observation of *L. pneumophila* Lens expressing ds-Red marker (in red) immediately after amoebae release. Picture is representative of 2 independent experiments.

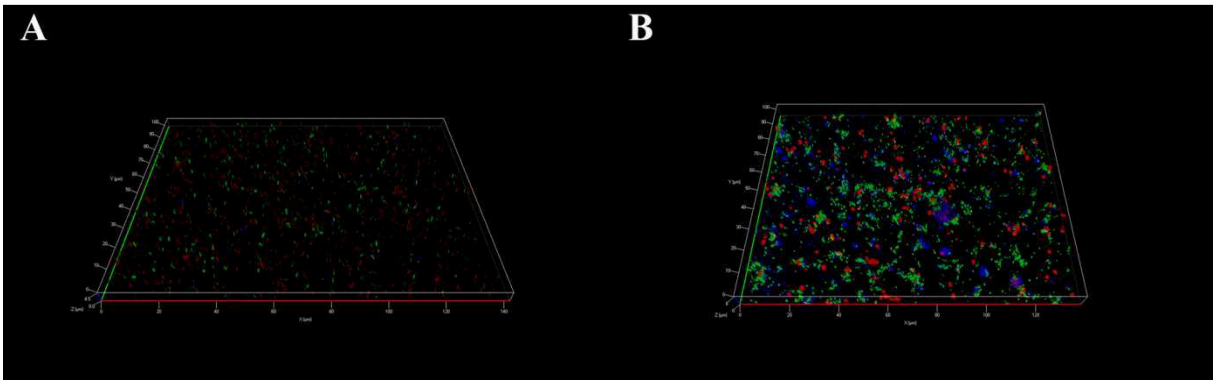


Figure 7: Apotome imaging after 7 days of biofilm development on a glass surface of a mixture of A) AG *L. pneumophila* Lens or B) MG *L. pneumophila* Lens expressing Ds-Red marker (in red) or GFP marker (in green) and polysaccharides (in blue). Pictures are representative of 3 independent experiments.

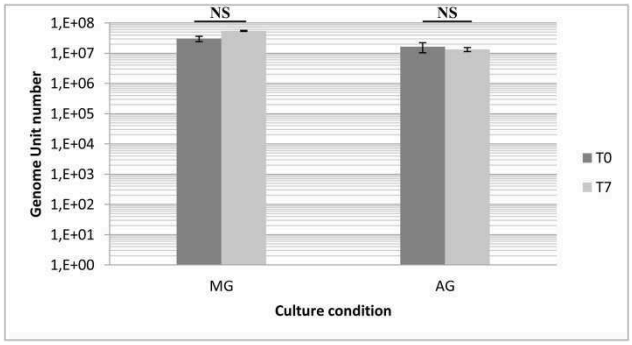


Figure 8: Results of qPCR amplification *mip* gene from MG and AG *L. pneumophila* Lens deposited on glass surface in Evian mineral water at T = 0 and T = 7 days. Error bars indicate standard deviation from three independent experiments. The p-value is equal to 0,5913 for AG *L. pneumophila* Lens and 0,2709 for MG *L. pneumophila* Lens. It is considered not to be statistically significant (NS).

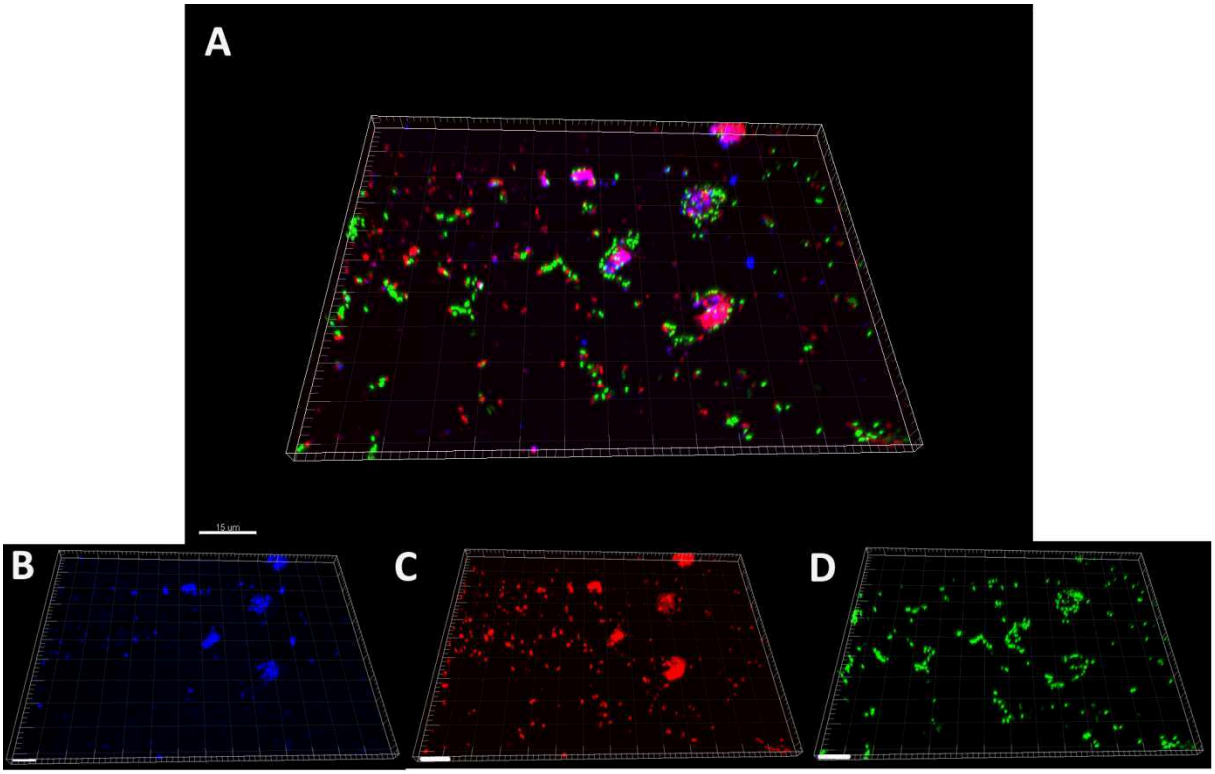


Figure 9: Apotome imaging after 7 days of biofilm development on a glass surface of a mixture of *L. pneumophila* lens AG expressing ds-Red marker (in red), and MG GFP marker (in green). Polysaccharides appear in blue. Pictures are representative of 3 independent experiments. Scale bar corresponds to 10µm.

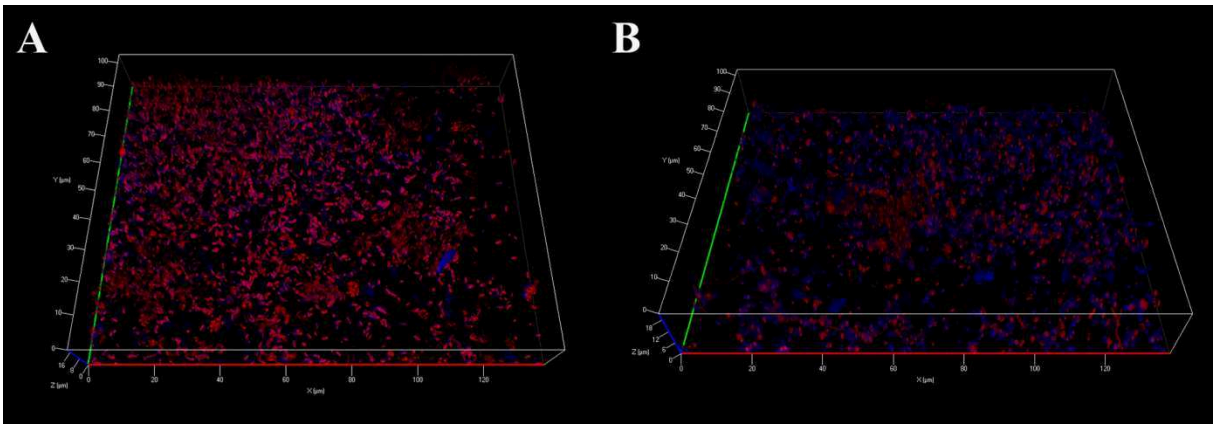


Figure 10: Apotome imaging after 7 days of biofilm development on a glass surface of a A) *L. pneumophila* Lens treated with supernatant of AG *L. pneumophila* Lens or B) with supernatant of AG *L. longbeachae*. Bacteria are in red and polysaccharides appear in blue. Pictures are representative of 3 independent experiments.

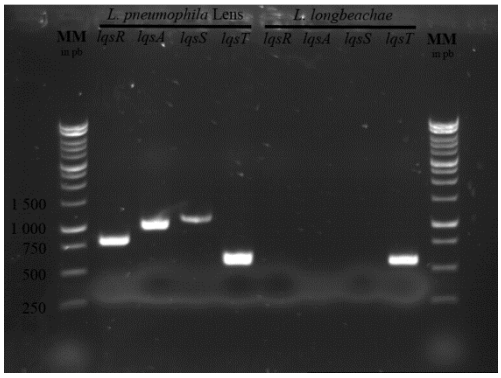


Figure 11: Picture of *lqs* PCR analysis electrophoresis gel of *L. pneumophila* Lens and L. *longbeachae*. Pictures are representative of 3 independent experiments.

Table 1: Sequence and name of primers used for tested presence or absence of *lqs* gene.

Name	Sequence
lqsA forward	AATCCTGGCAAGGGAAACAC
lqsA reverse	AACACGGCTCCAAAGATGTC
lqsR forward	CGTATTGCAGCTGGATGAGG
lqsR reverse	GGCAGGAACCAAACAATTCG
lqsS forward	CTGGTTGCCTCAGCCTTATG
lqsS reverse	AGCGTATTCGCCCTCTTTAG
lqsT forward	GATGCAAGCCACCAAATCAC
lqsT reverse	GCAAGCGGCGTTCTTAAATC

Références bibliographiques

Abu Kwaik, Y., Gao, L.Y., Stone, B.J., Venkataraman, C., and Harb, O.S. (1998) Invasion of protozoa by Legionella pneumophila and its role in bacterial ecology and pathogenesis. *Appl Environ Microbiol* **64**: 3127-3133.

Adeleke, A., Pruckler, J., Benson, R., Rowbotham, T., Halablab, M., and Fields, B. (1996) Legionella-like amebal pathogens--phylogenetic status and possible role in respiratory disease. *Emerg Infect Dis* **2**: 225-230.

Adeleke, A.A., Fields, B.S., Benson, R.F., Daneshvar, M.I., Pruckler, J.M., Ratcliff, R.M. et al. (2001) Legionella drozanskii sp. nov., Legionella rowbothamii sp. nov. and Legionella fallonii sp. nov.: three unusual new Legionella species. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**: 1151-1160.

Al-Khodor, S., Price, C.T., Habyarimana, F., Kalia, A., and Abu Kwaik, Y. (2008) A Dot/Icm-translocated ankyrin protein of Legionella pneumophila is required for intracellular proliferation within human macrophages and protozoa. *Mol Microbiol* **70**: 908-923.

Al-Quadan, T., Price, C.T., and Abu Kwaik, Y. (2012) Exploitation of evolutionarily conserved amoeba and mammalian processes by Legionella. *Trends Microbiol* **20**: 299-306.

Alli, O.A., Gao, L.Y., Pedersen, L.L., Zink, S., Radulic, M., Doric, M., and Abu Kwaik, Y. (2000) Temporal pore formation-mediated egress from macrophages and alveolar epithelial cells by Legionella pneumophila. *Infect Immun* **68**: 6431-6440.

Anthony, M., Rose, B., Pegler, M.B., Elkins, M., Service, H., Thamotharampillai, K. et al. (2002) Genetic analysis of Pseudomonas aeruginosa isolates from the sputa of Australian adult cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* **40**: 2772-2778.

Asare, R., and Abu Kwaik, Y. (2007) Early trafficking and intracellular replication of Legionella longbeachaea within an ER-derived late endosome-like phagosome. *Cell Microbiol* **9**: 1571-1587.

Atlas, R.M. (1999) Legionella: from environmental habitats to disease pathology, detection and control. *Environ Microbiol* **1**: 283-293.

Baillie, G.S., and Douglas, L.J. (1999) Role of dimorphism in the development of Candida albicans biofilms. *J Med Microbiol* **48**: 671-679.

Barker, J., and Brown, M.R. (1995) Speculations on the influence of infecting phenotype on virulence and antibiotic susceptibility of Legionella pneumophila. *J Antimicrob Chemother* **36**: 7-21.

Barker, J., Lambert, P.A., and Brown, M.R. (1993) Influence of intra-amoebic and other growth conditions on the surface properties of Legionella pneumophila. *Infect Immun* **61**: 3503-3510.

Barker, J., Scaife, H., and Brown, M.R. (1995) Intraphagocytic growth induces an antibiotic-resistant phenotype of Legionella pneumophila. *Antimicrob Agents Chemother* **39**: 2684-2688.

Barker, J., Brown, M.R., Collier, P.J., Farrell, I., and Gilbert, P. (1992) Relationship between Legionella pneumophila and Acanthamoeba polyphaga: physiological status and susceptibility to chemical inactivation. *Appl Environ Microbiol* **58**: 2420-2425.

Bauer, W.D., and Mathesius, U. (2004) Plant responses to bacterial quorum sensing signals. *Curr Opin Plant Biol* **7**: 429-433.

Beck von Bodman, S., and Farrand, S.K. (1995) Capsular polysaccharide biosynthesis and pathogenicity in Erwinia stewartii require induction by an N-acylhomoserine lactone autoinducer. *J Bacteriol* **177**: 5000-5008.

Bellamy, W., Takase, M., Wakabayashi, H., Kawase, K., and Tomita, M. (1992) Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *J Appl Bacteriol* **73**: 472-479.

Benson, R.F., and Fields, B.S. (1998) Classification of the genus Legionella. *Semin Respir Infect* **13**: 90-99.

Berk, S.G., Ting, R.S., Turner, G.W., and Ashburn, R.J. (1998) Production of respirable vesicles containing live Legionella pneumophila cells by two Acanthamoeba spp. *Appl Environ Microbiol* **64**: 279-286.

Besemer, K., Singer, G., Limberger, R., Chlup, A.K., Hochedlinger, G., Hodl, I. et al. (2007) Biophysical controls on community succession in stream biofilms. *Appl Environ Microbiol* **73**: 4966-4974.

Bhopal, R.S. (1991) Surveillance of disease and information on laboratory request forms: the example of Legionnaires' disease. *J Infect* **22**: 97-98.

Bitar, D.M., Molmeret, M., and Abu Kwaik, Y. (2004) Molecular and cell biology of Legionella pneumophila. *Int J Med Microbiol* **293**: 519-527.

Bollin, G.E., Plouffe, J.F., Para, M.F., and Prior, R.B. (1985a) Difference in virulence of environmental isolates of Legionella pneumophila. *J Clin Microbiol* **21**: 674-677.

Bollin, G.E., Plouffe, J.F., Para, M.F., and Hackman, B. (1985b) Aerosols containing Legionella pneumophila generated by shower heads and hot-water faucets. *Appl Environ Microbiol* **50**: 1128-1131.

Boyd, C.D., and O'Toole, G.A. (2012) Second messenger regulation of biofilm formation: breakthroughs in understanding c-di-GMP effector systems. *Annu Rev Cell Dev Biol* **28**: 439-462.

Branda, S.S., Vik, S., Friedman, L., and Kolter, R. (2005) Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol* **13**: 20-26.

Breiman, R.F., Fields, B.S., Sanden, G.N., Volmer, L., Meier, A., and Spika, J.S. (1990) Association of shower use with Legionnaires' disease. Possible role of amoebae. *JAMA* **263**: 2924-2926.

Brown, M.R., and Barker, J. (1999) Unexplored reservoirs of pathogenic bacteria: protozoa and biofilms. *Trends Microbiol* **7**: 46-50.

Bruggemann, H., Cazalet, C., and Buchrieser, C. (2006a) Adaptation of Legionella pneumophila to the host environment: role of protein secretion, effectors and eukaryotic-like proteins. *Curr Opin Microbiol* **9**: 86-94.

Bruggemann, H., Hagman, A., Jules, M., Sismeiro, O., Dillies, M.A., Gouyette, C. et al. (2006b) Virulence strategies for infecting phagocytes deduced from the in vivo transcriptional program of Legionella pneumophila. *Cell Microbiol* **8**: 1228-1240.

Byrne, B., and Swanson, M.S. (1998) Expression of Legionella pneumophila virulence traits in response to growth conditions. *Infect Immun* **66**: 3029-3034.

Campocasso, A., Boughalmi, M., Fournous, G., Raoult, D., and La Scola, B. (2012) Legionella tunisiensis sp. nov. and Legionella massiliensis sp. nov., isolated from environmental water samples. *Int J Syst Evol Microbiol* **62**: 3003-3006.

Carlson, H.K., Vance, R.E., and Marletta, M.A. (2010) H-NOX regulation of c-di-GMP metabolism and biofilm formation in Legionella pneumophila. *Mol Microbiol*.

Case, R.J., Labbate, M., and Kjelleberg, S. (2008) AHL-driven quorum-sensing circuits: their frequency and function among the Proteobacteria. *ISME J* **2**: 345-349.

Cazalet, C., Rusniok, C., Bruggemann, H., Zidane, N., Magnier, A., Ma, L. et al. (2004) Evidence in the Legionella pneumophila genome for exploitation of host cell functions and high genome plasticity. *Nat Genet* **36**: 1165-1173.

Cazalet, C., Gomez-Valero, L., Rusniok, C., Lomma, M., Dervins-Ravault, D., Newton, H.J. et al. (2010) Analysis of the Legionella longbeachae genome and transcriptome uncovers unique strategies to cause Legionnaires' disease. *PLoS Genet* **6**: e1000851.

Cheng, K.J., and Costerton, J.W. (1986) Microbial adhesion and colonization within the digestive tract. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser* **13**: 239-261.

Chien, M., Morozova, I., Shi, S., Sheng, H., Chen, J., Gomez, S.M. et al. (2004) The genomic sequence of the accidental pathogen Legionella pneumophila. *Science* **305**: 1966-1968.

Choudhary, S., and Schmidt-Dannert, C. (2010) Applications of quorum sensing in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol* **86**: 1267-1279.

Cianciotto, N.P. (2001) Pathogenicity of Legionella pneumophila. *Int J Med Microbiol* **291**: 331-343.

Cirillo, J.D., Falkow, S., and Tompkins, L.S. (1994) Growth of Legionella pneumophila in Acanthamoeba castellanii enhances invasion. *Infect Immun* **62**: 3254-3261.

Cirillo, J.D., Cirillo, S.L., Yan, L., Bermudez, L.E., Falkow, S., and Tompkins, L.S. (1999) Intracellular growth in Acanthamoeba castellanii affects monocyte entry mechanisms and enhances virulence of Legionella pneumophila. *Infect Immun* **67**: 4427-4434.

Clarke, M.B., and Sperandio, V. (2005a) Transcriptional autoregulation by quorum sensing Escherichia coli regulators B and C (QseBC) in enterohaemorrhagic E. coli (EHEC). *Mol Microbiol* **58**: 441-455.

Clarke, M.B., and Sperandio, V. (2005b) Events at the host-microbial interface of the gastrointestinal tract III. Cell-to-cell signaling among microbial flora, host, and pathogens: there is a whole lot of talking going on. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **288**: G1105-1109.

Clarke, M.B., and Sperandio, V. (2005c) Transcriptional regulation of flhDC by QseBC and sigma (FliA) in enterohaemorrhagic Escherichia coli. *Mol Microbiol* **57**: 1734-1749.

Clarke, M.B., Hughes, D.T., Zhu, C., Boedeker, E.C., and Sperandio, V. (2006) The QseC sensor kinase: a bacterial adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 10420-10425.

Cooley, M., Chhabra, S.R., and Williams, P. (2008) N-Acylhomoserine lactone-mediated quorum sensing: a twist in the tail and a blow for host immunity. *Chem Biol* **15**: 1141-1147.

Costerton, J.W., Geesey, G.G., and Cheng, K.J. (1978) How bacteria stick. *Sci Am* **238**: 86-95.

Curreri, A.R., and Ansfield, F.J. (1958) Chemotherapy in solid tumors. *Wis Med J* **57**: 365-371.

Curreri, A.R., Ansfield, F.J., Mc, I.F., Waisman, H.A., and Heidelberger, C. (1958) Clinical studies with 5-fluorouracil. *Cancer Res* **18**: 478-484.

De Buck, E., Maes, L., Meyen, E., Van Mellaert, L., Geukens, N., Anne, J., and Lammertyn, E. (2005) Legionella pneumophila Philadelphia-1 tatB and tatC affect intracellular replication and biofilm formation. *Biochem Biophys Res Commun* **331**: 1413-1420.

Declerck, P., Behets, J., van Hoef, V., and Ollevier, F. (2007a) Replication of Legionella pneumophila in floating biofilms. *Curr Microbiol* **55**: 435-440.

Declerck, P., Behets, J., van Hoef, V., and Ollevier, F. (2007b) Detection of Legionella spp. and some of their amoeba hosts in floating biofilms from anthropogenic and natural aquatic environments. *Water Res* **41**: 3159-3167.

Declerck, P., Behets, J., De Keersmaecker, B., and Ollevier, F. (2007c) Receptor-mediated uptake of Legionella pneumophila by Acanthamoeba castellanii and Naegleria lovaniensis. *J Appl Microbiol* **103**: 2697-2703.

Declerck, P., Behets, J., Delaedt, Y., Margineanu, A., Lammertyn, E., and Ollevier, F. (2005) Impact of non-Legionella bacteria on the uptake and intracellular replication of Legionella pneumophila in Acanthamoeba castellanii and Naegleria lovaniensis. *Microb Ecol* **50**: 536-549.

Dennis, P.J., Wright, A.E., Rutter, D.A., Death, J.E., and Jones, B.P. (1984) Legionella pneumophila in aerosols from shower baths. *J Hyg (Lond)* **93**: 349-353.

Diederen, B.M. (2008) Legionella spp. and Legionnaires' disease. *J Infect* **56**: 1-12.

Dobrindt, U., Hochhut, B., Hentschel, U., and Hacker, J. (2004) Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat Rev Microbiol* **2**: 414-424.

Dolnick, B.J. (1993) Cloning and characterization of a naturally occurring antisense RNA to human thymidylate synthase mRNA. *Nucleic Acids Res* **21**: 1747-1752.

Dolnick, B.J. (2005) The rTS signaling pathway as a target for drug development. *Clin Colorectal Cancer* **5**: 57-60.

Dolnick, B.J., and Wu, X.P. (1993) Effects of 5-fluorouracil on mRNA. *Adv Exp Med Biol* **339**: 57-63; discussion 65.

Dolnick, B.J., and Black, A.R. (1996) Alternate splicing of the rTS gene product and its overexpression in a 5-fluorouracil-resistant cell line. *Cancer Res* **56**: 3207-3210.

Dolnick, B.J., Black, A.R., Winkler, P.M., Schindler, K., and Hsueh, C.T. (1996) rTS gene expression is associated with altered cell sensitivity to thymidylate synthase inhibitors. *Adv Enzyme Regul* **36**: 165-180.

Dolnick, R., Wu, Q., Angelino, N.J., Stephanie, L.V., Chow, K.C., Sufrin, J.R., and Dolnick, B.J. (2005) Enhancement of 5-fluorouracil sensitivity by an rTS signaling mimic in H630 colon cancer cells. *Cancer Res* **65**: 5917-5924.

Dols-Lafargue, M., Willemot, R.M., Monsan, P.F., and Remaud-Simeon, M. (2001a) Factors affecting alpha,-1,2 glucooligosaccharide synthesis by Leuconostoc mesenteroides NRRL B-1299 dextransucrase. *Biotechnol Bioeng* **74**: 498-504.

Dols-Lafargue, M., Willemot, R.M., Monsan, P.F., and Remaud-Simeon, M. (2001b) Reactor optimization for alpha-1,2 glucooligosaccharide synthesis by immobilized dextransucrase. *Biotechnol Bioeng* **75**: 276-284.

Donlan, R.M. (2002) Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* **8**: 881-890.

Donlan, R.M., and Costerton, J.W. (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* **15**: 167-193.

Dorer, M.S., Kirton, D., Bader, J.S., and Isberg, R.R. (2006) RNA interference analysis of Legionella in Drosophila cells: exploitation of early secretory apparatus dynamics. *PLoS Pathog* **2**: e34.

Duncan, C., Prashar, A., So, J., Tang, P., Low, D.E., Terebiznik, M., and Guyard, C. (2011) Lcl of Legionella pneumophila is an immunogenic GAG binding adhesin that promotes interactions with lung epithelial cells and plays a crucial role in biofilm formation. *Infect Immun* **79**: 2168-2181.

Dupuy, M., Mazoua, S., Berne, F., Bodet, C., Garrec, N., Herbelin, P. et al. (2011) Efficiency of water disinfectants against Legionella pneumophila and Acanthamoeba. *Water Res* **45**: 1087-1094.

Edelstein, P.H. (1981) Improved semiselective medium for isolation of Legionella pneumophila from contaminated clinical and environmental specimens. *J Clin Microbiol* **14**: 298-303.

Edelstein, P.H. (1982) Comparative study of selective media for isolation of Legionella pneumophila from potable water. *J Clin Microbiol* **16**: 697-699.

Engebrecht, J., and Silverman, M. (1984) Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 4154-4158.

Engebrecht, J., Nealson, K., and Silverman, M. (1983) Bacterial bioluminescence: isolation and genetic analysis of functions from Vibrio fischeri. *Cell* **32**: 773-781.

Engebrecht, J., Simon, M., and Silverman, M. (1985) Measuring gene expression with light. *Science* **227**: 1345-1347.

Ewann, F., and Hoffman, P.S. (2006) Cysteine metabolism in Legionella pneumophila: characterization of an L-cystine-utilizing mutant. *Appl Environ Microbiol* **72**: 3993-4000.

Faucher, S.P., Mueller, C.A., and Shuman, H.A. (2011) Legionella Pneumophila Transcriptome during Intracellular Multiplication in Human Macrophages. *Front Microbiol* **2**: 60.

Faulkner, G., Berk, S.G., Garduno, E., Ortiz-Jimenez, M.A., and Garduno, R.A. (2008) Passage through Tetrahymena tropicalis triggers a rapid morphological differentiation in Legionella pneumophila. *J Bacteriol* **190**: 7728-7738.

Feeley, J.C., Gibson, R.J., Gorman, G.W., Langford, N.C., Rasheed, J.K., Mackel, D.C., and Baine, W.B. (1979) Charcoal-yeast extract agar: primary isolation medium for Legionella pneumophila. *J Clin Microbiol* **10**: 437-441.

Ferhat, M., Atlan, D., Vianney, A., Lazzaroni, J.C., Doublet, P., and Gilbert, C. (2009) The TolC protein of Legionella pneumophila plays a major role in multi-drug resistance and the early steps of host invasion. *PLoS One* **4**: e7732.

Fields, B.S., Benson, R.F., and Besser, R.E. (2002) Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin Microbiol Rev* **15**: 506-526.

Fields, B.S., Barbaree, J.M., Sanden, G.N., and Morrill, W.E. (1990) Virulence of a Legionella anisa strain associated with Pontiac fever: an evaluation using protozoan, cell culture, and guinea pig models. *Infect Immun* **58**: 3139-3142.

Fields, B.S., Fields, S.R., Loy, J.N., White, E.H., Steffens, W.L., and Shotts, E.B. (1993) Attachment and entry of Legionella pneumophila in Hartmannella vermiformis. *J Infect Dis* **167**: 1146-1150.

Fliermans, C.B., Cherry, W.B., Orrison, L.H., Smith, S.J., Tison, D.L., and Pope, D.H. (1981) Ecological distribution of Legionella pneumophila. *Appl Environ Microbiol* **41**: 9-16.

Fox, J.E. (2004) Chemical communication threatened by endocrine-disrupting chemicals. *Environ Health Perspect* **112**: 648-653.

Fraser, D.W., Tsai, T.R., Orenstein, W., Parkin, W.E., Beecham, H.J., Sharrar, R.G. et al. (1977) Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. *N Engl J Med* **297**: 1189-1197.

Fujiya, M., Musch, M.W., Nakagawa, Y., Hu, S., Alverdy, J., Kohgo, Y. et al. (2007) The Bacillus subtilis quorum-sensing molecule CSF contributes to intestinal homeostasis via OCTN2, a host cell membrane transporter. *Cell Host Microbe* **1**: 299-308.

Fuqua, C., Parsek, M.R., and Greenberg, E.P. (2001) Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annu Rev Genet* **35**: 439-468.

Fuqua, W.C., and Winans, S.C. (1994) A LuxR-LuxI type regulatory system activates Agrobacterium Ti plasmid conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite. *J Bacteriol* **176**: 2796-2806.

Gao, L.Y., and Abu Kwaik, Y. (1999a) Activation of caspase 3 during Legionella pneumophila-induced apoptosis. *Infect Immun* **67**: 4886-4894.

Gao, L.Y., and Abu Kwaik, Y. (1999b) Apoptosis in macrophages and alveolar epithelial cells during early stages of infection by Legionella pneumophila and its role in cytopathogenicity. *Infect Immun* **67**: 862-870.

Gao, L.Y., Susa, M., Ticac, B., and Abu Kwaik, Y. (1999) Heterogeneity in intracellular replication and cytopathogenicity of Legionella pneumophila and Legionella micdadei in mammalian and protozoan cells. *Microb Pathog* **27**: 273-287.

Garcia, M.T., Jones, S., Pelaz, C., Millar, R.D., and Abu Kwaik, Y. (2007) Acanthamoeba polyphaga resuscitates viable non-culturable Legionella pneumophila after disinfection. *Environ Microbiol* **9**: 1267-1277.

Garrity, G.M., Elder, E.M., Davis, B., Vickers, R.M., and Brown, A. (1982) Serological and genotypic diversity among serogroup 5- reacting environmental Legionella isolates. *J Clin Microbiol* **15**: 646-653.

George, J.R., Pine, L., Reeves, M.W., and Harrell, W.K. (1980) Amino acid requirements of Legionella pneumophila. *J Clin Microbiol* **11**: 286-291.

Giao, M.S., Azevedo, N.F., Wilks, S.A., Vieira, M.J., and Keevil, C.W. (2011) Interaction of Legionella pneumophila and Helicobacter pylori with bacterial species isolated from drinking water biofilms. *BMC Microbiol* **11**: 57.

Giltner, C.L., van Schaik, E.J., Audette, G.F., Kao, D., Hodges, R.S., Hassett, D.J., and Irvin, R.T. (2006) The Pseudomonas aeruginosa type IV pilin receptor binding domain functions as an adhesin for both biotic and abiotic surfaces. *Mol Microbiol* **59**: 1083-1096.

Glick, T.H., Gregg, M.B., Berman, B., Mallison, G., Rhodes, W.W., Jr., and Kassanoff, I. (1978) Pontiac fever. An epidemic of unknown etiology in a health department: I. Clinical and epidemiologic aspects. *Am J Epidemiol* **107**: 149-160.

Glockner, G., Albert-Weissenberger, C., Weinmann, E., Jacobi, S., Schunder, E., Steinert, M. et al. (2008) Identification and characterization of a new conjugation/type IVA secretion system (trb/tra) of

Legionella pneumophila Corby localized on two mobile genomic islands. *Int J Med Microbiol* **298**: 411-428.

Gonzalez, J.E., and Marketon, M.M. (2003) Quorum sensing in nitrogen-fixing rhizobia. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**: 574-592.

Gonzalez, J.M., Sherr, E.B., and Sherr, B.F. (1990) Size-selective grazing on bacteria by natural assemblages of estuarine flagellates and ciliates. *Appl Environ Microbiol* **56**: 583-589.

Gould, T.A., Schweizer, H.P., and Churchill, M.E. (2004a) Structure of the Pseudomonas aeruginosa acyl-homoserinelactone synthase LasI. *Mol Microbiol* **53**: 1135-1146.

Gould, T.A., Watson, W.T., Choi, K.H., Schweizer, H.P., and Churchill, M.E. (2004b) Crystallization of Pseudomonas aeruginosa AHL synthase LasI using beta-turn crystal engineering. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**: 518-520.

Greub, G., and Raoult, D. (2004) Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin Microbiol Rev* **17**: 413-433.

Greub, G., La Scola, B., and Raoult, D. (2004) Amoebae-resisting bacteria isolated from human nasal swabs by amoebal coculture. *Emerg Infect Dis* **10**: 470-477.

Guerrieri, E., Bondi, M., Sabia, C., de Niederhausern, S., Borella, P., and Messi, P. (2008) Effect of bacterial interference on biofilm development by Legionella pneumophila. *Curr Microbiol* **57**: 532-536.

Hagele, S., Kohler, R., Merkert, H., Schleicher, M., Hacker, J., and Steinert, M. (2000) Dictyostelium discoideum: a new host model system for intracellular pathogens of the genus Legionella. *Cell Microbiol* **2**: 165-171.

Hammer, B.K., and Bassler, B.L. (2009) Distinct sensory pathways in Vibrio cholerae El Tor and classical biotypes modulate cyclic dimeric GMP levels to control biofilm formation. *J Bacteriol* **191**: 169-177.

Harada, E., Iida, K., Shiota, S., Nakayama, H., and Yoshida, S. (2010) Glucose metabolism in Legionella pneumophila: dependence on the Entner-Doudoroff pathway and connection with intracellular bacterial growth. *J Bacteriol* **192**: 2892-2899.

Hardie, K.R., and Heurlier, K. (2008) Establishing bacterial communities by 'word of mouth': LuxS and autoinducer 2 in biofilm development. *Nat Rev Microbiol* **6**: 635-643.

Havarstein, L.S., Coomaraswamy, G., and Morrison, D.A. (1995) An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in Streptococcus pneumoniae. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 11140-11144.

Helbig, J.H., Benson, R.F., Pelaz, C., Jacobs, E., and Luck, P.C. (2007) Identification and serotyping of atypical Legionella pneumophila strains isolated from human and environmental sources. *J Appl Microbiol* **102**: 100-105.

Henke, J.M., and Bassler, B.L. (2004a) Three parallel quorum-sensing systems regulate gene expression in Vibrio harveyi. *J Bacteriol* **186**: 6902-6914.

Henke, J.M., and Bassler, B.L. (2004b) Quorum sensing regulates type III secretion in Vibrio harveyi and Vibrio parahaemolyticus. *J Bacteriol* **186**: 3794-3805.

Higgins, D.A., Pomianek, M.E., Kraml, C.M., Taylor, R.K., Semmelhack, M.F., and Bassler, B.L. (2007) The major Vibrio cholerae autoinducer and its role in virulence factor production. *Nature* **450**: 883-886.

Hilbi, H., Hoffmann, C., and Harrison, C.F. (2011) Legionella spp. outdoors: colonization, communication and persistence. *Environ Microbiol Rep* **3**: 286-296.

Hindre, T., Bruggemann, H., Buchrieser, C., and Hechard, Y. (2008) Transcriptional profiling of Legionella pneumophila biofilm cells and the influence of iron on biofilm formation. *Microbiology* **154**: 30-41.

Hoch, J., Silhavy, TJ (1995) Two-Component Signal Transduction. *ASM Press, Washington, DC*.

Hoffmann, R., and Michel, R. (2001) Distribution of free-living amoebae (FLA) during preparation and supply of drinking water. *Int J Hyg Environ Health* **203**: 215-219.

Hong, H.A., Duc le, H., and Cutting, S.M. (2005) The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiol Rev* **29**: 813-835.

Hooi, D.S., Bycroft, B.W., Chhabra, S.R., Williams, P., and Pritchard, D.I. (2004) Differential immune modulatory activity of Pseudomonas aeruginosa quorum-sensing signal molecules. *Infect Immun* **72**: 6463-6470.

Hooper, L.V., and Gordon, J.I. (2001) Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science* **292**: 1115-1118.

Horn, M., Wagner, M., Muller, K.D., Schmid, E.N., Fritsche, T.R., Schleifer, K.H., and Michel, R. (2000) Neochlamydia hartmannellae gen. nov., sp. nov. (Parachlamydiaceae), an endoparasite of the amoeba Hartmannella vermiformis. *Microbiology* **146 (Pt 5)**: 1231-1239.

Hughes, D.T., and Sperandio, V. (2008) Inter-kingdom signalling: communication between bacteria and their hosts. *Nat Rev Microbiol* **6**: 111-120.

Hume R.D., H.W.D. (1984) Growth of Legionella, Escherichia and Pseudomonas among cells of the green algae Chlorella, Gloeocystis, and scenedesmus as seen by scanning electron microscppy. *Micron And Microscopica Acta* **15**: 107-108

Huws, S.A., McBain, A.J., and Gilbert, P. (2005) Protozoan grazing and its impact upon population dynamics in biofilm communities. *J Appl Microbiol* **98**: 238-244.

Hwang, I., Cook, D.M., and Farrand, S.K. (1995) A new regulatory element modulates homoserine lactone-mediated autoinduction of Ti plasmid conjugal transfer. *J Bacteriol* **177**: 449-458.

Ibey, B.L., Beier, H.T., Rounds, R.M., Cote, G.L., Yadavalli, V.K., and Pishko, M.V. (2005) Competitive binding assay for glucose based on glycodendrimer-fluorophore conjugates. *Anal Chem* **77**: 7039-7046.

Inouye, S., and Nakamura, M. (2003) Identification of biotinylated lysine residues in the photoprotein aequorin by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry peptide mapping after lysine-specific endopeptidase digestion. *Anal Biochem* **316**: 216-222.

Isberg, R.R., O'Connor, T.J., and Heidtman, M. (2009) The Legionella pneumophila replication vacuole: making a cosy niche inside host cells. *Nat Rev Microbiol* **7**: 13-24.

Jahan, N., Potter, J.A., Sheikh, M.A., Botting, C.H., Shirran, S.L., Westwood, N.J., and Taylor, G.L. (2009) Insights into the biosynthesis of the Vibrio cholerae major autoinducer CAI-1 from the crystal structure of the PLP-dependent enzyme CqsA. *J Mol Biol* **392**: 763-773.

Ji, G., Beavis, R.C., and Novick, R.P. (1995) Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 12055-12059.

Ji, G., Beavis, R., and Novick, R.P. (1997) Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants. *Science* **276**: 2027-2030.

Jonas, D., Rosenbaum, A., Weyrich, S., and Bhakdi, S. (1995) Enzyme-linked immunoassay for detection of PCR-amplified DNA of legionellae in bronchoalveolar fluid. *J Clin Microbiol* **33**: 1247-1252.

Kaiser, D.A., and Pollard, T.D. (1996) Characterization of actin and poly-L-proline binding sites of Acanthamoeba profilin with monoclonal antibodies and by mutagenesis. *J Mol Biol* **256**: 89-107.

Kaper, J.B., Nataro, J.P., and Mobley, H.L. (2004) Pathogenic Escherichia coli. *Nat Rev Microbiol* **2**: 123-140.

Kaplan, H.B., and Greenberg, E.P. (1985) Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the Vibrio fischeri luminescence system. *J Bacteriol* **163**: 1210-1214.

Katz, S.M., and Hammel, J.M. (1987) The effect of drying, heat, and pH on the survival of Legionella pneumophila. *Ann Clin Lab Sci* **17**: 150-156.

Kelly, R.C., Bolitho, M.E., Higgins, D.A., Lu, W., Ng, W.L., Jeffrey, P.D. et al. (2009) The Vibrio cholerae quorum-sensing autoinducer CAI-1: analysis of the biosynthetic enzyme CqsA. *Nat Chem Biol* **5**: 891-895.

Kendall, M.M., and Sperandio, V. (2007) Quorum sensing by enteric pathogens. *Curr Opin Gastroenterol* **23**: 10-15.

Kessler, A., Schell, U., Sahr, T., Tiaden, A., Harrison, C., Buchrieser, C., and Hilbi, H. (2013) The Legionella pneumophila orphan sensor kinase LqsT regulates competence and pathogen-host interactions as a component of the LAI-1 circuit. *Environ Microbiol* **15**: 646-662.

Kikuhara, H., Ogawa, M., Miyamoto, H., Nikaido, Y., and Yoshida, S. (1994) Intracellular multiplication of Legionella pneumophila in Tetrahymena thermophila. *J UOEH* **16**: 263-275.

Kilvington, S., and Price, J. (1990) Survival of Legionella pneumophila within cysts of Acanthamoeba polyphaga following chlorine exposure. *J Appl Bacteriol* **68**: 519-525.

Kim, B.R., Anderson, J.E., Mueller, S.A., Gaines, W.A., and Kendall, A.M. (2002) Literature review--efficacy of various disinfectants against Legionella in water systems. *Water Res* **36**: 4433-4444.

Kong, H.H., and Pollard, T.D. (2002) Intracellular localization and dynamics of myosin-II and myosin-IC in live Acanthamoeba by transient transfection of EGFP fusion proteins. *J Cell Sci* **115**: 4993-5002.

Koubar, M., Rodier, M.H., and Frere, J. (2013) Involvement of minerals in adherence of Legionella pneumophila to surfaces. *Curr Microbiol* **66**: 437-442.

Koubar, M., Rodier, M.H., Garduno, R.A., and Frere, J. (2011) Passage through Tetrahymena tropicalis enhances the resistance to stress and the infectivity of Legionella pneumophila. *FEMS Microbiol Lett* **325**: 10-15.

Kuiper, M.W., Wullings, B.A., Akkermans, A.D., Beumer, R.R., and van der Kooij, D. (2004) Intracellular proliferation of Legionella pneumophila in Hartmannella vermiformis in aquatic biofilms grown on plasticized polyvinyl chloride. *Appl Environ Microbiol* **70**: 6826-6833.

Kwaik, Y.A., and Harb, O.S. (1999) Phenotypic modulation by intracellular bacterial pathogens. *Electrophoresis* **20**: 2248-2258.

Labbate, M., Queck, S.Y., Koh, K.S., Rice, S.A., Givskov, M., and Kjelleberg, S. (2004) Quorum sensing-controlled biofilm development in Serratia liquefaciens MG1. *J Bacteriol* **186**: 692-698.

Lawrence, J.R., Korber, D.R., Hoyle, B.D., Costerton, J.W., and Caldwell, D.E. (1991) Optical sectioning of microbial biofilms. *J Bacteriol* **173**: 6558-6567.

Lomma, M., Dervins-Ravault, D., Rolando, M., Nora, T., Newton, H.J., Sansom, F.M. et al. (2010) The Legionella pneumophila F-box protein Lpp2082 (AnkB) modulates ubiquitination of the host protein parvin B and promotes intracellular replication. *Cell Microbiol* **12**: 1272-1291.

Lucas, C.E., Brown, E., and Fields, B.S. (2006) Type IV pili and type II secretion play a limited role in Legionella pneumophila biofilm colonization and retention. *Microbiology* **152**: 3569-3573.

Luo, Z.Q. (2011) Striking a balance: modulation of host cell death pathways by legionella pneumophila. *Front Microbiol* **2**: 36.

Luo, Z.Q. (2012) Legionella secreted effectors and innate immune responses. *Cell Microbiol* **14**: 19-27.

Luo, Z.Q., Su, S., and Farrand, S.K. (2003a) In situ activation of the quorum-sensing transcription factor TraR by cognate and noncognate acyl-homoserine lactone ligands: kinetics and consequences. *J Bacteriol* **185**: 5665-5672.

Luo, Z.Q., Smyth, A.J., Gao, P., Qin, Y., and Farrand, S.K. (2003b) Mutational analysis of TraR. Correlating function with molecular structure of a quorum-sensing transcriptional activator. *J Biol Chem* **278**: 13173-13182.

Magnuson, R., Solomon, J., and Grossman, A.D. (1994) Biochemical and genetic characterization of a competence pheromone from B. subtilis. *Cell* **77**: 207-216.

Mallegol, J., Duncan, C., Prashar, A., So, J., Low, D.E., Terebeznik, M., and Guyard, C. (2012) Essential roles and regulation of the Legionella pneumophila collagen-like adhesin during biofilm formation. *PLoS One* **7**: e46462.

Mampel, J., Spirig, T., Weber, S.S., Haagensen, J.A., Molin, S., and Hilbi, H. (2006) Planktonic replication is essential for biofilm formation by Legionella pneumophila in a complex medium under static and dynamic flow conditions. *Appl Environ Microbiol* **72**: 2885-2895.

Marston, B.J., Plouffe, J.F., File, T.M., Jr., Hackman, B.A., Salstrom, S.J., Lipman, H.B. et al. (1997) Incidence of community-acquired pneumonia requiring hospitalization. Results of a population-based active surveillance Study in Ohio. The Community-Based Pneumonia Incidence Study Group. *Arch Intern Med* **157**: 1709-1718.

Mates, A.K., Sayed, A.K., and Foster, J.W. (2007) Products of the Escherichia coli acid fitness island attenuate metabolite stress at extremely low pH and mediate a cell density-dependent acid resistance. *J Bacteriol* **189**: 2759-2768.

Matz, C., and Jurgens, K. (2005) High motility reduces grazing mortality of planktonic bacteria. *Appl Environ Microbiol* **71**: 921-929.

Matz, C., Deines, P., Boenigk, J., Arndt, H., Eberl, L., Kjelleberg, S., and Jurgens, K. (2004) Impact of violacein-producing bacteria on survival and feeding of bacterivorous nanoflagellates. *Appl Environ Microbiol* **70**: 1593-1599.

Mazur, T., and Hadas, E. (1994) The effect of the passages of Acanthamoeba strains through mice tissues on their virulence and its biochemical markers. *Parasitol Res* **80**: 431-434.

McDade, J.E., Shepard, C.C., Fraser, D.W., Tsai, T.R., Redus, M.A., and Dowdle, W.R. (1977) Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *N Engl J Med* **297**: 1197-1203.

McIntyre, M., Quinn, F.D., Fields, P.I., and Berdal, B.P. (1991) Rapid identification of Legionella pneumophila zinc metalloprotease using chromogenic detection. *APMIS* **99**: 316-320.

McLean, R.J., Lawrence, J.R., Korber, D.R., and Caldwell, D.E. (1991) Proteus mirabilis biofilm protection against struvite crystal dissolution and its implications in struvite urolithiasis. *J Urol* **146**: 1138-1142.

Mead, T.J., and Yutzey, K.E. (2009) Notch pathway regulation of chondrocyte differentiation and proliferation during appendicular and axial skeleton development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 14420-14425.

Meighen, E.A. (1991) Molecular biology of bacterial bioluminescence. *Microbiol Rev* **55**: 123-142.

Miller, M.B., Skorupski, K., Lenz, D.H., Taylor, R.K., and Bassler, B.L. (2002) Parallel quorum sensing systems converge to regulate virulence in Vibrio cholerae. *Cell* **110**: 303-314.

Miller ST, X.K., Campagna SR, Taga ME, Semmelhack MF, et al. (2004) A novel form of the bacterial quorum sensing signal AI-2 recognized by the Salmonella typhimurium receptor LsrB. *Mol. Cell.* **15**: 87.

Milton, D.L. (2006) Quorum sensing in vibrios: complexity for diversification. *Int J Med Microbiol* **296**: 61-71.

Minogue, T.D., Wehland-von Trebra, M., Bernhard, F., and von Bodman, S.B. (2002) The autoregulatory role of EsaR, a quorum-sensing regulator in Pantoea stewartii ssp. stewartii: evidence for a repressor function. *Mol Microbiol* **44**: 1625-1635.

Molmeret, M., Bitar, D.M., Han, L., and Kwaik, Y.A. (2004a) Cell biology of the intracellular infection by Legionella pneumophila. *Microbes Infect* **6**: 129-139.

Molmeret, M., Bitar, D.M., Han, L., and Kwaik, Y.A. (2004b) Disruption of the phagosomal membrane and egress of Legionella pneumophila into the cytoplasm during the last stages of intracellular infection of macrophages and Acanthamoeba polyphaga. *Infect Immun* **72**: 4040-4051.

Molmeret, M., Horn, M., Wagner, M., Santic, M., and Abu Kwaik, Y. (2005) Amoebae as training grounds for intracellular bacterial pathogens. *Appl Environ Microbiol* **71**: 20-28.

Molmeret, M., Jones, S., Santic, M., Habyarimana, F., Esteban, M.T., and Kwaik, Y.A. (2010) Temporal and spatial trigger of post-exponential virulence-associated regulatory cascades by Legionella pneumophila after bacterial escape into the host cell cytosol. *Environ Microbiol* **12**: 704-715.

Molofsky, A.B., and Swanson, M.S. (2004) Differentiate to thrive: lessons from the Legionella pneumophila life cycle. *Mol Microbiol* **53**: 29-40.

Mondamert, L., Labanowski, J., N'Goye, F., Talbot, H.M., and Croue, J.P. (2011) High pressure membrane foulants of seawater, brackish water and river water: origin assessed by sugar and bacteriohopanepolyol signatures. *Biofouling* **27**: 21-32.

Moorthy, S., and Watnick, P.I. (2004) Genetic evidence that the Vibrio cholerae monolayer is a distinct stage in biofilm development. *Mol Microbiol* **52**: 573-587.

More, M.I., Finger, L.D., Stryker, J.L., Fuqua, C., Eberhard, A., and Winans, S.C. (1996) Enzymatic synthesis of a quorum-sensing autoinducer through use of defined substrates. *Science* **272**: 1655-1658.

Moss, C.W., and Dees, S.B. (1979a) Cellular fatty acid composition of WIGA, a rickettsia-like agent similar to the Legionnaires disease bacterium. *J Clin Microbiol* **10**: 390-391.

Moss, C.W., and Dees, S.B. (1979b) Further studies of the cellular fatty acid composition of Legionnaires disease bacteria. *J Clin Microbiol* **9**: 648-649.

Moss, C.W., Weaver, R.E., Dees, S.B., and Cherry, W.B. (1977) Cellular fatty acid composition of isolates from Legionnaires disease. *J Clin Microbiol* **6**: 140-143.

Muder, R.R., and Yu, V.L. (2002) Infection due to Legionella species other than L. pneumophila. *Clin Infect Dis* **35**: 990-998.

Murga, R., Forster, T.S., Brown, E., Pruckler, J.M., Fields, B.S., and Donlan, R.M. (2001) Role of biofilms in the survival of Legionella pneumophila in a model potable-water system. *Microbiology* **147**: 3121-3126.

Nadell, C.D., Bucci, V., Drescher, K., Levin, S.A., Bassler, B.L., and Xavier, J.B. (2013) Cutting through the complexity of cell collectives. *Proc Biol Sci* **280**: 20122770.

Nesper, J., Lauriano, C.M., Klose, K.E., Kapfhammer, D., Kraiss, A., and Reidl, J. (2001) Characterization of Vibrio cholerae O1 El tor galU and galE mutants: influence on lipopolysaccharide structure, colonization, and biofilm formation. *Infect Immun* **69**: 435-445.

Neu, T.R., Kuhlicke, U., and Lawrence, J.R. (2002) Assessment of fluorochromes for two-photon laser scanning microscopy of biofilms. *Appl Environ Microbiol* **68**: 901-909.

Neumeister, B., Reiff, G., Faigle, M., Dietz, K., Northoff, H., and Lang, F. (2000) Influence of Acanthamoeba castellanii on intracellular growth of different Legionella species in human monocytes. *Appl Environ Microbiol* **66**: 914-919.

Novick, R.P., and Geisinger, E. (2008) Quorum sensing in staphylococci. *Annu Rev Genet* **42**: 541-564.

Ohno, A., Kato, N., Yamada, K., and Yamaguchi, K. (2003) Factors influencing survival of Legionella pneumophila serotype 1 in hot spring water and tap water. *Appl Environ Microbiol* **69**: 2540-2547.

Ohno, A., Kato, N., Sakamoto, R., Kimura, S., and Yamaguchi, K. (2008) Temperature-dependent parasitic relationship between Legionella pneumophila and a free-living amoeba (Acanthamoeba castellanii). *Appl Environ Microbiol* **74**: 4585-4588.

Oliver, C.M., Schaefer, A.L., Greenberg, E.P., and Sufrin, J.R. (2009) Microwave synthesis and evaluation of phenacylhomoserine lactones as anticancer compounds that minimally activate quorum sensing pathways in Pseudomonas aeruginosa. *J Med Chem* **52**: 1569-1575.

Ostap, E.M., and Pollard, T.D. (1996) Biochemical kinetic characterization of the Acanthamoeba myosin-I ATPase. *J Cell Biol* **132**: 1053-1060.

Page, F.C. (1976) *An illustrated key to freshwater and soil amoebae : with notes on cultivation and ecology*. Ambleside: Freshwater Biological Association.

Parsek, M.R., and Greenberg, E.P. (2005) Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends Microbiol* **13**: 27-33.

Passador, L., Cook, J.M., Gambello, M.J., Rust, L., and Iglewski, B.H. (1993) Expression of Pseudomonas aeruginosa virulence genes requires cell-to-cell communication. *Science* **260**: 1127-1130.

Pearce, M.M., Theodoropoulos, N., Mandel, M.J., Brown, E., Reed, K.D., and Cianciotto, N.P. (2012) Legionella cardiaca sp. nov., isolated from a case of native valve endocarditis in a human heart. *Int J Syst Evol Microbiol* **62**: 2946-2954.

Pearson, J.P., Passador, L., Iglewski, B.H., and Greenberg, E.P. (1995) A second N-acylhomoserine lactone signal produced by Pseudomonas aeruginosa. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 1490-1494.

Pearson, J.P., Gray, K.M., Passador, L., Tucker, K.D., Eberhard, A., Iglewski, B.H., and Greenberg, E.P. (1994) Structure of the autoinducer required for expression of Pseudomonas aeruginosa virulence genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 197-201.

Pecastaings, S., Berge, M., Dubourg, K.M., and Roques, C. (2010) Sessile Legionella pneumophila is able to grow on surfaces and generate structured monospecies biofilms. *Biofouling* **26**: 809-819.

Pestova, E.V., Havarstein, L.S., and Morrison, D.A. (1996) Regulation of competence for genetic transformation in Streptococcus pneumoniae by an auto-induced peptide pheromone and a two-component regulatory system. *Mol Microbiol* **21**: 853-862.

Peterson, S., Cline, R.T., Tettelin, H., Sharov, V., and Morrison, D.A. (2000) Gene expression analysis of the Streptococcus pneumoniae competence regulons by use of DNA microarrays. *J Bacteriol* **182**: 6192-6202.

Pettit, D.A., Williamson, J., Cabral, G.A., and Marciano-Cabral, F. (1996) In vitro destruction of nerve cell cultures by Acanthamoeba spp.: a transmission and scanning electron microscopy study. *J Parasitol* **82**: 769-777.

Piao, Z., Sze, C.C., Barysheva, O., Iida, K., and Yoshida, S. (2006) Temperature-regulated formation of mycelial mat-like biofilms by Legionella pneumophila. *Appl Environ Microbiol* **72**: 1613-1622.

Pickup, Z.L., Pickup, R., and Parry, J.D. (2007) Effects of bacterial prey species and their concentration on growth of the amoebae Acanthamoeba castellanii and Hartmannella vermiformis. *Appl Environ Microbiol* **73**: 2631-2634.

Pine, L., George, J.R., Reeves, M.W., and Harrell, W.K. (1979) Development of a chemically defined liquid medium for growth of Legionella pneumophila. *J Clin Microbiol* **9**: 615-626.

Pine, L., Hoffman, P.S., Malcolm, G.B., Benson, R.F., and Keen, M.G. (1984) Determination of catalase, peroxidase, and superoxide dismutase within the genus Legionella. *J Clin Microbiol* **20**: 421-429.

Piper, K.R., Beck von Bodman, S., and Farrand, S.K. (1993) Conjugation factor of Agrobacterium tumefaciens regulates Ti plasmid transfer by autoinduction. *Nature* **362**: 448-450.

Pompeani, A.J., Irgon, J.J., Berger, M.F., Bulyk, M.L., Wingreen, N.S., and Bassler, B.L. (2008) The Vibrio harveyi master quorum-sensing regulator, LuxR, a TetR-type protein is both an activator and a repressor: DNA recognition and binding specificity at target promoters. *Mol Microbiol* **70**: 76-88.

Preston, T.M., and King, C.A. (1984) Amoeboid locomotion of Acanthamoeba castellanii with special reference to cell-substratum interactions. *J Gen Microbiol* **130**: 2317-2323.

Price, C.T., Al-Khodor, S., Al-Quadan, T., Santic, M., Habyarimana, F., Kalia, A., and Kwaik, Y.A. (2009) Molecular mimicry by an F-box effector of Legionella pneumophila hijacks a conserved polyubiquitination machinery within macrophages and protozoa. *PLoS Pathog* **5**: e1000704.

Pritchard, D.I., Todd, I., Brown, A., Bycroft, B.W., Chhabra, S.R., Williams, P., and Wood, P. (2005) Alleviation of insulitis and moderation of diabetes in NOD mice following treatment with a synthetic Pseudomonas aeruginosa signal molecule, N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone. *Acta Diabetol* **42**: 119-122.

Pruckler, J.M., Benson, R.F., Moyenuddin, M., Martin, W.T., and Fields, B.S. (1995) Association of flagellum expression and intracellular growth of Legionella pneumophila. *Infect Immun* **63**: 4928-4932.

Rasis, M., and Segal, G. (2009) The LetA-RsmYZ-CsrA regulatory cascade, together with RpoS and PmrA, post-transcriptionally regulates stationary phase activation of Legionella pneumophila Icm/Dot effectors. *Mol Microbiol* **72**: 995-1010.

Rasko, D.A., Moreira, C.G., Li de, R., Reading, N.C., Ritchie, J.M., Waldor, M.K. et al. (2008) Targeting QseC signaling and virulence for antibiotic development. *Science* **321**: 1078-1080.

Rasmussen, T.B., and Givskov, M. (2006a) Quorum sensing inhibitors: a bargain of effects. *Microbiology* **152**: 895-904.

Rasmussen, T.B., and Givskov, M. (2006b) Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. *Int J Med Microbiol* **296**: 149-161.

Reading, N.C., Rasko, D.A., Torres, A.G., and Sperandio, V. (2009) The two-component system QseEF and the membrane protein QseG link adrenergic and stress sensing to bacterial pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 5889-5894.

Rodgers, F.G., Greaves, P.W., Macrae, A.D., and Lewis, M.J. (1980) Electron microscopic evidence of flagella and pili on Legionella pneumophila. *J Clin Pathol* **33**: 1184-1188.

Rogers, J., and Keevil, C.W. (1992) Immunogold and fluorescein immunolabelling of Legionella pneumophila within an aquatic biofilm visualized by using episcopic differential interference contrast microscopy. *Appl Environ Microbiol* **58**: 2326-2330.

Rogers, J., Dowsett, A.B., Dennis, P.J., Lee, J.V., and Keevil, C.W. (1994a) Influence of temperature and plumbing material selection on biofilm formation and growth of Legionella pneumophila in a model potable water system containing complex microbial flora. *Appl Environ Microbiol* **60**: 1585-1592.

Rogers, J., Dowsett, A.B., Dennis, P.J., Lee, J.V., and Keevil, C.W. (1994b) Influence of Plumbing Materials on Biofilm Formation and Growth of Legionella pneumophila in Potable Water Systems. *Appl Environ Microbiol* **60**: 1842-1851.

Rohr, U., Weber, S., Michel, R., Selenka, F., and Wilhelm, M. (1998) Comparison of free-living amoebae in hot water systems of hospitals with isolates from moist sanitary areas by identifying genera and determining temperature tolerance. *Appl Environ Microbiol* **64**: 1822-1824.

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

Rowbotham, T.J. (1983) Isolation of Legionella pneumophila from clinical specimens via amoebae, and the interaction of those and other isolates with amoebae. *J Clin Pathol* **36**: 978-986.

Rowbotham, T.J. (1998) Isolation of Legionella pneumophila serogroup 1 from human feces with use of amebic cocultures. *Clin Infect Dis* **26**: 502-503.

Ruby, E.G. (1996) Lessons from a cooperative, bacterial-animal association: the Vibrio fischeri-Euprymna scolopes light organ symbiosis. *Annu Rev Microbiol* **50**: 591-624.

Ruehlemann, S.A., and Crawford, G.R. (1996) Panic in the potting shed. The association between Legionella longbeachae serogroup 1 and potting soils in Australia. *Med J Aust* **164**: 36-38.

Rumbaugh, K.P. (2007) Convergence of hormones and autoinducers at the host/pathogen interface. *Anal Bioanal Chem* **387**: 425-435.

Sahr, T., Rusniok, C., Dervins-Ravault, D., Sismeiro, O., Coppee, J.Y., and Buchrieser, C. (2012) Deep sequencing defines the transcriptional map of L. pneumophila and identifies growth phase-dependent regulated ncRNAs implicated in virulence. *RNA Biol* **9**: 503-519.

Sahr, T., Bruggemann, H., Jules, M., Lomma, M., Albert-Weissenberger, C., Cazalet, C., and Buchrieser, C. (2009) Two small ncRNAs jointly govern virulence and transmission in Legionella pneumophila. *Mol Microbiol* **72**: 741-762.

Sanden, G.N., Morrill, W.E., Fields, B.S., Breiman, R.F., and Barbaree, J.M. (1992) Incubation of water samples containing amoebae improves detection of legionellae by the culture method. *Appl Environ Microbiol* **58**: 2001-2004.

Schaefer, A.L., Val, D.L., Hanzelka, B.L., Cronan, J.E., Jr., and Greenberg, E.P. (1996) Generation of cell-to-cell signals in quorum sensing: acyl homoserine lactone synthase activity of a purified Vibrio fischeri LuxI protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 9505-9509.

Schaefer, A.L., Greenberg, E.P., Oliver, C.M., Oda, Y., Huang, J.J., Bittan-Banin, G. et al. (2008) A new class of homoserine lactone quorum-sensing signals. *Nature* **454**: 595-599.

Schauder, S., Shokat, K., Surette, M.G., and Bassler, B.L. (2001) The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule. *Mol Microbiol* **41**: 463-476.

Schuster, F.L., and Visvesvara, G.S. (2004a) Amebae and ciliated protozoa as causal agents of waterborne zoonotic disease. *Vet Parasitol* **126**: 91-120.

Schuster, F.L., and Visvesvara, G.S. (2004b) Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int J Parasitol* **34**: 1001-1027.

Schuster, F.L., and Visvesvara, G.S. (2004c) Opportunistic amoebae: challenges in prophylaxis and treatment. *Drug Resist Updat* **7**: 41-51.

Schuster, M., Urbanowski, M.L., and Greenberg, E.P. (2004a) Promoter specificity in Pseudomonas aeruginosa quorum sensing revealed by DNA binding of purified LasR. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 15833-15839.

Schuster, M., Hawkins, A.C., Harwood, C.S., and Greenberg, E.P. (2004b) The Pseudomonas aeruginosa RpoS regulon and its relationship to quorum sensing. *Mol Microbiol* **51**: 973-985.

Schuster, M., and E. P. Greenberg (2008) LuxR-type proteins in Pseudomonas aeruginosa quorum sensing: distinct mechanisms with global implications. *ASM Press, Washington, DC*: 133-144.

Scott, J.E. (1996) Alcian blue. Now you see it, now you don't. *Eur J Oral Sci* **104**: 2-9.

Seed, P.C., Passador, L., and Iglewski, B.H. (1995) Activation of the Pseudomonas aeruginosa lasI gene by LasR and the Pseudomonas autoinducer PAI: an autoinduction regulatory hierarchy. *J Bacteriol* **177**: 654-659.

Segal, G., and Shuman, H.A. (1998a) How is the intracellular fate of the Legionella pneumophila phagosome determined? *Trends Microbiol* **6**: 253-255.

Segal, G., and Shuman, H.A. (1998b) Intracellular multiplication and human macrophage killing by Legionella pneumophila are inhibited by conjugal components of IncQ plasmid RSF1010. *Mol Microbiol* **30**: 197-208.

Segal, G., and Shuman, H.A. (1999) Legionella pneumophila utilizes the same genes to multiply within Acanthamoeba castellanii and human macrophages. *Infect Immun* **67**: 2117-2124.

Segal, G., Purcell, M., and Shuman, H.A. (1998) Host cell killing and bacterial conjugation require overlapping sets of genes within a 22-kb region of the Legionella pneumophila genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 1669-1674.

Segal, G., Russo, J.J., and Shuman, H.A. (1999) Relationships between a new type IV secretion system and the icm/dot virulence system of Legionella pneumophila. *Mol Microbiol* **34**: 799-809.

Sheehan, K.B., Henson, J.M., and Ferris, M.J. (2005) Legionella species diversity in an acidic biofilm community in Yellowstone National Park. *Appl Environ Microbiol* **71**: 507-511.

Simek, K., and Chrzanowski, T.H. (1992) Direct and indirect evidence of size-selective grazing on pelagic bacteria by freshwater nanoflagellates. *Appl Environ Microbiol* **58**: 3715-3720.

Simon MI, C.B., Crane A. (2007) Two-component signaling systems. *Academic, San Diego*.

Solomon JM, L.B., Grossman AD. (1996) Purification and characterization of an extracellular peptide factor that affects two different developmental pathways in

Bacillus subtilis. *Genes Dev* **10**: 2014-2024.

Sperandio, V. (2001) Genome sequence of E. coli O157:H7. *Trends Microbiol* **9**: 159.

Sperandio, V., Torres, A.G., Giron, J.A., and Kaper, J.B. (2001) Quorum sensing is a global regulatory mechanism in enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7. *J Bacteriol* **183**: 5187-5197.

Sperandio, V., Mellies, J.L., Nguyen, W., Shin, S., and Kaper, J.B. (1999) Quorum sensing controls expression of the type III secretion gene transcription and protein secretion in enterohemorrhagic and enteropathogenic Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 15196-15201.

Sperandio, V., Torres, A.G., Jarvis, B., Nataro, J.P., and Kaper, J.B. (2003) Bacteria-host communication: the language of hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 8951-8956.

Spirig, T., Tiaden, A., Kiefer, P., Buchrieser, C., Vorholt, J.A., and Hilbi, H. (2008) The Legionella autoinducer synthase LqsA produces an alpha-hydroxyketone signaling molecule. *J Biol Chem* **283**: 18113-18123.

Steinert, M., Hentschel, U., and Hacker, J. (2002) Legionella pneumophila: an aquatic microbe goes astray. *FEMS Microbiol Rev* **26**: 149-162.

Steinert, M., Emody, L., Amann, R., and Hacker, J. (1997) Resuscitation of viable but nonculturable Legionella pneumophila Philadelphia JR32 by Acanthamoeba castellanii. *Appl Environ Microbiol* **63**: 2047-2053.

Stevens, A.M., Dolan, K.M., and Greenberg, E.P. (1994) Synergistic binding of the Vibrio fischeri LuxR transcriptional activator domain and RNA polymerase to the lux promoter region. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 12619-12623.

Stojek, N.M., and Dutkiewicz, J. (2011) Co-existence of Legionella and other Gram-negative bacteria in potable water from various rural and urban sources. *Ann Agric Environ Med* **18**: 330-334.

Stone, B.J., and Kwaik, Y.A. (1999) Natural competence for DNA transformation by Legionella pneumophila and its association with expression of type IV pili. *J Bacteriol* **181**: 1395-1402.

Stoodley, P., Debeer, D., and Lewandowski, Z. (1994) Liquid flow in biofilm systems. *Appl Environ Microbiol* **60**: 2711-2716.

Stoodley, P., Hall-Stoodley, L., and Lappin-Scott, H.M. (2001a) Detachment, surface migration, and other dynamic behavior in bacterial biofilms revealed by digital time-lapse imaging. *Methods Enzymol* **337**: 306-319.

Stoodley, P., Wilson, S., Hall-Stoodley, L., Boyle, J.D., Lappin-Scott, H.M., and Costerton, J.W. (2001b) Growth and detachment of cell clusters from mature mixed-species biofilms. *Appl Environ Microbiol* **67**: 5608-5613.

Stoodley, P., Jacobsen, A., Dunsmore, B.C., Purevdorj, B., Wilson, S., Lappin-Scott, H.M., and Costerton, J.W. (2001c) The influence of fluid shear and AICI3 on the material properties of Pseudomonas aeruginosa PAO1 and Desulfovibrio sp. EX265 biofilms. *Water Sci Technol* **43**: 113-120.

Storey, M.V., Ashbolt, J., and Stenstrom, T.A. (2004a) Biofilms, thermophilic amoebae and Legionella pneumophila--a quantitative risk assessment for distributed water. *Water Sci Technol* **50**: 77-82.

Storey, M.V., Langmark, J., Ashbolt, N.J., and Stenstrom, T.A. (2004b) The fate of legionellae within distribution pipe biofilms: measurement of their persistence, inactivation and detachment. *Water Sci Technol* **49**: 269-275.

Stout, J.E., Yu, V.L., and Best, M.G. (1985) Ecology of Legionella pneumophila within water distribution systems. *Appl Environ Microbiol* **49**: 221-228.

Sun, J., Daniel, R., Wagner-Dobler, I. & Zeng, A. P (2004) Is autoinducer-2 a universal signal for interspecies communication: a comparative genomic and phylogenetic analysis of the synthesis and signal transduction pathways. *BMC Evol Biol* **4**.

Sutherland, I.W. (2001a) The biofilm matrix--an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol* **9**: 222-227.

Sutherland, I.W. (2001b) Exopolysaccharides in biofilms, flocs and related structures. *Water Sci Technol* **43**: 77-86.

Swanson, M.S., and Hammer, B.K. (2000) Legionella pneumophila pathogesesis: a fateful journey from amoebae to macrophages. *Annu Rev Microbiol* **54**: 567-613.

Taga, M.E., Semmelhack, J.L., and Bassler, B.L. (2001) The LuxS-dependent autoinducer AI-2 controls the expression of an ABC transporter that functions in AI-2 uptake in Salmonella typhimurium. *Mol Microbiol* **42**: 777-793.

Temmerman, R., Vervaeren, H., Noseda, B., Boon, N., and Verstraete, W. (2006) Necrotrophic growth of Legionella pneumophila. *Appl Environ Microbiol* **72**: 4323-4328.

Tesh, M.J., and Miller, R.D. (1983) Arginine biosynthesis in Legionella pneumophila: absence of N-acetylglutamate synthetase. *Can J Microbiol* **29**: 1230-1233.

Tesh, M.J., Morse, S.A., and Miller, R.D. (1983) Intermediary metabolism in Legionella pneumophila: utilization of amino acids and other compounds as energy sources. *J Bacteriol* **154**: 1104-1109.

Thomas, V., McDonnell, G., Denyer, S.P., and Maillard, J.Y. (2010) Free-living amoebae and their intracellular pathogenic microorganisms: risks for water quality. *FEMS Microbiol Rev* **34**: 231-259.

Thomas, V., Bouchez, T., Nicolas, V., Robert, S., Loret, J.F., and Levi, Y. (2004) Amoebae in domestic water systems: resistance to disinfection treatments and implication in Legionella persistence. *J Appl Microbiol* **97**: 950-963.

Tiaden, A., Spirig, T., Weber, S.S., Bruggemann, H., Bosshard, R., Buchrieser, C., and Hilbi, H. (2007) The Legionella pneumophila response regulator LqsR promotes host cell interactions as an element of the virulence regulatory network controlled by RpoS and LetA. *Cell Microbiol* **9**: 2903-2920.

Tiaden, A., Spirig, T., Sahr, T., Walti, M.A., Boucke, K., Buchrieser, C., and Hilbi, H. (2010) The autoinducer synthase LqsA and putative sensor kinase LqsS regulate phagocyte interactions, extracellular filaments and a genomic island of Legionella pneumophila. *Environ Microbiol* **12**: 1243-1259.

Tiaden, A., Spirig, T., Carranza, P., Bruggemann, H., Riedel, K., Eberl, L. et al. (2008) Synergistic contribution of the Legionella pneumophila lqs genes to pathogen-host interactions. *J Bacteriol* **190**: 7532-7547.

Tison, D.L., Pope, D.H., Cherry, W.B., and Fliermans, C.B. (1980) Growth of Legionella pneumophila in association with blue-green algae (cyanobacteria). *Appl Environ Microbiol* **39**: 456-459.

Tresse, O., Lescob, S., and Rho, D. (2003) Dynamics of living and dead bacterial cells within a mixed-species biofilm during toluene degradation in a biotrickling filter. *J Appl Microbiol* **94**: 849-854.

Tsai, T.F., Finn, D.R., Plikaytis, B.D., McCauley, W., Martin, S.M., and Fraser, D.W. (1979) Legionnaires' disease: clinical features of the epidemic in Philadelphia. *Ann Intern Med* **90**: 509-517.

Tu, K.C., and Bassler, B.L. (2007) Multiple small RNAs act additively to integrate sensory information and control quorum sensing in Vibrio harveyi. *Genes Dev* **21**: 221-233.

Urbanowski, M.L., Lostroh, C.P., and Greenberg, E.P. (2004) Reversible acyl-homoserine lactone binding to purified Vibrio fischeri LuxR protein. *J Bacteriol* **186**: 631-637.

van der Kooij, D., Veenendaal, H.R., and Scheffer, W.J. (2005) Biofilm formation and multiplication of Legionella in a model warm water system with pipes of copper, stainless steel and cross-linked polyethylene. *Water Res* **39**: 2789-2798.

Vendeville, A., Winzer, K., Heurlier, K., Tang, C.M., and Hardie, K.R. (2005) Making 'sense' of metabolism: autoinducer-2, LuxS and pathogenic bacteria. *Nat Rev Microbiol* **3**: 383-396.

Venkataraman, C., Haack, B.J., Bondada, S., and Abu Kwaik, Y. (1997) Identification of a Gal/GalNAc lectin in the protozoan Hartmannella vermiformis as a potential receptor for attachment and invasion by the Legionnaires' disease bacterium. *J Exp Med* **186**: 537-547.

Venkataraman, C., Gao, L.Y., Bondada, S., and Kwaik, Y.A. (1998) Identification of putative cytoskeletal protein homologues in the protozoan host Hartmannella vermiformis as substrates for

induced tyrosine phosphatase activity upon attachment to the Legionnaires' disease bacterium, Legionella pneumophila. *J Exp Med* **188**: 505-514.

Vervaeren, H., Temmerman, R., Devos, L., Boon, N., and Verstraete, W. (2006) Introduction of a boost of Legionella pneumophila into a stagnant-water model by heat treatment. *FEMS Microbiol Ecol* **58**: 583-592.

Visvesvara, G.S., Moura, H., and 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.

Vogel, J.P., Roy, C., and Isberg, R.R. (1996) Use of salt to isolate Legionella pneumophila mutants unable to replicate in macrophages. *Ann N Y Acad Sci* **797**: 271-272.

Vogel, J.P., Andrews, H.L., Wong, S.K., and Isberg, R.R. (1998) Conjugative transfer by the virulence system of Legionella pneumophila. *Science* **279**: 873-876.

von Bodman, S.B., Majerczak, D.R., and Coplin, D.L. (1998) A negative regulator mediates quorum-sensing control of exopolysaccharide production in Pantoea stewartii subsp. stewartii. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 7687-7692.

von Bodman, S.B., Ball, J.K., Faini, M.A., Herrera, C.M., Minogue, T.D., Urbanowski, M.L., and Stevens, A.M. (2003) The quorum sensing negative regulators EsaR and ExpR(Ecc), homologues within the LuxR family, retain the ability to function as activators of transcription. *J Bacteriol* **185**: 7001-7007.

Wadowsky, R.M., and Yee, R.B. (1983) Satellite growth of Legionella pneumophila with an environmental isolate of Flavobacterium breve. *Appl Environ Microbiol* **46**: 1447-1449.

Warren, W.J., and Miller, R.D. (1979) Growth of Legionnaires disease bacterium (Legionella pneumophila) in chemically defined medium. *J Clin Microbiol* **10**: 50-55.

Waters, C.M., and Bassler, B.L. (2005) Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 319-346.

Waters, C.M., and Bassler, B.L. (2006) The Vibrio harveyi quorum-sensing system uses shared regulatory components to discriminate between multiple autoinducers. *Genes Dev* **20**: 2754-2767.

Watnick, P., and Kolter, R. (2000) Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol* **182**: 2675-2679.

Weekers, P.H., Bodelier, P.L., Wijen, J.P., and Vogels, G.D. (1993) Effects of Grazing by the Free-Living Soil Amoebae Acanthamoeba castellanii, Acanthamoeba polyphaga, and Hartmannella vermiformis on Various Bacteria. *Appl Environ Microbiol* **59**: 2317-2319.

Weiss, E., and Westfall, H.N. (1984) Substrate utilization by Legionella cells after cryopreservation in phosphate buffer. *Appl Environ Microbiol* **48**: 380-385.

Whiteley, M., Bangera, M.G., Bumgarner, R.E., Parsek, M.R., Teitzel, G.M., Lory, S., and Greenberg, E.P. (2001) Gene expression in Pseudomonas aeruginosa biofilms. *Nature* **413**: 860-864.

Williams, P. (2007) Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world. *Microbiology* **153**: 3923-3938.

Williams, P., Winzer, K., Chan, W.C., and Camara, M. (2007) Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **362**: 1119-1134.

Winson, M.K., Camara, M., Latifi, A., Foglino, M., Chhabra, S.R., Daykin, M. et al. (1995) Multiple N-acyl-L-homoserine lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in Pseudomonas aeruginosa. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 9427-9431.

Winzer, K., Hardie, K.R., and Williams, P. (2002a) Bacterial cell-to-cell communication: sorry, can't talk now - gone to lunch! *Curr Opin Microbiol* **5**: 216-222.

Winzer, K., Hardie, K.R., and Williams, P. (2003) LuxS and autoinducer-2: their contribution to quorum sensing and metabolism in bacteria. *Adv Appl Microbiol* **53**: 291-396.

Winzer, K., Hardie, K.R., Burgess, N., Doherty, N., Kirke, D., Holden, M.T. et al. (2002b) LuxS: its role in central metabolism and the in vitro synthesis of 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone. *Microbiology* **148**: 909-922.

Xavier, K.B., and Bassler, B.L. (2003) LuxS quorum sensing: more than just a numbers game. *Curr Opin Microbiol* **6**: 191-197.

Yang, G., Benson, R.F., Ratcliff, R.M., Brown, E.W., Steigerwalt, A.G., Thacker, W.L. et al. (2012) Legionella nagasakiensis sp. nov., isolated from water samples and from a patient with pneumonia. *Int J Syst Evol Microbiol* **62**: 284-288.

Yim, G., Wang, H. M. H. & Davies, J. (2007) Antibiotics as signalling molecules. *Philos Trans R Soc London B Biol Sci* **362**: 1195–1200.

Yu, V.L. (2002) Legionella surveillance: political and social implications--a little knowledge is a dangerous thing. *J Infect Dis* **185**: 259-261.

Yu, V.L., Plouffe, J.F., Pastoris, M.C., Stout, J.E., Schousboe, M., Widmer, A. et al. (2002) Distribution of Legionella species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: an international collaborative survey. *J Infect Dis* **186**: 127-128.

Zhu, J., and Winans, S.C. (1999) Autoinducer binding by the quorum-sensing regulator TraR increases affinity for target promoters in vitro and decreases TraR turnover rates in whole cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 4832-4837.

Zhu, J., and Winans, S.C. (2001) The quorum-sensing transcriptional regulator TraR requires its cognate signaling ligand for protein folding, protease resistance, and dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 1507-1512.

Zhu, J., Miller, M.B., Vance, R.E., Dziejman, M., Bassler, B.L., and Mekalanos, J.J. (2002) Quorum-sensing regulators control virulence gene expression in Vibrio cholerae. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 3129-3134.

Zhu, W., Banga, S., Tan, Y., Zheng, C., Stephenson, R., Gately, J., and Luo, Z.Q. (2011) Comprehensive identification of protein substrates of the Dot/Icm type IV transporter of Legionella pneumophila. *PLoS One* **6**: e17638.

Résumé :

Impact de la multiplication chez l'hôte *Acanthamoeba castellanii* sur le développement de biofilms par *Legionella pneumophila*

Legionella pneumophila est une bactérie intracellulaire facultative retrouvée aussi bien dans les environnements aqueux naturels qu'artificiels. Cette bactérie est l'agent de la légionellose, une pneumopathie sévère. Les milieux aqueux sont colonisés par des biofilms, une association de micro-organismes enveloppés d'une matrice exopolymérique. Les légionelles sont capables de coloniser et de survivre au sein de ces biofilms. Dans les réseaux d'eaux, les biofilms sont la cible de la prédation des amibes qui se retrouvent ensuite parasités par les légionelles et favorisent ainsi leur multiplication.

Nous avons étudié l'impact de l'origine de multiplication des légionelles sur la colonisation et la formation de biofilms. Notre étude a démontré que dans tous les cas les légionelles sont présentes à la surface de biofilms préformés. Notre étude a mis en évidence que les légionelles issues de la multiplication au sein d'amibes sont capables de former des agrégats compacts empaquetés dans une matrice exopolysaccharidique. Ce phénotype « biofilm » se manifeste après induction par une molécule amibienne en cours de caractérisation. De plus, notre étude a mis en évidence l'existence d'un nouveau système de communication de type Quorum Sensing permettant une communication inter et intra-espèce qui permet l'induction de ce phénotype chez les légionelles.

Mots clés : *Legionella*, biofilm, amibes, auto-inducteur, système de communication

Abstract :

Impact of multiplication in *Acanthamoeba castellanii* on biofilms formation by *Legionella pneumophila*.

Legionella pneumophila is a facultative intracellular Gram-negative bacterium colonizing freshwater as well as artificial environments. This bacterium is the agent of Legionnaires' disease, a severe pneumonia. Water network are colonized by biofilms, an association of microorganisms embedded in exopolymeric matrix. *Legionella* are able to colonize and survive within biofilms which are the major source of human infection. In water systems, biofilms are the target of amoeba predation that can be parasitized by *Legionella*. Amoebae are the major multiplication site of *Legionella* in the environment.

We studied the impact of multiplication origin on colonization and biofilm formation by *Legionella*. Our study demonstrated that *Legionella* whatever their origins are present at the surface of pre-formed biofilms. Our study showed that *Legionella* issued from multiplication within amoebae are able to form compact aggregates packed in an exopolysaccharidic matrix. This "biofilm" phenotype occurs after induction by an amoebic molecule that has to be characterized. In addition, our study revealed the existence of a new QS system for inter and intra-species communication that allows the induction of this biofilm phenotype to other *Legionella*.

Key words : *Legionella*, biofilms, amoeba, auto-inducer, communication system