

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 :

Mohamad KOUBAR

IMPACT DES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX SUR L'ETAT PHYSIOLOGIQUE
ET L'INFECTIOSITE DE *LEGIONELLA PNEUMOPHILA* LENS

Directeurs de Thèse : Professeurs Jacques FRERE et Marie-Hélène RODIER

Soutenue le 15 juin 2011

devant la Commission d'Examen

JURY

Rapporteurs : M^{me} Sophie JARRAUD, MCU PH, HDR, Université de Lyon Nord
M. Robert DURAN, Professeur, Université de Pau

Examineurs : M^{me} Marie-Hélène RODIER, Professeur, Université de Poitiers
M. Christophe BURUCOA, Professeur, Université de Poitiers
M. Loïc FAVENNEC, Professeur, Université de Rouen
M. Jacques FRERE, Professeur, Université de Poitiers

DÉDICACE

Aux plus chers parents qui ont toujours sacrifié pour mon succès et mon bonheur, et qui ont tout offert pour mon plaisir et mon progrès dont ils cueillent le fruit de cette sacrifice et ce don inépuisables à travers ce travail qui constitue un pas supplémentaire vers mon succès auquel ils ont longtemps rêvé et souhaité.

*A Mostafa KOUBAR et Ayda ALAMEH,
Je dédie ce travail avec mon grand merci et mes francs souhaits qu'il leur plait et qu'ils en soient fiers.*

REMERCIEMENTS

J'ai essayé à travers ces quelques lignes d'exprimer ma reconnaissance ainsi que les sentiments d'amour et d'attachement que je vous porte

Je remercie très fortement :

Mes directeurs de thèse Pr. Marie-Hélène RODIER et Pr. Jacques FRERE pour la confiance et la liberté qu'ils m'ont accordées, leur support et leur soutien pendant toutes ces années et leur aide pour que ce mémoire aboutisse de la meilleure façon possible.

Le jury et les rapporteurs d'avoir accepté évaluer ce travail

Mes amis du labo (Adrienne, Aïcha, Clémence, Emerancienne, Emilie Fouque, Emilie Portier, Jean-Fabrice, Julien, Laetitia, Mathieu, Nadjat, Nicolas, Renaud, Tawfik, Thomas et Vanessa) avec lesquels j'ai passé des moments agréables que je n'oublierai jamais.

Les enseignants et les personnels du laboratoire (Alain, Christian, Christine, Christophe, Daniel, Jean-Marc, Karine, Marie-Claude, Stéphanie et Yann) qui ont assuré une merveilleuse ambiance durant toutes ces années.

Mes amis (Ahmad, Claire, Elias, Fatima, Ghalia, Ghislane, Hania, Joelle Nader, Mahmoud, Raed, Rana et Soumayya) qui ont laissé de jolies traces et de beaux souvenirs dans ma mémoire.

Je tiens à remercier :

Joelle Jandry, Nasma Najjar et Nawel Chافتar pour les moments inoubliables que nous avons passé ensemble et pour leur présence à mon côté quand j'avais besoin.

Mon grand frère Khodor Terro, pour son aide et pour les bons moments pendant toute la durée de mon séjour à Poitiers.

Je garde un remerciement spécial à Pascale Mustapha, l'amie qui était toujours à côté de moi dans les moments difficiles de la thèse et de l'enseignement ainsi que dans mes plus beaux moments que j'ai vécu en France.

Enfin, je remercie toutes les personnes qui m'ont aidé directement par leur conseils minutieux ou indirectement en m'encourageant à mieux faire à chaque pas.

Je regrette de ne pouvoir qu'utiliser ce petit mot pour exprimer ce GRAND MERCI

SOMMAIRE

Introduction générale.....	01
Introduction bibliographique.....	04
1. <i>Legionella</i>	05
1-1 : Historique	05
1-2 : Taxonomie	05
1-3 : Présentation de la bactérie.....	07
1-3-1 : Morphologie	07
1-3-2 : Caractères culturels.....	07
1-3-3 : Caractères métaboliques.....	08
1-4 : Cycle de vie et différents phénotypes de <i>L. pneumophila</i>	08
2- Ecologie des légionelles.....	11
2-1 : La présence dans des biofilms	12
2-2 : Interactions avec les protozoaires	14
2-2-1 : Les amibes.....	14
2.2.2 : <i>Tetrahymena</i>	17
2.2.3 : Matières minérales et <i>Legionella</i>	21
3- Pouvoir pathogène de <i>L. pneumophila</i>	23
3.1- Mode de contamination et de transmission.....	23
3.2- Facteurs de virulence	24
3.2.1- Facteurs de surfaces.....	24
3.2.2- Facteurs sécrétés.....	25
3.3- La légionellose.....	25
3.3.1- la fièvre de Pontiac	26
3.3.2- la maladie du légionnaire.....	26
3.3.3- la légionellose extra-pulmonaire.....	27
3.4- Infection des cellules humaines.....	27
3.4.1- Infection des macrophages	27

3.4.2- Infection des pneumocytes	29
3.5- Infection des animaux.....	30
Matériel et méthodes	33
1. Les différents types cellulaires et conditions de culture	34
1-1 : <i>Legionella pneumophila</i>	34
1-1-1 : Production de légionelles non filamenteuses	36
1-1-2 : Production de légionelles post-amibes.....	36
1-1-3 : Production de légionelles post- <i>Tetrahymena</i>	36
1-1-4 : Traitement des suspensions à la gentamicine.....	37
1-1-5 : Survie bactérienne à long terme.....	38
1-1-6 : Traitement des cellules à la protéinase K.....	38
1-2 : <i>Acanthamoeba castellanii</i>	38
1-3 : <i>Tetrahymena tropicalis</i>	39
1-4 : Pneumocytes humains de type II.....	40
1-5 : Monocytes humains.....	40
1-6 : Préparation des différents types d'eaux.....	41
1-6-1 : Eau ultra-pure.....	41
1-6-2 : Eau d'Evian.....	41
1-6-3 : Solution mère de matières organiques.....	42
1-6-4 : Solutions de minéraux	43
2. Analyse protéomique	43
2-1 : Migration mono dimensionnelle.....	43
2-1-1 : Extraction des protéines	43
2-1-2 : Electrophorèse 1D	43
2-2 : Migration bidimensionnelle.....	44
2-2-1 : Extraction des protéines	44
2-2-2 : Migration électrophorétique.....	44
3. Procédures d'infection des différents types cellulaires par <i>Legionella pneumophila</i> ...	46
3-1 : Préparation de <i>Acanthamoeba castellanii</i>	46

3-2 : Préparation des pneumocytes	46
3-3 : Préparation des macrophages	47
3-4 : Infection des cellules.....	47
4. Infection des souris A/J par <i>Legionella pneumophila</i>	47
4-1 : Appareil d'aérosolisation	48
4-2 : Infection par les aérosols de légionelles.....	49
4-3 : Infection intra-nasale.....	49
4-4 : Broyages des organes	50
4-5 : Rapport poids humide sur poids sec (wet-to-dry ratio)	50
Résultats et discussion	51
1. Impact des matières organiques et minérales sur la survie de <i>L. pneumophila</i> :.....	52
1-1 : Effet de la matière minérale sur la cultivabilité.....	52
1-2 : Effet de la matière organique sur la cultivabilité	53
2. Détection de l'adhérence des bactéries aux surfaces	54
3. Influence de la composition ionique de l'eau sur le phénomène d'adhérence.....	59
4. Influence de la concentration ionique de l'eau sur le phénomène d'adhérence	61
5. Effet de la durée de contact avec le calcium sur l'adhérence bactérienne	62
6. Calcium et modification du profil protéique bactérien	63
7. Traitement des cellules à la protéinase K.....	66
8. Matières minérales et infection	68
8-1 : Détermination des conditions de préparation des légionelles post-amibiennes.	68
8-2 : Infection des cellules par <i>Legionella pneumophila</i>	69
8-3 : Infection des souris A/J par <i>Legionella pneumophila</i>	71
8-3-1 : Détection et multiplication des légionelles dans les poumons	71
8-3-2 : Rapport poids mouillé / poids sec des poumons	73
8-3-3 : Dissémination extra-pulmonaire	74
9. Impact du passage dans <i>Tetrahymena tropicalis</i> sur le comportement de <i>Legionella pneumophila</i>	75
9-1 : Résistance à la gentamicine	75

9-2 : Survie à long terme.....	77
9-3 : Infection des pneumocytes humains (A549)	78
Conclusion générale et perspectives	79
Annexes	84
Références bibliographiques	97

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Cycle de vie de <i>L. pneumophila</i>	09
Figure 2 : Expression réciproque des phénotypes de réplication et de transmission	10
Figure 3 : la vie environnementale de <i>Legionella</i> dans les protozoaires.....	16
Figure 4 : <i>Tetrahymena tropicalis</i>	18
Figure 5 : Coculture <i>L. pneumophila</i> - <i>T. tropicalis</i>	20
Figure 6 : Evolution du nombre de cas de légionellose en France, 1988-2009	26
Figure 7 : Cycle de vie de <i>L. pneumophila</i> dans les protozoaires et les macrophages	28
Figure 8 : Survie des légionelles à 37°C, dans l'eau ultra pure et l'eau d'Evian.....	52
Figure 9 : Survie des légionelles à 37°C, dans l'eau ultra pure et l'eau d'Evian en présence de matières organiques	53
Figure 10 : Survie de <i>L. pneumophila</i> à 37°C avec ou sans matières organiques et minérales	53
Figure 11 : Coloration Live/Dead® BacLight des suspensions bactériennes après 11 jours d'incubation à 37°C.	55
Figure 12 : Coloration Live/Dead® BacLight des suspensions bactériennes après 11 jours d'incubation à 20°C	56
Figure 13 : analyse des photographies de microscopie après un séjour de 11 jours dans différentes eaux	57
Figure 14 : Dénombrement sur gélose BCYE des légionelles présentes après un séjour de 11 jours dans différentes eaux	58
Figure 15 : dénombrement des légionelles dans différentes eaux après un séjour de 28 jours	59
Figure 16 : adhérence après 11 jours de <i>L. pneumophila</i> sur le verre en fonction des ions présents.....	60
Figure 17 : Adhérence de <i>L. pneumophila</i> aux parois (plastique hydrophile)	61
Figure 18 : Influence du Ca (80 mg/l) sur la quantité de bactéries libres en fonction du temps	62
Figure 19: profils protéiques de <i>L. pneumophila</i> placée 11 jours dans différentes eaux .	63

Figure 20 : profils protéiques obtenus par électrophorèse bidimensionnelle de <i>L. pneumophila</i> dans différentes eaux.....	64
Figure 21 : dénombrement sur gélose des légionelles adhérees aux surfaces dans différentes conditions	67
Figure 22 : Cultivabilité des légionelles après infection des amibes.....	68
Figure 23 : Coloration Baclight™ des amibes après infection des légionelles	69
Figure 24 : infection d'amibes, de macrophages et de pneumocytes II par différentes suspensions de légionelles.....	70
Figure 25 : Cultivabilité des légionelles dans les poumons	72
Figure 26 : Ratio des poids de poumon mouillé sur poids de poumon sec (Wet-to-Dry ratio) dans les homogénats de poumons murins T0 et 48 h post-infection (d2) dans les différents groupes expérimentaux	74
Figure 27 : Cultivabilité des légionelles après traitement à la gentamicine.	76
Figure 28 : Influence du passage dans <i>Tetrahymena tropicalis</i> sur la cultivabilité de <i>L. pneumophila</i> en fonction du temps	77
Figure 29 : Multiplication des <i>L. pneumophila</i> dans les pneumocytes (A549).....	78

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Espèces et sérogroupes du genre <i>Legionella</i>	6
Tableau 2 : Composition moyenne en minéraux de l'eau d'Evian.....	41
Tableau 3 : Facteur de multiplication entre J_0 et J_2	73
Tableau 4 : Positivité pour la présence de colonies de Lp Lens dans les homogénats de foie et de rate murins à 48 h post-infection dans les différents groupes expérimentaux	75

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACES : Acide N-(acétamido-2)-amino-2-éthane sulfonique
APS : Ammonium Persulfate
ATCC : American Type Culture Collection
BCYE : Buffered Charcoal Yeast Extract
BSA : Albumine sérique bovine
BYE : Buffered Yeast Extract
CHAPS : 3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate
CNRL : Centre National de Référence des Légionelles
COT : Carbone Organique Total
CSTB : Centre Scientifique et Technique du Bâtiment
DMSO : Dimethyl Sulphoxide
DTT : Dithiothréitol
EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétracétique
ENS : Ecole nationale supérieure
EPHE : Ecole pratique des hautes études
EUP : eau ultra pure
FMI : Forme Mature Intracellulaire
FS : Forme Stationnaire
GspA : Global stress protein A
HPI : Matière organique hydrophilique
HPO : Matière organique hydrophobique
Lly : Legiolysin protein
LMP : Low Melting Point
LPS : Lipopolysaccharide
Mip : Macrophage infectivity potentiator
MO : Matière Organique
MOD : Matière Organique Dissoute
MOI : Multiplicité d'infection
MOMP : Major Outer Membran Protein
Naip5 : neuronal apoptosis inhibitory protein 5
NOD-LRR : Nucleotide-binding oligomerization-leucine-rich repeat
PCB : Plate Count Broth

PMA : Phorbol 12-Myristate 13-Acetate

PVDF : PolyVinylidene Fluoride

PYG : Peptone, Yeast extract, Glucose

QSP : Quantité suffisante pour

Rib : Release of intracellular bacteria

RPMI : Roswell Park Memorial Institute medium

SDS : sodium dodécylsulfate

SDS-PAGE : sodium dodécylsulfate – Polyacrylamide gel electrophoresis

SVF : Sérum de Veau Fœtal

TEMED : Tétra-méthyl-éthylènediamine

THP : Matière organique transphilique

UFC : Unité Formant Colonie

VBNC : Viable but nonculturable

WASP : Whitley Automatic Spiral Plater

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Legionella pneumophila, et particulièrement le sérotype 1 de cette espèce, est l'agent responsable de la légionellose, une infection respiratoire dont la mortalité est d'environ 10 %. La contamination humaine se fait exclusivement par l'inhalation d'un aérosol d'eau contaminée par *Legionella*. Ces bactéries ont la capacité de se multiplier dans les macrophages alvéolaires et dans les cellules épithéliales pulmonaires induisant ainsi la légionellose. L'environnement hydrique constitue le réservoir majeur de ces bactéries qui affectionnent particulièrement les eaux tièdes et colonisent, à la faveur de conditions favorables, les biofilms des réseaux d'eau chaude sanitaire et circuits associés aux tours aéroréfrigérantes qui permettent, entre autres, sa dissémination dans l'air.

Le travail réalisé au cours de cette thèse fait partie d'un projet ANR (programme « LEGIOAEROPATHO ») qui avait pour objectif d'étudier le rôle de l'environnement dans la dynamique de *L. pneumophila* et son influence dans la survie, la cytotoxicité et l'interaction de la bactérie avec l'hôte. Ce projet reposait sur une approche intégrant (1) le réservoir hydrique et certains de ses facteurs biotiques et abiotiques (présence de protozoaires, influence de la composition de l'eau), (2) le vecteur air et ses variables environnementales (humidité relative, polluants de l'air, rayonnements), et (3) l'hôte. La première et la dernière partie de ce projet ont été étudiées dans le cadre de cette thèse alors que la deuxième partie a entièrement été réalisée par les autres partenaires du programme et les résultats correspondants ne sont pas rapportés dans ce document.

Ce projet a été réalisé grâce à une collaboration entre quatre équipes qui ont participé dans des différentes parties de ce programme :

- Le Laboratoire de Chimie et de Microbiologique de l'Eau (LCME) – Poitiers
- Le Laboratoire Recherche et Innovation pour l'Hygiène du Bâtiment (RIHB) du Centre Scientifique et Technique du Bâtiment (CSTB) – Marnes la Vallée
- Le Centre National de Référence des Légionelles (CNRL), INSERM U851, Faculté de médecine Lyon Est – Lyon
- L'Ecole Pratique des Hautes Etudes (EPHE), LCPME - Nancy

En ce qui concerne le travail réalisé au cours de ma thèse, nous avons essayé dans la première partie du projet ANR de déterminer l'impact des différents facteurs environnementaux telle que la présence des matières minérales et organiques sur le comportement de *L. pneumophila* dans le milieu hydrique.

Des légionelles répliquées dans les amibes (post-amibes) ont été préparées afin de les utiliser dans la troisième partie du travail pour infecter les hôtes : (i) des cellules humaines (macrophages et pneumocytes) et (ii) des souris A/J.

La troisième partie du programme ANR a été réalisée à Lyon sous la direction du Dr. Florence ADER, principalement dans l'animalerie de l'Ecole Nationale Supérieure (ENS). Il s'agissait de mettre en place un équipement expérimental développé pour cette étude pour la production d'aérosols de légionelles et l'exposition d'un modèle murin, dans la partie de niveau de risque III de cette animalerie. Cette étape a nécessité de la part des équipes concernées un effort particulier pour convaincre les instances locales de l'intérêt de cette installation qui a dû être retirée dès la fin des expérimentations.

Cette troisième partie avait pour but de comparer l'infectiosité de différentes préparations bactériennes (bactéries ayant séjourné dans l'eau minérale et des bactéries post-amibes) sur des cellules humaines mais aussi sur un modèle murin, en utilisant alors deux méthodes d'exposition, la voie intra-nasale et la voie aérosols.

Nous avons également étudié l'interaction de *Legionella* avec *Tetrahymena tropicalis*, un protozoaire d'eau douce isolé dans les mêmes niches écologiques que *Legionella* et qui pourrait jouer un rôle dans la dissémination des légionelles dans l'environnement. Cette étude ne fait pas partie du programme ANR, mais porte globalement sur la même thématique que son premier volet. Nous avons acquis les compétences à la manipulation de ce protozoaire au travers d'une collaboration avec le Pr. Rafael GARDUNO et à un accueil de un mois dans son laboratoire (Laboratoire de Pathogénie Bactérienne, Université de Dalhousie, Halifax NS, Canada). Nous souhaitons, au travers de cette étude, mieux comprendre l'impact du passage de *Legionella* dans *T. tropicalis*.

Nous avons donc au cours de ce travail, étudié l'effet de différents facteurs environnementaux sur le comportement, la survie et la résistance de *Legionella pneumophila* vis à vis de différentes conditions de stress ainsi que la capacité de cette bactérie à infecter différents types cellulaires humains et un modèle murin.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

1. *Legionella*

1-1 : *Historique*

En 1976, une épidémie frappe le 56ème congrès de l'American Legion (anciens combattants) à Philadelphie aux USA: 182 personnes sont atteintes d'une pneumonie sévère sur les 4400 participants et 29 en meurent (Fraser et al., 1977) (incidence en mortalité : 0,7 %, en nombre de cas : 4 %).

Il a fallu cinq mois pour trouver la cause réelle de ces décès. En janvier 1977, la bactérie fut isolée par McDade et al. (1977) à partir de poumons de patients décédés, grâce à la mise au point d'un milieu adapté. L'enquête qui a suivi cette épidémie a montré que l'incidence de la maladie était proportionnelle au temps passé dans l'hôtel. Aucune transmission par nourriture ou inter humaine n'a pu être démontrée. La contamination par voie aérienne a été rapidement considérée comme une hypothèse réaliste, incriminant le système de climatisation de l'hôtel (Fraser et al., 1977).

À partir de l'isolement de la bactérie, de nombreuses enquêtes sérologiques rétrospectives ont été réalisées et ont permis de rattacher à ce microorganisme plusieurs pneumopathies aiguës inexplicables, par exemple dans des échantillons isolés en 1943 par Tatlock (Tatlock, 1944), ou encore en 1968 à Pontiac (Etats-Unis).

Enfin le nom « *Legionella pneumophila* » n'a été associé qu'en 1979 à cette bactérie, seule représentante à l'époque d'une nouvelle famille, les *Legionellaceae* (Brenner et al, 1979).

1-2 : *Taxonomie*

La famille des *Legionellaceae* a été créée en 1979 (McDade et al., 1979 ; Brenner et al., 1979). Cette famille se situe au sein de l'ordre des *legionellales* (classe *Gamma Proteobacteria*, embranchement *Proteobacteria*, règne *Bacteria*) et comprend actuellement un seul genre : *Legionella* (Fields et al., 2001) avec 49 espèces décrites.

Il existe 70 sérogroupes distincts dans le genre *Legionella* (Adeleke et al., 2001; Benson et Fields 1998 ; Lo Presti et al., 1999 ; Lo Presti et al., 2001). L'identification du séroroupe est réalisée suivant la structure antigénique (la protéine MOMP 'Major Outer Membran Protein', les lipopolysaccharides ...).

L'espèce *L. pneumophila* est responsable de la majorité des infections humaines, elle comporte 15 sérogroupes, le séroroupe 1 provoquant entre 70% et 90% des cas de légionellose. Les espèces et leurs sérogroupes sont répertoriés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Espèces et sérogroupes du genre *Legionella*^a (Fields et al., 2002)

	Espèce	Nombre de sérogroupes	Nombres de sérogroupes associés à une pathologie
1.	<i>L. pneumophila</i>	15	15
2.	<i>L. bozemanii</i>	2	2
3.	<i>L. dumoffii</i>	1	1
4.	<i>L. micdadei</i>	1	1
5.	<i>L. longbeachae</i>	2	2
6.	<i>L. jordanis</i>	1	1
7.	<i>L. wadsworthii</i>	1	1
8.	<i>L. hackeliae</i>	2	2
9.	<i>L. feeleeii</i>	2	2
10.	<i>L. maceachernii</i>	1	1
11.	<i>L. birminghamensis</i>	1	1
12.	<i>L. cincinnatiensis</i>	1	1
13.	<i>L. gormanii</i>	1	1
14.	<i>L. sainthelensi</i>	2	2
15.	<i>L. tucsonensis</i>	1	1
16.	<i>L. anisa</i>	1	1
17.	<i>L. lansingensis</i>	1	1
18.	<i>L. erythra</i>	2	1 ^b
19.	<i>L. parisiensis</i>	1	1
20.	<i>L. oakridgensis</i>	1	1
21.	<i>L. spiritensis</i>	1	0
22.	<i>L. jamestowniensis</i>	1	0
23.	<i>L. santacrucis</i>	1	0
24.	<i>L. cherrii</i>	1	0
25.	<i>L. steigerwaltii</i>	1	0
26.	<i>L. rubrilucens</i>	1	0
27.	<i>L. israelensis</i>	1	0
28.	<i>L. quinlivanii</i>	2	0
29.	<i>L. brunensis</i>	1	0
30.	<i>L. moravica</i>	1	0
31.	<i>L. gratiana</i>	1	0
32.	<i>L. adelaidensis</i>	1	0
33.	<i>L. fairfieldensis</i>	1	0
34.	<i>L. shakespearei</i>	1	0
35.	<i>L. waltersii</i>	1	0

36.	<i>L. genomospecies</i>	1	0
37.	<i>L. quateirensis</i>	1	0
38.	<i>L. worsleiensis</i>	1	0
39.	<i>L. geestiana</i>	1	0
40.	<i>L. natarum</i>	1	0
41.	<i>L. londoniensis</i>	1	0
42.	<i>L. taurinensis</i>	1	0
43.	<i>L. lytica</i>	1	0
44.	<i>L. drozanskii</i>	1	0
45.	<i>L. rowbothamii</i>	1	0
46.	<i>L. fallonii</i>	1	0
47.	<i>L. gresilensis</i>	1	0
48.	<i>L. beliardensis</i>	1	0

^a : Espèces présentées dans l'ordre chronologique de leur date d'isolement ou d'identification ; ^b : *L. erythra* SG 2 a été isolé chez l'homme
 Une 49^{ème} espèce est proposée par Kuroki et al. (2007), *L. yabuuchiae*
 Le génome de *L. pneumophila* et *L. longbeachae* est séquencé (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

1-3 : Présentation de la bactérie

1-3-1 : Morphologie

Les légionelles sont des bacilles à gram négatif de taille comprise entre 0,3 et 0,9µm de largeur et entre 2 et 20µm de longueur (Rodgers et al., 1978 ; Chandler et al., 1979 ; Winn, 1988). Ces bactéries sont aérobies strictes, non capsulées, non sporulées et peuvent présenter en culture des formes allongées parfois filamenteuses (Diederer, 2008).

Les légionelles sont mobiles à l'exception de trois espèces (*L. oakridgensis*, *L. londiniensis* et *L. natarum*), elles utilisent un ou plusieurs flagelles polaires ou subpolaires pour assurer une mobilité lente par glissement (Thomason et al., 1979) et sont couvertes par des pili distribués sur toute la surface des bactéries (Rodgers et al., 1979, Rodgers et al., 1980).

1-3-2 : Caractères culturels

Legionella est une bactérie incapable de se développer sur les milieux de culture classique utilisés au laboratoire, elle exige le fer et la L-cystéine pour sa croissance et pour son isolement sur gélose (Fields et al, 2002). Ces bactéries sont capables de se développer à des températures comprises entre 25 et 42°C et peuvent survivre à 60°C. Leur croissance est optimale dans un milieu légèrement acide (pH=6,9) mais elles peuvent tolérer un pH plus acide (jusqu'à 5,5).

Les légionelles sont des bactéries chimio-organotrophes et les acides aminés jouent un rôle indispensable dans leur métabolisme. L'arginine et l'acide L-glutamique surtout sont utilisés comme source d'énergie et de carbone. La température optimale de croissance est de 35°C et cette croissance est favorisée en présence de 2,5% de CO₂.

Legionella est cultivée sur un milieu de culture spécifique BCYE (Buffered Charcoal Yeast Extract) (Feeley et al., 1979) composé de charbon actif comme détoxifiant, d'extrait de levure comme source de protéines et d'un tampon ACES (acide N-(acétamido-2)-amino-2-éthane sulfonique). Elles ne sont pas cultivables sur gélose au sang.

Les colonies sont observées après un temps d'incubation qui varie entre 3 et 7 jours et sont généralement gris-bleu clair, d'autres couleurs pouvant être retrouvées (marron, vert...) (AFNOR, 2003). Elles présentent en outre un aspect dit en 'verre fritté' lorsqu'elles sont observées à la loupe binoculaire.

1-3-3 : Caractères métaboliques

Les légionelles sont des bactéries uréase-négatives, elles n'hydrolysent pas les sucres (ni fermentation ni oxydation) et sont catalases-positives (sauf *L. worleiensis*). Deux catalases ont été décrites (KatA et KatB) et quelques espèces, *L. pneumophila* inclus, ont la capacité d'hydrolyser l'hippurate (Hebert, 1981). Les réactions d'oxydase sont variables selon les espèces. La plupart d'entre elles produisent une β -lactamase.

40% à 90% des acides gras chez cette bactérie sont ramifiés (Lambert et Moss, 1989), ce point est notable, car ces acides gras sont fréquents chez les bactéries à gram positif et rares ou présents en très faible quantité chez les bactéries à gram négatif (Garrigues et Véron, 1987).

1-4 : Cycle de vie et différents phénotypes de *L. pneumophila*

Le cycle de vie de *L. pneumophila* est composé de différentes phases, parmi elles : la phase de réplication et la phase de transmission (figure 1).

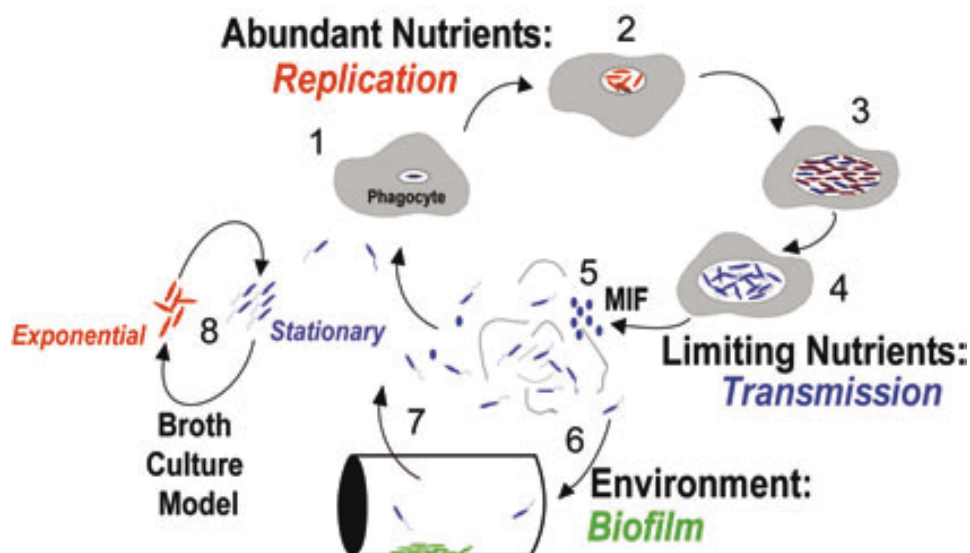


Figure 1 : Cycle de vie de *L. pneumophila* (Molofsky et Swanson, 2004)

Le cycle de vie biphasique a été initialement décrit par Rowbotham *et al.* en 1986. Il est caractérisé par l'alternance entre une forme de réplication et une forme de transmission. La bactérie a plusieurs caractéristiques dépendantes de chaque phase, elle est immobile, à paroi rugueuse et pauvre en substances de réserve (α -hydroxybutyrate) en phase de réplication, alors que la bactérie est plus petite, mobile, à paroi lisse et riche en inclusions de réserve en phase de transmission. A l'aide des outils génétiques modernes et par la modélisation des cultures synchrones, Molofsky et al. (2005) confirment l'existence de ces deux phases caractéristiques des cultures en milieu liquide : phases exponentielle et stationnaire.

Le régulateur CsrA est un élément clé de la phase de réplication en la favorisant et en inhibant la phase de transmission.

Lorsque les nutriments sont épuisés, la réponse stringente (par le biais de l'alarmone ppGpp) stimule le système LetA/S. Il s'en suit une augmentation de la concentration du facteur sigma S et l'entrée en phase stationnaire, ou en phase de transmission (Molofsky et Swanson, 2004) (figure 2A).

Lorsque la quantité de nutriments commence à diminuer, la multiplication est réprimée et la bactérie se différencie en une forme transmissible capable de se libérer de la cellule hôte, de survivre aux stress de son nouvel environnement et apte à établir une niche de réplication dans un nouveau phagocyte en échappant à la destruction lysosomale. Selon Swanson et Hammer (2000), le processus de différenciation serait déclenché par l'épuisement en acides aminés et par la production de la guanosine bis-pyrophosphate (ppGpp), le signal caractéristique de la réponse stringente. L'accumulation de cette alarmone stimule le système

A Replication Phase

Abundant Nutrients

Other Signals → SpoT? → [ppGpp] ^{high} → LetA/S → LetE → CsrB → CsrA

[amino acids] _{low} → RelA → [ppGpp] ^{high}

CsrA → RpoN/FleQ → FliA → flagellum/motility

CsrA → RpoS → Dot/Icm Secretion

CsrA → RpoS → stress resistance

CsrA → RpoS → cytotoxicity

CsrA → RpoS → endosome evasion/sodium sensitivity

CsrA → RpoS → Replication

Legend:

- Positive Regulation (solid red arrow)
- Negative Regulation (solid black arrow)
- Active Interaction in Replication Phase (red T-bar)
- Inactive Interaction in Replication Phase (black T-bar)
- Speculative Interaction (dotted line)

Transmission Traits:

stress resistance	flagellum/motility	lysosome evasion	cytotoxicity	endosome evasion/sodium sensitivity
-------------------	--------------------	------------------	--------------	-------------------------------------

B Transmission Phase

Limiting Nutrients

Other Signals → SpoT? → [ppGpp] ^{high} → LetA/S → LetE → CsrB → CsrA

[amino acids] _{low} → RelA → [ppGpp] ^{high}

CsrA → RpoN/FleQ → FliA → flagellum/motility

CsrA → RpoS → Dot/Icm Secretion

CsrA → RpoS → stress resistance

CsrA → RpoS → cytotoxicity

CsrA → RpoS → endosome evasion/sodium sensitivity

CsrA → RpoS → Replication

Legend:

- Positive Regulation (solid blue arrow)
- Negative Regulation (solid black arrow)
- Active Interaction in Transmission Phase (blue T-bar)
- Inactive Interaction in Transmission Phase (black T-bar)
- Speculative Interaction (dotted line)
- Required for trait (non-regulatory interaction) (green arrow)

Transmission Traits:

stress resistance	flagellum/motility	lysosome evasion	cytotoxicity	endosome evasion/sodium sensitivity
-------------------	--------------------	------------------	--------------	-------------------------------------

RpoS induit aussi FlhA favorisant la fuite de la bactérie, sa motilité, sa résilience et son infection d'un nouvel hôte phagocyte. Le système de sécrétion de type IV Dot/Icm est requis pour la cytotoxicité ainsi que l'évasion endosomale, probablement en exportant directement les effecteurs de virulence (Molofsky et Swanson, 2004) (figure 2B).

10

présentent sous forme de bâtonnets courts, à paroi très épaisse. Leur taux de respiration très faible est compatible avec un métabolisme réduit. Elles possèdent des traits communs avec les bactéries de phase stationnaire comme la composition de la membrane externe. Les MIF possèdent la protéine Hsp60 (qui agit comme invasine pour les cellules HeLa) dans leur membrane externe, contrairement aux bactéries en phase stationnaire. En plus de Hsp60, d'autres protéines comme DotO et DotH, se localisant sur la surface bactérienne pendant la phase de la fin de la multiplication intracellulaire (correspondant à la maturation MIF) peuvent jouer un rôle optimisant de l'infectiosité des MIF de *L. pneumophila* pour les nouveaux hôtes.

De plus, les formes MIF sont 10 fois plus infectieuses et ont montré une résistance accrue à la rifampicine (3 à 5 fois) et à la gentamicine (10 à 1000 fois) par rapport aux bactéries en phase stationnaire. Elles ont également une tolérance plus grande pour des pH élevés. Par conséquent, la forme MIF peut représenter une forme transmissible environnementale associée à la maladie des légionnaires (Garduno et al., 2002).

2- Ecologie des légionelles

Les légionelles sont des bactéries à tropisme hydrique. Elles affectionnent particulièrement les eaux tièdes et colonisent, à la faveur de conditions favorables, les réseaux d'eau chaude sanitaire et les circuits associés aux tours aéroréfrigérantes (Borella et al., 2005). Elles sont retrouvées dans des sources aussi diverses que l'eau sur les plantes dans les forêts, les eaux souterraines (Riffard et al, 2001; Brooks et al, 2004) et l'eau de mer (Ortiz-Roque & Hazen, 1987). La bactérie survit aussi dans des sources artificielles d'eau salée (Heller et al., 1998)

Legionella a des besoins nutritionnels très stricts (L-cystéine, fer) pour qu'elle soit cultivable au laboratoire et ces exigences sont en contradiction apparente avec leur large distribution dans les eaux. De plus, la matière organique de l'eau, toujours présente en faible quantité (de l'ordre du mg/L) favorise en priorité les autres bactéries autochtones qui sont en compétition avec les légionelles. Ces dernières peuvent survivre dans une large gamme de conditions environnementales (Fliermans et al., 1981), elles sont résistantes aux pH bas (elles peuvent résister à une exposition à pH 2,0 durant cinq jours dans l'eau (Ohno et al., 2003)) et ont été isolées à partir de sources environnementales allant d'un pH de 2,7 à 8,3 (Anand et al., 1983; Sheehan et al., 2005).

Le premier facteur qui affecte l'évolution des *Legionella* dans l'eau est la température. Les *Legionella* sont, en effet, surtout présentes dans les eaux réchauffées (Lee and West, 1991) des systèmes de conditionnement d'air, des tours aéroréfrigérantes, dans les réseaux d'eau chaude sanitaire. Elles ont été isolées à partir de systèmes d'eau chaude jusqu'à 66 °C, mais sont détruites quand la température dépasse 70 °C (Dennis et al., 1984; Dennis, 1988).

Dans les microcosmes expérimentaux, en cultures mixtes, les *Legionella* se multiplient entre 20 et 43 °C, et de façon optimale entre 30 et 40° C. Kusnetsov et al. (1996) ont constaté que la croissance des légionelles diminue à des températures supérieures à 44-45 °C, et que la température qui limite la croissance est comprise entre 48,4 et 50,0. La résistance de *Legionella* à la température, comparativement plus élevée que celle des autres bactéries hétérotrophes pourrait expliquer leur relative prédominance dans ces milieux. Quand la température descend en dessous de 37 °C, le taux de reproduction de la bactérie diminue et il y a peu ou pas d'augmentation du nombre de bactéries en dessous de 20 °C. Pourtant, quelle que soit la température, les *Legionella* ne peuvent que survivre dans une eau de robinet stérilisée (sans la présence de microorganismes). A ce jour, aucune expérience n'a pu montrer que les légionelles étaient en mesure de se multiplier par elles-mêmes dans l'eau (multiplication extracellulaire).

La survie et le développement de *Legionella* dans l'environnement sont essentiellement liés à deux facteurs : la présence dans des biofilms et l'interaction avec des protozoaires.

2-1 : La présence dans des biofilms

En 1901, Whipple rapporte l'importance de l'adhérence aux surfaces sur l'augmentation de l'activité bactérienne des micro-organismes d'origine hydrique. De nombreuses études ont reconnu, ensuite, l'importance des surfaces dans l'activité des microorganismes. La formation de biofilm se produit couramment dans des environnements naturels et artificiels et sur une gamme de surfaces différentes. Les biofilms constituent des structures qui permettent aux microorganismes de mieux résister aux conditions défavorables, comme les éléments nutritifs limités ou les températures extrêmes.

L'adhérence aux surfaces se produit généralement au moyen d'une substance polysaccharidique extracellulaire sécrétée par les cellules (Donlan, 2000). Cette substance (le glycocalyx) est une matrice de polysaccharide polyanionique extrêmement hydratée (97% d'eau) produite par une polymérase localisée au niveau du composant lipopolysaccharide de la paroi cellulaire (Morton et al., 1998 ; Costerton, 1999). La matrice peut être constituée de

protéines, lipides, polysaccharides, ADN et ARN (Shirtliff et al, 2002 ; Sutherland, 2001) qui peuvent fournir les différents éléments nécessaires à la croissance bactérienne (Leriche et al., 2000). Les biofilms naturels peuvent contenir des écosystèmes microbiens complexes composés de bactéries d'algues de levures et de protozoaires...(Shirtliff et al, 2002). Ces biofilms, qui peuvent inclure légionelles et protozoaires, peuvent se former sur les surfaces des réseaux d'eau chaude sanitaires ou dans les circuits d'eau de refroidissement mal entretenus. Le biofilm facilite l'échange d'éléments nutritifs et gazeux, et peut éventuellement protéger les micro-organismes non seulement des biocides, mais aussi des augmentations périodiques de température et des tentatives d'élimination physique, en particulier dans les zones où les surfaces sont difficilement accessibles ou corrodées. Les biofilms peuvent se former aux interfaces, en particulier à celles qui existent entre l'eau et des surfaces solides, mais ils sont également observés aux interfaces huile-eau. Les biofilms sont susceptibles de se former plus facilement là où existe un faible débit d'eau et où l'eau stagne.

La présence de gradients de nutriments, de pH et d'oxygène dans la matrice répond aux besoins des différents micro-organismes de la population (Wimpenny et al., 2000; Allison, 2003).

De nombreuses études sur "*Legionella* et biofilms" décrivent des communautés microbiennes naturelles (Colbourne et al, 1984; Colbourne & Dennis, 1985; Verissimo et al, 1990; Storey et al., 2004). Murga et al. (2001) ont étudié l'implantation et la multiplication de légionelles dans un biofilm artificiel composé de *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* et *Flavobacterium*. Ils ont observé que dans ces conditions, les légionelles ne se multiplient pas mais peuvent persister vivantes dans le biofilm. L'ajout de l'amibe *Hartmanella* a permis leur multiplication.

La littérature rapporte cependant que les légionelles pourraient tirer profit de la présence de certaines bactéries pour leurs nutriments et leur survie dans le biofilm. Ainsi, les légionelles peuvent former des colonies satellites autour de bactéries aquicoles telles que les *Flavobacterium*, les *Pseudomonas*, les *Alcaligenes* et les *Acinetobacter* dans des milieux solides qui ne permettent pas leur multiplication (Fliermans, 1996). La contribution à la survie et la multiplication des légionelles de certaines bactéries des biofilms n'est pas à exclure, mais n'est toujours pas démontrée à l'heure actuelle.

Legionella est plus résistante dans les biofilms que sous forme planctonique (Barker et al, 1992; Cargill et al, 1992; Surman et al., 1993; Santegoeds et al., 1998). Mais quel que soit son

état (sessile ou planctonique), la capacité de cette bactérie à se multiplier sans la présence d'hôtes cellulaires eucaryotes, n'est pour l'instant pas confirmée.

2-2 : Interactions avec les protozoaires

La description d'amibes (14 espèces) et d'autres protozoaires comme hôtes naturels des *Legionella* est bien illustrée dans la littérature (Fliermans, 1996 ; Atlas, 1999 ; Fields, 2002). Les légionelles sont des parasites d'au moins deux types de protozoaires : des amibes (*Acanthamoeba*, etc.) et des ciliés (*Tetrahymena*, etc.) qui peuvent accompagner les légionelles dans leurs biotopes naturels et dans les réseaux d'eau.

2-2-1 : Les amibes

Les amibes sont des protozoaires (unicellulaires eucaryotes), de taille variant entre 20 µm et 1mm de longueur mais souvent comprise entre 200 et 500 µm. Elles se déplacent à l'aide de pseudopodes par de multiples déformations du cytosquelette, et peuvent plus rarement être équipées de flagelles pour assurer leur mobilité. Elles se reproduisent de façon asexuée par mitose et n'ont pas de forme définie.

Les amibes ne sont pas photosynthétiques et se nourrissent principalement de microalgues ou d'autres protozoaires plus petits tels que des euglènes, diatomées, chlorelles... par phagocytose.

Dans l'environnement, on distingue deux formes différentes d'amibes : les amibes libres qui sont capables de vivre de façon autonome dans l'environnement sans la présence d'un hôte et les amibes parasitaires qui se développent généralement peu dans l'environnement et sont en permanence à la recherche d'un hôte.

Les amibes libres peuvent coloniser les réseaux d'eau et ont été isolées à partir de nombreuses sources : eaux d'arrosage (Hoffmann et Michel, 2001; Thomas et al., 2008), réseaux d'eau potable (Rohr et al., 1998 ; Kilvington et al., 2004 ; Thomas et al., 2008) et de refroidissements (Barbaree et al., 1986).

Les amibes libres les plus fréquemment isolées dans les réseaux d'eaux potables sont les *Naegleria*, les *Acanthamoeba*, et les *Hartmannella*. Les espèces du genre *Acanthamoeba* sont en outre, à ce jour, les plus fréquemment rencontrées dans les infections humaines.

Le cycle de vie des amibes libres, telles qu'*Acanthamoeba* ssp., se caractérise par deux formes, une forme végétative métaboliquement active et mobile : le trophozoïte, et une forme immobile de résistance à des conditions environnementales hostiles : le kyste (Philippe et al., 2006). Les trophozoïtes se différencient en kystes lorsque les conditions de vie deviennent défavorables : déficit en matières nutritives, chaleur, froid et dessiccation (Byers et al., 1991).

Au cours de la phase d'enkystement, les amibes s'arrondissent et forment deux couches distinctes : l'endokyste, contenant de la cellulose et l'ectokyste, contenant différents polysaccharides et protéines (Khunkitti et al., 1998; Lloyd et al., 2001). Les kystes sont métaboliquement inactifs et peuvent rester viables pendant plus de 20 ans (Mazur et al., 1995 ; Sriram et al., 2008).

Interaction amibes libres - *Legionella*

Les amibes libres sont d'importants prédateurs qui contrôlent des communautés microbiennes. La présence commune de ces protozoaires dans les milieux hydriques associée avec des bactéries permet aux amibes de les ingérer et les utiliser comme matières nutritives. Certaines bactéries ont évolué et sont devenues résistantes à ces protozoaires. Parmi celles-ci, on retrouve des bactéries pathogènes telles que les *Legionella* spp mais aussi des bactéries des genres *Chlamydomyxa*, *Mycobacterium*, *Listeria*, *Pseudomonas* (Greub et Raoult, 2002).

La très probable impossibilité des *Legionella* à se multiplier à l'extérieur d'un hôte constitue un argument fort pour rendre les protozoaires seuls candidats potentiels de la multiplication des *Legionella* dans les réseaux et finalement les premiers responsables de la pression de sélection exercée dans le milieu (Leclerc, 2005). De plus, le passage dans ces protozoaires a un effet remarquable sur la bactérie en permettant une expression de la virulence (Kramer et Ford, 1994). Les bactéries déjà passées à travers des amibes ont ainsi une infectiosité plus grande pour les cellules épithéliales (Cirillo et al., 1994). Le passage dans les amibes peut être aussi considéré comme réactif des bactéries VBNC (viable but nonculturable), parce qu'il permet de redonner une cultivabilité aux bactéries non cultivables (Steinert et al, 1997 ; Snelling et al., 2006 ; Alleron et al., 2008). Le cycle de multiplication des légionelles dans un réseau d'eau est présenté en figure 3.

Les amibes peuvent fournir aux légionelles une protection jusqu'à que les conditions de vie redeviennent favorables (Barbaree et al., 1986). La capacité des trophozoïtes à former des

kystes (quand les conditions de vie sont défavorables) peut être aussi exploitée par les légionelles. Kilvington et Price (1990) ont ainsi retrouvé des légionelles dans des kystes amibiens.

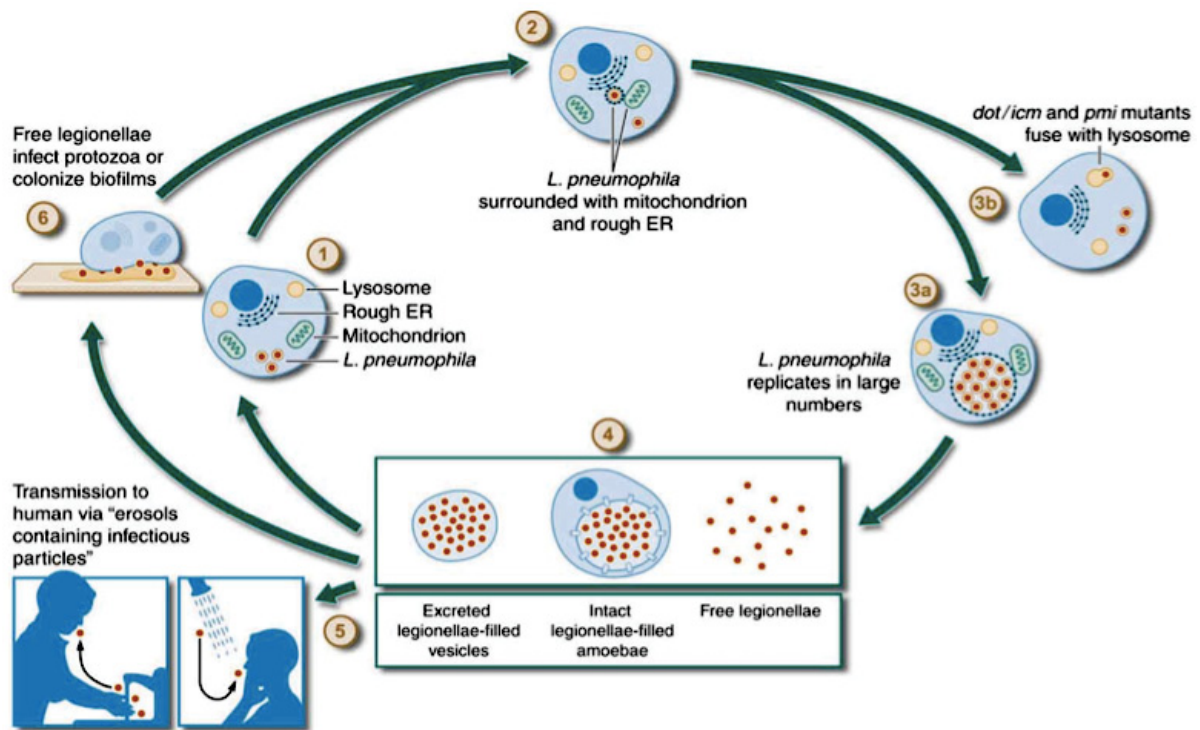


Figure 3 : la vie environnementale de *Legionella* dans les protozoaires (Molmeret et al., 2004)

Le mécanisme de l'interaction entre les amibes et les légionelles a été fortement étudié ces dernières années. Ces études démontrent la complexité de ce mécanisme ainsi que la présence chez *Legionella* de processus d'attachement diversifiés pour les protozoaires et pour une grande variété de cellules animales (cellules phagocytaires ou non) (Harb et al., 1998 ; Venkataraman et al., 1998)

La plupart des légionelles sont en effet internalisées dans les amibes par endocytose, ce qui représente un mode conventionnel de phagocytose. En 2000, Swanson et Hammer ont mis en évidence un mode inhabituel de phagocytose: le mode « coiling », caractérisé par la formation d'un pseudopode long et fin qui s'enroule autour de la bactérie, créant ainsi une vésicule d'emprisonnement.

De nombreuses études ont détaillé la phagocytose par endocytose (Garin et al., 2001 ; Kagan et Roy, 2002 ; Kagan et al., 2004). Le phagosome contenant *Legionella* évite les interactions avec les endosomes, et ne fusionne pas immédiatement avec le compartiment lysosomal (Horwitz, 1983). Ce phagosome se met en contact de façon transitoire avec des mitochondries

et commence, dans les 5 minutes suivant l'internalisation, à recruter des vésicules du réticulum endoplasmique rugueux (RER) (Tilney et al., 2001). Dans les heures qui suivent, le phagosome maintient les interactions avec les vésicules du RER et *Legionella* commence la réplication dans le phagosome entourée d'une membrane qui ressemble au RER.

Les légionelles restent au stade de réplication jusqu'à épuisement du milieu, notamment le manque d'acides aminés entraîne l'activation du régulon de la phase stationnaire, ce qui donne naissance à des bactéries aptes à résister aux stress de la vie aquatique. A ce stade, les légionelles commencent l'expression de facteurs de virulence qui leur permettent de quitter les amibes et les rendent capables d'infecter de nouvelles cellules hôtes (Swanson et Hammer, 2000).

A la fin de la phase répliative, le déclenchement de la mise en place des pores est activé. Les pores sont insérés en premier temps dans la membrane du phagosome permettant aux bactéries de sortir et d'accéder au cytoplasme de l'amibe. Ensuite les pores sont formés et insérés dans la membrane plasmique de l'amibe permettant sa lyse et l'échappement des légionelles vers le milieu extracellulaire (Harb et al., 2000).

2.2.2 : *Tetrahymena*

Les *Tetrahymena* (Figure 4) sont des ciliés libres piriformes, fréquents dans l'eau douce de taille comprise entre 28 et 250 µm selon les espèces (Elliot, 1973). Elles appartiennent à la classe des *Oligohymenophorea*, sous-classe *Hymenostomia*, ordre *Hymenostomatida*, sous-ordre *Tetrahymenina* (Corliss, 1984; 1994). Ces protozoaires sont équipés de deux lignes de cils qui permettent leur déplacement : les méridiens principaux avec un nombre compris entre 17 et 42 qui alternent avec des méridiens secondaires. Ils sont équipés d'une zone buccale située à proximité du pôle antérieur de la cellule, la position de cette zone désignant la surface ventrale de la cellule (Elliot, 1973).

Dans les conditions naturelles, les espèces de *Tetrahymena* utilisent diverses sources de nourriture. La plupart se nourrissent de bactéries, mais quelques unes comme *T. chironimi* et *T. rostrata* sont des parasites facultatifs qui vivent sur les tissus et les fluides corporels de leurs hôtes (Corliss, 1962). L'entrée des nutriments dans *Tetrahymena* peut suivre plusieurs chemins et utiliser différents mécanismes : (i) diffusion à travers la membrane cellulaire (uniformément sur toute la surface ou à des endroits spécifiques et par le biais de la

membrane de la vacuole digestive) et (ii) transport actif, pinocytose ou phagocytose. Le mode d'entrée des nutriments dépend de la nature des aliments, des conditions environnementales qui entourent le cilié ainsi que son état physiologique. L'eau, les ions et les molécules non polaires, par exemple, peuvent entrer par diffusion, transport actif et pinocytose alors que les macromolécules et les particules entrent par pinocytose et phagocytose (Elliot, 1973).



Figure 4 : *Tetrahymena tropicalis* (LCME-Poitiers, ce travail)

Tetrahymena peut ingérer avec une grande efficacité des particules mobiles ou non, faciles à digérer ou non. Plusieurs études ont ainsi été réalisées pour observer l'ingestion de différentes particules non mobiles. Les résultats montrent que *Tetrahymena* ingère sous des conditions appropriées de l'or colloïdal, du latex et du charbon (Elliot et Clemmons, 1966 ; Chapman-Andressen et Nilsson, 1968).

Tetrahymena montre en outre un considérable pouvoir de sélection quand le milieu contient un mélange de particules consommables et non consommables. Par exemple *T. pyriformis* ingère avec sélectivité les bactéries dans un milieu contenant un mélange de bactéries et d'or colloïdal, alors qu'elle ingère ces mêmes particules d'or colloïdal quand il n'y a pas de bactéries dans le milieu (Elliot et Clemmons, 1966).

Plusieurs espèces bactériennes et levuriformes (Harris, 1967) peuvent servir de nutriments qu'elles soient vivantes ou mortes. Le taux d'alimentation de bactéries par *T. pyriformis* a été étudié par Curds et Cockburn (1969), qui ont trouvé que ce taux dépendait de la concentration simultanée des bactéries et des ciliés dans le milieu.

L'interaction entre *Tetrahymena* et nombreuses bactéries telles que *L. pneumophila* a été plus intensément étudiée durant les dernières années, suite à l'observation et l'identification de

différentes espèces de *Tetrahymena* dans les mêmes lieux que *L. pneumophila* ainsi que l'utilisation de ce protozoaire comme un hôte par *L. pneumophila*.

Interactions *Tetrahymena*-*Legionella*

Les *Tetrahymena* sont des protozoaires parfois isolés avec des amibes et des *Cyclidium* sp. dans l'eau des tours de refroidissement contenant des légionelles. Ce fut le cas sur un site particulièrement impliqué dans la propagation d'une épidémie de légionellose (Barbaree et al., 1986). Contrairement aux amibes, le rôle joué par les ciliés comme réservoir naturel de *L. pneumophila* n'est pas clair et reste controversé (Berk et al., 2008).

Barbaree et al. (1986) ont montré que les *Tetrahymena* sp. peuvent favoriser la multiplication intracellulaire de *L. pneumophila* et que ces protozoaires peuvent être des réservoirs pour la survie et la multiplication de légionelles dans l'eau des tours de refroidissement. *T. pyriformis* par exemple, permet la multiplication de *L. pneumophila* à 35°C (Fields et al., 1984 ; Barbaree et al., 1986 ; Fields et al., 1986) alors que cette croissance est limitée à 25°C dans la même espèce (Fields et al., 1984). Une autre espèce, *T. vorax* ne permet pas la multiplication de *L. pneumophila* à 20-22°C (Smith-Somerville et al., 1991). Cependant, dans tous les cas (même en absence de croissance observée), *L. pneumophila* ingérée par les ciliés survit dans les vacuoles alimentaires (Berk et al., 2008).

Après avoir été ingérées par *Tetrahymena*, les légionelles sont expulsées dans des vésicules vers le milieu extérieur. Ces vésicules contenant des légionelles vivantes sont accumulées sous forme d'aggrégats (Berk et al., 2008). *Tetrahymena* peut ainsi générer un grand nombre de vésicules libres chargées de légionelles (McNealy, 2002).

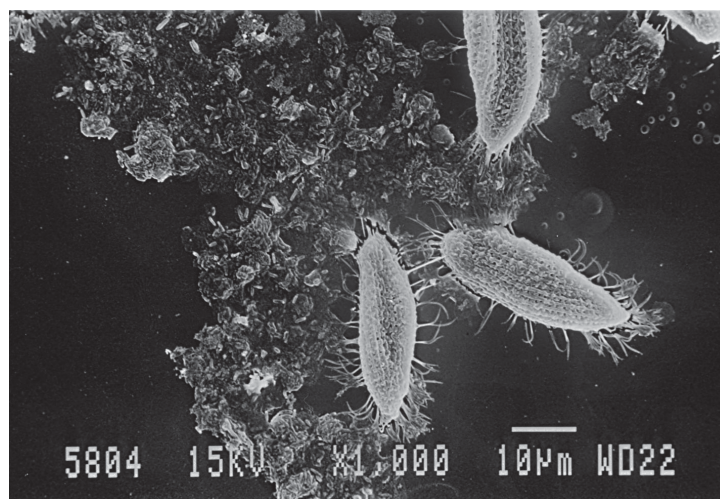


Figure 5 : Coculture *L. pneumophila*- *T. tropicalis* (LCME – Poitiers, ce travail)
Quelques protozoaires entourés de nombreux amas de « pellets » de légionelles
Photo prise après cinq jours de co-culture.

La production massive de vésicules (Figure 5) est un processus rapide qui se produit sans réplication des légionelles dans le cilié et qui dépend du système Dot/Icm utilisé par les légionelles pour s'échapper de la digestion dans *Tetrahymena*. Le système Dot/Icm est un système de sécrétion de type IV permettant une modification de la voie endocytaire des protozoaires infectés. Ce système implique un très grand nombre des gènes dont les produits sont sécrétés et qui sont nécessaires à la croissance intracellulaire. Le terme précédemment utilisé de vésicule peut être remplacé par le terme "pellet" parce que les légionelles expulsées ne sont pas entourées d'une membrane continue et que les fragments associés à la membrane de la "vésicule" sont d'origine bactérienne (Berk et al., 2008).

Le taux de formation des pellets de légionelles varie selon le ratio nombre de bactéries/nombre de ciliés. Garduno al. (2006) ont montré que pour un ratio de 10^2 bactéries par cilié, *Tetrahymena* produit ~ 1 pellet/heure alors qu'avec un ratio de 10^4 , la quantité produite sera de l'ordre de ~ 5 pellets/heure. Un pellet contient ~ 100 légionelles vivantes avec un diamètre moyen de $4,2 \mu\text{m}$ et un volume estimé de $38.8 \mu\text{m}^3$. Une autre étude concernant le ratio de production de pellets a montré qu'après 24 heures de co-incubation avec des ratio bactérie/*Tetrahymena* de 100, 1000 et 10000, le nombre moyen de pellets/*Tetrahymena*/heure était de 1, 2 et 5 respectivement (Berk et al., 2008).

Le taux de production de pellets diminue progressivement du fait de la diminution de la quantité de bactéries libres dans le milieu extracellulaire et de la présence des bactéries ingérées par le cilié non encore expulsées.

Après 50 minutes de co-incubation avec des légionelles, les premières pellets sont produites et *Tetrahymena* passe alors d'un cilié fusiforme très mobile vers un cilié rond et très peu mobile. A ce stade, le nombre des vacuoles alimentaires dans le cilié reste constant, le nombre des nouvelles vacuoles formées équivalant alors au nombre des pellets produits (Elliot, 1973 ; Chapman-Andresen et Nilsson, 1968).

La composition des pellets a été étudié par Berk et al. (2008). Certaines de ces formations sont composées de légionelles serrées les unes contre les autres, avec des matériaux translucides et des fragments de membrane remplissant les espaces entre les cellules bactériennes. D'autres pellets contiennent moins de bactéries et plus de fragments de membranes.

Les légionelles ingérées par *Tetrahymena* ont la capacité de se différencier d'une forme stationnaire (FS) vers une forme plus virulente, la forme mature intracellulaire (FMI). Une étude récente réalisée par Faulkner et al. (2008) montre que les FS peuvent rapidement (<1h) et directement (sans réplication bactérienne) se différencier en FMI pendant le passage dans *T. tropicalis*. Ces FMI sont des formes très infectieuses pour les cellules en cultures et sont résistantes aux stress environnementaux (Garduno et al., 1998 ; Garduno et al., 2002).

Observées au microscope, les FMI présentent un cytoplasme dense aux électrons avec de grosses inclusions. Leurs membranes sont complexes et différent de celles des FS, typiquement de bactéries Gram négatives. Les FMI ne présentent pas de signes de division cellulaire, contrairement aux légionelles FS (Byrne et Swanson, 1998 ; Faulkner et Garduno, 2002 ; Joshi et al., 2001). Ces FMI sont de 10 à 100 fois plus infectieuses pour les cellules HeLa que les FS, ont un taux de respiration très faible et sont plus résistantes aux antibiotiques, aux pH élevés et à la lyse par les détergents.

Malgré toutes ces différences, les FS et les FMI ont des points communs, comme la capacité à infecter des cellules en culture, la résistance à la chaleur et la présence d'inclusions cytoplasmiques (Garduno et al., 2002).

L'interaction entre *Tetrahymena* et les légionelles peut prédisposer ces bactéries à infecter l'homme par leur empactage dans des unités infectieuses respirables contenant une centaine de FMI. Ces ciliés pourraient alors jouer un rôle, insuffisamment pris en compte à l'heure actuelle, dans la transmission de la légionellose.

2.2.3 : Matières minérales et *Legionella*

L'attachement des bactéries aux surfaces, les facteurs qui influencent ce processus, ainsi que la formation ultérieure de biofilm ont été très étudiés ces dernières années (Bos et al, 1999; Riedewald, 2006 ; Advincula et al, 2007). Les microorganismes ont une forte tendance à s'associer aux surfaces (Lappin-Scott et Costerton, 1989). Une fois les microorganismes fixés à une surface, un processus en plusieurs étapes débute, conduisant à la formation d'un complexe constituant finalement une communauté microbienne, "le biofilm".

Le biofilm, communauté microbienne pouvant contenir des bactéries, des levures, des champignons et des protozoaires, adhère à une surface et est entouré par une matrice composée de polymères organiques (Shircliff et al, 2002). Ce biofilm peut jouer un rôle important en tant que niche de protection protégeant les bactéries contre des agents antimicrobiens et des conditions environnementales défavorables (Elkins et al, 1999).

L'influence de la présence de minéraux sur la contamination microbienne et sur l'adhérence des bactéries aux surfaces n'a été que peu étudiée. Borella et al (2003) ont étudié la relation entre la présence de cuivre et de manganèse sur la colonisation de réseaux domestiques par *Legionella* spp. Leurs résultats montrent que cette colonisation est inhibée par le cuivre et renforcée par le manganèse, avec des concentrations basses pour ces deux minéraux ($>50\mu\text{g/l}$ et $>3\mu\text{g/l}$, respectivement). D'autre part, le risque d'une contamination de l'eau par *Legionella* est six fois moindre quand la concentration en cuivre dans l'eau dépasse $50\mu\text{g/l}$ (Borella et al., 2004).

D'autres minéraux comme le zinc et le fer sont des éléments importants pour la croissance microbienne (Hantke, 2001), et en particulier pour *L. pneumophila*, qui est fer-dépendante et contient une superoxyde dismutase et une zinc-métalloprotéase, un facteur de pathogénie important (James et al, 1997; Sahney et al, 2001). La présence du fer et son influence sur l'adhérence et la formation de biofilms ont été étudiés par Hindré et al (2008). Leurs résultats ont démontré qu'une concentration élevée en pyrophosphate de fer (1,25 vs 0,25 g/l) était défavorable à la formation de biofilm avec *L. pneumophila* Lens. La concentration en zinc peut aussi avoir un rôle dans la présence ou l'absence de *Legionella* dans l'eau. Borella et al. (2004) ont ainsi montré qu'une concentration en zinc $< 20\text{mg/l}$ semble être protectrice contre la colonisation des réseaux par *Legionella*.

La présence d'ion argent sur *Legionella* a montré une totale inhibition de cette bactérie après 6 heures d'exposition à une solution à $0,05\text{mg/l}$ d'ion Ag (Miyamoto et al., 2000).

La présence de différents minéraux dans l'eau pourrait être considérée comme un indicateur de risque de colonisation bactérienne et de présence de biofilm. Par exemple, l'étude réalisée par Borella et al. (2003) a montré que la contamination microbienne de l'eau domestique est liée à sa composition minérale. Des concentrations élevées en calcium et basses en fer ont été corrélées à la présence de *Pseudomonas* spp. Une autre étude réalisée en 2004 montre qu'on peut prévoir l'absence de colonisation de *Legionella* dans des eaux chaudes contenant de faibles concentrations en fer, en zinc et en manganèse et des concentrations élevées en cuivre (Borella et al., 2004).

Une bonne compréhension de l'interaction entre les minéraux et la colonisation des réseaux par légionelles pourrait aider à proposer des solutions plus efficaces concernant le traitement du risque légionelles dans les réseaux d'eau. Plusieurs études réalisées sur cette interaction montrent que la présence des ions cuivre et argent a été plus efficace que le traitement thermique pour l'élimination de *L. pneumophila*. Un traitement avec le cuivre et l'argent a réduit le taux de *L. pneumophila* de 72% à 2% alors que le traitement thermique a échoué à établir un contrôle à long terme (Mietzner et al., 1997).

3- Pouvoir pathogène de *L. pneumophila*

3.1- Mode de contamination et de transmission

La contamination par *Legionella* se fait par l'inhalation d'aérosols contaminés par cette bactérie (Fields et al., 2002). Pour que *Legionella* soit capable d'arriver aux alvéoles, d'infecter et de détruire les macrophages pulmonaires, les aérosols qui portent ces bactéries doivent avoir certaines caractéristiques en particulier concernant la taille des gouttelettes et leur concentration en légionelles. Le diamètre des gouttelettes doit être inférieur à 5µm pour qu'il puisse atteindre les alvéoles pulmonaires (Girod et al., 1982 ; Bollin et al., 1985) et supérieur à 2µm pour qu'il puisse contenir une ou plusieurs bactéries (Baron et willeke, 1986).

A l'heure actuelle, concernant la légionellose, aucune contamination ni transmission interhumaine ou manuportée n'a été démontrée, aucun isolement septique n'est donc nécessaire dans le cas d'un patient atteint (Benhamou et al., 2005).

3.2- Facteurs de virulence

Les différents facteurs de virulence de *L. pneumophila* sont exprimés sous formes physiologique, phénotypique et génétique. On retrouve, parmi d'autres, des facteurs de surfaces et des facteurs de sécrétion.

3.2.1- Facteurs de surfaces

La pathogénicité de *Legionella* est due à plusieurs structures présentes sur la surface bactérienne. Le lipopolysaccharide (LPS) est l'un des facteurs essentiels des membranes des bactéries à gram négatif. C'est une endotoxine et un important déterminant immunogène de la surface cellulaire de *Legionella* (Helbig et al., 1997 ; Mintz et al., 1992). Il a un rôle important dans l'adhérence de la bactérie à la muqueuse respiratoire (Steinert et al., 2002).

La protéine « Major Outer Membran Protein » (MOMP) est la protéine majeure de la membrane externe (Engleberg et al., 1986). La taille de cette protéine chez *Legionella* se situe entre 24 et 33 KDa (Gabay et Horwitz, 1985; Nolte et Collin, 1986). Gabay et al. (1985) ont démontré que cette protéine a le même rôle que des porines d' *E. coli*, qu'elle est capable de s'insérer dans les membranes, incluant celles des cellules hôtes, et d'ouvrir des canaux permettant le passage des ions en particulier les cations.

Sans MOMP, les légionelles conservent leur capacité à se multiplier dans les cellules mais perdent la capacité à les infecter (Cianciotto et al., 1989).

D'autres facteurs d'attachement sont décrits. Par exemple, les pili de type IV peuvent médier un attachement indépendant du complément à des cellules hôtes de mammifères (Stone et Abu Kwaik, 1998; Soderberg et al., 2004). Ou encore, la protéine de choc thermique (Hsp60), induite pendant la croissance dans les macrophages ou sous l'action de la chaleur permet l'attachement et l'entrée des légionelles dans les cellules HeLa (Hoffman et al., 1990 ; Garduno et al., 1998a).

Les flagelles de *L. pneumophila* ont un effet favorisant la mise en place de l'infection, mais n'ont pas d'influence sur le phénomène d'attachement ou d'adhérence. Ils ne seraient pas nécessaires non plus à la réplication intracellulaire dans les cellules hôtes. Leur effet positif est de permettre aux bactéries d'avoir plus de chance de rencontrer les cellules hôtes et les flagelles renforceraient ainsi leur capacité d'invasion (Dietrich et al., 2001).

Parmi les facteurs de surface, Mip (Macrophage infectivity potentiator) est une protéine homodimérique de 24 KDa exprimée de façon constitutive durant la croissance intracellulaire

de la bactérie (Köhler et al., 2000). Cette protéine, exposée à la surface des bactéries extracellulaires, est nécessaire pour les premières étapes d'infection des cellules hôtes (Cianciotto et al., 2001) et contribue à la survie intracellulaire de *Legionella* dans les macrophages, les cellules épithéliales et les protozoaires (Steinert et al., 2002).

3.2.2- Facteurs sécrétés

L. pneumophila sécrète plusieurs composés dans le milieu extracellulaire comme des enzymes, des pigments et des substances toxiques. Parmi ces composés, la protéine legiolysin (Lly) est responsable de l'activité hémolytique et provoque le brunissement du milieu de culture qui peut être observé à l'œil nu (Wintermeyer et al., 1991). Cette protéine n'a pas d'influence sur la réplication intracellulaire chez les hôtes amibiens ou dans des cellules de type macrophage, mais le mutant négatif *lly* montre une résistance nettement plus basse à la lumière que le type sauvage, indiquant une contribution de la protéine Lly à l'adaptation écologique des *Legionella* (Steinert et al., 1995).

Le système de sécrétion le plus important pour la mise en place de l'infection intracellulaire est le système *Dot/Icm* (Defective in organelle trafficking et Intracellular multiplication). C'est un système de sécrétion de type IV similaire au système de transfert utilisé pour la conjugaison (Segal et Shuman, 1998; Segal et al., 1999). Cet appareil exporte les facteurs de virulence qui inhibent la fusion phago-lysosome et reprogramment la vacuole qui contient les légionelles.

3.3- La légionellose

Les différentes manifestations cliniques dues à *Legionella* sont regroupées sous le terme général de légionellose. Cette maladie est à déclaration obligatoire en France depuis 1987. On a rapporté 1206 cas de légionellose en 2009 et 310 cas ont été déclarés en France jusqu'en juin 2010 selon l'Institut National de Veille Sanitaire (<http://www.invs.sante.fr>).

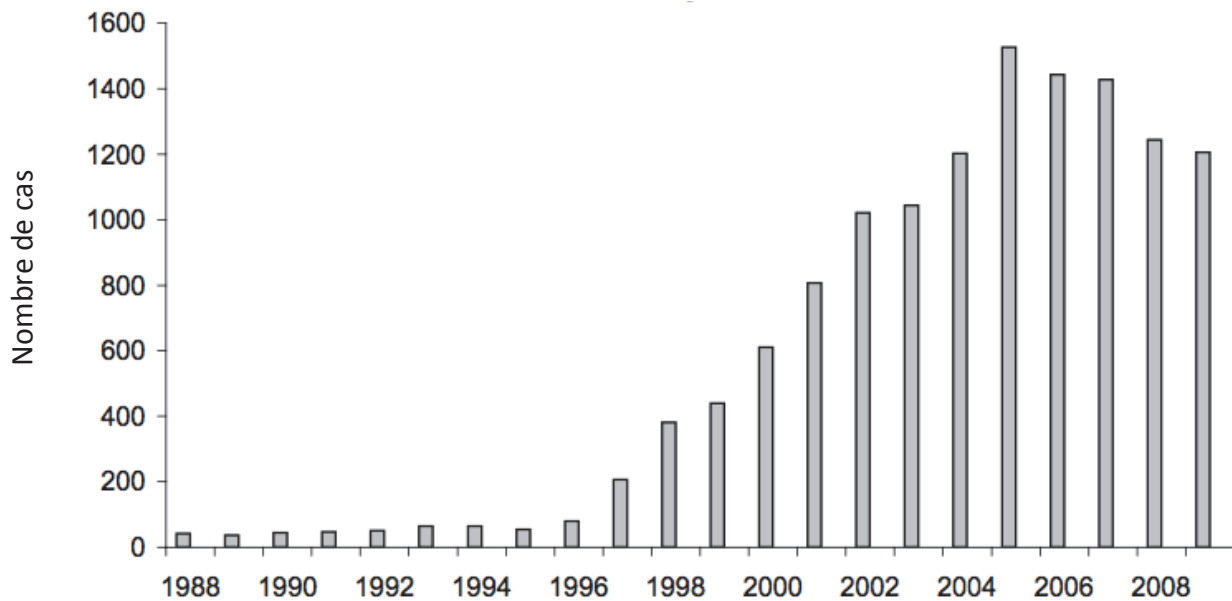


Figure 6 : Evolution du nombre de cas de légionellose en France, 1988-2009
(http://www.invs.sante.fr/surveillance/legionellose/donnees_2009/evolution_et_incidence_do_1988_2009.pdf)

De nombreuses investigations au cours de cas de légionellose ont été réalisées depuis 1998 pour déterminer l'origine de ces contaminations. Dans plusieurs cas, (Paris 1998, Lens 2003-2004..), des tours aérorefrigérantes contaminées ont été incriminées.

L'infection de l'homme peut revêtir sous trois formes : la fièvre de Pontiac, la légionellose et la légionellose extra-pulmonaire.

3.3.1- la fièvre de Pontiac

La fièvre de Pontiac est une maladie aiguë non mortelle, guérissant de façon spontanée en 2 à 5 jours. C'est une légionellose bénigne avec une courte période d'incubation qui ne provoque pas de pneumonie. Elle a été découverte en 1968 suite à une épidémie à Pontiac (Glick et al., 1978).

3.3.2- la maladie du légionnaire

La maladie du légionnaire est une infection pulmonaire aiguë et grave, débutant par un syndrome pseudo-grippal après une période d'incubation de 2-10 jours ou plus (WHO, 2004) (Den Boer et al 2002; Lettinga et al, 2002). Les premiers symptômes sont souvent non spécifiques : une légère rhinite, une fièvre, une sensation de malaise et des douleurs musculaires. Environ la moitié des patients présentent des expectorations parfois striées de sang. Plus tard, les symptômes deviennent plus marqués avec l'apparition d'une forte fièvre,

de bronchiolite, d'alvéolite, et une atteinte pulmonaires avec des infiltrats (Bartram et al., 2007).

La maladie du légionnaire survient chez les personnes fragilisées (personnes âgées, immunodéprimées, fumeurs..) et peut avoir un taux de mortalité important, atteignant parfois 15-20% en absence d'un traitement antibiotique adapté.

3.3.3- la légionellose extra-pulmonaire

Cette forme de légionellose rare mais dangereuse atteint les patients immunodéprimés. Les légionelles disséminent des poumons vers les autres tissus et organes provoquant des manifestations cliniques très sévères (Muder et Yu, 2002).

3.4- Infection des cellules humaines

3.4.1- Infection des macrophages

L'infection des macrophages alvéolaires est l'élément essentiel dans la pathogénicité de la maladie du légionnaire (Cianciotto et al., 1995). Plusieurs études concernant les mécanismes moléculaires de la réplication intracellulaire des légionelles dans les protozoaires et dans les macrophages humaines ont montré des similitudes flagrantes dans les procédés d'infection de ces deux types cellulaires qui sont très éloignés sur l'arbre phylogénétique (figure 7). Les amibes peuvent fournir aux légionelles la possibilité d'effectuer leur réplication, représentant une première adaptation des bactéries aux environnements intracellulaires. D'après Cirillo et al. (1994), l'interaction de *L. pneumophila* avec les amibes dans l'environnement améliorerait même leur capacité à infecter les macrophages humains par l'expression de facteurs de virulence.

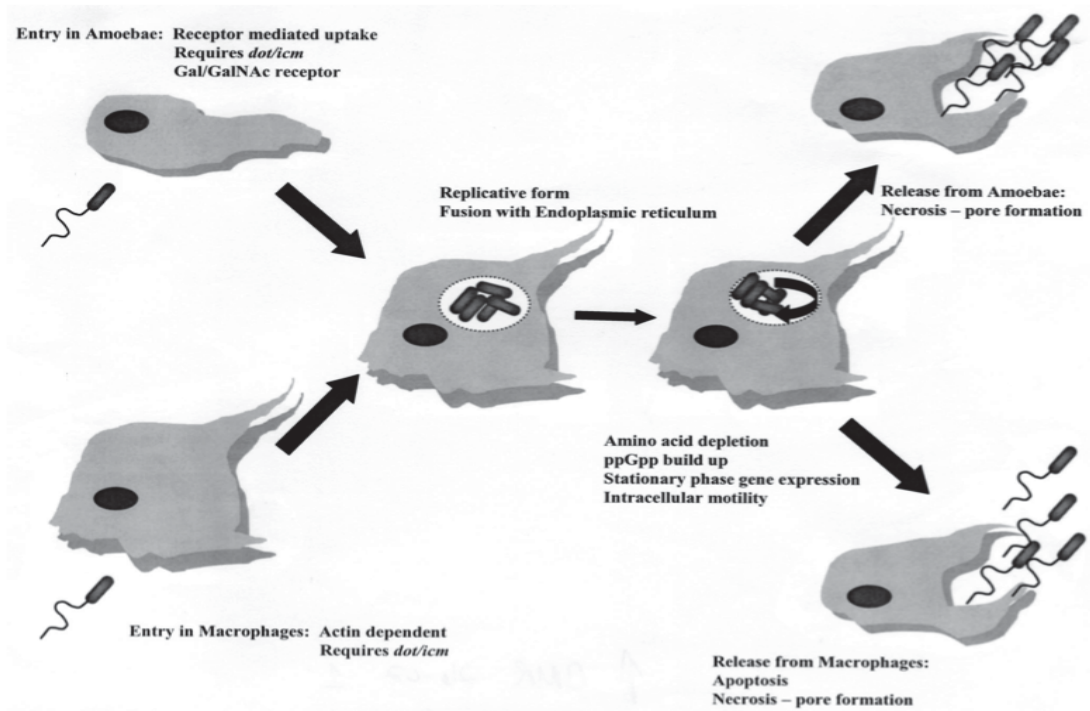


Figure 7 : Cycle de vie de *L. pneumophila* dans les protozoaires et les macrophages (Fields et al., 2002)

L'attachement se produirait, en présence de sérum, entre les bactéries opsonisées et les récepteurs CR1 et CR3 des macrophages (Payne et Horwitz, 1987) par l'intermédiaire de la protéine majeure de membrane externe (MOMP). L'attachement peut également survenir en l'absence de complément (Rodgers et Gibson, 1993; Elliott et Winn, 1986).

L'attachement de *L. pneumophila* aux monocytes et aux macrophages se produit selon le mode de phagocytose classique et le mode « coiling » (Horwitz, 1984; Rechnitzer et Blom, 1989 ; Dowling et al., 1992) sans effet dans le trafic ultérieur des légionelles dans les macrophages.

Dans les quelques minutes qui suivent l'internalisation, le même phénomène décrit pour les amibes se répète, avec une inhibition de la fusion phago-lysosome et une réplication intracellulaire.

Après l'épuisement des ressources nutritives, en particulier les acides aminés, les légionelles évoluent vers la phase stationnaire et deviennent capables de former des pores membranaires dans les macrophages et provoquer leur lyse (Kirby et al., 1998).

La même étude suggère la présence d'au moins deux types de pores qui s'insèrent dans les membranes de la cellule hôte au cours des différentes phases de l'infection. Le premier « pore d'invasion » est inséré dans la membrane du phagosome au début de l'infection, permettant le

transfert des effecteurs dans le cytoplasme de la cellule hôte ainsi que la poursuite du processus infectieux. Le deuxième « pore de sortie » est formé à la phase terminale de la réplication et est indispensable à la lyse de la cellule hôte par son pouvoir cytotoxique (toxine Rib). Des mutants spontanés, désignés *rib* (release of intracellular bacteria), ont été identifiés, ils sont capables de croissance dans les macrophages mais impuissants en sortir. Ces mutants gardent la capacité de former les pores d'invasion mais sont défectifs pour les pores de sortie associés à la cytotoxine.

Le système de sécrétion de type IV a un rôle important dans ce phénomène. L'apoptose n'a été jamais observée chez les protozoaires tels que *A. castellanii* et *A. polyphaga*.

La mort cellulaire peut survenir par nécrose aussi bien chez les macrophages que chez les protozoaires. Elle est induite par la toxine Rib formatrice de pores. Le phénomène de nécrose est indispensable à *Legionella* pour se libérer de la cellule hôte (Leclerc, 2005).

3.4.2- Infection des pneumocytes

La paroi alvéolaire est composée des macrophages et de cellules épithéliales (pneumocytes) de type I et II. Les pneumocytes de type I sont responsables des échanges gazeux entre l'organisme et son environnement, ce sont des cellules très fines et très étendues (400 μm^2), qui se développent en une sorte de film très fin et de grande surface, formant un voile cytoplasmique de 0,1 à 0,2 μm d'épaisseur. Ils n'ont pas la capacité de se diviser et couvrent 90 % de la surface alvéolaire totale.

Les pneumocytes de type II sont plus nombreux que les pneumocytes de type I, leur forme est cubique à arrondie et ils ne présentent pas d'extension cytoplasmique et jouent un rôle dans la conservation de l'élasticité des poumons. Ils ont la capacité de se multiplier et, si besoin, de se différencier en cellules de type I, permettant le renouvellement et la restauration de l'épithélium.

In vitro, *L. pneumophila* peut se répliquer au sein des lignées des cellules épithéliales alvéolaires de type I et le type II (Nash et al., 1984, Gao et al., 1998; Mody et al., 1993) et d'autres lignées de cellules épithéliales et fibroblastiques (Garduno et al., 1998; Oldham et Rodgers, 1985). Les cellules épithéliales de type I et II couvrent plus de 95% de la surface alvéolaire et sont probablement des sites alternatifs de la réplication des légionelles dans les poumons (Gao et al., 1999; Oldham et Rodgers, 1985).

Plusieurs récepteurs de type glycoprotéine comme l'asialo-GM1 et l'asialo-GM2 ont été décrits comme étant impliqués dans l'attachement de *L. pneumophila* aux cellules épithéliales alvéolaires (Thomas et Brooks, 2004). D'autres facteurs ont été étudiés comme la présence de métaux comme le zinc sur l'augmentation de l'adhérence et de l'invasion de *L. pneumophila* dans les pneumocytes de type II. Cette adhérence semble impliquer une reconnaissance des récepteurs à zinc chez les pneumocytes par une adhésine bactérienne et les récepteurs héparane-sulfaté de la cellule hôte, mais pas par le pili de type IV (Yaradou et al., 2007).

Bien que le mécanisme d'entrée de *Legionella* ne soit pas complètement élucidé, plusieurs facteurs sont impliqués dans l'adhérence de *L. pneumophila*, y compris l'opsonisation du complément (Husmann et Johnson, 1992; Marra et al., 1990; Payne et Horwitz, 1987).

En 2000, une étude a rapporté l'implication de deux groupes de gènes *enh1* et *enh2* dans l'amélioration de l'entrée de *L. pneumophila* dans les cellules (Cirillo et al., 2000). Le gène *rtxA*, qui est présent dans le locus *enh1*, est impliqué dans l'adhérence aux macrophages et aux cellules épithéliales et dans la virulence de *L. pneumophila* (Cirillo et al., 2001; Cirillo et al., 2000).

Une autre étude montre l'importance d'un gène *laiA* et l'implication de son produit dans l'adhérence de *L. pneumophila* et l'invasion de la lignée pulmonaire épithéliale humaine A549, alors que sa présence n'a pas d'incidence sur la multiplication de *L. pneumophila* dans la lignée de macrophages humains U937 (Chang et al., 2005). Cette étude a montré, en utilisant comme témoin négatif un mutant *laiA*, que la capacité de phagocytose des légionelles par les cellules épithéliales de type II est liée à l'adhérence de ces bactéries aux cellules.

Bien que le mécanisme de signalisation ne soit pas encore élucidé, l'attachement par l'intermédiaire de LaiA pourrait induire des changements dont des réarrangements du cytosquelette (Clark et Brugge, 1995) nécessaires pour l'induction de la phagocytose.

3.5- Infection des animaux

Le modèle animal est un outil d'étude très intéressant pour élucider les interactions *Legionella*-hôte. *L. pneumophila* a la capacité de se multiplier dans des cultures de cellules mononucléées de l'homme et de cobaye (Horwitz et Silverstein, 1980; Kishimoto et al., 1981). Les cobayes sont des animaux très sensibles à l'infection par *Legionella*, et ils ont été largement utilisés comme modèle pour l'étude de la légionellose (Baker et Campbell, 1980).

Les cobayes infectés présentent des symptômes ressemblant étroitement à la maladie humaine (Collins, 1986).

Le modèle souris est très utilisé pour étudier les maladies infectieuses et immunitaires pour une grande diversité de souches bactériennes, mais ce n'est pas le cas pour *Legionella*, car la plupart des espèces murines sont résistantes à l'infection par ces bactéries. La croissance de *Legionella* dans les macrophages péritonéaux est limitée chez la plupart des souches murines consanguines, même avec des taux d'infectiosité relativement élevés (Yamamoto et al., 1987; Yoshida et Mizuguchi, 1986).

Les souris A/J font exception à cette résistance (Yamamoto et al., 1988). La sensibilité de cette souche murine à *L. pneumophila* est due à une mutation naturelle dans la protéine 5 inhibitrice de l'apoptose neuronale (Naip5 : neuronal apoptosis inhibitory protein 5). Les souris de la souche A/J portent des substitutions pour 14 acides aminés dans Naip5 (Diez et al., 2003). Cette protéine est l'une des protéines de la famille « nucleotide-binding oligomerization-leucine-rich repeat (NOD- LRR) » qui sont des récepteurs cytoplasmiques de reconnaissance des formes comportant des composants du système immunitaire inné (Inohara et Nunez, 2003). Molofsky et al. (2006) ont démontré que Naip5 reconnaît la flagelline de *L. pneumophila* qui a été transportée dans le cytoplasme des cellules hôtes. La Naip5 mutée naturellement a été défectueuse dans le contrôle de l'infection par *L. pneumophila* par le biais de la caspase-1 et de la voie de signalisation dépendante de Ipaf (ICE-protease-activating factor) dans cellules hôtes (Zamboni et al., 2006). Ipaf peut aussi induire l'apoptose dans les cellules humaines d'une manière dépendante de caspase-1 (Poyet et al., 2001).

L'infection des cobayes par *Legionella* peut être réalisée selon différentes méthodes : infection intranasale, infection intrapéritoniale et par aérosols. Une étude réalisée par Fitzgeorge et al. (1983) propose une comparaison entre ces 3 méthodes. L'instillation intranasale a provoqué des inondations massives dans les voies respiratoires supérieures mais ne génère pas suffisamment de particules de petite taille pour être déposées dans les bronchioles terminales et les alvéoles respiratoires. Leurs résultats montrent aussi par la même voie que l'infection des cobayes avec 10^9 bactéries n'induit pas la maladie, mais les mêmes souches utilisées se sont toutes révélées fatales après une injection intrapéritonéale de fortes concentrations bactériennes.

L'infection par aérosols de 10^5 bactéries a été insuffisante pour donner lieu à une réponse anticorps chez les animaux survivants et même 10^9 bactéries par voie intranasale n'ont pas produit de séroconversion (Fitzgeorge et al., 1983).

L'étude de l'infection sur modèle animal, la comparaison entre les différentes méthodes d'infection et surtout l'étude approfondie de l'infection par aérosols pourrait aider à une meilleure compréhension de la maladie chez l'homme, sachant que les lésions pulmonaires produites par l'infection avec des aérosols chez différents modèles animaux (cobaye, singes rhésus et ouistitis) sont très semblables à celles observées chez l'homme (Baskerville et al., 1983).

MATERIEL ET METHODES

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Les différents types cellulaires et conditions de culture

1-1 : *Legionella pneumophila*

La souche utilisée dans notre étude est *L. pneumophila* séro groupe 1 Lens HL 0350 5056 fournie par le Centre National de Référence des Légionelles (CNRL) de Lyon.

Cette bactérie a été en 2003 à l'origine d'une épidémie dans la région de Lens (France), pour laquelle on a relevé 90 cas dont 17 se sont révélés mortels.

Deux milieux de culture ont été utilisés:

- Milieu gélosé « Buffered Charcoal Yeast Extract » (BCYE) (Composition en annexe 1) : les boîtes de culture sont incubées dans une étuve à 37°C pendant 3 jours.
- Milieu liquide « Buffered Yeast Extract » (BYE) (Composition en annexe 1) : la culture bactérienne est réalisée dans un tube Falcon® et incubée dans une étuve à 37°C pendant 3-5 jours.

Conservation :

Les souches bactériennes sont conservées avec 30% de glycérol dans un congélateur à -20°C pour une utilisation courante et dans un congélateur à -80°C pour une conservation plus longue.

Dénombrement :

Les bactéries cultivables sont dénombrées à l'aide d'un WASP (Don Whitley Scientific Limited) ou par dilutions décimales sur géloses BCYE.

L'ajustement des suspensions cellulaires en milieu liquide est réalisé à l'aide de la correspondance $1\text{DO} = 10^9$ légionelles / ml.

Coloration Live/Dead® BacLight™ et dénombrement au microscope à épifluorescence

Principe :

Le kit Molecular probes Live/Dead® BacLight Viability Kits L-7012 contient un mélange de composés colorant les acides nucléiques :

- 1- Syto9 dye : 3,34 mM

2- Iodure de propidium : 20 mM

Ces colorants diffèrent au niveau de leurs caractéristiques spectrales et de leur capacité à pénétrer dans les membranes cellulaires.

Les bactéries possédant des membranes cellulaires intactes se colorent en vert fluorescent, puisque le Syto9, de faible masse moléculaire, peut pénétrer dans toutes les cellules et émet une fluorescence verte lorsqu'il est excité par de la lumière bleue.

Les bactéries qui présentent des membranes endommagées se colorent en rouge fluorescent parce que l'iodure de propidium qui a une masse moléculaire plus élevée que le Syto9 ne peut pénétrer que dans les cellules qui ont une membrane suffisamment altérée. Ce composé émet une coloration rouge qui masque la coloration verte émise par le Syto9.

Le BacLight™ permet ainsi de distinguer et de quantifier les bactéries vivantes et les bactéries mortes sous microscope à épifluorescence.

Méthode :

1 ml de la suspension bactérienne à étudier est mis en présence de 1,5 µl de chacun des deux colorants de BacLight™, puis la suspension est placée dans l'obscurité pendant 15 minutes.

Cette suspension est ensuite filtrée sur membrane PVDF (PolyVinylidene Fluoride) 0,22 µm (Millipore). Le filtre est ensuite placé sur une lame de verre, une goutte d'huile fournie dans le kit est déposée et le tout est recouvert par une lamelle.

L'observation est réalisée avec un microscope à épifluorescence Olympus Bx 41 (avec contraste de phase et fluorescence) équipé de filtres d'excitation de longueurs d'onde comprises entre 430 nm et 490 nm.

10 champs ont été photographiés pour chaque échantillon. Les champs photographiques ont été au préalable calibrés à l'aide d'une lame de Malassez.

Le nombre des cellules est déterminé en utilisant la formule suivante :

$$N = (YAd) / av$$

- N : nombre de cellules/mL
- Y : nombre moyen de cellules par champ observé
- A : surface de filtration utile (surface de la membrane = 3,8 cm²)
- d : facteur de dilution
- a : surface de champ microscopique observé (soit 0,00038 cm²)
- v : volume de suspension filtrée (en mL)

Collecte des légionelles adhérentes aux surfaces par sonication

Les ultrasons sont des ondes à haute énergie pouvant permettre, dans notre travail, de décrocher les bactéries qui ont adhéré à la surface des flacons.

Le bain d'eau de l'appareil de sonication est préalablement dégazé pour ne pas perdre de puissance pendant la sonication des échantillons. Puis, les flacons de verre contenant les bactéries incubées dans les différentes conditions sont placés dans ce bain et la sonication est effectuée en trois tranches de 3 min séparées par 30 secondes de refroidissement dans un bain de glace pour éviter l'échauffement.

1-1-1 : Production de légionelles non filamenteuses

Le protocole de production de cellules de légionelles non filamenteuses est présenté en annexe (2)

1-1-2 : Production de légionelles post-amibes

Les bactéries post-amibes sont récupérées 96h après l'infection des amibes par des bactéries libres non filamenteuses préparées selon le protocole de l'annexe (2), l'infection des amibes est réalisée dans le tampon-amibes (annexe 3). La majorité des bactéries, après ces 96 heures, est extra-amibes.

Après cette durée, la suspension d'amibes infectées (96h) est centrifugée à 500g pour éliminer les débris amibiens, le surnageant étant récupéré et utilisé comme inoculum pour l'infection avec des bactéries post-amibes.

1-1-3 : Production de légionelles post-*Tetrahymena*

Préparation de *Tetrahymena tropicalis*

T. tropicalis est cultivé en milieu PCB (Plate Count Broth, Difco®) dans des tubes Falcon® de 50mL (Composition en annexe 4).

Pour que les légionelles infectent mieux *Tetrahymena*, il faut remplacer le milieu de culture « PCB » par un tampon pauvre « Osterhout's Buffer » (composition en annexe 4). Pour cela, le milieu de culture contenant *Tetrahymena* est centrifugé à 500g pendant 10 minutes à 25°C. 20% du volume du PCB est ensuite remplacé par l'Osterhout's Buffer et ce milieu est placé 5 minutes à l'obscurité à température ambiante. Le milieu PCB doit être remplacé progressivement par du Osterhout's Buffer avec des pourcentages de remplacement allant de

20% à 40%, 60%, 80% puis 100% en conservant toujours les 5 minutes dans l'obscurité juste après le remplacement pour que *Tetrahymena* s'adapte bien au nouveau milieu.

Quand le milieu PCB est complètement remplacé par l'Osterhout's Buffer, les ciliés doivent être numérés pour en déterminer la concentration.

L'ajout de lugol permet de tuer *Tetrahymena* pour permettre la numération au microscope. La concentration de *Tetrahymena* est ajustée à 5.10^4 cellules/mL.

Infection de *Tetrahymena*

Dans une flasque de 75cm², 20 mL d'une suspension de *Tetrahymena* (5.10^4 cellules/mL) sont infectés par des légionelles (MOI de l'infection = 1000). La flasque est ensuite placée à l'obscurité pendant 48 heures.

Isolement des vésicules

Après 48 heures d'incubation, la quasi totalité des légionelles a été expulsée dans le tampon sous forme de vésicules ou « pellets ».

Pour récupérer les vésicules qui sont en suspension avec les *Tetrahymena* infectées, une centrifugation (500 g/10 min/25 °C) est réalisée. Le culot obtenu contient les vésicules et les *Tetrahymena* infectées. Après centrifugation, le tube est placé sur la paillasse pendant 20 minutes pour que les *Tetrahymena* présentes dans le culot repassent dans le surnageant. Ce surnageant est ensuite remplacé par du tampon Osterhout et ce mode opératoire est répété 2 fois. Les vésicules isolées sont resuspendues soit dans l'eau osmosée soit dans le tampon Osterhout.

Libération des légionelles post-*Tetrahymena*

Après avoir resuspendu le culot de vésicules, les légionelles intra-vesiculaires sont libérées par passage de la suspension à travers une aiguille de 27 gauges. Ce passage crée une force mécanique qui casse les vésicules et libère les légionelles qui sont à l'intérieur.

La manipulation doit être réalisée sous hotte à flux laminaire avec précaution car le passage à travers la seringue génère des aérosols de légionelles.

1-1-4 : Traitement des suspensions à la gentamicine

Le test de résistance à la gentamicine est réalisé comme suit :

1 mL de la suspension bactérienne à tester est incubé avec de la gentamicine à 100 µg/mL pendant une heure à température ambiante.

L'antibiotique est éliminé par centrifugation (5000 g, 10 minutes, température ambiante) et deux lavages par 1 mL d'eau osmosée stérile. Le culot est ensuite repris dans 1mL d'eau osmosée et les bactéries cultivables sont dénombrées sur géloses BCYE.

1-1-5 : Survie bactérienne à long terme

La survie à long terme est réalisée dans du tampon d'enkystement (0,1M KCl ; 8mM MgSO₄ ; 0,4mM CaCl₂ ; 1mM NaHCO₃⁻ ; 0,02M Tris). Il s'agit d'un milieu très pauvre dans lequel les légionelles ne se multiplient pas (Bouyer et al., 2007). Les tubes sont conservés à température ambiante et dans l'obscurité.

1-1-6 : Traitement des cellules à la protéinase K

Des suspensions de légionelles non filamenteuses (annexe 2) sont ajustées à 10⁸ bactéries / ml dans une eau adaptée à l'expérience (EUP ou Evian). Une solution de protéinase K stérilisée par filtration est ajoutée pour obtenir une concentration finale de 1 mg/ml. La digestion des cellules totales est réalisée pendant 1h à 37 °C. Deux lavages en l'eau ultra pure (centrifugation à 2300 g, 10 min) sont ensuite appliqués pour éliminer la protéinase K. Les suspensions cellulaires sont alors prêtes pour leur utilisation.

1-2 : *Acanthamoeba castellanii*

La souche d'amibe libre utilisée (*A. castellanii* ATCC 50739) a été fournie par le Dr M. Steinert (Institute of Molecular Infection Biology, Würzburg, Allemagne).

La culture de cette amibe est réalisée à 25°C dans des flasques Falcon® traitées pour culture cellulaire, le milieu de culture utilisé étant le PYG (Peptone, Yeast extract, Glucose) (Composition en annexe 3).

Cette souche est maintenue par repiquage régulier en flasques.

Conservation :

La congélation des amibes est réalisée dans une solution de DMSO 7,5% selon le protocole présenté en annexe 5.

Dénombrement :

Le tapage de la flasque d'amibes sur la paillasse permet le décrochage des amibes du fond de la flasque. Un échantillon de la suspension amibienne est dénombré à l'aide d'une lame Fast-Read[®] et d'un microscope photonique.

1-3 : *Tetrahymena tropicalis*

La souche de *T. tropicalis* a été fournie par Pr. R. Garduno (Department of Microbiology and Immunology, Dalhousie University, Halifax, Canada) au cours d'un stage réalisé dans son laboratoire (15 Novembre 2008 – 14 Décembre 2008).

La culture de ce protozoaire est réalisée dans le milieu PCB. Pour cela, deux gouttes de l'ancienne culture sont transférées dans 5ml de PCB stérile. Les tubes de culture sont conservés dans l'obscurité à température ambiante.

Conservation :

La conservation à long terme (3 mois) se fait dans des tubes Falcon[®] contenant un milieu de culture gélosé « Biphasic medium » (composition en annexe 4) au dessus duquel on ajoute de l'eau osmosée pour laisser diffuser lentement le milieu de culture vers le protozoaire présent dans l'eau.

La culture est conservée à l'obscurité à 18°C.

Dénombrement :

Les cellules de *Tetrahymena* sont tuées par traitement au lugol (solution d'iodure de potassium, 1 µl d'une solution à 2 % pour 1 ml de suspension, 10 min sur la paillasse). Le dénombrement est réalisé à l'aide d'une lame Fast-Read[®] et d'un microscope photonique.

1-4 : Pneumocytes humains de type II

Les pneumocytes humains de type II (A549) sont cultivés dans le milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium; Gibco®) contenant 10% de sérum de veau fœtal (RPMI-SVF) (Gibco).

La culture est réalisée dans des flasques de culture Falcon® à 37°C, sous 5% de CO₂. Les repiquages sont réalisés lorsque les cellules sont confluentes (environ tous les 2 jours). Pour cela, les cellules sont décrochées par traitement ménagé à la trypsine. Le milieu de culture est éliminé et les cellules sont traitées par 2 mL de trypsine à 0,05% (Trypsine-EDTA, Gibco) pendant 5 minutes à 37°C, 5% CO₂. 5 mL de RPMI-SVF sont alors ajoutés pour inactiver la trypsine. Deux gouttes de cette suspension cellulaire sont transférées dans une nouvelle flasque contenant 5mL de RPMI-SVF et la culture est poursuivie à 37°C, 5% CO₂.

Conservation :

La congélation des pneumocytes est réalisée dans une solution de DMSO à 7,5% selon le protocole fourni en annexe 5.

Dénombrement :

Après avoir traité les pneumocytes par la trypsine 0,05%, et ajouté le milieu de culture pour inactiver l'enzyme, la suspension est numérée à l'aide d'une lame Fast-Read® à l'aide un microscope photonique

1-5 : Monocytes humains

Les monocytes humains (U937) sont cultivés dans du RPMI-SVF.(Gibco®).

La culture est réalisée dans des flasques de culture Falcon® à 37°C, 5% de CO₂. Le renouvellement du milieu de culture se fait deux fois par semaines : l'ancien milieu de culture contenant les cellules en suspension est transféré dans un tube stérile Falcon®, une centrifugation (500g) est réalisée à température ambiante et le surnageant est remplacé par 5mL de RPMI-SVF préalablement chauffés à 37°C.

Après remise en suspension du culot, deux gouttes de la suspension cellulaire sont transférées dans une nouvelle flasque contenant 5mL de RPMI-SVF.

Conservation :

La congélation des monocytes est réalisée dans une solution de DMSO à 7,5% selon le protocole fourni en annexe 5.

Dénombrement :

Les monocytes, étant des cellules non adhérentes, sont dénombrées à l'aide d'une lame Fast-Read[®] avec un microscope photonique.

Maturation des monocytes en macrophages

Les monocytes (U937) sont cultivés dans du RPMI avec 10% de sérum de veau fœtal et placés à l'étuve (37°C, 5%CO₂).

La concentration des cellules est ajustée suite au dénombrement. Une centrifugation (1000rpm, 5min, T° ambiante) est réalisée et le surnageant est remplacé par un nouveau milieu qui contient du RPMI+ SVF 10% et du PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) (Sigma-Aldrich) à 50ng/mL pour induire la différenciation des monocytes en macrophages.

1-6 : Préparation des différents types d'eaux**1-6-1 : Eau ultra-pure**

L'eau ultra-pure est obtenue avec l'appareil Milli-Q Gradient (Millipore). Elle est stérilisée par autoclavage (pH=6).

1-6-2 : Eau d'Evian

L'eau d'Evian est stérilisée par filtration 0,22 µm (Corning) sous hotte à flux laminaire. Le filtrat est récupérée dans des bouteilles en verre préalablement pyrolysées et autoclavées. Le pH final observé est de 7,2.

Les concentrations des matières minérales présentes dans l'eau d'Evian sont indiquées dans le tableau 2.

Tableau 2 : composition moyenne en minéraux de l'eau d'Evian (d'après le fournisseur)

Elément	Concentration en mg/l
Calcium (Ca ²⁺)	80
Magnésium (Mg ²⁺)	26
Sodium (Na ⁺)	6,5
Potassium (K ⁺)	1
Chlorure (Cl ⁻)	6,8
Bicarbonates (HCO ₃ ⁻)	360

Sulfates (SO₄²⁻)	10
Silice	15
Fluor	0,12

1-6-3 : Solution mère de matières organiques

La MOD (matière organique dissoute) peut être fractionnée en trois parties, les HPO (hydrophobiques), les THP (transphiliques) et les HPI (hydrophiliques).

La fraction MOD retenue pour notre étude est la HPO, car elle correspond à la partie la plus représentative de la fraction non entropique de la MOD.

L'extraction consiste à faire percoler un échantillon préalablement filtré (0,8 µm), acidifié à pH = 2 à l'acide chlorhydrique, sur deux colonnes de 250 mL de résines XAD 8 et XAD 4 en série, à un débit de 3 L/h puis à éluer les MOD adsorbées par un mélange acétonitrile/eau.

Au préalable, les résines sont régénérées par passage successif de 5 L de soude à 0,1 N (soude en pastille Carlo Erba), 5 L d'eau ultra-pure et 5 L d'acide chlorhydrique à 0,1 N (37 % de Carlo Erba). Ce protocole est à réitérer jusqu'à obtention d'un COT (carbone organique total) résiduel en sortie XAD 4 inférieur à 0,5 mg C/L. Un suivi du COT durant la filtration des différentes eaux, montre des valeurs constantes en sorties XAD 8 et XAD 4 indiquant que les résines n'atteignent pas la saturation. L'éluat contient les HPI.

L'étape de filtration terminée, les HPO sont adsorbées sur XAD 8 et les TPH sur XAD 4.

Pour les HPO, l'élution est réalisée en utilisant un mélange acétonitrile/eau (75/25 ; v/v), après avoir injecté de l'acide formique pour éliminer l'excédent de chlorures introduits lors de l'acidification des échantillons avec l'acide chlorhydrique, jusqu'à obtention d'une conductivité équivalente en entrée et en sortie de colonne.

La solution d'HPO est alors concentrée par évaporation sous pression réduite à 40 °C, afin d'éliminer l'acide formique et l'acétonitrile. Chaque extrait est lyophilisé et stocké à 4 °C, à l'abri de la lumière dans un flacon en verre ambré. Les HPO utilisées dans cette étude ont été fournies sous forme de poudre par le Dr. Bernard PARINET (UMR 6008).

Dans une bouteille pyrolysée (500°C, 3h), 10 mg de matière organique sont dissous dans 100 ml d'eau pure et la solution obtenue est stérilisée par filtration à 0,22 µm. Le filtrat est collecté dans une bouteille préalablement pyrolysée et autoclavée.

La concentration de la solution mère de MO est déterminée à l'aide d'un COTmètre (TOC-5000A, Shimazu).

1-6-4 : Solutions de minéraux

Des solutions de minéraux sont préparées à l'aide d'eau ultra-pure et de sels de qualité ultra-pure (Sigma) de CaCl_2 , MgCl_2 , NaCl et KCl . Les solutions sont stérilisées par filtration (0,22 μm).

2. Analyse protéomique

2-1 : Migration mono dimensionnelle

2-1-1 : Extraction des protéines

2mL d'une suspension de *L. pneumophila* ($2 \cdot 10^9$ /mL) une centrifugation à 5000 g pendant 5 minutes à température ambiante a été réalisée. Les culots sont lavés par de l'eau ultra-pure

Le tampon de charge suivant est préparé :

- Tris-HCl (pH 6,8) : 100 mM
- SDS (electrophoresis grade) : 4%
- Bleu de Bromophenol : 0,2%
- Glycérol : 20%

Il est stocké à 4°C.

Le culot bactérien préparé ci-dessus est resuspendu dans 100 μL de tampon de charge, cette suspension étant ensuite portée à ébullition pendant 1 minute à 100°C. Après refroidissement, une centrifugation à 10 000 g pendant 3 minutes est effectuée pour culoter les débris cellulaires. Le surnageant constitue l'échantillon protéique.

2-1-2 : Electrophorèse 1D

L'électrophorèse est réalisée à l'aide d'une cuve MINI PROTEAN II xi Cell BIO-RAD.

Le tampon de migration est composé de Tris 0,1M, Glycine 0,384 M et 0,2 % SDS, pH 6,8.

Le gel est constitué de deux parties, chacune ayant une concentration différente en acrylamide : le gel de concentration contient 4 % d'acrylamide (partie supérieure), le gel de migration 10% d'acrylamide (Composition des mini-gels en annexe 6).

La migration est réalisée à 100 volts jusqu'à que le front de migration atteigne l'extrémité inférieure du gel.

Le gel est ensuite coloré au bleu de coomassie (voir annexe 7).

2-2 : Migration bidimensionnelle

L'électrophorèse 2D consiste à faire migrer les protéines selon 2 étapes successives. En premier temps les protéines sont soumises à un champ électrique dans un gradient de pH. Cette étape s'appelle l'isofocalisation, elle consiste en une migration des protéines en fonction de leur charge. Les protéines ne migrent pas dans la zone de pH où leur charge globale devient nulle. Cette première étape est ensuite suivie par une deuxième migration en SDS-PAGE à 90° de la première. Cette deuxième dimension est réalisée en présence de sodium dodécylsulfate (SDS), un détergent anionique qui dénature les protéines et permet d'homogénéiser la charge des protéines traitées, ce qui permet de les séparer ensuite en fonction de leur masse.

2-2-1 : Extraction des protéines

Un culot bactérien correspondant à environ 10^{10} bactéries est lavé deux fois dans un tampon de lavage (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 ; EDTA 10mM), par une centrifugation de 2 minutes à 10000 g à 4°C. Le culot est repris dans 450 µL de tampon de réhydratation (Urée 7,5 M ; Thiourée 2M ; DTT 100mM ; CHAPS 4% ; Ampholytes 3-10 0,2%), le mélange est vortexé vigoureusement pendant 2 min puis incubé à 30°C pendant deux heures en vortexant toutes les 15 minutes.

Les tubes sont ensuite centrifugés à 13000 g à 15°C pendant 30 minutes et les surnagants sont stockés à -80°C jusqu'à utilisation.

La concentration protéique des échantillons a été dosée par une méthode dérivée de celle de Lowry (RC DC Protein Assay, Biorad), la BSA étant utilisée comme protéine standard pour réaliser la droite d'étalonnage (Annexe 8)

2-2-2 : Migration électrophorétique

Nous avons utilisé des bandelettes Immobiline™ DryStrip pH 3-10 à gradient non linéaire, 18cm GE, Healthcare.

Nous avons utilisé le Bio-Rad Protean IEF Cell pour réaliser l'isofocalisation.

Réhydratation passive des bandelettes

La concentration des extraits protéiques est ajustée à 1 mg/mL à l'aide du tampon de réhydratation.

On ajoute 1,5 µl du colorant orange G 0,4% à 150 µL de chaque extrait protéique.

150 µg d'extrait sont déposés sur une bandelette de gel de façon homogène. Cette bandelette est ensuite recouverte d'huile minérale et incubée à température ambiante pendant 16 heures.

Première dimension

Les bandelettes réhydratées sont placées dans le « Bio-Rad Protean IEF Cell » et deux papiers filtres hydratés par 7 µL d'eau osmosée sont placés entre le gel et chaque électrode.

La première dimension est réalisée à 20°C avec les paramètres suivants :

- Un maximum de 50µA/gel
- 0 à 250 volts avec « rapid ramp » (15 minutes)
- 250 volts à 4000 volts avec « linear ramp » (deux heures)
- le voltage est ensuite conservé à 4000 volts jusqu'au passage à 20000 V/h.

Après la fin de la première dimension, les bandelettes sont congelées à -80°C jusqu'à la réalisation de la deuxième dimension.

Deuxième dimension

Avant la réalisation de la deuxième dimension, les bandelettes doivent être saturées en SDS et en agent réducteur : le dithiothréitol (DTT) pour ioniser les protéines et réduire les ponts disulfures. Elles seront ensuite mises dans un second bain d'iodoacétamide qui provoque la réoxydation des protéines au cours de la migration et alkyle le DTT résiduel pour minimiser les traînées verticales sur le gel (Protocole détaillé en annexe 9).

La migration de la seconde dimension est réalisée, à 10 °C, dans le système PROTEAN II xi and XL Cells (Bio-Rad), à 10 mA/gel pendant 1 heure puis à 40 mA/gel jusqu'à que le front de migration atteigne la partie inférieure du gel.

Les gels sont ensuite colorés au nitrate d'argent (Annexe 7).

Analyse des gels

Les gels colorés sont scannés à l'aide d'un Agfa GS-710 (Calibrated Imaging Densitometer) et analysés visuellement. Les spots protéiques sont prélevés manuellement et transmis au

service d'analyse de l'UR Microbiologie - QuaSA/Plateforme protéomique de l'INRA de Theix pour identification.

3. Procédures d'infection des différents types cellulaires par *Legionella pneumophila*

3-1 : Préparation de *Acanthamoeba castellanii*

Les amibes sont cultivées dans le milieu PYG pendant 2-3 jours à température ambiante dans des flasques de 75cm². Le milieu de culture PYG est ensuite remplacé par 10 mL de « tampon amibe » pour laver la couche cellulaire et se débarrasser des kystes.

Un deuxième lavage est ensuite réalisé avec 10mL de « tampon amibe » et les amibes sont décrochées en tapant fortement sur les flasques. La concentration finale de la suspension amibienne en « tampon amibe » est ajustée à 5x10⁵ cellules/mL. 1mL de cette suspension est déposé dans chaque puits d'une plaque de 12 puits laissée 60-90 minutes à T° ambiante pour obtenir une adhérence uniforme des amibes au fond des puits.

100 µL d'une suspension de légionelles sont alors introduite dans chaque puits.

3-2 : Préparation des pneumocytes

Les pneumocytes humains de type II (A549) sont cultivés dans des flasques de 75cm² avec du RPMI contenant 10% de sérum de veau fœtal. Pour décrocher les cellules, le RPMI est remplacé par 5mL de trypsine 0,05% et la flasque est mise dans l'étuve de 37°C pendant 5 min.

Une fois les cellules décrochées, 20 mL de RPMI + 10%SVF ont été ajoutés aux 5mL de trypsine pour récolter les cellules et neutraliser la trypsine. La concentration cellulaire finale de la suspension a été ajustée à 5x10⁵ /mL.

1mL de cette suspension a été déposé dans chaque puits d'une plaque de 12 puits, placée à l'étuve (37°C, 5%CO₂) pendant 12 à 24 heures avant l'infection, le temps pour les cellules d'adhérer au fond du puits.

3-3 : Préparation des macrophages

Les monocytes (U937) sont cultivés dans du RPMI avec 10% de sérum de veau fœtal et placés à l'étuve (37°C, 5%CO₂).

Deux jours avant l'infection, la concentration des cellules doit être ajustée à 5x10⁵ cellules/mL. Une centrifugation (140 g, 5min, T° ambiante) est réalisée et le surnageant est remplacé par un nouveau milieu qui contient du RPMI+ SVF 10% et du PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) à 50ng/mL pour induire la différenciation des monocytes en macrophages. 1mL de la suspension est ensuite déposé dans chaque puits. Les cellules seront prêtes à être infectées 48 heures après cette préparation.

3-4 : Infection des cellules

Quelque soit le type cellulaire utilisé, l'infection est réalisée par l'ajout de 100 µL d'une suspension de légionelles dans chaque puits.

Une MOI (multiplicité d'infection) de 1 a été utilisée. Immédiatement après l'ajout des bactéries, les plaques sont centrifugées à 140 g pendant 5 minutes à température ambiante, puis placées à l'étuve (37 °C, 5% CO₂ sauf pour les amibes) pendant 1 heure.

Le milieu est remplacé par centrifugation (140 g, 5 minutes à température ambiante) par le milieu adéquat (« tampon amibes » pour les amibes et RPMI-SVF pour les autres cellules) après un lavage par la même solution pour éliminer les bactéries n'ayant pas adhéré aux cellules. La concentration bactérienne à T₀ est déterminée immédiatement après remplacement du milieu, après pipetage vigoureux du puits sacrifié pour cette mesure.

4. Infection des souris A/J par *Legionella pneumophila*

L'infection des souris a été réalisée dans le laboratoire de bactériologie (INSERM U851) de la Faculté de Médecine Lyon-Est - Université de Lyon1. J'ai assisté le Dr Florence ADER pour la manipulation des animaux. Elle a réalisé les instillations intra-nasales et les prélèvements d'organes. Dans cette série d'expériences, j'ai réalisé les préparations bactériennes, la préparation des organes pour les dénombrements bactériens.

L'infection a été réalisée sur des souris A/J âgées de 8 semaines (mâles et femelles) selon deux méthodes différentes : infection par voie aérosol et infection intra-nasale. Deux phénotypes bactériens différents ont été utilisés pour réaliser l'infection :

- 1- légionelles libres préparées selon le protocole fournie par le CNRL de Lyon (Annexe 2), mais à la dernière étape, ces bactéries sont resuspendues dans de l'eau d'Evian®
- 2- légionelles post-amibiennes récupérées 96h après l'infection des amibes par des légionelles libres.

4-1 : Appareil d'aérosolisation

L'appareil d'aérosolisation a été installé dans l'animalerie de l'Ecole Nationale Supérieure de Lyon par Enric ROBINE et Thi-lan HA du Centre Scientifique et Technique du Bâtiment (CSTB, Marne la Vallée) après avoir été conçu et réalisé dans leurs locaux.

L'appareil d'aérosolisation est un système clos, constitué de plusieurs parties reliées entre elles et placé tout entier dans un isolateur sous vide. Ce système constitue un équipement qui doit être placé dans un environnement de classe de risque III.

La première partie de l'appareil est constituée d'un générateur qui crée des aérosols de légionelles à partir d'une suspension bactérienne liquide, provoqués par le passage de l'air comprimé stérile dans la suspension bactérienne. Les aérosols produits passent dans une structure dans laquelle est appliqué un contre courant d'air comprimé (1,5 bar) stérile qui sèche les aérosols et diminue l'humidité relative jusqu'à environ 43%.

Les aérosols traversant la « passerelle » de séchage entrent dans une structure de stabilisation séparée du compartiment des souris par un robinet. Cette étape de stabilisation des aérosols est très importante pour que les souris présentes dans le compartiment voisin reçoivent un flux constant d'aérosols.

Quand l'humidité relative est stable (environ 10 min après le début de l'aérosolisation), le robinet qui sépare les souris des aérosols est ouvert et les aérosols passent dans le compartiment des souris qui est relié à un compteur de particules.

Le compteur de particules permet de détecter quantitativement le passage des légionelles à travers le compartiment des souris.

Après la séance d'aérosolisation, une pompe placée derrière le compartiment des souris aspire les aérosols présents dans toutes les parties de l'appareil d'aérosolisation pour que l'on puisse ouvrir le compartiment murin et récupérer les souris.

4-2 : Infection par les aérosols de légionelles

20 mL de la suspension de bactéries sont placés dans le générateur et la production d'aérosols a été activée.

Après 10 minutes de mise en contact des souris avec les aérosols, le robinet qui laisse passer les aérosols vers les souris est fermé et un autre robinet relié à un système d'impaction sur milieu liquide est ouvert pendant 10 minutes, permettant ainsi de mesurer la concentration bactérienne présente dans les aérosols.

Le nombre des souris infectées par aérosols est de 6 souris/séance d'aérosolisation (4 séances réalisées) et ces souris sont sacrifiées comme suit :

- 3 souris sacrifiées 1 heure après l'aérosolisation (T_0)
- 3 souris sacrifiées 48 heures après l'aérosolisation (T_{48})

Les souris sacrifiées après une heure d'aérosolisation permettent de déterminer la quantité de bactéries reçues par les souris.

Les souris sacrifiées après 48 heures d'aérosolisation nous donnent des informations sur la prolifération bactérienne dans l'animal.

4-3 : Infection intra-nasale

L'infection intra-nasale est réalisée sous hotte à flux laminaire par le dépôt de 40 μ L de la suspension bactérienne appropriée au bout du museau de la souris.

Le nombre des souris infectées pour chacun phénotype bactérien est de 6 souris. De la même manière que pour les animaux infectés par aérosol, 3 souris seront sacrifiées :

- 3 heures après l'infection (T_0)
- 48 heures après l'infection (T_{48})

Les souris T_0 sont sacrifiées après 3 heures dans le cas de l'instillation intra-nasale contre une heure dans le cas de l'exposition aux aérosols, car il semble que les bactéries arrivent plus

rapidement dans les poumons de l'animal dans le cas des aérosols que dans le cas des gouttes déposées au bout de son museau.

Une coloration Baclight™ pour tous les échantillons bactériens (libres et post-amibiens, avant et après aérosolisation) a été réalisée pour établir une correspondance entre numération sur gélose et numération sur photos ainsi que pour détecter un éventuel changement de phénotype (bactéries filamenteuses par exemple).

4-4 : Broyages des organes

Après avoir été infectées, les souris sacrifiées sont disséquées par le Dr. Florence ADER, pour prélever poumons, foie, rate ainsi que des échantillons de sang.

Les organes prélevés sont broyés à l'aide d'un broyeur électrique stérile. Des échantillons calibrés ainsi que du sang servent ensuite à ensemer des géloses BCYE.

4-5 : Rapport poids humide sur poids sec (wet-to-dry ratio)

Le Wet-to-Dry Ratio représente le poids de poumon mouillé sur poids de poumon sec. L'œdème pulmonaire est ici utilisé pour traduire le niveau d'infection qui sera estimé d'autant plus important que la masse de liquide dans le poumon sera élevée.

Après avoir broyé les poumons, le poids des échantillons de 100 µl de chaque poumon a été déterminé puis ces échantillons sont mis dans une étuve à 50°C pendant 15 jours. Le poids des échantillons secs permet ensuite le calcul du rapport poids mouillé/poids sec.

RESULTATS ET DISCUSSION

RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. Impact des matières organiques et minérales sur la survie de *L. pneumophila* :

Nous avons étudié l'effet de la présence des matières minérales et organiques sur la cultivabilité de *L. pneumophila*. Des prélèvements échelonnés dans le temps ont été réalisés pour déterminer la concentration des bactéries cultivables en suspension dans chacune des conditions testées par dénombrement des UFC (Unité Formant Colonie).

1-1 : Effet de la matière minérale sur la cultivabilité

Deux conditions différentes ont été étudiées: Eau d'Evian (EE) et Eau ultra Pure (EP).

La figure 8 montre la cultivabilité dans l'eau ultra-pure et dans l'eau d'Evian après incubation de 8 et 11 jours à 37°C. Bien que les deux courbes aient la même allure globale, les bactéries ont une meilleure survie dans l'eau ultra pure que dans l'eau d'Evian.

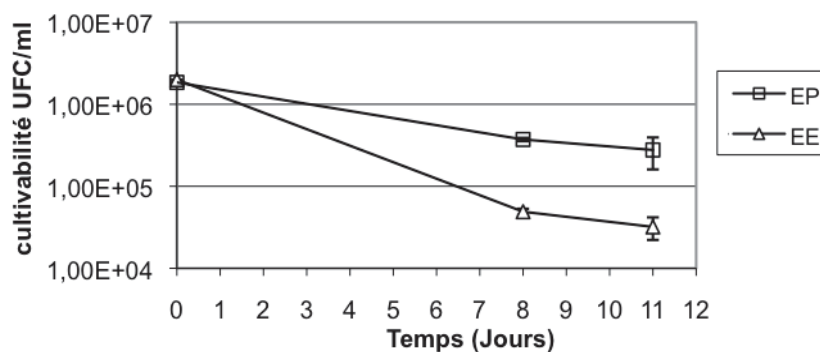


Figure 8 : Survie des légionelles à 37°C, dans l'eau ultra pure et l'eau d'Evian.

n= 3

En effet la diminution du taux de survie de *L. pneumophila* dans l'EP est compris entre 10 et 15 % (~ 1 log d'abattement) après 11 jours d'incubation. Les résultats de la même expérimentation réalisée dans l'eau d'Evian montrent un abattement proche de 2 log. Il y a donc une importante différence après 8 et 11 jours d'incubation entre la cultivabilité des bactéries en suspension dans l'EP et la cultivabilité de celles incubées dans l'EE.

1-2 : Effet de la matière organique sur la cultivabilité

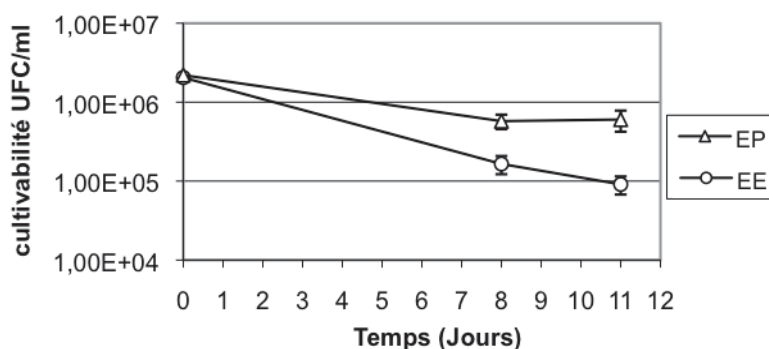


Figure 9 : Survie des légionelles à 37°C, dans l'eau ultra pure et l'eau d'Evian en présence de matières organiques
n= 3

Les résultats de la figure 9 montrent que la présence des matières organiques (MO) semble améliorer la survie de *L. pneumophila* aussi bien dans l'eau d'Evian que dans l'Eau ultra pure. Mais la différence présente entre les 2 conditions (avec ou sans MO) ne serait pas due à l'influence des MO mais plutôt à celle des matières minérales qui favoriseraient l'adhérence des légionelles sur les surfaces, comme nous le verrons dans la suite de ce travail.

Pour mieux visualiser l'influence des MO, la figure 10 montre l'ensemble des résultats présentés figure 1 et 2 sur la survie réalisés en incubant *L. pneumophila* dans deux types d'eaux (EP et EE) supplémentées ou non en MO.

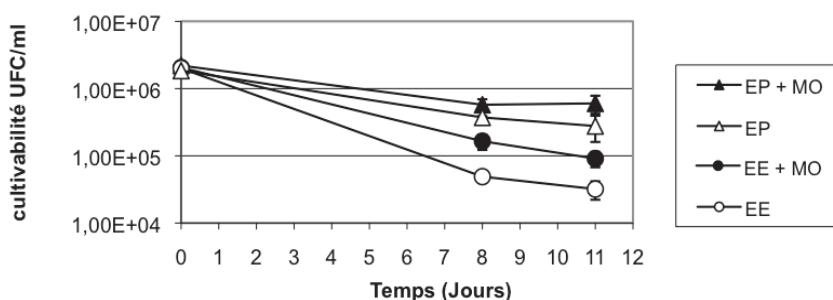


Figure 10 : Survie de *L. pneumophila* à 37°C avec ou sans matières organiques et minérales
n= 3

On peut voir que la MO favorise la survie des légionelles quelle que soit l'eau utilisée (EP ou EE), cette amélioration étant plus significative en eau d'Evian que dans l'eau ultra pure. La présence des matières minérales favoriserait l'adhérence bactérienne aux surfaces (voir plus loin, paragraphe 3), par conséquent l'influence des matières organiques serait masquée par la présence des matières minérales.

En ce qui concerne l'eau ultra pure, on peut voir une légère amélioration de la survie bactérienne en présence des matières organiques.

Les mêmes expérimentations ont été réalisées à 20°C et ont montré des résultats similaires (figures 12 et 13 pages suivantes).

Les résultats obtenus au cours de ces expériences montrent que les survies bactériennes observées dans les différentes conditions testées ne semblent pas différentes. La présence de matières organiques favorise légèrement la survie des légionelles dans les 2 types d'eaux (EP et EE). Comme nous allons les voir, les matières minérales favorisent l'adhérence des légionelles sur les surfaces du flacon, ce qui masque l'influence des matières organiques sur la survie bactérienne.

2. Détection de l'adhérence des bactéries aux surfaces

Les résultats obtenus dans les expériences réalisées précédemment, à savoir la différence de survie bactérienne entre les différents types d'eau, nous a permis d'émettre deux hypothèses:

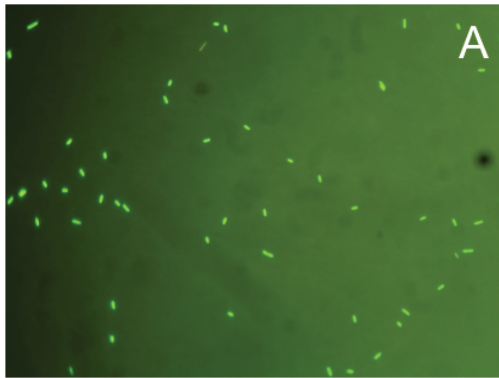
- 1- *L. pneumophila* meurt plus dans l'eau d'Evian que dans l'eau Ultra pure
- 2- *L. pneumophila* adhère sur la surface de verre en présence d'eau d'Evian

Nous avons utilisé la sonication pour essayer de confirmer l'une des deux hypothèses. Après 11 jours d'incubation à 37°C, une coloration Live/Dead[®] BacLight (Figure 11) a été réalisée pour deux échantillons bactériens différents :

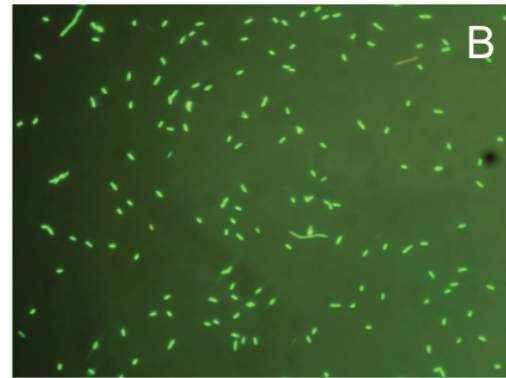
- 1- la suspension bactérienne transférée du flacon d'origine vers un nouveau flacon stérile
- 2- de l'eau ultra pure placée dans le flacon d'origine pour remplacer la suspension bactérienne qui a été récupérée en 1

Une sonication est réalisée après l'ajout de l'eau ultra pure pour libérer les éventuelles bactéries adhérentes à la surface du flacon.

Eau d'Evian (37°C)

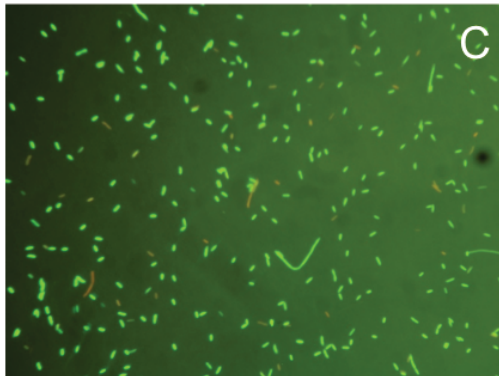


Suspension initiale dans un nouveau flacon stérile

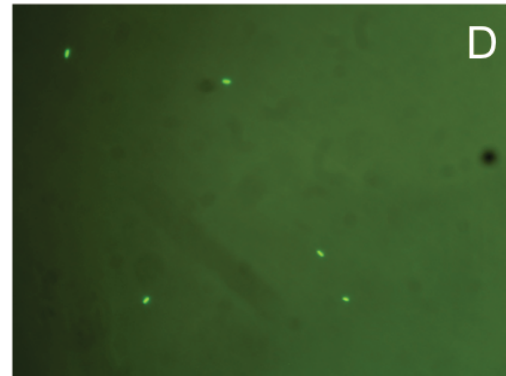


Eau pure dans le flacon d'origine

Eau ultra Pure (37°C)



Suspension initiale dans un nouveau flacon stérile



Eau pure dans le flacon d'origine

Figure 11 : Coloration Live/Dead® BacLight des suspensions bactériennes après 11 jours d'incubation à 37°C.

Ces photos sont représentatives des résultats obtenus. $n = 3$

La surface des photographies représente $3,8 \cdot 10^4 \mu\text{m}^2$

(eau pure dans le flacon d'origine : la suspension est remplacée par de l'eau pure et le flacon est soniqué pour décrocher les bactéries des surfaces)

Les résultats observés montrent qu'après 11 jours à 37°C, la concentration des bactéries en suspension est plus faible dans l'eau d'Evian (figure 11A) que dans l'eau ultra pure (figure 11C), ces résultats pourraient signifier que la survie bactérienne est meilleure dans l'eau ultra pure que dans l'eau d'Evian.

L'observation des photos obtenues après sonication montre une libération plus importante de bactéries dans le flacon qui contenait l'eau d'Evian (figure 11B) que dans le flacon qui contenait de l'eau ultra pure (figure 11D).

Ces résultats nous montrent qu'en présence d'eau d'Evian, les bactéries adhèrent plus aux surfaces de verre que lorsqu'elles sont incubées dans l'eau ultra pure.

La même expérience a été réalisée à une température de 20°C. La coloration Live/Dead® BacLight après 11 jours d'incubation montre des résultats similaires (figure 12).

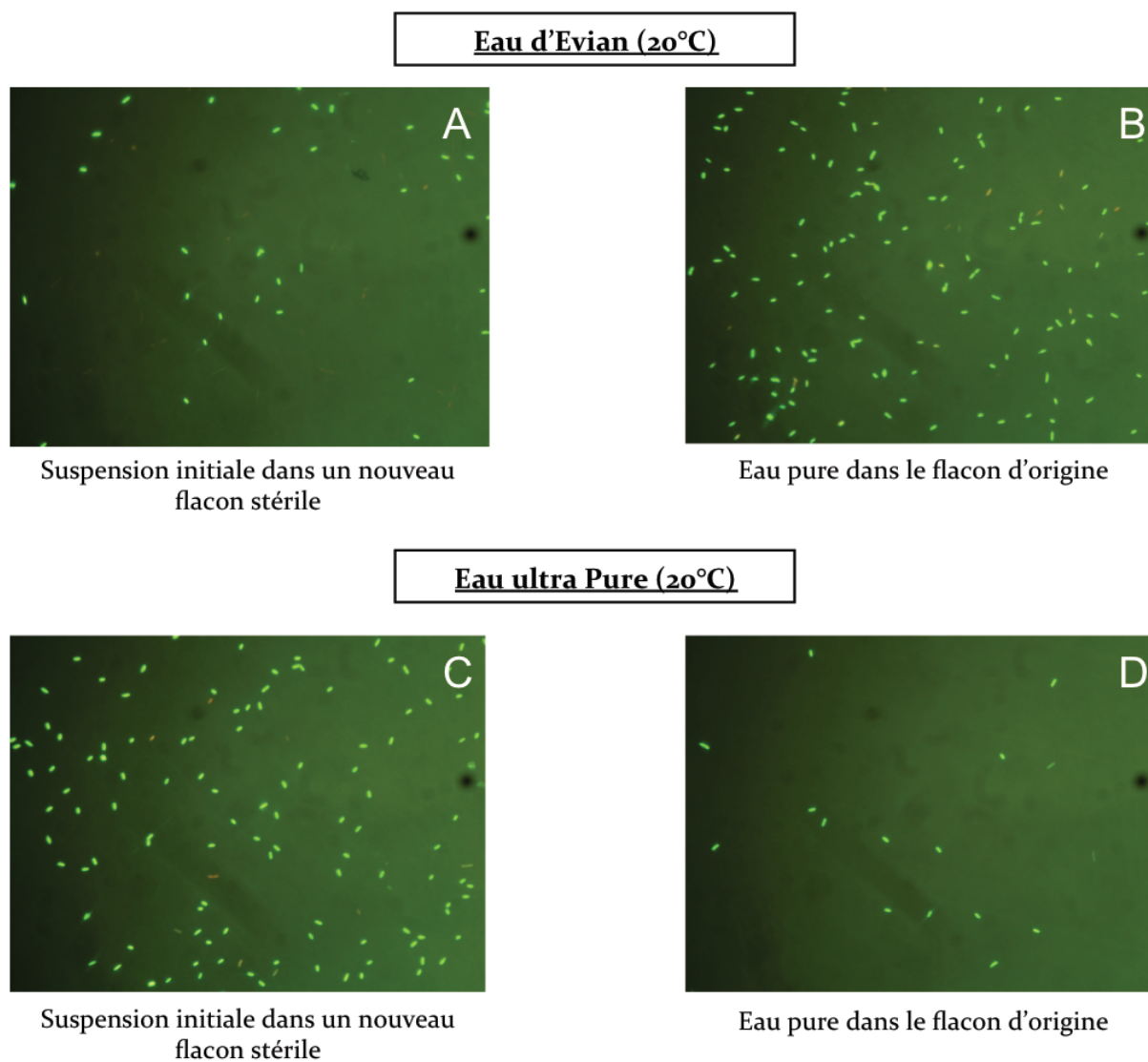


Figure 12 : Coloration Live/Dead® BacLight des suspensions bactériennes après 11 jours d'incubation à 20°C

Ces photos sont représentatives des résultats obtenus. n = 3

La surface des photographies représente $3,8 \cdot 10^4 \mu\text{m}^2$

(Eau pure dans le flacon d'origine : la suspension est remplacée par de l'eau pure et le flacon est soniqué pour décrocher les bactéries des surfaces)

La numération des bactéries à partir des photos (figures 11 et 12) a permis de présenter les résultats sous forme de diagrammes (figure 13).

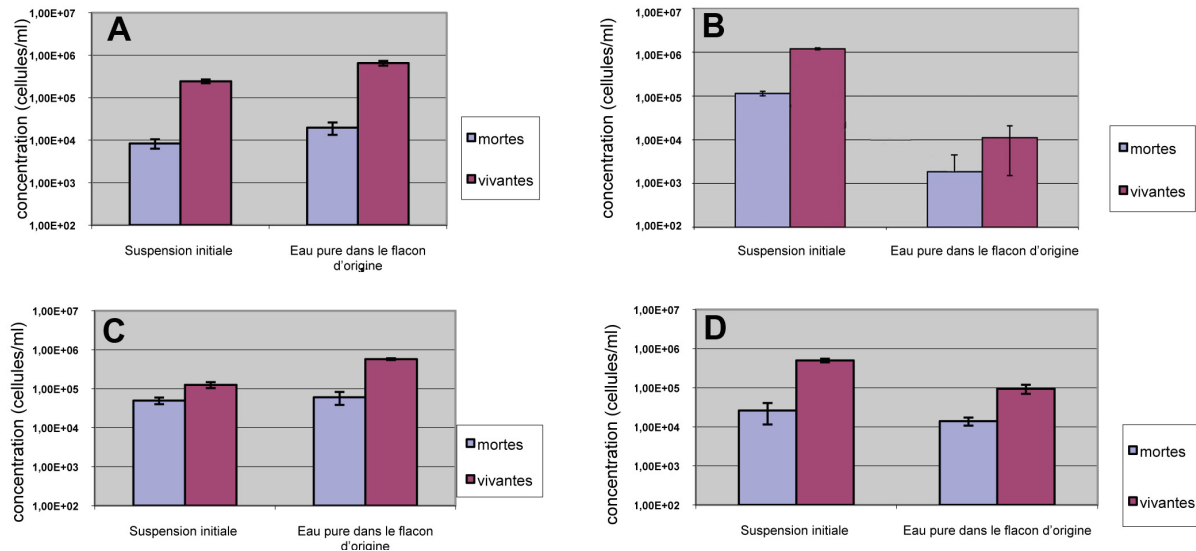


Figure 13 : analyse des photographies de microscopie après un séjour de 11 jours dans différentes eaux

Dénombrement des cellules vivantes et mortes à partir des données présentées figures 4 et 5

Survie à 37 °C : A : dans l'eau d'Evian ; B : dans l'eau ultra pure

Survie à 20 °C : C : dans l'eau d'Evian ; D : dans l'eau ultra pure

(Eau pure dans le flacon d'origine : la suspension est remplacée par de l'eau pure et le flacon est soniqué pour décrocher les bactéries des surfaces)

(Moyennes de 5 photos par histogramme)

Après le remplacement de la suspension bactérienne initiale par de l'eau pure et la réalisation d'une sonication, on observe une libération plus importante des bactéries des surfaces en présence d'eau d'Evian qu'en présence d'eau ultra pure. Cette adhérence a, à peu près, la même valeur quelle que soit la température testée (20 ou 37 °C).

En parallèle à la numération sur photos, et pour faire une comparaison entre les bactéries vivantes et les bactéries cultivables, une numération des échantillons sur gélose BCYE a été réalisée. Les résultats (figure 14) montrent que les bactéries sont majoritaires en suspension dans l'eau ultra pure (figure 14, B et D). En revanche, en présence d'eau d'Evian, les bactéries ont majoritairement adhéré aux surfaces (figure 14, A et C).

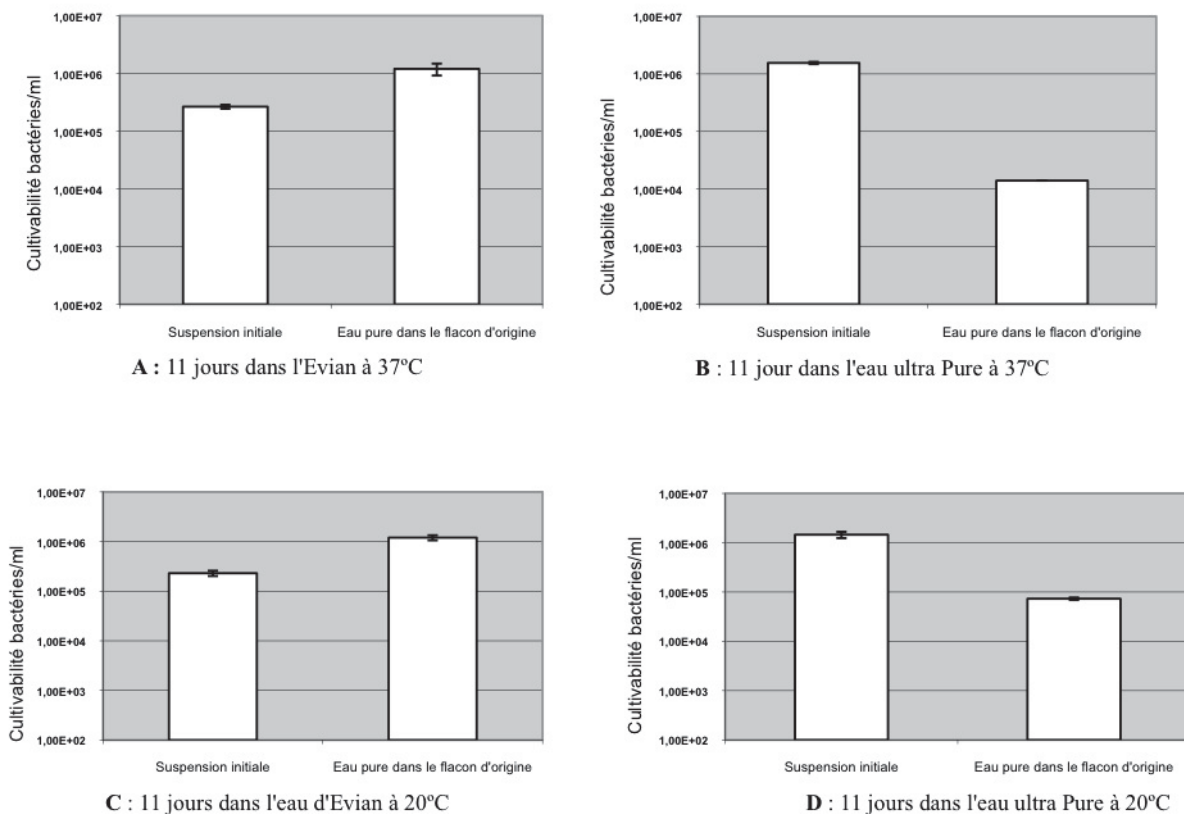


Figure 14 : Dénombrement sur gélose BCYE des légionelles présentes après un séjour de 11 jours dans différentes eaux
Eau pure dans le flacon d'origine : la suspension est remplacée par de l'eau pure et le flacon est soniqué pour décrocher les bactéries des surfaces ; n=3

Ces résultats montrent l'importance de la présence d'eau d'Evian sur le phénomène d'adhérence des légionelles aux surfaces aux 2 températures testées, 20°C ou 37°C.

Les mêmes études ont été réalisées (à 37°C) :

- après 4 semaines dans des flacons de verre
- après 11 jours dans des flacons de plastique hydrophile traité pour la culture cellulaire (Nunc, Nuclon surface).

Nous observons le même phénomène d'adhérence des bactéries aux surfaces beaucoup plus marqué en présence d'eau d'Evian qu'en eau ultra pure (résultats non montrés).

L'ensemble des résultats présentés ci-dessus a été obtenu à l'aide de suspensions bactériennes à 10^6 bactéries/ml. Nous avons mené une étude complémentaire en utilisant une concentration bactérienne plus importante afin d'une part de tester l'effet d'une autre concentration bactérienne sur l'adhérence aux surfaces, et d'autre part, pour permettre la préparation des échantillons pour l'aérosolisation, étape non présentée dans cette étude, mais réalisée dans programme ANR LEGIOAEROPATHO (voir introduction générale). Nous avons ainsi

préparé des suspensions à environ 10^8 cellules/ml. Ces suspensions ont été incubées 4 semaines à 37 °C dans des flacons de verre. A J28, un échantillon de la suspension bactérienne du flacon a été étalé sur gélose BCYE (figure 15). Un lavage du flacon a été ensuite réalisé avec de l'Eau ultra Pure pour éliminer les éventuelles bactéries libres restantes. Le flacon a été rempli avec de l'Eau ultra Pure et une sonication a été réalisée.

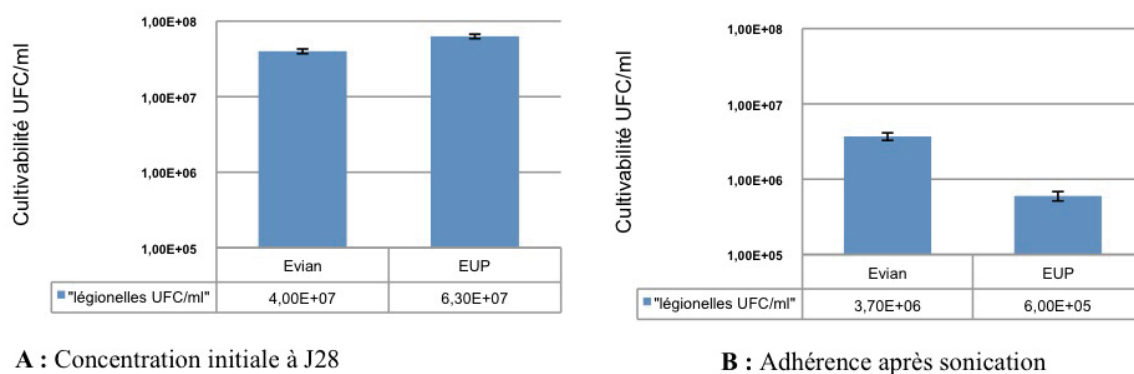


Figure 15 : dénombrement des légionelles dans différentes eaux après un séjour de 28 jours

A : suspension présente dans le flacon 28 jours

B : remplacement de la suspension par de l'eau ultra pure puis sonication

(n=3)

Nos résultats confirment que la présence d'eau d'Evian a un effet important sur l'adhérence de *L. pneumophila* sur les surfaces en verre (figure 15) bien que les concentrations initiales des suspensions bactériennes aient été augmentées d'un facteur 100 par rapport aux expériences précédentes.

Nous avons également testé cette charge bactérienne de 10^8 cellules/ml dans des flacons en plastique hydrophile et nous avons obtenus des résultats similaires (non montrés).

Pris dans leur ensemble, ces résultats nous permettent de conclure que la présence d'eau d'Evian favorise l'adhérence des légionelles sur des surfaces de verre ou de plastique hydrophile à des concentrations bactériennes différentes et à 20 ou 37 °C.

3. Influence de la composition ionique de l'eau sur le phénomène d'adhérence

Pour déterminer quel est ou quels sont les ions présents dans l'eau d'Evian qui ont un effet sur l'adhérence de *L. pneumophila* aux surfaces, ce phénomène d'adhérence a été étudié avec de

l'eau ultra-pure supplémentée avec les principaux ions entrant dans la composition de l'eau d'Evian et à la même concentration que dans cette eau. Après 11 jours d'incubation, la suspension bactérienne contenant les bactéries libres (planctoniques) est remplacée par de l'eau pure et une sonication est réalisée pour décrocher les bactéries adhérees (sessiles). Les suspensions de bactéries planctoniques et sessiles ont été dénombrées sur gélose BCYE (figure 16).

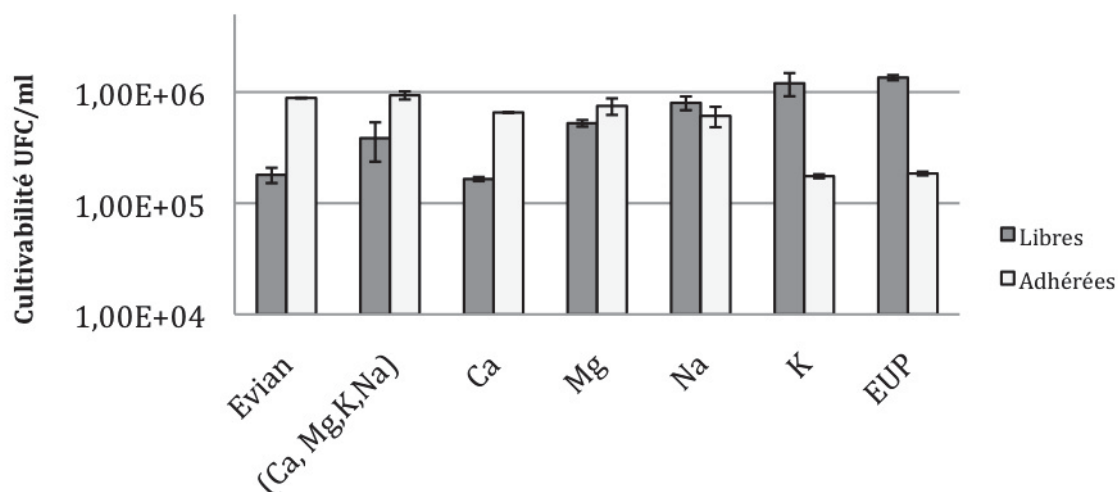


Figure 16 : adhérence après 11 jours de *L. pneumophila* sur le verre en fonction des ions présents
n=3

Les résultats présentés dans la figure 16 ne sont pas issus des mêmes suspensions bactériennes et les valeurs de départ sont donc légèrement différentes. Cependant on peut noter que pour le potassium ou le sodium, la concentration des bactéries libres est supérieure à celle des bactéries adhérees, comme dans le cas de l'eau ultra pure seule.

En présence d'eau d'Evian, la concentration des bactéries adhérees est plus grande que celle des bactéries libres. Des résultats similaires sont obtenus pour le calcium, le magnésium ou un mélange constitué des 4 cations présents dans l'eau d'Evian.

Ces résultats montrent que certains des ions présents dans l'eau d'Evian pourraient jouer un rôle important dans le phénomène d'adhérence des légionelles aux surfaces. Le calcium semble participer le plus à ce phénomène par rapport aux autres ions testés séparément, puisqu'en sa présence, l'adhérence des bactéries aux surfaces est la plus importante.

4. Influence de la concentration ionique de l'eau sur le phénomène d'adhérence

Afin de déterminer le rôle de la concentration ionique sur l'adhérence, la même expérimentation a été réalisée en faisant varier la concentration en calcium, magnésium et sodium. Le but de cette expérience était de rechercher une éventuelle relation de proportionnalité entre la concentration ionique et l'adhérence bactérienne aux surfaces.

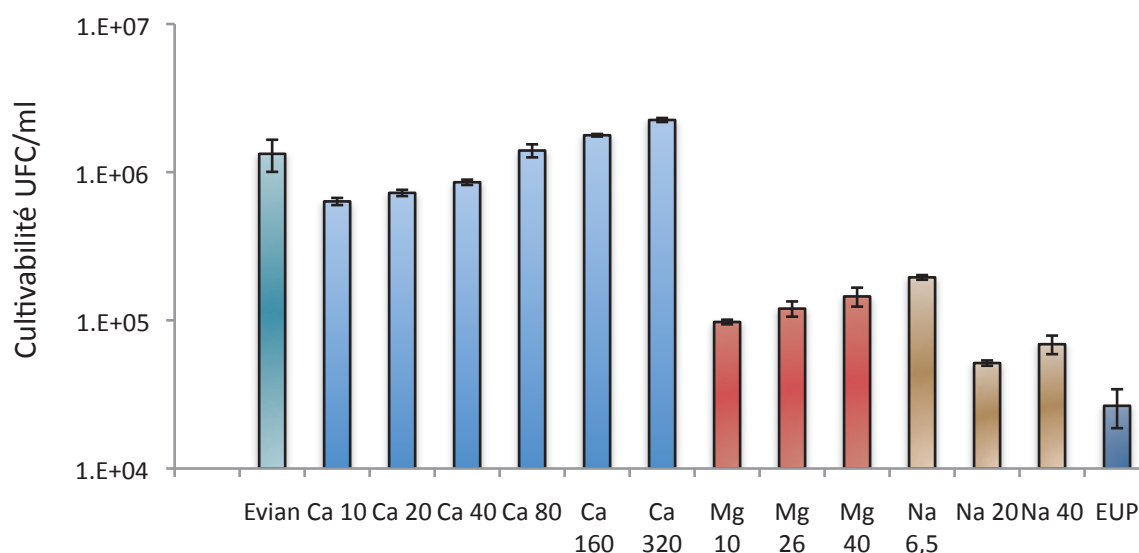


Figure 17 : Adhérence de *L. pneumophila* aux surfaces (plastique hydrophile)
n=3

Les résultats obtenus (figure 17) confirment que c'est le calcium qui a l'effet le plus important sur l'adhérence des bactéries aux surfaces, parmi les ions testés et aux concentrations retenues. Même à la plus faible concentration testée (10 mg/l), la présence de calcium provoque une adhérence marquée qui va augmenter parallèlement à la concentration de calcium présent dans le milieu. L'intensité de cette adhérence est de l'ordre de celle observée en présence d'eau d'Evian. Ce n'est pas le cas pour les deux autres ions testés pour lesquels l'adhérence est beaucoup plus faible. Pour le Mg, l'adhérence croît avec l'augmentation de la concentration en magnésium. En revanche, pour l'ion sodium, une concentration de 6,5 mg/l, conduit à une adhérence plus élevée qu'à des concentrations de 20 ou 40 mg/l, ce qui pourrait être en relation avec la toxicité de sodium pour *Legionella* (Byrne et Swanson, 1998).

Ces résultats montrent que, parmi les ions testés, c'est le calcium qui a l'effet le plus marqué sur l'adhérence de *L. pneumophila* aux surfaces même aux plus faibles concentrations testées.

5. Effet de la durée de contact avec le calcium sur l'adhérence bactérienne

Nous avons donc observé que la présence du calcium favorise l'adhérence de *L. pneumophila* aux surfaces de verre et de plastique hydrophile. Nous avons ensuite cherché à mettre en évidence l'effet de la durée d'incubation de *L. pneumophila* avec l'ion calcium sur l'adhérence bactérienne aux surfaces.

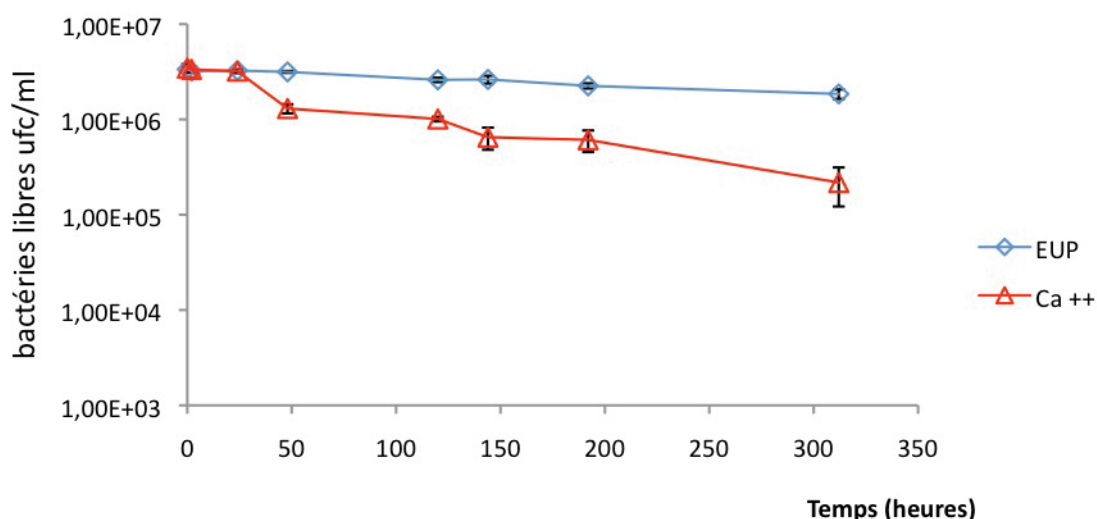


Figure 18 : Influence du Ca (80 mg/l) sur la quantité de bactéries libres en fonction du temps

La valeur 0 correspond à deux mesures effectuées à 0 et à 2h. (n= 3)

Pour cela, nous avons incubé des bactéries dans de l'eau ultra pure seule et avec Ca à 80 mg/l (concentration de l'eau d'Evian). Ces résultats sont présentés sur la figure 18.

Nos résultats montrent qu'après 2 ou 24 heures d'incubation, il n'y a pas de différence de concentrations des bactéries libres dans l'eau pure et l'eau supplémentée en calcium.

Au delà de 24 heures, la concentration des bactéries libres en suspension diminue avec le temps en présence du calcium. La différence entre les deux conditions testées devient de plus en plus importante. Au delà de 24 heures, la quantité de bactéries libres dans l'eau ultra pure est toujours plus importante que dans l'eau supplémentée avec du calcium. La diminution de la concentration en bactéries libres peut atteindre 1 log après 312 heures (13 jours) d'incubation.

Ces résultats montrent que le phénomène d'adhérence n'est pas un phénomène immédiat. Il faut attendre plus de 24h pour observer l'adhérence des bactéries aux surfaces.

6. Calcium et modification du profil protéique bactérien

L'existence d'un délai nécessaire pour observer l'adhérence des bactéries aux surfaces nous a laissé penser que ce phénomène pourrait être lié à un changement phénotypique plutôt qu'à un processus physique. Il pourrait donc s'accompagner d'un changement dans l'expression des protéines qui permettent aux bactéries d'adhérer aux surfaces.

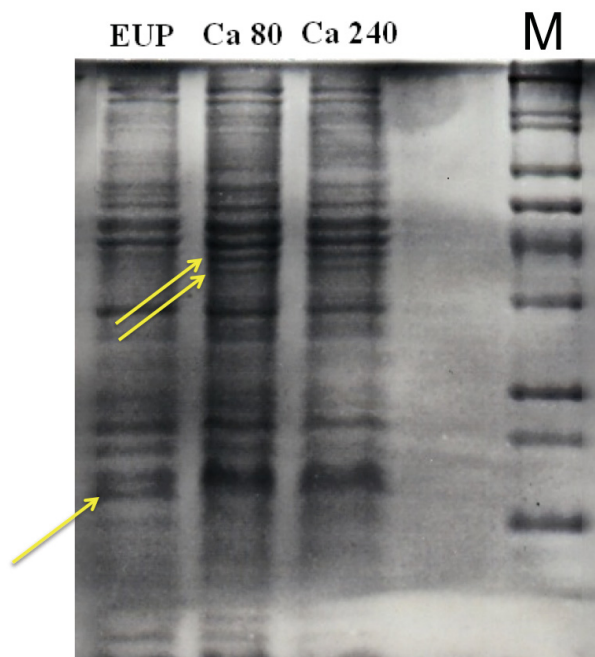


Figure 19: profils protéiques de *L. pneumophila* placée 11 jours dans différentes eaux

EUP : eau ultra pure ;

Ca 80 et Ca 240 : solution de chlorure de calcium dans l'eau ultra pure à 0 et 240 mg/l, respectivement

M étalon Sigma : S8445- 1VL (6,5-200 kDa)

Les flèches indiquent les positions où des changements majeurs dans les profils sont visibles.

Ce changement au niveau protéique a été étudié tout d'abord à l'aide d'une migration des échantillons protéiques sur SDS-PAGE des trois conditions différentes : eau ultra pure et eau ultra pure supplémentée avec 80mg/l ou 240 mg/l du calcium.

La photo du gel (figure 19), montre un changement du profil protéique des bactéries en fonction ou non de la présence de calcium. On remarque en effet une apparition ou une surexpression de certaines bandes, particulièrement dans trois zones précises (indiquées par des flèches sur la figure 19).

Ce changement est observé entre l'EUP et le calcium, et pour les deux concentrations testées (figure 19). Il semble donc que la présence du calcium soit responsable de cette modification du profil protéique bactérien.

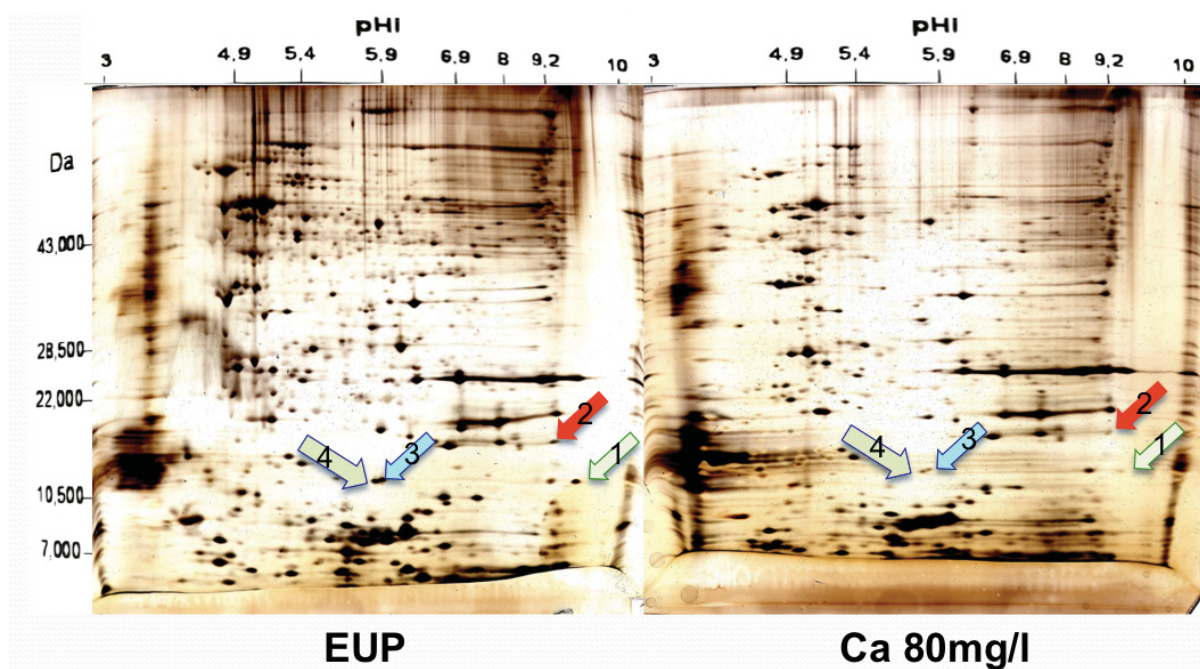


Figure 20 : profils protéiques obtenus par électrophorèse bidimensionnelle de *L. pneumophila* dans différentes eaux
 Les protéines sont extraites de bactéries ayant séjournées 11 jours dans les deux eaux suivantes : EUP (eau pure) ;
 Ca 80mg/l (solution de chlorure de calcium dans l'eau ultra pure).
 Les flèches indiquent les 4 protéines dont l'intensité est plus faible dans les gels "Ca 80 mg/l"
 Photographie de deux gels représentatifs

Pour mieux caractériser ces modifications protéiques, nous avons choisi de procéder à une analyse par électrophorèse bidimensionnelle. Deux conditions ont été retenues, un maintien pendant 11j des bactéries dans l'eau ultra pure et dans une solution de chlorure de calcium (équivalent à 80mg/l de Ca^{2+}). Les résultats obtenus (figure 20) montrent une variation de l'expression d'un certain nombre de protéines.

Par analyse visuelle et comparaison de plusieurs gels (5 gels par condition, correspondant chacun à des suspensions bactériennes différentes), nous avons identifié quatre protéines dont l'intensité est modifiée entre ces deux conditions et sur tous les gels observés. Cette intensité est plus faible en présence du calcium pour les 4 protéines (figure 20). Nous n'avons pas observé d'autres modifications notables et qui seraient constamment visibles sur tous nos gels.

Les deux premières protéines sous exprimées ont un pHi compris entre 9,2 et 10 (protéines 1 et 2, figure 20) alors que le pHi des deux autres est voisin de 5,9 (protéines 3 et 4, figure 20). Toutes ces protéines ont une taille comprise approximativement entre 10,5 et 22 kDa.

Les protéines correspondantes ont été excisées pour identification.

Les résultats obtenus ont montré que les spots 3 et 4 correspondent à la même protéine. Il s'agit de GspA (global stress protein). Chez la plupart des bactéries, cette protéine est induite sous l'influence de nombreuses conditions de stress. Chez *Legionella*, il a été montré que l'expression du gène *gspA* est augmentée après exposition de la bactérie à un choc thermique, à un stress oxydatif, à un choc osmotique ou à un choc acide et durant l'infection intracellulaire des macrophages (Abu Kwaik et al., 1997). Ici, nous observons une réduction apparente de l'intensité de l'expression de cette protéine sous l'influence de la présence de calcium. Cependant, nos observations résultent de la comparaison de deux conditions, l'une dans l'eau ultra-pure, qui nous sert de référence, l'autre en présence de chlorure de calcium à 80 mg/l. Il n'est donc pas à exclure que le niveau d'expression dans notre condition de référence (eau ultra-pure) puisse correspondre à un stress osmotique, ce qui pourrait donc expliquer notre observation.

Le spot 2 correspond à la protéine Mip (macrophages infectiosity potentiator) qui est un facteur majeur de virulence et qui est nécessaire à la multiplication des légionelles dans les macrophages alvéolaires humaines et les protozoaires (Cianciotto et al., 1989 ; Cianciotto et Fields, 1992 ; Riboldi-Tunncliffe et al., 2001). Il s'agit également d'un facteur important dans l'optimisation de la survie intracellulaire de *Legionella* dans les protozoaires (Helbig et al., 2001). L'expression du gène *mip* chez *Legionella* est plus importante en phase stationnaire que durant la phase exponentielle et est principalement sous la dépendance de RpoS, le facteur sigma de phase stationnaire (Bachman et Swanson, 2004). Ici, nous observons une diminution de la quantité de Mip en présence de calcium. Le régulon RpoS est étroitement associé dans la réponse au stress (Bachman et Swanson, 2004). Il n'est donc pas à exclure, là encore, qu'il pourrait s'agir comme nous le supposons pour GspA, d'une surexpression de Mip en condition de stress osmotique, dans l'eau ultra-pure.

L'analyse de la protéine 1 n'a pu être pour l'instant conduite avec succès du fait de quantités trop faibles de protéines extraites à partir des gels, malgré nos nombreuses tentatives de préparation. Cette analyse se poursuit actuellement par une approche LC MS/MS qui nécessite des quantités plus faibles.

Le choix de poursuivre notre analyse des profils protéiques par une approche en électrophorèse 2D a été guidé par nos observations réalisées en électrophorèse monodimensionnelle. Cependant, les résultats obtenus ne nous permettent pas de conclure sur l'éventuelle participation de protéines à l'adhérence de ces bactéries aux surfaces en présence

de calcium. Nous avons préparé des extraits acellulaires solubles. Il est probable qu'ils contiennent peu de protéines membranaires, alors que ce serait probablement celles-ci, parmi l'ensemble des protéines, qui pourraient le plus être impliquées dans un processus d'adhérence. Une analyse comparable, mais utilisant des extraits membranaires aurait probablement pu lever cette hypothèse. Par manque de temps, cette étude n'a pas été entreprise.

7. Traitement des cellules à la protéinase K

Afin d'évaluer une éventuelle participation de protéines exposées à la surface des cellules dans l'adhérence des légionelles, une digestion à la protéinase K de cellules entières a été entreprise. Nous avons réalisé plusieurs essais à l'aide de différentes concentrations de protéinase K, de 0 à 2 mg/ml (37 °C, 1h). Aucune différence significative dans les dénombrements sur gélose effectués sur ces différents échantillons n'a été observée (résultats non montrés).

Des suspensions bactériennes à 10^8 cellules/ml ont été préparées dans deux types d'eau, EUP et eau d'Evian. Ces cellules ont été incubées à 37 °C pendant 3 jours. D'après nos observations précédentes (figure 18, Page 66), ce délai était susceptible de permettre aux légionelles d'exprimer les éventuelles protéines leur permettant d'adhérer aux surfaces.

Après ces 3 jours, des aliquotes ont été traités à la protéinase K et les différents lots de cellules ont ensuite été dilués à 10^6 cellules/ml, dans les mêmes eaux. Les suspensions ont ensuite été incubées 1 heure à 37°C dans des flasques de culture pour comparer leur adhérence aux surfaces. Les suspensions bactériennes ont ensuite été remplacées par de l'eau stérile et une sonication a été réalisée afin de détacher les bactéries adhérentes.

Une coloration Baclight (résultats non montrés) et une numération sur gélose (figure 21) ont été réalisées.

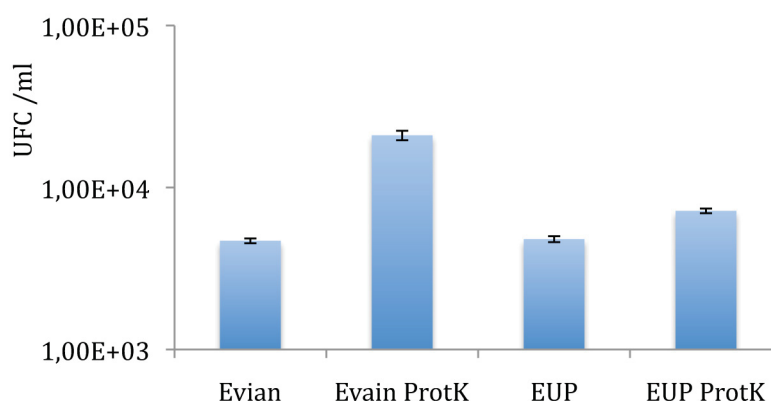


Figure 21 : dénombrement sur gélose des légionelles adhérentes aux surfaces dans différentes conditions

Evian, EUP : cellules placées 3 jours dans l'eau ultra pure (EUP) ou l'eau d'Evian

ProtK : cellules traitées à la protéinase K

n= 2

Nous n'observons pas de différence entre les quantités de cellules adhérentes aux surfaces préalablement placées dans l'EUP ou dans l'eau d'Evian (figure 21). Cependant, il est possible que la durée d'exposition au calcium (3 jours d'attente au lieu des 11 jours utilisés précédemment) ainsi que le délai d'adhérence aux surfaces (une heure) soient responsables de cette absence de différence.

Le phénomène d'adhérence après traitement à la protéinase K est plus important pour les échantillons "eau d'Evian" que pour les échantillons "eau ultra pure". Cette observation, ajoutée aux précédentes, confirme le rôle important des minéraux (du calcium ?) dans le processus de préparation des cellules à l'adhérence aux surfaces.

Tous les échantillons traités à la protéinase K présentent une adhérence plus importante que les mêmes lots non traités. Il semble donc que cette digestion facilite l'adhérence aux surfaces, au contraire de ce que attendions dans le cas de l'implication de protéines. Les protéines de surface ne joueraient donc pas un rôle direct dans l'adhérence. Elles pourraient même masquer partiellement les éléments impliqués dans ce processus, par exemple des lipides ou des polysaccharides, qui après digestion à la protéinase K seraient plus accessibles pour interagir avec les surfaces. Cependant, il n'est pas à exclure qu'une digestion ménagée de protéines de surface par la protéinase K conduise à nos observations. Nous aurions alors plutôt procédé à une maturation des ces protéines, les rendant plus aptes à l'adsorption aux surfaces. Cependant, l'activité non spécifique de la protéinase K rend peu probable cette dernière hypothèse. Pour répondre à ces hypothèses, nous devons reproduire cette expérience avec des concentrations de protéases ou des durées de traitement plus importantes, mais aussi avec

d'autres protéases (par exemple la trypsine), dans des conditions expérimentales ne conduisant pas à la mort des cellules.

8. Matières minérales et infection

8-1 : Détermination des conditions de préparation des légionelles post-amibiennes

Afin de déterminer les conditions de coculture légionelles-amibes permettant d'obtenir des bactéries libres, après réplique de ces légionelles dans les amibes, nous avons procédé à différents essais.

Pour infecter les amibes (*A. castellanii*), nous avons préparé des suspensions de légionelles non filamenteuses. Pour espérer obtenir après coculture, des suspensions de légionelles majoritairement post-amibiennes, nous avons choisi d'utiliser peu de bactéries au départ des cocultures (environ $5 \cdot 10^3$ UFC/ml). Les cocultures ont donc été conduites avec une MOI de 0,02.

Après 96h de coculture, nous obtenons environ 10^7 UFC/ml, ce qui remplit nos objectifs (figure 22). C'est cette condition qui sera utilisée pour nos préparations de légionelles post-amibes.

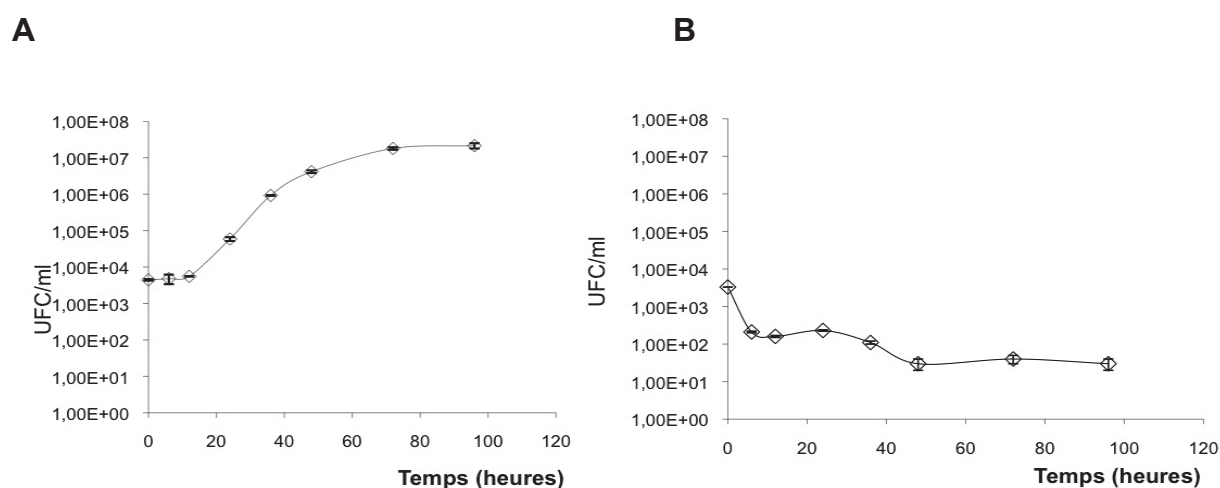


Figure 22 : Cultivabilité des légionelles après infection des amibes

A : dénombrement d'une coculture légionelles-amibes au cours du temps

B : dénombrement d'une culture de légionelles dans le même tampon qu'en A, mais sans amibes.

n =3

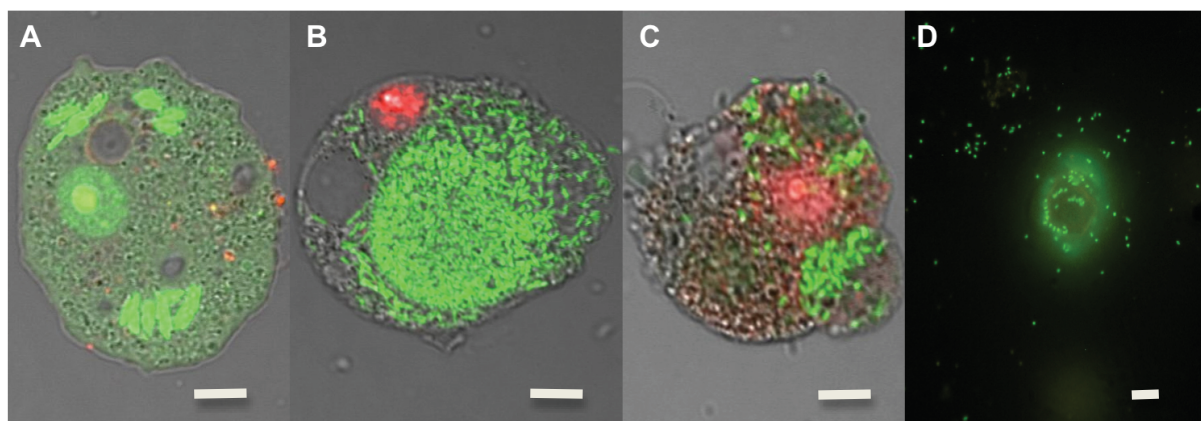


Figure 23 : Coloration BacLight™ des amibes après infection des légionelles

A à C : images en microscopie confocale ; D image en microscopie à épifluorescence

A : après 24 h d'infection ; B : après 48 h d'infection ; C : après 72 h d'infection ; D : après 96 heures d'infection. Les photographies sont représentatives de la majorité des cellules observées pour chaque condition, sauf pour C (voir texte)

La barre représente 10 μm

8-2 : Infection des cellules par *Legionella pneumophila*

L'impact de la présence des matières minérales a été étudié en infectant différents types cellulaires (macrophages, amibes et pneumocytes) par trois préparations bactériennes différentes : des bactéries non filamenteuses à "J0" (placées dans l'eau d'Evian et testées immédiatement) et "J11" (après 11 jours d'incubation à 37°C dans l'eau d'Evian) et des bactéries post-amibes.

Les résultats de l'infection des macrophages (figure 24A) montrent qu'il n'y a pas de différence au niveau de la multiplication des légionelles entre les deux préparations J0 et J11. Ces deux types présentent à peu près le même comportement de T_{0h} à T_{24h} avec une augmentation de population de 1,5 à 2 log, ainsi qu'une décroissance similaire entre T_{24h} et T_{48h} avec une réduction de population d'environ 0,5 log. Le phénotype bactérien post-amibes a une pente plus forte que les deux autres préparations bactériennes étudiées avec une augmentation de 2,5 log entre T_{0h} et T_{24h} et une réduction plus faible que 0,5 log entre T_{24h} et T_{48h} . Ces résultats montrent que le séjour des légionelles de 11 jours dans l'eau d'Evian n'a pas d'influence sur la multiplication des légionelles dans les macrophages. De plus, les bactéries post-amibes se multiplient plus dans les macrophages que les autres phénotypes bactériens.

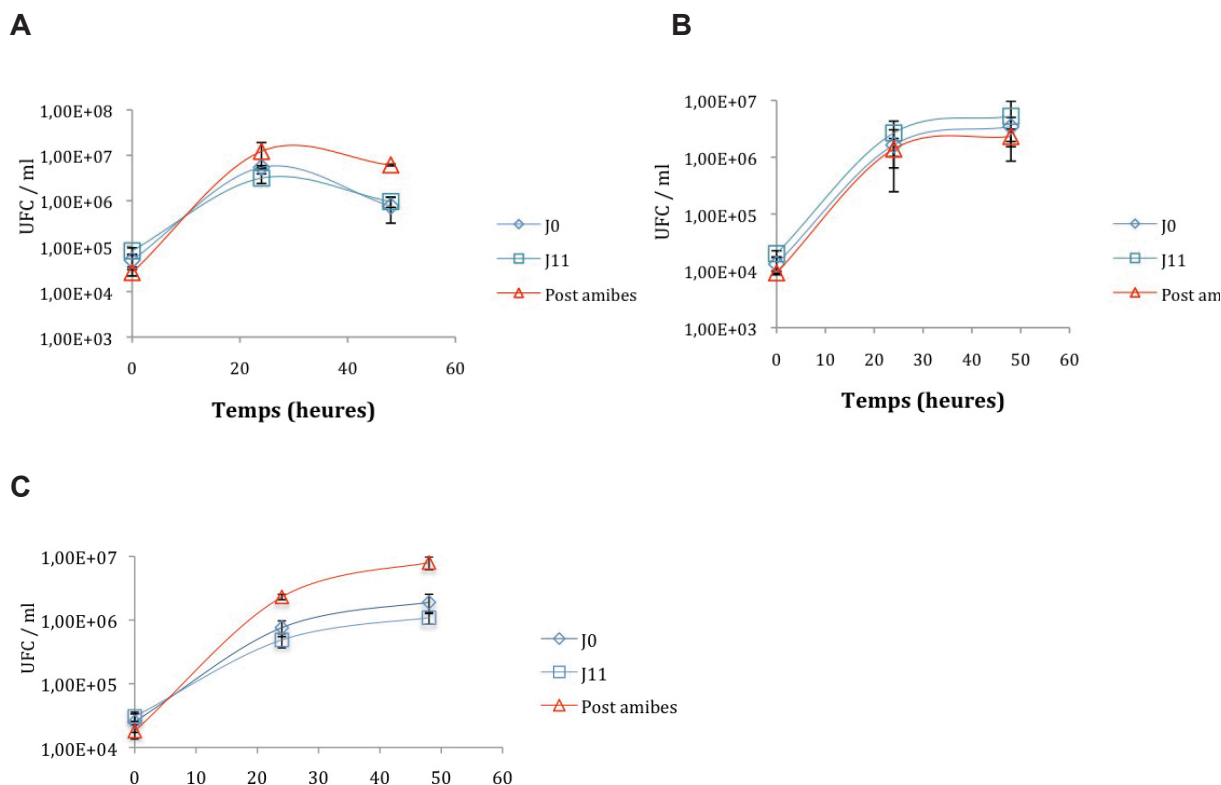


Figure 24 : infection d'amibes, de macrophages et de pneumocytes II par différentes suspensions de légionelles

A : infection des macrophages U937

B : infection de l'amibe *A. castellanii*

C : infection de pneumocytes II (A549)

J0 et J11 : suspensions de légionelles restées dans l'eau d'Evian respectivement 0 et 11 jours.

Post amibes : légionelles répliquées dans l'amibe *A. castellanii*

(n = 3)

Lors de l'infection d'*A. castellanii* (figure 24B), la même pente est observée entre T_{0h} et T_{24h} avec une augmentation de $\sim 2,5$ log des trois préparations bactériennes. Entre T_{24h} et T_{48h} , la population bactérienne semble stable. Ces résultats montrent que la présence de matières minérales n'a pas d'influence sur la multiplication des bactéries dans les amibes. A l'inverse de l'infection des macrophages, le phénotype post-amibe a la même pente d'infection que les deux autres préparations.

En ce qui concerne l'infectiosité des légionelles pour les pneumocytes (figure 24C), on ne remarque pas de différence entre J0 et J11. Une augmentation de la concentration bactérienne de $\sim 1,5 - 2$ log après 48 heures d'infection est observé pour ces deux préparations bactériennes. Pour le phénotype bactérien post-amibes, on observe une meilleure capacité de multiplication : la population bactérienne augmente de ~ 2 log après 24 heures et dépasse 2,5 log après 48 heures d'infection.

En conclusion, nous observons qu'il y a très peu de différence entre les suspensions bactériennes placées 0 et 11 jours dans l'eau d'Evian. Le vieillissement de la suspension de légionelles dans l'eau d'Evian n'a donc pas modifié de façon détectable le comportement de ces bactéries vis à vis des types cellulaires testés.

Par contre, nous confirmons les observations décrites dans la littérature : le passage dans les amibes améliore la capacité des légionelles à infecter les cellules épithéliales et les macrophages (Cirillo et al., 1994), par rapport à nos témoins constitués par les suspensions de légionelles dans l'eau d'Evian. Nous observons de façon inattendue que ce phénomène ne se reproduit pas contre de nouvelles populations d'amibes.

8-3 : Infection des souris A/J par Legionella pneumophila

8-3-1 : Détection et multiplication des légionelles dans les poumons

L'équipement permettant l'exposition des souris aux aérosols de légionelles a été développé dans le cadre du programme ANR LEGIOAEROPATHO par les équipes du CSTB et de l'EPHE de Nancy participant à ce programme. Cet équipement a été introduit dans l'animalerie de l'ENS de Lyon et les expérimentations sur la souris ont été conduites sous la direction du Dr Florence ADER.

Les souris A/J ont été infectées par deux phénotypes bactériens différents : des légionelles post-amibes (dans le tampon amibe) et des légionelles à J0 dans l'eau d'Evian. Les résultats d'infection des macrophages et des pneumocytes nous ayant montré qu'il n'y a pas de différence de comportement entre J0 et J11, nous n'avons donc pas retenu J11 pour l'infection des souris. Cette infection a été réalisée selon deux méthodes : par voie intra-nasale et par aérosols.

Les souris ont été sacrifiées après 1 ou 3 heures selon la méthode d'infection, constituant le T0, et 48h après infection, constituant le T48. Les poumons ont été prélevés et broyés et une partie de ce broyat a été utilisée pour ensemercer des géloses BCYE pour numération des légionelles.

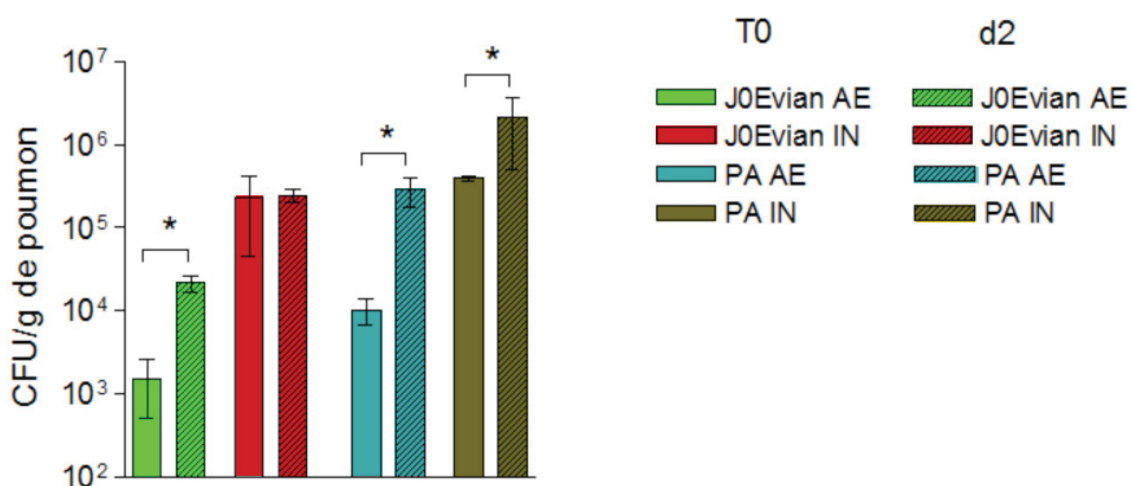


Figure 25 : Cultivabilité des légionelles dans les poumons

J0Evian : bactéries à J0 dans l'eau d'Evian ; PA : bactéries post amibes ; AE : infection par aérosols ; IN : infection intra-nasale ; T0 : Sacrifice des souris après 1 heure pour les AE et 3 heures pour les IN ; d2 : sacrifice des souris après 48 heures d'infection (n=3)

La comparaison intra-groupes des souris (figure 25) montre qu'il y a une augmentation significative de 0 à 48 heures des populations bactériennes dans les poumons, à l'exception de l'infection en intra-nasal réalisée avec le phénotype bactérien Evian pour lequel on n'observe pas d'augmentation. Cette augmentation est de l'ordre de ~ 1 log pour Evian aérosol ; $\sim 1,5$ log pour post-amibes aérosol et de $\sim 0,5$ log pour post-amibes intra-nasal.

Ces résultats montrent que nous avons réussi à infecter les souris avec la méthode aérosols et que nous arrivons par cette technique à retrouver des légionelles dans les poumons des souris dès T0.

De plus, ces résultats laissent à penser que les bactéries post-amibes semblent plus aptes à se multiplier dans les poumons que les bactéries eau d'Evian et que l'infection par les aérosols semble plus favoriser la multiplication des légionelles que l'infection par voie intra-nasale. Néanmoins, le faible nombre de souris utilisées ne permet pas d'obtenir des résultats significatifs.

A T0 les souris reçoivent plus de bactéries par voie intra-nasale que par aérosols, quel que soit le type de légionelles utilisées. En effet, l'injection par voie intra-nasale nécessite des quantités de légionelles assez importantes, de l'ordre de 10^6 par souris (injection de 40 μ l d'une suspension de légionelles à $2,5 \times 10^7$ légionelles/ml). L'expérience acquise par le Dr Florence ADER montre qu'en dessous de cette dose, l'infection de la souris par injection intra-nasale n'est pas efficace. Nous observons donc que l'infection par aérosols semble plus

efficace que la voie intra-nasale, puisque des doses plus faibles permettent une infection de la souris.

A 48 heures, les bactéries apportées par les aérosols se sont mieux multipliées que les bactéries injectées par voie intra-nasale, exception faite des bactéries post-amibes. Donc, les aérosols semblent être plus efficaces pour infecter la souris, et le passage dans les amibes semble compenser cet effet lorsque les bactéries sont apportées par voie intra-nasale.

Tableau 3 : Facteur de multiplication entre J0 et J2

AE	J0Evian	13,99
	PA	27,83
IN	J0Evian	1, 07
	PA	5,4

Le facteur de multiplication entre 0 et 48 heures a été calculé (tableau 3). Les résultats obtenus montrent que les bactéries post-amibes se multiplient mieux dans les souris que les bactéries eau d'Evian, quelle que soit la méthode utilisée pour l'infection. De plus l'aérosolisation des bactéries augmente le facteur de multiplication dans les poumons des souris.

8-3-2 : Rapport poids mouillé / poids sec des poumons

La mesure du rapport poids mouillé / poids sec des poumons (Wet-to-Dry) est l'un des indicateurs de l'intensité de l'infection des poumons. Ce rapport est d'autant plus grand que

l'infection est grave, par suite de l'entrée massive d'eau dans les poumons infectés.

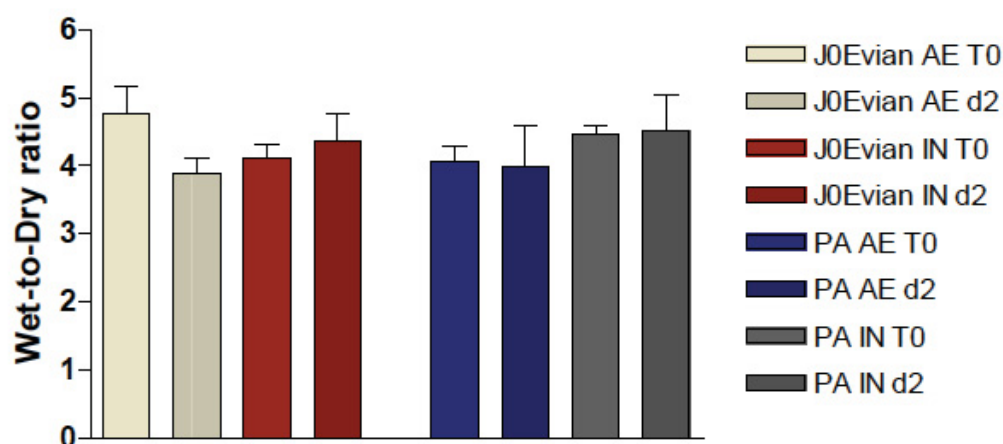


Figure 26 : Ratio des poids de poumon mouillé sur poids de poumon sec (Wet-to-Dry ratio) dans les homogénats de poumons murins T0 et 48 h post-infection (d2) dans les différents groupes expérimentaux (Voir légende figure 25)

Les résultats du rapport Wet-to-Dry (figure 26) montrent qu'il n'y a pas de différence significative observée entre les différentes conditions testées, ce rapport étant compris entre 4 et 5 pour tous les échantillons de poumons infectés. Ces résultats nous paraissent étonnants dans la mesure où l'infection semble être installée, au moins dans certaines des conditions testées. Là encore, le trop faible nombre de souris utilisées ne nous permet pas de conclure. De nouvelles expérimentations, en incluant plus d'animaux, devraient être menées.

8-3-3 : Dissémination extra-pulmonaire

L'étude de la dissémination extra-pulmonaire a pour but de déterminer si les légionelles réussissent à sortir de la sphère pulmonaire et à se propager dans les autres organes.

Les résultats (tableau 4) représentent des valeurs qualitatives montrant la présence des bactéries dans le foie et la rate des souris étudiées. Le nombre de souris utilisées dans ce travail était de trois par condition, soit 12 animaux.

Ces résultats montrent que la dissémination dans le foie et la rate est similaire (33%) pour les deux phénotypes bactériens, par voie aérosols. En revanche, cette dissémination est plus importante pour les bactéries post-amibes que pour les bactéries eau d'Evian, par voie intra-

nasale. La voie aérosol serait donc plus efficace pour infecter la souris, phénomène compensé lors d'une infection par voie intra-nasale pour des bactéries post-amibes.

Tableau 4 : Positivité pour la présence de colonies de Lp Lens dans les homogénats de foie et de rate murins à 48 h post-infection dans les différents groupes expérimentaux

48 h post-infection (n= 3)		Foie (%)	Rate (%)
AE	J0Evian	33	33
	PA	33	33
IN	J0Evian	66	0
	PA	100	100

Cette partie du travail portant sur l'infection des souris apporte ainsi un éclairage préliminaire sur la capacité des différents phénotypes bactériens à infecter les souris et à disséminer dans leurs organes.

Nous avons montré que l'équipement développé pour l'exposition des souris aux aérosols est fonctionnel. Nous montrons également que les doses infectieuses efficaces apportées par voie aérosols sont plus faibles par rapport à celles nécessaires dans l'approche plus classique de l'infection par voie intra-nasale. Ces observations pourraient donc avoir des conséquences sur les valeurs établies vis à vis du risque légionelles. Il serait donc nécessaire de reproduire ces expériences qui n'ont pu être réalisées qu'avec peu d'animaux, du fait des conditions difficiles que nous avons rencontrées lors de la réalisation des ces manipulations.

9. Impact du passage dans *Tetrahymena tropicalis* sur le comportement de *Legionella pneumophila*

9-1 : Résistance à la gentamicine

Nous avons exposé trois types bactériens différents à la gentamicine : des légionelles non filamenteuses (bactéries libres), des légionelles post-*Tetrahymena* collectées 7 jours et 90 jours après passage dans le protozoaire.

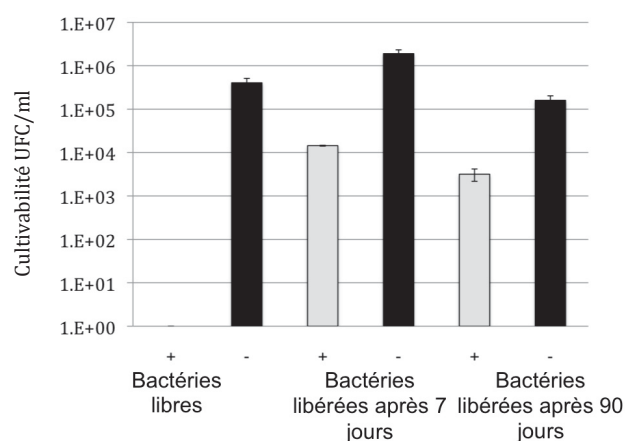


Figure 27 : Cultivabilité des légionelles après traitement à la gentamicine.

Les échantillons sont traités (+) ou non (-) avec la gentamicine (100µg/ml)

Les résultats (figure 27) montrent que les bactéries libres sont très sensibles à la gentamicine puisqu'on n'observe plus de bactéries cultivables après traitement. En revanche, les bactéries libérées des pellets après 7 ou 90 jours montrent une résistance à cet antibiotique, puisque nous avons observé une réduction de seulement 2 log de la cultivabilité pour ces 2 préparations bactériennes.

Le comportement des bactéries en phase stationnaire et post-*Tetrahymena* est donc différent face à la gentamicine, antibiotique largement utilisé dans l'étude des bactéries intracellulaires pathogènes (Isberg et Falkow, 1985; Fernandez *et al.*, 1989).

Nos résultats confirment les travaux réalisés par Garduno et al. (2002) sur la résistance à la gentamicine des FMI extraites des cellules HeLa.

Bouyer et al. (2007) ont par ailleurs testé la résistance à la gentamicine de légionelles présentes dans des vésicules sécrétées par les amibes, et observent également une résistance plus élevée pour ces bactéries, sans cependant déterminer si elle est due à un effet barrière de la membrane des vésicules ou à une résistance intrinsèque des bactéries.

Dans notre étude, nous montrons que cette résistance n'est pas due à la présence de barrières physiques, comme les membranes de pellets, puisque les pellets ont été préalablement éclatés par plusieurs passages au travers d'une aiguille de 27 gauges. Ces bactéries gardent de plus leur résistance à la gentamicine après 90 jours de séjour dans un milieu pauvre en matières nutritives.

Nos résultats démontrent que le passage des légionelles dans *T. tropicalis* augmente leur résistance à la gentamicine et que ce caractère perdure au moins 90 jours après le passage dans le protozoaire.

9-2 : Survie à long terme

La survie à long terme (120 jours) dans un milieu pauvre a été étudiée pour des légionelles libres et pour des bactéries empaquetées dans les pellets de *T. tropicalis* (figure 28).

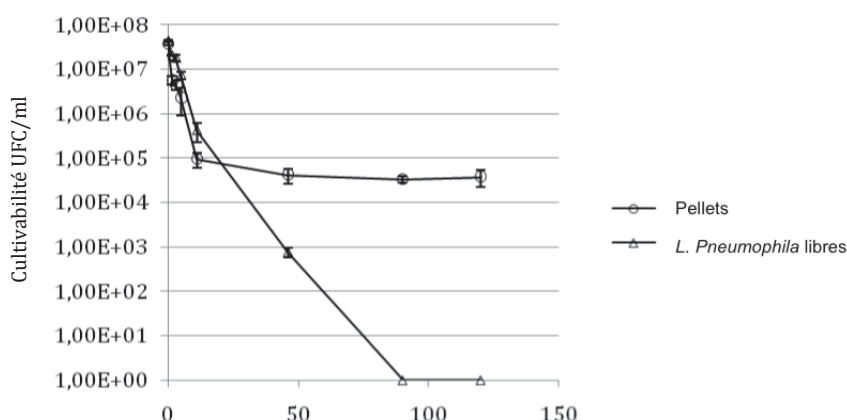


Figure 28 : Influence du passage dans *Tetrahymena tropicalis* sur la cultivabilité de *L. pneumophila* en fonction du temps
L. pneumophila Lens seule (Δ) et en présence de *T. tropicalis* ($\circ$), dans le tampon d'enkystement

Les résultats montrent que, entre 0 et 11 jours d'incubation la réduction est la même pour les deux types bactériens. Elle est de 2,5 log pour les deux conditions après 11 jours d'incubation dans le tampon d'enkystement. Après cette période, les courbes montrent une différence notable puisqu'on constate une chute de cultivabilité des bactéries libres puis une perte totale de la cultivabilité de ces bactéries dès 90 jours. Pour les bactéries contenues dans les pellets, une réduction de seulement 0,5 log est observée entre J11 et J50, puis, entre 50 et 120 jours, la population se stabilise à une concentration proche de 5.10^4 UFC/ml.

Nous avons choisi de laisser les échantillons dans un état le plus proche de celui retrouvé en milieu naturel. Nous avons observé que les pellets continuent à être parfaitement visibles dans nos échantillons en microscopie photonique durant toute la période de l'expérience (non montré). Les bactéries n'ont donc été libérées des pellets qu'au moment des prélèvements pour leur numération. La survie des légionelles post-*Tetrahymena* observée dans le milieu pauvre peut donc être due à la protection assurée par les membranes des pellets, ou à une résistance intrinsèque acquise par les légionelles lors de leur passage dans le cilié.

9-3 : Infection des pneumocytes humains (A549)

Nous avons infecté des pneumocytes humains avec des bactéries libres (fraichement préparées, donc à J0) et des bactéries de pellets conservés 90 jours dans un milieu pauvre. Les résultats (figure 29) montrent que quelle que soit la concentration bactérienne utilisée pour réaliser l'infection, les bactéries libérées des pellets sont plus infectieuses que les bactéries libres. De plus, on remarque que les bactéries contenues dans les pellets conservent leur potentiel infectant au moins pendant 90 jours.

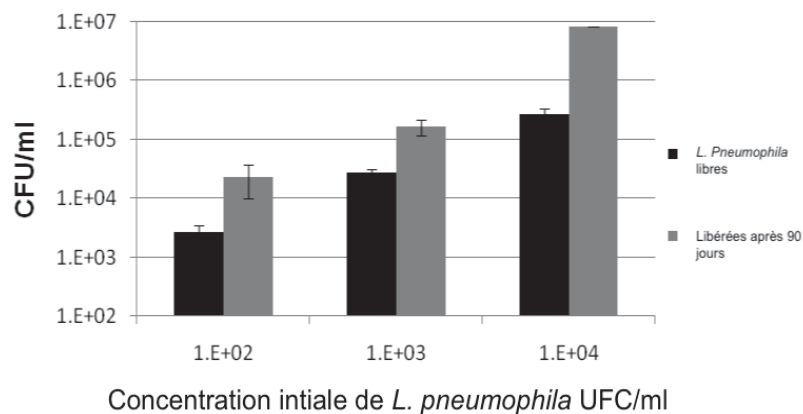


Figure 29 : Multiplication des *L. pneumophila* dans les pneumocytes (A549)

L. pneumophila libres : légionelles non filamenteuses préparées fraîchement

Libérées après 90 jours : légionelles provenant de pellets de *T. tropicalis* cassés 90 jours après leur production par le protozoaire.

Ces résultats suggèrent que le passage de *L. pneumophila* dans *T. tropicalis* a un rôle important pour conserver l'infectiosité des légionelles et pour donner à ces bactéries un caractère plus infectieux que les bactéries libres.

Ces protozoaires sont donc des hôtes qu'il faudrait mieux prendre en compte dans le risque légionelles, ceux qui sont habituellement considérés comme associés à ces bactéries étant plutôt les amibes. Il serait donc nécessaire d'accroître la recherche autour de la relation *Tetrahymena* - *Legionella*.

CONCLUSION GENERALE

PERSPECTIVES

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Influence des matières minérales et organiques sur la physiologie de *Legionella*

L'objectif de la première partie de cette étude a été d'évaluer l'influence des matières minérales et organiques sur la survie de *L. pneumophila* dans l'eau. La présence des matières organiques semble favoriser, mais seulement dans une faible mesure, la survie de la bactérie.

En ce qui concerne les matières minérales, nos premiers résultats ont montré que l'eau ultra pure semblait favoriser la survie des légionelles par rapport à l'eau d'Evian, sur la base de la numération des populations bactériennes en suspension. Ces résultats nous ont amené à émettre l'hypothèse qu'un autre phénomène pourrait expliquer cette observation. En fait, ces analyses ne nous informaient que sur la densité de la population de bactéries libres. Nous nous sommes donc intéressés aux populations fixées.

Nous avons soniqué les flacons pour remettre en suspension les bactéries adhérentes aux surfaces. Nous avons pu ainsi récupérer la totalité des bactéries et observer qu'il n'y pas de différence entre les densités de populations présentes dans l'eau d'Evian ou dans l'eau ultra pure. Nous observons que l'eau d'Evian permet en réalité une adsorption des bactéries aux surfaces testées d'une manière plus importante que l'eau ultra pure.

Nous avons alors souhaité déterminer quels minéraux présents dans l'eau d'Evian pouvaient être responsables de ce phénomène. Parmi ceux testés, l'ion calcium a montré l'effet le plus important sur l'adhérence des bactéries aux surfaces de verre et de plastique hydrophile.

Ces résultats novateurs pourraient être exploités pour lutter contre la présence et la dissémination de *Legionella* dans les réseaux d'eau. Cette bactérie, qui constitue un problème de santé publique depuis 35 ans, pourrait être protégée contre les traitements appliqués dans les réseaux par une vie sessile, dans le biofilm. La présence du calcium, favorisant l'adhérence des légionelles aux surfaces, pourrait d'une manière indirecte concourir à la protection des légionelles en favorisant leur attachement aux surfaces et aux biofilms. A notre connaissance, la relation entre la concentration de calcium dans l'eau et sa contamination par *Legionella* n'a pas été encore étudiée, mais Borella et al. (2003) montrent que la contamination de l'eau par *Pseudomonas* spp. est corrélée positivement à une concentration élevée du calcium.

Ces résultats laissent penser que les minéraux pourraient constituer un indicateur du risque de la contamination des réseaux par *Legionella* et qu'il serait pertinent de poursuivre une étude dans ce sens.

L'impact du calcium sur l'adhérence nous a encouragé à approfondir l'étude de ce phénomène. Nous avons observé que le processus d'adhérence n'apparaît pas de façon immédiate et que la présence de calcium dans le milieu provoque une modification au niveau de l'expression protéique. La comparaison des profils en électrophorèse 2D de bactéries incubées en eau ultra pure et en eau d'Evian nous a montré que 4 taches, correspondant à au plus 3 protéines, sont moins intenses en présence de minéraux. Ces protéines correspondent à GspA, Mip, et à une troisième protéine en cours d'identification. Pour les deux premières, nos observations pourraient être artéfactuelles et résulter du stress osmotique provoqué dans l'eau ultra pure. Notre étude a porté sur l'analyse de l'ensemble des protéines mais le protocole appliqué ne favorise pas l'étude des protéines membranaires. Il sera plus informatif de nous focaliser sur cette fraction des protéines, puisqu'elles seraient logiquement plus impliquées dans les phénomènes d'adhérence.

Néanmoins, afin de tenter d'approfondir le rôle éventuel des protéines de surface, nous avons incubé des légionelles en présence de protéinase K. Nos résultats montrent que le traitement à la protéinase K augmente l'adhérence des bactéries incubées dans l'eau d'Evian. Ce résultat intéressant montre que ce traitement a démasqué des sites d'adsorption aux surfaces mis en place de façon plus importante sur les cellules au cours de l'incubation dans l'eau d'Evian que dans l'eau ultra pure. La nature de ces sites reste encore à déterminer.

L'étude des membranes devra donc être poursuivie en nous focalisant sur leurs protéines, mais également sur leur composition en lipides, par exemple par l'analyse du lipidome récemment mise en place dans l'Unité (en collaboration avec le Dr Jean-Marc Berjeaud), et aussi par l'étude des sucres présents sur ces surfaces bactériennes (polysaccharides ...).

Interactions *Legionella-Tetrahymena*

L'interaction entre les protozoaires et *Legionella* est considérée comme étant un facteur favorisant la dissémination et la résistance de la bactérie. *Legionella* est incapable de se multiplier par elle-même dans la nature sans le passage dans certains protozoaires comme les amibes qui jouent un rôle crucial dans sa multiplication et qui améliorent son infectiosité et sa survie. De nombreuses études ont traité de la relation amibes-légionelles (pour des revues

récentes, Borella et al., 2005 ; Bichai et al., 2008), mais la relation avec d'autres protozoaires, comme les *Tetrahymena*, n'a pas bénéficié d'un intérêt aussi important.

Tetrahymena est un protozoaire cilié présent naturellement dans les milieux naturels et artificiels (Berk et al., 2008).

Nous avons étudié l'impact du passage de *L. pneumophila* dans *T. tropicalis* sur la résistance, la survie et l'infectiosité de cette bactérie. *T. tropicalis* excrète la bactérie dans des pellets qui peuvent contenir jusqu'à 100 cellules chacun, la bactérie étant alors sous forme mature intracellulaire (FMI).

Nous avons observé que le passage des légionelles dans *T. tropicalis* augmente leur résistance à la gentamicine. De plus, ce caractère perdure au moins 90 jours après le passage dans le protozoaire.

La survie à long terme a été également étudiée lors du passage des bactéries dans les *Tetrahymena*. Nous observons que cette survie est notablement améliorée, et ce jusqu'à 4 mois après le passage dans le protozoaire. Dans nos expériences, nous n'avons pas libéré les bactéries des pellets avant les tests de survie à long terme. La meilleure survie des légionelles post-*Tetrahymena* pourrait donc être due à la protection assurée par les membranes des pellets ou à une résistance intrinsèque de ces cellules.

Pour répondre à ces hypothèses, il serait nécessaire de compléter cette étude en utilisant des bactéries post-*Tetrahymena* libérées des pellets avant le test de survie à long terme.

Garduno et al, (2002) ont observé que l'infectiosité de légionelles FMI post-cellules HeLa est élevée pour les macrophages et pour les cellules HeLa.

Pour notre part, nous avons réalisé l'étude de l'infectiosité des légionelles FMI post-*Tetrahymena* vis à vis de pneumocytes humains. Ces bactéries FMI s'avèrent plus infectieuses que la forme stationnaire, même après un séjour de 90 jours dans un milieu pauvre.

L'ensemble de nos résultats concernant l'interaction *Tetrahymena-Legionella* suggère un rôle important de ce protozoaire dans la résistance des légionelles aux stress environnementaux, dans l'augmentation de l'infectiosité vis à vis des cellules humaines et dans la résistance

bactérienne aux antibiotiques. Ce protozoaire pourrait donc participer activement au risque légionelles et sa présence devrait être prise en compte dans les installations à risque.

***Legionella*-modèle murin**

Les travaux réalisés à Lyon sous la responsabilité du Dr Florence ADER avaient comme objectif de tester l'exposition de souris aux aérosols de légionelles. Cet objectif, en lui même, concentrait de nombreuses difficultés techniques rendant cette approche rarement mise en œuvre dans les programmes de recherche.

Nous avons comparé l'infectiosité de deux phénotypes bactériens, (i) des légionelles dans l'eau d'Evian, utilisée ici pour mimer une eau naturelle et (ii) des légionelles post-amibes pour étudier l'impact de ce passage sur leur niveau d'infectiosité.

Nous avons mis en œuvre deux modalités d'infection, l'exposition à des aérosols pour mimer la manière la plus probable de transmission des légionelles chez l'hôte et l'injection intra-nasale, comme témoin positif d'infection.

Les difficultés techniques ont été surmontées et nous avons réussi à infecter les souris par l'exposition aux aérosols. Nous montrons que la dose infectieuse est plus basse par cette voie que par la voie intra-nasale. De plus, nous observons que les bactéries post-amibes semblent plus infectieuses que les bactéries en phase stationnaire (suspendues dans l'eau d'Evian).

Ce travail, bien que préliminaire, a permis de dégager des tendances concernant le comportement du modèle murin vis à vis de l'exposition aux aérosols de légionelles, mais aussi concernant l'importance de l'état physiologique des bactéries dans ces aérosols.

La lourdeur des protocoles, les contraintes liées au modèle animal et celles liées à la manipulation en zone de risque III (légionelles aérosolisées), ne nous ont pas permis de recruter un nombre suffisant d'animaux pour ces expériences. Il serait donc fortement souhaitable de compléter cette étude afin de confirmer nos résultats préliminaires.

ANNEXES

Annexe 1

Milieux de Culture pour *Legionella*

Préparation de la gélose BCYE

Composition pour 1 litre:

- Extrait de levure	12 g
- Tampon ACES	10 g
- Charbon actif	2 g
- Hydroxyde de potassium	2,8 g
- Agar (Difco, 214530)	15 g
- L-cystéine hydrochloride	0.5 g
- Pyrophosphate de fer	0.3 g

- Mélanger et dissoudre l'extrait de levure, le charbon actif, l'hydroxyde de potassium et l'agar dans 350 ml d'eau Milli-RO.

Dissoudre le tampon ACES dans 500 ml d'eau Milli-RO puis ajouter cette solution tampon au mélange précédent. Ajuster le pH à $6,9 \pm 0,2$ avec une solution de HCl 1M ou de KOH 1M si nécessaire et ajouter 150 ml d'eau Milli-RO pour atteindre 1 litre.

Ensuite stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 min.

Stocker le milieu à température ambiante.

- La L-cystéine est préparée à une concentration de 80g/l et le pyrophosphate de fer à 50g/l à l'aide d'eau Milli-Q puis filtrés sur filtre seringue 0,2µm et conservés à 4°C jusqu'à utilisation. Ces solution 200 fois concentrées seront ajoutées au milieu en surfusion à 50°C lors de l'utilisation à raison de 2,5ml/500ml de milieu.

Préparation du milieu BYE liquide

Composition pour 1 litre:

- Extrait de levure	12 g
- Tampon ACES	10 g
- Hydroxyde de potassium	2,8 g
- L-cystéine hydrochloride	0.5 g
- Pyrophosphate de fer	0.3 g

Tous les composants sauf la L-cystéine hydrochloride et le pyrophosphate de fer sont dissous dans environ 800 mL d'eau Milli-RO et le pH est ajusté à $6.9 \pm 0,05$ à l'aide de solution de HCl 1M ou de solution de KOH 1M si nécessaire. Ensuite, compléter le volume à 1 litre avec de l'EUP. Le milieu est ensuite filtré sur un système Steritop Millipore stérile dans une bouteille en verre borosilicaté stérile. Le milieu est conservé en chambre froide à 4°C et un échantillon est mis à l'étude à 37°C pendant plusieurs jours pour vérifier qu'il n'y a pas eu contamination lors de la préparation (témoin de stérilité).

La L-cystéine est préparée à une concentration de 80 g/L et le pyrophosphate de fer à 50 g/L à l'aide d'EUP puis filtrés stérilement sur filtre seringue 0,2 µm et conservés à 4°C jusqu'à utilisation. Ces solutions 200 fois concentrées seront ajoutées au milieu liquide lors de l'utilisation à raison de 25 µL/5 mL de milieu.

Annexe 2

Production de légionelles non filamenteuses

(Protocole fourni par le CNRL de Lyon)

1. Ensemencer une boîte de BCYE avec 2-3 billes de *legionella* *Lens* conservés à -20°C.
2. Mettre la boîte 3 jours dans l'étuve de 37°C.
3. Resuspendre 3 colonies (pour éviter les dérivées clonales) dans 5 ml de BYE.
4. Mettre le tube contenant les 5 ml dans l'étuve 37°C pendant 3-5 jours.
5. Ensemencer avec 100µl une boîte de BCYE.
6. Mettre la boîte à l'étuve de 37 °C 48 heures.
7. Resuspendre le tapis bactérien formé sur la boîte BCYE avec 10 ml de EUP autoclavée.
8. Mettre dans une erlen 91 ml de BYE 10% (10ml de BYE + 90 ml de EUP autoclavée)
9. Ajouter 9 ml de la suspension de {7} aux 91 ml de {8}.
10. Laisser pousser 14 heures maximum à 37°C (pour éviter la formation des filaments).
11. Centrifuger la suspension 15 min (5000t/min à 4°C).
12. Jeter le surnagent et laver deux fois (5000t/min, 4°C, 5min) avec de l'EUP autoclavée.
13. Resuspendre le culot avec 10 ml d'EUP autoclavée.

Annexe 3

Milieux pour *Acanthamoeba castellanii*

Préparation des solutions nécessaires à la préparation du PYG et du tampon amibe

- $\text{MgSO}_4 : 7\text{H}_2\text{O}$ 0,4M
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 : 2\text{H}_2\text{O}$ 0,25M
- $\text{CaCl}_2 : 2\text{H}_2\text{O}$ 0,05M
- KH_2PO_4 0,25M
- $(\text{NH}_4)_2\text{FeII}(\text{SO}_4)_2 : 6\text{H}_2\text{O}$ 5mM
- Glucose 2M

⇒ Attention!!! Pour la préparation de la solution de glucose, mettre d'abord de l'eau dans le bêcher, agiter puis verser la poudre. (Si on met la poudre avant l'eau → cristallisation → il faut alors chauffer pour dissoudre le glucose).

Préparation du milieu PYG liquide (pour la culture d'*Acanthamoeba castellanii*)

Composition pour 1 litre:

Dissoudre dans 900 mL d'EUP:

- | | |
|---------------------|------|
| - Citrate de sodium | 1 g |
| - Protéose peptone | 20 g |
| - Extrait de levure | 1 g |

Ensuite, ajouter :

- | | |
|---|-------|
| - $\text{MgSO}_4 : 7\text{H}_2\text{O}$ 0,4M | 10 mL |
| - $\text{Na}_2\text{HPO}_4 : 2\text{H}_2\text{O}$ 0,25M | 10 mL |
| - $\text{CaCl}_2 : 2\text{H}_2\text{O}$ 0,05M | 8 mL |
| - KH_2PO_4 0,25M | 10 mL |

Ajuster le pH à 6,5 avec une solution de HCl 1N ou de NaOH 1N.

Autoclaver à 120°C pendant 20 min, laisser refroidir ; puis, ajouter :

- 10 mL $(\text{NH}_4)_2\text{FeII}(\text{SO}_4)_2 : 6\text{H}_2\text{O}$ 5mM stérile (filtré sur 0,22µm)
- 50 mL Glucose 2M stérile

Préparation du tampon amibes (*Acanthamoeba* Buffer) pour 1 L

La préparation est la même que pour le milieu PYG mais sans peptone, extrait de levure ni glucose.

Annexe 4

Milieux pour *Tetrahymena tropicalis*

PCB Medium :

- 5g de l'extrait de levure (Bacto™ Yeast extract 212750)
- 10g de Tryptone (Bacto™ Tryptone 211705)
- 2g D-glucose
- Ajuster à 1 litre avec de l'eau distillée
- Ajuster le pH à 7.0 avec KOH (1M)
- Autoclaver 30 minutes.
- Le milieu est conservé à température ambiante.

Solution d'Osterhout (100x) :

- 10,5g de NaCl
- 0,23g de KCl
- 0,1g de CaCl₂
- 0,4g de MgSO₄-7H₂O
- 0,85g de MgCl₂-6H₂O
- Ajuster à 1 litre avec de l'eau distillée
- Stériliser par filtration (0,22µm)
- Le milieu est conservé à 4 °C

Osterhout's buffer :

- 40 ml de la solution d'Osterhout (100x)
- 0,121g de Tris base (hydroxymethyl aminomethane)
- Ajuster à 1 litre avec de l'eau distillée
- Ajuster le pH à 7.0 avec KOH (1M)
- Autoclaver 30 minutes.
- Le milieu est conservé à température ambiante.

Biphasic medium :

- 8g Dextrine (ICN - Biomedicals - 901520)
- 5g Levure autolysée (Difco 0229-01)
- 0,6g Acétate de sodium trihydraté (Sigma - S8750)
- 0,6g Concentré du foie (Sigma 202-3)
- 3g Bacto-casitone (Difco 0259-01)
- 2g Acides casaminés (Difco 0230-01)
- 16g Agar
- Ajuster à 1 litre avec de l'eau distillée
- Ajuster le pH à 7,3 avec KOH (1M)
- Autoclaver 30 minutes

Annexe 5

Congélation des cellules avec DMSO

- Préparer une solution de DMSO 15% comme suit :
 - Mettre 750µl de DMSO dans un tube de 15ml
 - Incuber sur glace et attendre la solidification de DMSO
 - Ajouter 4,25ml du milieu (PYG pour les amibes et RPMI pour les monocytes et les pneumocytes) dans le tube puis mélanger par retournement
- Décoller les pneumocytes en mettant 1,5ml de trypsine dans la flasque
- Incuber la suspension cellulaire à 37 °C pendant 3 minutes
- Ajouter 5ml de milieu (PYG ou RPMI) à la suspension cellulaire pour désactiver la trypsine
- Ajouter la suspension cellulaire à la solution de DMSO (concentration finale en DMSO est 7,5%).
- Distribuer 1ml dans des cryotubes
- Garder au congélateur -80 °C jusqu'à l'utilisation

Annexe 6

Préparation des gels d'électrophorèse

<u>Gels de séparation</u>	<u>mini gels</u>	<u>grands gels</u>
Acrylamide 40%	4,86 ml	23,55 ml
Bis-acrylamide 2%	2,38 ml	12,57 ml
Tris pH 8,9	2,5 ml (de Tris-HCl 1,5M)	29,02 ml (de Tris 1M)
SDS	100 µl (de SDS 10%)	387 µl (de SDS 20%)
Eau distillée	3,58 ml	11,56 ml
TEMED (6,6M) 76,7%	5 µl	60,75 µl
APS 10% (w/v)	50µl	232,2 µl

L'Ammonium PerSulfate (APS) et le TEMED sont ajoutés juste avant de couler les gels. Les 2 gels sont ensuite coulés en laissant 1,5cm en haut pour le gel de concentration et le strip puis 5ml de 1-butanol sont ajoutés au-dessus des gels de façon à régulariser la surface du gel et éviter l'évaporation. Après polymérisation, le butanol est enlevé, la surface des gels est rincée abondamment plusieurs fois avec de l'EUP puis de l'EUP est ajouté à la surface des gels. Les gels sont ensuite placés à 4 °C pendant la nuit. Ensuite, l'eau à la surface des gels de résolution est enlevée et le restant d'eau est ôté en utilisant du papier absorbant. Les gels de concentration sont ensuite coulés à la surface des gels de résolution.

<u>Gels de concentration</u>	<u>mini gels</u>	<u>grands gels</u>
Acrylamide 40%	0,48 ml	1,384 ml
Bis-acrylamide 2%	0,26 ml	0,736 ml
Tris pH 6,8	1,26 ml (de Tris-HCl 0,5M)	1,522 ml (de Tris 1M)
SDS	50 µl (de SDS 10%)	60,9 µl (de SDS 20%)
Eau distillée	2,92 ml	8,37 ml
TEMED (6,6M) 76,7%	5 µl	39,75 µl
APS 10% (w/v)	25 µl	60,9 µl

L'APS et le TEMED sont ajoutés juste avant de couler les gels. Les 2 gels sont ensuite coulés au-dessus des gels de résolution en laissant 0,5cm au-dessus du gel de concentration pour pouvoir déposer la bandelette de gel par la suite. Ils sont ensuite recouverts par du 1-butanol afin de régulariser leur surface. Après polymérisation, le 1-butanol est enlevé, la surface des gels rincée abondamment à l'EUP et du tampon de migration 1X (25 mM Tris ; 0,192 M Glycine, pH 8,3, 0,1% SDS) est ajouté à la surface des gels afin de faciliter le dépôt des bandelettes de gels à la surface des gels de concentration.

Annexe 7

Coloration des gels d'électrophorèse

Coloration au Bleu de Coomassie

1. Etape de fixation

A la fin de la migration, les gels sont fixés dans une solution (40% méthanol, 7% acide acétique, 53% eau distillée) pendant 30 minutes.

2. Etape de coloration

Les gels sont colorés avec la solution Bleu de Coomassie (50% méthanol, 7% acide acétique, 2,5 g Bleu de Coumassie, QSP eau 100%)

3. Etape de décoloration

Les gels sont décolorés dans une solution décolorante (40% méthanol, 7% acide acétique, 53% eau distillée) sous agitation lente, en changeant souvent de bain.

4. Etape de lavage

Les gels sont placés dans plusieurs bains d'eau distillée, puis ils sont conservés dans de l'eau distillée jusqu'à qu'ils soient scannés.

Coloration au nitrate d'argent

Kit Silver Stain Plus – BioRad

1. Etape de fixation

A la fin de la migration, placer les gels dans 'Fixative Enhancer Solution' (50% méthanol, 10% acide acétique, 10% Fixative Enhancer Concentrate, 30% eau distillée).

La durée de la fixation est de 20 minutes sous agitation lente.

2. Etape de rinçage

Enlever la 'Fixative Enhancer Solution'.

Rincer le gel deux fois avec 400 ml de l'eau distillée pendant 10 minutes chacune.

3. Etape de coloration

Préparer la solution de coloration (35% de l'eau distillée, 5% de 'Silver Complex Solution', 5% de Reduction Moderator Solution' et 5% de 'Image Development Reagent') dans les 5 minutes avant l'utilisation.

Ajouter 50% de 'Development Accelerator Solution' juste avant le début de la coloration.

La coloration est réalisée sous agitation lente pendant au moins 15 minutes.

4. Etape d'arrêt de coloration

Enlever la solution de coloration.

Placer les gels dans une solution d'acide acétique 5% pour une durée minimale de 15 minutes.

Annexe 8

Dosage des protéines

Le dosage des protéines est réalisé avec le kit :

RC DC Protein Assay Kit II (N° catalogue 500-0112) - Biorad

Faire la gamme étalon :

Concentration ($\mu\text{g/ml}$ de BSA)	0	200	400	600	800	1000
BSA à 1 mg/ml (en μl)	0	12	24	36	48	60
H ₂ O (en μl)	60	48	36	24	12	0

Protocole de dosage des protéines (RC DC Protein Assay-BioRad)

Remarque : 5 μl de DC Reagent S + 250 μl de DC Reagent A = Reagent A

$\Rightarrow$ 127 μl de Reagent A/échantillon (ou standard)

1. Dans un tube eppendorf, mettre :
25 μl d'échantillon à doser
125 μl de RC Reagent I
Après 1 min, ajouter 125 μl de RD Reagent II
Vortexer puis centrifuger à 15000g pendant 3-5min.
Eliminer le surnageant par retournement sur papier absorbant
2. Répéter l'étape 1 en ajoutant au culot :
125 μl de RC Reagent I
Après 1 minute, ajouter 40 μl de RD Reagent II
Vortexer puis centrifuger à 15000g pendant 3-5 minutes
Eliminer le surnageant par retournement sur papier absorbant
3. Ajouter au culot 127 μl de Reagent A
Vortexer et incuber 5 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière (le précipité doit être dissous)
Vortexer
4. Ajouter 1ml de DC Reagent B
Vortexer et incuber 15 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière
5. Lire la DO des échantillons à 750nm

Annexe 9

Equilibration des bandelettes des gels

1. Préparer 10 ml de tampon d'équilibration de base (Urée 6M ; SDS 2% ; Tris-HCl 0,375M pH8,8 ; Glycérol 20%)
2. Préparer deux tubes distincts : l'un contenant 100mg de DTT et l'autre 125mg d'iodoacétamide.
3. Ajouter 5ml de tampon d'équilibration de base au tube contenant le DTT. Bien mélanger et ajouter une pointe (de cône) de Bleu de Bromophénol en poudre de façon à obtenir la solution d'équilibration I.
4. Sortir les strips (ayant subits l'IEF) de -80 °C. lorsqu'ils sont décongelés, placer les, face gel vers le haut, dans une cuve de réhydratation et couvrir chaque strip avec 2,5ml de solution d'équilibration I. Incuber à température ambiante sous agitation lente pendant 10 minutes.
5. Pendant l'étape 4, préparer la solution d'équilibration II en ajoutant 5ml de tampon d'équilibration de base et une pointe de Bleu de Bromophénol au tube contenant l'iodoacétamide.
6. Lorsque l'étape 4 est terminée, enlever la solution d'équilibration I et ajouter 2,5ml de solution d'équilibration II à chaque strip. Incuber à température ambiante sous agitation lente pendant 10 minutes.
7. Lorsque l'étape 6 est terminée, enlever la solution d'équilibration II.
8. Placer le strip (face gel devant et extrémité + sur la gauche) au dessus du gel de concentration sans former des bulles, Enlever l'excès du tampon de migration avec du papier absorbant sans toucher le strip.
9. Le strip est ensuite immobilisé à la surface du gel de concentration en ajoutant de l'agarose 2% LMP (Low Melting Point) préparé dans le tampon de migration.
10. Réaliser l'électrophorèse.

Annexe 10

Identification du spot numéro 2

Mascot Search Results

Protein View

Match to: [gi|54296815](#) Score: 79 Expect: 0.053
macrophage infectivity potentiator [*Legionella pneumophila* str. Paris]
Found in search of D:\data\donne\Donnees 2011\Semaine-15-2011\ID-279 Jacques FRERE\E-PP-ECH-ESIP- 12466(2)_21_0001.t

Nominal mass (M_r): 24865; Calculated pI value: 9.19
NCBI BLAST search of [gi|54296815](#) against nr
Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Legionella pneumophila str. Paris](#)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
Number of mass values searched: 41
Number of mass values matched: 6
Sequence Coverage: 29%

Matched peptides shown in **Bold Red**

1 MKMKLVTA AV MGLAMSTAMA ATDATSLATD KDKLSYSIGA DLGKNFKNQG
51 IDVNPEAMAK GMDAMSGAQ LALTEQQMKD VLNKFQKDL AKRTAEFNKK
101 ADENKVKGEA **FLTENKKNKP** **VVVLPSGLQY** **KV**INSGNGVK **PGKSDTVTVE**
151 **YTGRLIDGT**V **FDSTEK**TGKP ATFQVSQVIP GWTEALQLMP AGSTWEIYVP
201 SGLAYGPRSV **GGPIGPNETL** **IFKIHLISVK** KSS

Show predicted peptides also

Sort Peptides By ☒ Residue Number ☐ Increasing Mass ☐ Decreasing Mass

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	ppm	Miss	Sequence
108 - 116	1008.5026	1007.4953	1007.4924	3	0	K.GEAFLTENK.N
117 - 131	1598.9446	1597.9373	1597.9192	11	0	K.NKPGVVVLPSGLQYK.V
144 - 154	1227.5862	1226.5789	1226.5779	1	0	K.SDTVTV EYTG R.L
155 - 166	1324.6762	1323.6689	1323.6558	10	0	R.LIDGTVFDSTEK.T
209 - 223	1528.8343	1527.8270	1527.8297	-2	0	R.SVGPIGPNETLIFK.I
224 - 230	809.5295	808.5223	808.5171	6	0	K.IHLISVK.K

Annexe 11

Identification du spot numéro 3

Mascot Search Results

Protein View

Match to: [gi|54295036](#) Score: 104 Expect: 0.00015
global stress protein GspA [*Legionella pneumophila* str. Lens]
Found in search of D:_DATA\RAW_Maldi\Donnees 2011\Semaine-04-2011\ID-265-Jacques-FRERE\E-PP-ECH-ESIP- 11994(EUP3)_03_0001.t

Nominal mass (M_r): 18983; Calculated pI value: 5.86
NCBI BLAST search of [gi|54295036](#) against nr
Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Legionella pneumophila str. Lens](#)

Variable modifications: Carbamidomethyl (C),Oxidation (M)
Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
Number of mass values searched: 46
Number of mass values matched: 10
Sequence Coverage: 46%

Matched peptides shown in **Bold Red**

1 **MNTTSLSLTP LLRHSVGFER FNDLFESMRN ADDSTYAYPA YDIEKHGEDS**
51 YMITMAVPGF QESDLNIMVQ NDQLRVSGRI QEKETKESEY **LHRGIVTRAF**
101 **EQIFRLADHM KVTGAEIKNG LLSISLIREI PEEAKPRIIP** IKSISDQESN
151 KKSKTIEPES KKKISN

Show predicted peptides also

Sort Peptides By ☒ Residue Number ☐ Increasing Mass ☐ Decreasing Mass

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss	Sequence
1 - 13	1446.8091	1445.8018	1445.7912	7	0	-. MNTTSLSLTPLLR.H
1 - 13	1462.7811	1461.7738	1461.7861	-8	0	-. MNTTSLSLTPLLR.H Oxidation (M)
14 - 20	831.4076	830.4004	830.4035	-4	0	R. HSVGFER.F
21 - 29	1158.5333	1157.5261	1157.5175	7	0	R. FNDLFESMR.N
21 - 29	1174.5292	1173.5219	1173.5125	8	0	R. FNDLFESMR.N Oxidation (M)
30 - 45	1835.8043	1834.7971	1834.7897	4	0	R. NADDSTYAYPAYDIEK.H
87 - 93	933.4460	932.4387	932.4352	4	0	K. ESEYLHR.G
99 - 105	910.4787	909.4714	909.4708	1	0	R. AFEQIFR.L
119 - 128	1085.6741	1084.6668	1084.6604	6	0	K. NGLLSISLIR.E
129 - 137	1068.5740	1067.5667	1067.5611	5	0	R. EIPEAKPRI.I

Annexe 12

Identification du spot numéro 4

Mascot Search Results

Protein View

Match to: gi|54295036 Score: 102 Expect: 0.00024
global stress protein GspA [Legionella pneumophila str. Lens]
Found in search of D:_DATA\RAW_Maldi\Donnees 2011\Semaine-04-2011\ID-265-Jacques-FRERE\E-PP-ECH-ESIP- 11995(EUP4)_04_0001.'

Nominal mass (M_r): 18983; Calculated pI value: 5.86
NCBI BLAST search of gi|54295036 against nr
Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Legionella pneumophila str. Lens](#)

Variable modifications: Carbamidomethyl (C),Oxidation (M)
Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
Number of mass values searched: 47
Number of mass values matched: 9
Sequence Coverage: 46%

Matched peptides shown in **Bold Red**

1 M**NTTSLSLTP** LLRHSVGFER FNDLFESMRN ADDSTYAYPA YDIEKHGEDS
51 YMITMAVPGF QESDLNIMVQ NDQLRVSGRI QEKETKESEY L**ERGIVTRAF**
101 **EQIFRLADHM** KVTGAEIKNG **LLSISLIREI** PEEAKPRIIP IKSISDQESN
151 KSKKTIEPES KKKISN

Show predicted peptides also

Sort Peptides By ☒ Residue Number ☐ Increasing Mass ☐ Decreasing Mass

Start	End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss	Sequence
2	13	1315.7587	1314.7514	1314.7507	1	0	M.NTTSLSLTPLL.R.H
14	20	831.4071	830.3998	830.4035	-4	0	R.HSVGFER.F
21	29	1158.5317	1157.5244	1157.5175	6	0	R.FNDLFESMR.N
21	29	1174.5191	1173.5118	1173.5125	-1	0	R.FNDLFESMR.N Oxidation (M)
30	45	1835.8067	1834.7994	1834.7897	5	0	R.NADDSTYAYPAYDIEK.H
87	93	933.4434	932.4361	932.4352	1	0	K.ESEYLR.G
99	105	910.4768	909.4695	909.4708	-1	0	R.AFEQIFR.L
119	128	1085.6728	1084.6655	1084.6604	5	0	K.NGLLSISLIR.E
129	137	1068.5714	1067.5641	1067.5611	3	0	R.EIPEEAKPR.I

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abu Kwaik Y, Gao LY, Harb OS & Stone BJ (1997) Transcriptional regulation of the macrophage-induced gene (*gspA*) of *Legionella pneumophila* and phenotypic characterization of a null mutant. *Mol Microbiol* **24**: 629-642.
- Adeleke AA, Fields BS, Benson RF, *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.
- Advincula MC, Petersen D, Rahemtulla F, Advincula R & Lemons JE (2007) Surface analysis and biocorrosion properties of nanostructured surface sol-gel coatings on Ti6Al4V titanium alloy implants. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **80**: 107-120.
- AFNOR (2003) recherche et dénombrement des légionelle et *Legionella pneumophila*, Norme AFNOR T90-431, Septembre 2003
- Alleron L, Merlet N, Lacombe C & Frere J (2008) Long-term survival of *Legionella pneumophila* in the viable but nonculturable state after monochloramine treatment. *Curr Microbiol* **57**: 497-502.
- Allison DG (2003) The biofilm matrix. *Biofouling* **19**: 139-150.
- Atlas RM (1999) *Legionella*: from environmental habitats to disease pathology, detection and control. *Environ Microbiol* **1**: 283-293.
- Bachman MA & Swanson MS (2004) Genetic evidence that *Legionella pneumophila* RpoS modulates expression of the transmission phenotype in both the exponential phase and the stationary phase. *Infect Immun* **72**: 2468-2476.
- Baker LA & Campbell PA (1980) Thioglycolate medium decreases resistance to bacterial infection in mice. *Infect Immun* **27**: 455-460.
- Barbaree JM, Fields BS, Feeley JC, Gorman GW & Martin WT (1986) Isolation of protozoa from water associated with a legionellosis outbreak and demonstration of intracellular multiplication of *Legionella pneumophila*. *Appl Environ Microbiol* **51**: 422-424.
- Barker J, Brown MR, Collier PJ, Farrell I & Gilbert P (1992) Relationship between *Legionella pneumophila* and *Acanthamoeba polyphaga*: physiological status and susceptibility to chemical inactivation. *Appl Environ Microbiol* **58**: 2420-2425.
- Baron PA & Willeke K (1986) Respirable droplets from whirlpools: measurements of size distribution and estimation of disease potential. *Environ Res* **39**: 8-18.

Bartram J, Chartier Y, Lee JV et al (2007) Legionella and the prevention of legionellosis. WHO Press World Health Organization, Geneva, Switzerland

Benhamou D, Bru JP, Chidiac C, et al. (2005) [Legionnaire's disease: definition, diagnosis and treatment]. *Med Mal Infect* **35**: 1-5.

Benson RF & Fields BS (1998) Classification of the genus *Legionella*. *Semin Respir Infect* **13**: 90-99.

Berk SG, Faulkner G, Garduno E, Joy MC, Ortiz-Jimenez MA & Garduno RA (2008) Packaging of live *Legionella pneumophila* into pellets expelled by *Tetrahymena* spp. does not require bacterial replication and depends on a Dot/Icm-mediated survival mechanism. *Appl Environ Microbiol* **74**: 2187-2199.

Bichai F, Payment P & Barbeau B (2008) Protection of waterborne pathogens by higher organisms in drinking water: a review. *Can J Microbiol* **54**: 509-524.

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.

Borella P, Guerrieri E, Marchesi I, Bondi M & Messi P (2005) Water ecology of *Legionella* and protozoan: environmental and public health perspectives. *Biotechnol Annu Rev* **11**: 355-380.

Borella P, Montagna MT, Romano-Spica V, et al. (2003) Relationship between mineral content of domestic hot water and microbial contamination. *J Trace Elem Med Biol* **17 Suppl 1**: 37-43.

Borella P, Montagna MT, Romano-Spica V, et al. (2004) *Legionella* infection risk from domestic hot water. *Emerg Infect Dis* **10**: 457-464.

Bos R, van der Mei HC & Busscher HJ (1999) Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions--its mechanisms and methods for study. *FEMS Microbiol Rev* **23**: 179-230.

Bouyer S, Imbert C, Rodier MH & Hechard Y (2007) Long-term survival of *Legionella pneumophila* associated with *Acanthamoeba castellanii* vesicles. *Environ Microbiol* **9**: 1341-1344.

Brenner DJ, Steigerwalt AG & McDade JE (1979) Classification of the Legionnaires' disease bacterium: *Legionella pneumophila*, genus novum, species nova, of the family *Legionellaceae*, familia nova. *Ann Intern Med* **90**: 656-658.

Brooks T, Osicki R, Springthorpe V, Sattar S, Filion L, Abrial D & Riffard S (2004) Detection and identification of *Legionella* species from groundwaters. *J Toxicol Environ Health A* **67**: 1845-1859.

Byers TJ, Kim BG, King LE & Hugo ER (1991) Molecular aspects of the cell cycle and encystment of *Acanthamoeba*. *Rev Infect Dis* **13 Suppl 5**: S373-384.

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

Cargill KL, Pyle BH, Sauer RL & McFeters GA (1992) Effects of culture conditions and biofilm formation on the iodine susceptibility of *Legionella pneumophila*. *Can J Microbiol* **38**: 423-429.

Chang B, Kura F, Amemura-Maekawa J, Koizumi N & Watanabe H (2005) Identification of a novel adhesion molecule involved in the virulence of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* **73**: 4272-4280.

Chapman-Andresen C & Nilsson JR (1968) On vacuole formation in *Tetrahymena pyriformis* GL. *C R Trav Lab Carlsberg* **36**: 405-432.

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

Cianciotto NP, Eisenstein BI, Mody CH, Toews GB & Engleberg NC (1989) A *Legionella pneumophila* gene encoding a species-specific surface protein potentiates initiation of intracellular infection. *Infect Immun* **57**: 1255-1262.

Cianciotto NP & Fields BS (1992) *Legionella pneumophila* mip gene potentiates intracellular infection of protozoa and human macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 5188-5191.

Cianciotto NP, Stamos JK & Kamp DW (1995) Infectivity of *Legionella pneumophila* mip mutant for alveolar epithelial cells. *Curr Microbiol* **30**: 247-250.

Cirillo JD, Falkow S & Tompkins LS (1994) Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion. *Infect Immun* **62**: 3254-3261.

Cirillo SL, Bermudez LE, El-Etr SH, Duhamel GE & Cirillo JD (2001) *Legionella pneumophila* entry gene rtxA is involved in virulence. *Infect Immun* **69**: 508-517.

Cirillo SL, Lum J & Cirillo JD (2000) Identification of novel loci involved in entry by *Legionella pneumophila*. *Microbiology* **146** (Pt 6): 1345-1359.

Clark EA & Brugge JS (1995) Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* **268**: 233-239.

Colbourne JS & Dennis PJ (1985) Distribution and persistence of *Legionella* in water systems. *Microbiol Sci* **2**: 40-43.

Colbourne JS, Pratt DJ, Smith MG, Fisher-Hoch SP & Harper D (1984) Water fittings

as sources of *Legionella pneumophila* in a hospital plumbing system. *Lancet* **1**: 210-213.

Collins MT (1986) *Legionella* infections in animals. *Isr J Med Sci* **22**: 662-673.

Corliss JO (1984) The kingdom Protista and its 45 phyla. *Biosystems* **17**: 87-126.

Corliss JO (1962) *Parasitology* (Abstr.), 52:10.

Corliss JO (1994) An interim utilitarian hierarchical classification and characterization of the protists, *Acta Protozool* **33**: 1-51

Costerton JW (1999) Introduction to biofilm. *Int J Antimicrob Agents* **11**: 217-221; discussion 237-219.

Curds CR & Cockburn A (1969) *J. Gen. Microbio.* **54**:343-358.

Den Boer JW, Yzerman EP, Schellekens J et al (2002) A large outbreak of Legionnaires' disease at a Dutch flower show. *Emerg Infect Dis* **8**:37-43

Dennis PJ, Green D & Jones BP (1984) A note on the temperature tolerance of *Legionella*. *J Appl Bacteriol* **56**: 349-350.

Dennis R (1988) Legionnaires' disease--preventative maintenance. *J Inst Hosp Eng* **42**: 14-15.

Diederer BM (2008) *Legionella* spp. and Legionnaires' disease. *J Infect* **56**: 1-12.

Dietrich C, Heuner K, Brand BC, Hacker J & Steinert M (2001) Flagellum of *Legionella pneumophila* positively affects the early phase of infection of eukaryotic host cells. *Infect Immun* **69**: 2116-2122.

Diez E, Lee SH, Gauthier S, Yaraghi Z, Tremblay M, Vidal S & Gros P (2003) Birc1e is the gene within the Lgn1 locus associated with resistance to *Legionella pneumophila*. *Nat Genet* **33**: 55-60.

Donlan RM (2000) Biofilms : Microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* **8** : 881-890.

Dowling JN, Saha AK & Glew RH (1992) Virulence factors of the family *Legionellaceae*. *Microbiol Rev* **56**: 32-60.

Elkins JG, Hassett DJ, Stewart PS, Schweizer HP & McDermott TR (1999) Protective role of catalase in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm resistance to hydrogen peroxide. *Appl Environ Microbiol* **65**: 4594-4600.

Elliott AM & Clemmons GL (1966) An ultrastructural study of ingestion and digestion

in *Tetrahymena pyriformis*. *J Protozool* **13**: 311-323.

Elliot, A. M. (ed.). 1973. Biology of *Tetrahymena*. Dowden, Hutchinson & Ross, Inc., Stroudsburg, PA..

Elliott JA & Winn WC, Jr. (1986) Treatment of alveolar macrophages with cytochalasin D inhibits uptake and subsequent growth of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* **51**: 31-36.

Engleberg NC, Pearlman E, Dixon D & Eisenstein BI (1986) Antibodies isolated by using cloned surface antigens recognize antigenically related components of *Legionella pneumophila* and other *Legionella* species. *J Immunol* **136**: 1415-1417.

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.

Faulkner G & Garduno RA (2002) Ultrastructural analysis of differentiation in *Legionella pneumophila*. *J Bacteriol* **184**: 7025-7041.

Feeley JC, Gibson RJ, Gorman GW, Langford NC, Rasheed JK, Mackel DC & Baine WB (1979) Charcoal-yeast extract agar: primary isolation medium for *Legionella pneumophila*. *J Clin Microbiol* **10**: 437-441.

Fernandez RC, Lee SH, Haldane D, Sumarah R & Rozee KR (1989) Plaque assay for virulent *Legionella pneumophila*. *J Clin Microbiol* **27**: 1961-1964.

Fields BS, Barbaree JM, Shotts EB, Jr., Feeley JC, Morrill WE, Sanden GN & Dykstra MJ (1986) Comparison of guinea pig and protozoan models for determining virulence of *Legionella* species. *Infect Immun* **53**: 553-559.

Fields BS, Benson RF & Besser RE (2002) *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin Microbiol Rev* **15**: 506-526.

Fields BS, Haupt T, Davis JP, Arduino MJ, Miller PH & Butler JC (2001) Pontiac fever due to *Legionella micdadei* from a whirlpool spa: possible role of bacterial endotoxin. *J Infect Dis* **184**: 1289-1292.

Fields BS, Shotts EB, Jr., Feeley JC, Gorman GW & Martin WT (1984) Proliferation of *Legionella pneumophila* as an intracellular parasite of the ciliated protozoan *Tetrahymena pyriformis*. *Appl Environ Microbiol* **47**: 467-471.

Fitzgeorge RB, Baskerville A, Broster M, Hambleton P & Dennis PJ (1983) Aerosol infection of animals with strains of *Legionella pneumophila* of different virulence: comparison with intraperitoneal and intranasal routes of infection. *J Hyg (Lond)* **90**: 81-89.

Fliermans CB (1996) Ecology of *Legionella*: From Data to Knowledge with a Little Wisdom. *Microb Ecol* **32**: 203-228.

Fliermans CB, Cherry WB, Orrison LH, Smith SJ, Tison DL & Pope DH (1981) Ecological distribution of *Legionella pneumophila*. *Appl Environ Microbiol* **41**: 9-16.

Fraser DW, Tsai TR, Orenstein W, *et al.* (1977) Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. *N Engl J Med* **297**: 1189-1197.

Gabay JE, Blake M, Niles WD & Horwitz MA (1985) Purification of *Legionella pneumophila* major outer membrane protein and demonstration that it is a porin. *J Bacteriol* **162**: 85-91.

Gabay JE & Horwitz MA (1985) Isolation and characterization of the cytoplasmic and outer membranes of the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*). *J Exp Med* **161**: 409-422.

Gao LY, Stone BJ, Brieland JK & Abu Kwaik Y (1998) Different fates of *Legionella pneumophila* pm1 and pm2 mutants within macrophages and alveolar epithelial cells. *Microb Pathog* **25**: 291-306.

Garduno E, Faulkner G, Ortiz-Jimenez MA, Berk SG, & Garduño RA (2006) Interaction with the ciliate *Tetrahymena* may predispose *Legionella pneumophila* to infect human cells, p. 297–300. In N. P. Cianciotto, Y. Abu Kwaik, P. H. Edelstein, B. S. Fields, D. F. Geary, T. G. Harrison, C. Joseph, R. M. Ratcliff, J. E. Stout, and M. S. Swanson (ed.), *Legionella*: state of the art 30 years after its recognition. ASM Press, Washington, DC.

Garduno RA, Garduno E, Hiltz M & Hoffman PS (2002) Intracellular growth of *Legionella pneumophila* gives rise to a differentiated form dissimilar to stationary-phase forms. *Infect Immun* **70**: 6273-6283.

Garduno RA, Garduno E & Hoffman PS (1998a) Surface-associated hsp60 chaperonin of *Legionella pneumophila* mediates invasion in a HeLa cell model. *Infect Immun* **66**: 4602-4610.

Garduno RA, Quinn FD & Hoffman PS (1998b) HeLa cells as a model to study the invasiveness and biology of *Legionella pneumophila*. *Can J Microbiol* **44**: 430-440.

Garin J, Diez R, Kieffer S, *et al.* (2001) The phagosome proteome: insight into phagosome functions. *J Cell Biol* **152**: 165-180.

Girod JC, Reichman RC, Winn WC, Jr., Klaucke DN, Vogt RL & Dolin R (1982) Pneumonic and nonpneumonic forms of legionellosis. The result of a common-source exposure to *Legionella pneumophila*. *Arch Intern Med* **142**: 545-547.

Glick TH, Gregg MB, Berman B, Mallison G, Rhodes WW, Jr. & 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.

Greub G & Raoult D (2002) Micro-organisms resistant to free-living amoebae. *Clin Microbiol Rev* ;17(2):413–33.

Harb OS, Gao LY & Abu Kwaik Y (2000) From protozoa to mammalian cells: a new paradigm in the life cycle of intracellular bacterial pathogens. *Environ Microbiol* **2**: 251-265.

Harb OS, Venkataraman C, Haack BJ, Gao LY & Kwaik YA (1998) Heterogeneity in the attachment and uptake mechanisms of the Legionnaires' disease bacterium, *Legionella pneumophila*, by protozoan hosts. *Appl Environ Microbiol* **64**: 126-132.

Harris JO (1967) Nonadaptive growth responses of *Tetrahymena pyriformis* grown on single bacterial species. *J Protozool* **14**: 600-602.

Hebert GA (1981) Hippurate hydrolysis by *Legionella pneumophila*. *J Clin Microbiol* **13**: 240-242.

Helbig JH, Luck PC, Steinert M, Jacobs E & Witt M (2001) Immunolocalization of the Mip protein of intracellularly and extracellularly grown *Legionella pneumophila*. *Lett Appl Microbiol* **32**: 83-88.

Heller R, Holler C, Sussmuth R & Gundermann KO (1998) Effect of salt concentration and temperature on survival of *Legionella pneumophila*. *Lett Appl Microbiol* **26**: 64-68.

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

Hoffman PS, Houston L & Butler CA (1990) *Legionella pneumophila* htpAB heat shock operon: nucleotide sequence and expression of the 60-kilodalton antigen in *L. pneumophila*-infected HeLa cells. *Infect Immun* **58**: 3380-3387.

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

Horwitz MA (1983) Formation of a novel phagosome by the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) in human monocytes. *J Exp Med* **158**: 1319-1331.

Horwitz MA (1984) Phagocytosis of the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) occurs by a novel mechanism: engulfment within a pseudopod coil. *Cell* **36**: 27-33.

Horwitz MA & Silverstein SC (1980) Legionnaires' disease bacterium (*Legionella*

pneumophila) multiples intracellularly in human monocytes. *J Clin Invest* **66**: 441-450.

Husmann LK & Johnson W (1992) Adherence of *Legionella pneumophila* to guinea pig peritoneal macrophages, J774 mouse macrophages, and undifferentiated U937 human monocytes: role of Fc and complement receptors. *Infect Immun* **60**: 5212-5218.

Inohara N & Nunez G (2003) NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat Rev Immunol* **3**: 371-382.

Isberg RR & Falkow S (1985) A single genetic locus encoded by *Yersinia pseudotuberculosis* permits invasion of cultured animal cells by *Escherichia coli* K-12. *Nature* **317**: 262-264.

Joshi AD, Sturgill-Koszycki S & Swanson MS (2001) Evidence that Dot-dependent and -independent factors isolate the *Legionella pneumophila* phagosome from the endocytic network in mouse macrophages. *Cell Microbiol* **3**: 99-114.

Kagan JC & Roy CR (2002) *Legionella* phagosomes intercept vesicular traffic from endoplasmic reticulum exit sites. *Nat Cell Biol* **4**: 945-954.

Kagan JC, Stein MP, Pypaert M & Roy CR (2004) *Legionella* subvert the functions of Rab1 and Sec22b to create a replicative organelle. *J Exp Med* **199**: 1201-1211.

Khunkitti W, Lloyd D, Furr JR & Russell AD (1998) *Acanthamoeba castellanii*: growth, encystment, excystment and biocide susceptibility. *J Infect* **36**: 43-48.

Kilvington S, Gray T, Dart J, Morlet N, Beeching JR, Frazer DG & Matheson M (2004) *Acanthamoeba keratitis*: the role of domestic tap water contamination in the United Kingdom. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**: 165-169.

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

Kirby JE, Vogel JP, Andrews HL & Isberg RR (1998) Evidence for pore-forming ability by *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol* **27**: 323-336.

Kishimoto RA, White JD, Shirey FG, McGann VG, Berendt RF, Larson EW & Hedlund KW (1981) In vitro responses of guinea pig peritoneal macrophages to *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* **31**: 1209-1213.

Kohler R, Bubert A, Goebel W, Steinert M, Hacker J & Bubert B (2000) Expression and use of the green fluorescent protein as a reporter system in *Legionella pneumophila*. *Mol Gen Genet* **262**: 1060-1069.

Kramer MH & Ford TE (1994) Legionellosis: ecological factors of an environmentally 'new' disease. *Zentralbl Hyg Umweltmed* **195**: 470-482.

Kuroki H, Miyamoto H, Fukuda K, *et al.* (2007) *Legionella impletisoli* sp. nov. and *Legionella yabuuchiae* sp. nov., isolated from soils contaminated with industrial wastes in Japan. *Syst Appl Microbiol* **30**: 273-279.

Kusnetsov JM, Ottoila E & Martikainen PJ (1996) Growth, respiration and survival of *Legionella pneumophila* at high temperatures. *J Appl Bacteriol* **81**: 341-347.

Lambert MA & Moss CW (1989) Cellular fatty acid compositions and isoprenoid quinone contents of 23 *Legionella* species. *J Clin Microbiol* **27**: 465-473.

Lappin-Scott HM & Costerton JW (1989) Bacterial biofilms and surface fouling. *Biofouling* **1**, 323-342.

Leclerc H (2005) [Legionella: from environmental habitats to human disease]. *Bull Acad Natl Med* **189**: 1221-1233; discussion 1233-1224.

Lee JV & West AA (1991) Survival and growth of *Legionella* species in the environment. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser* **20**: 121S-129S.

Leriche V, Sibille P & Carpentier B (2000) Use of an enzyme-linked lectinsorbent assay to monitor the shift in polysaccharide composition in bacterial biofilms. *Appl Environ Microbiol* **66**: 1851-1856.

Lettinga KD, Verbon A, Weverling GJ, *et al.* (2002) Legionnaires' disease at a Dutch flower show: prognostic factors and impact of therapy. *Emerg Infect Dis* **8**: 1448-1454.

Lloyd D, Turner NA, Khunkitti W, Hann AC, Furr JR & Russell AD (2001) Encystation in *Acanthamoeba castellanii*: development of biocide resistance. *J Eukaryot Microbiol* **48**: 11-16.

Lo Presti F, Riffard S, Meugnier H, *et al.* (2001) *Legionella gresilensis* sp. nov. and *Legionella beliardensis* sp. nov., isolated from water in France. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**: 1949-1957.

Lo Presti F, Riffard S, Meugnier H, *et al.* (1999) *Legionella taurinensis* sp. nov., a new species antigenically similar to *Legionella spiritensis*. *Int J Syst Bacteriol* **49 Pt 2**: 397-403.

Marra A, Horwitz MA & Shuman HA (1990) The HL-60 model for the interaction of human macrophages with the Legionnaires' disease bacterium. *J Immunol* **144**: 2738-2744.

Mazur T, Hadas E & Iwanicka I (1995) The duration of the cyst stage and the viability and virulence of *Acanthamoeba* isolates. *Trop Med Parasitol* **46**: 106-108.

McDade JE, Brenner DJ & Bozeman FM (1979) Legionnaires' disease bacterium

isolated in 1947. *Ann Intern Med* **90**: 659-661.

McDade JE, Shepard CC, Fraser DW, Tsai TR, Redus MA & Dowdle WR (1977) Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *N Engl J Med* **297**: 1197-1203.

McNealy T, AL Newsome, RA Johnson, & SG Berk (2002). Impact of amoebae, bacteria, and *Tetrahymena* on *Legionella pneumophila* multiplication and distribution in an aquatic environment, p. 170–175. In R. Marre, Y. Abu Kwaik, C. Bartlett, N. Cianciotto, B. S. Fields, M. Frosch, J. Hacker, and P. C. Lü ck (ed.), *Legionella*. ASM Press, Washington, DC.

Mietzner S, Schwille RC, Farley A, *et al.* (1997) Efficacy of thermal treatment and copper-silver ionization for controlling *Legionella pneumophila* in high-volume hot water plumbing systems in hospitals. *Am J Infect Control* **25**: 452-457.

Mintz CS, Schultz DR, Arnold PI & Johnson W (1992) *Legionella pneumophila* lipopolysaccharide activates the classical complement pathway. *Infect Immun* **60**: 2769-2776.

Miyamoto M, Yamaguchi Y & Sasatsu M (2000) Disinfectant effects of hot water, ultraviolet light, silver ions and chlorine on strains of *Legionella* and nontuberculous mycobacteria. *Microbios* **101**: 7-13.

Mody CH, Paine R, 3rd, Shahrabadi MS, Simon RH, Pearlman E, Eisenstein BI & Toews GB (1993) *Legionella pneumophila* replicates within rat alveolar epithelial cells. *J Infect Dis* **167**: 1138-1145.

Molmeret M, Bitar DM, Han L & Kwaik YA (2004) Cell biology of the intracellular infection by *Legionella pneumophila*. *Microbes Infect* **6**: 129-139.

Molofsky AB, Byrne BG, Whitfield NN, Madigan CA, Fuse ET, Tateda K & Swanson MS (2006) Cytosolic recognition of flagellin by mouse macrophages restricts *Legionella pneumophila* infection. *J Exp Med* **203**: 1093-1104.

Molofsky AB, Shetron-Rama LM & Swanson MS (2005) Components of the *Legionella pneumophila* flagellar regulon contribute to multiple virulence traits, including lysosome avoidance and macrophage death. *Infect Immun* **73**: 5720-5734.

Molofsky AB & Swanson MS (2004) Differentiate to thrive: lessons from the *Legionella pneumophila* life cycle. *Mol Microbiol* **53**: 29-40.

Morton LHG *et al.* (1998) Consideration of some implications of the resistance of biofilms to biocides. *International Biodeterioration and Biodegradation*, **41**:247–259

Muder RR & Yu VL (2002) Infection due to *Legionella* species other than *L. pneumophila*. *Clin Infect Dis* **35**: 990-998.

Nash TW, Libby DM & Horwitz MA (1984) Interaction between the legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) and human alveolar macrophages. Influence of antibody, lymphokines, and hydrocortisone. *J Clin Invest* **74**: 771-782.

Ohno A, Kato N, Yamada K & Yamaguchi K (2003) Factors influencing survival of *Legionella pneumophila* serotype 1 in hot spring water and tap water. *Appl Environ Microbiol* **69**: 2540-2547.

Oldham LJ & Rodgers FG (1985) Adhesion, penetration and intracellular replication of *Legionella pneumophila*: an in vitro model of pathogenesis. *J Gen Microbiol* **131**: 697-706.

Ortiz-Roque CM & Hazen TC (1987) Abundance and distribution of *Legionellaceae* in Puerto Rican waters. *Appl Environ Microbiol* **53**: 2231-2236.

Ormsbee RA, Peacock MG, Lattimer GL, Page LA & Fiset P (1981) A comparison of some biological characteristics of the Legionnaires' disease bacterium. *Annals of Clinical Laboratory Science* **11**, 53-62.

Payne NR & Horwitz MA (1987) Phagocytosis of *Legionella pneumophila* is mediated by human monocyte complement receptors. *J Exp Med* **166**: 1377-1389.

Philippe C, Bleh MF & Hartemann P (2006) [Intra-amoebal development of *Legionella pneumophila* and the potential role of amoebae in the transmission of Legionnaires' disease]. *Med Mal Infect* **36**: 196-200.

Poyet JL, Srinivasula SM, Tnani M, Razmara M, Fernandes-Alnemri T & Alnemri ES (2001) Identification of Ipaf, a human caspase-1-activating protein related to Apaf-1. *J Biol Chem* **276**: 28309-28313.

Rechnitzer C & Blom J (1989) Engulfment of the Philadelphia strain of *Legionella pneumophila* within pseudopod coils in human phagocytes. Comparison with other *Legionella* strains and species. *APMIS* **97**: 105-114.

Riboldi-Tunncliffe A, Konig B, Jessen S, *et al.* (2001) Crystal structure of Mip, a prolyl isomerase from *Legionella pneumophila*. *Nat Struct Biol* **8**: 779-783.

Riedewald F (2006) Bacterial adhesion to surfaces: the influence of surface roughness. *PDA J Pharm Sci Technol* **60**: 164-171.

Rodgers FG & Gibson FC, 3rd (1993) Opsonin-independent adherence and intracellular development of *Legionella pneumophila* within U-937 cells. *Can J Microbiol* **39**: 718-722.

Rodgers FG, Greaves PW & Macrae AD (1979) Flagella and fimbriae on *Legionella* organisms. *Lancet* **2**: 753-754.

Rodgers FG, Greaves PW, Macrae AD & Lewis MJ (1980) Electron microscopic

evidence of flagella and pili on *Legionella pneumophila*. *J Clin Pathol* **33**: 1184-1188.

Rodgers FG, Macrae AD & Lewis MJ (1978) Electron microscopy of the organism of Legionnaires' disease. *Nature* **272**: 825-826.

Rohr U, Weber S, Michel R, Selenka F & 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.

Sahney NN, Summersgill JT, Ramirez JA & Miller RD (2001) Inhibition of oxidative burst and chemotaxis in human phagocytes by *Legionella pneumophila* zinc metalloprotease. *J Med Microbiol* **50**: 517-525.

Santegoeds CM, Schramm A & de Beer D (1998) Microsensors as a tool to determine chemical microgradients and bacterial activity in wastewater biofilms and flocs. *Biodegradation* **9**: 159-167.

Segal G, Russo JJ & Shuman HA (1999) Relationships between a new type IV secretion system and the icm/dot virulence system of *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol* **34**: 799-809.

Segal G & Shuman HA (1998) Intracellular multiplication and human macrophage killing by *Legionella pneumophila* are inhibited by conjugal components of IncQ plasmid RSF1010. *Mol Microbiol* **30**: 197-208.

Sheehan KB, Henson JM & Ferris MJ (2005) *Legionella* species diversity in an acidic biofilm community in Yellowstone National Park. *Appl Environ Microbiol* **71**: 507-511.

Shirtliff ME, Mader JT & Camper AK (2002) Molecular interactions in biofilms. *Chem Biol* **9**: 859-871.

Sire S., Staub T. & Christmann D. (1994) Manifestations extra-pulmonaires des légionelloses, *Méd. Mal. Infec.*, **24**, 874-880

Smith-Somerville HE, Huryn VB, Walker C & Winters AL (1991) Survival of *Legionella pneumophila* in the cold-water ciliate *Tetrahymena vorax*. *Appl Environ Microbiol* **57**: 2742-2749.

Snelling WJ, Moore JE, McKenna JP, Lecky DM & Dooley JS (2006) Bacterial-protozoa interactions; an update on the role these phenomena play towards human illness. *Microbes Infect* **8**: 578-587.

Soderberg MA, Rossier O & Cianciotto NP (2004) The type II protein secretion system of *Legionella pneumophila* promotes growth at low temperatures. *J Bacteriol* **186**: 3712-3720.

Sriram R, Shoff M, Booton G, Fuerst P & Visvesvara GS (2008) Survival of

Acanthamoeba cysts after desiccation for more than 20 years. *J Clin Microbiol* **46**: 4045-4048.

Steinert M, Emody L, Amann R & Hacker J (1997) Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. *Appl Environ Microbiol* **63**: 2047-2053.

Steinert M, Engelhard H, Flugel M, Wintermeyer E & Hacker J (1995) The Lly protein protects *Legionella pneumophila* from light but does not directly influence its intracellular survival in *Hartmannella vermiformis*. *Appl Environ Microbiol* **61**: 2428-2430.

Steinert M, Hentschel U & Hacker J (2002) *Legionella pneumophila*: an aquatic microbe goes astray. *FEMS Microbiol Rev* **26**: 149-162.

Storey MV, Ashbolt J, Stenstrom (2004) The fate of legionellae within distribution pipe biofilms: measurement of their persistence, inactivation and detachment. *Water Science and Technology*, **49**:269–275.

Surman SB, Morton LHG, Keevil CW (1993) The use of biofilm generator in the evaluation of a biocide for use in water treatment. In: Edyvean R, ed. *Proceedings of the ninth International Biodeterioration and Biodegradation Society symposium*, Rugby, United Kingdom, Institute of Chemical Engineers, 6–12.

Sutherland IW (2001) The biofilm matrix--an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol* **9**: 222-227.

Swanson MS & Hammer BK (2000) *Legionella pneumophila* pathogenesis: a fateful journey from amoebae to macrophages. *Annu Rev Microbiol* **54**: 567-613.

Tatlock H. (1944) A rickettsia-like organism recovered from guinea pigs, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*, 95-99.

Thomas RJ & Brooks TJ (2004) Oligosaccharide receptor mimics inhibit *Legionella pneumophila* attachment to human respiratory epithelial cells. *Microb Pathog* **36**: 83-92.

Thomas V, Loret JF, Jousset M & Greub G (2008) Biodiversity of amoebae and amoebae-resisting bacteria in a drinking water treatment plant. *Environ Microbiol* **10**: 2728-2745.

Tilney LG, Harb OS, Connelly PS, Robinson CG & Roy CR (2001) How the parasitic bacterium *Legionella pneumophila* modifies its phagosome and transforms it into rough ER: implications for conversion of plasma membrane to the ER membrane. *J Cell Sci* **114**: 4637-4650.

Venkataraman C, Gao LY, Bondada S & Kwaik YA (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.

Whipple GC (1901). Changes that take place in the bacterial contents of waters during transportation. *Technical Quarterly MIT*, 14:21.

WHO (2004). Guidelines for Drinking Water Quality, 3rd ed. Vol. 1. Recommendations, Geneva, WHO

Wimpenny J, Manz W & Szewzyk U (2000) Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiol Rev* **24**: 661-671.

Winn WC, Jr. (1988) Legionnaires disease: historical perspective. *Clin Microbiol Rev* **1**: 60-81.

Wintermeyer E, Rdest U, Ludwig B, Debes A & Hacker J (1991) Characterization of legiolysin (lly), responsible for haemolytic activity, colour production and fluorescence of *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol* **5**: 1135-1143.

Yamamoto Y, Klein TW, Newton CA, Widen R & Friedman H (1987) Differential growth of *Legionella pneumophila* in guinea pig versus mouse macrophage cultures. *Infect Immun* **55**: 1369-1374.

Yamamoto Y, Klein TW, Newton CA, Widen R & Friedman H (1988) Growth of *Legionella pneumophila* in thioglycolate-elicited peritoneal macrophages from A/J mice. *Infect Immun* **56**: 370-375.

Yaradou DF, Raze D, Ginevra C, *et al.* (2007) Zinc-dependent cytoadherence of *Legionella pneumophila* to human alveolar epithelial cells in vitro. *Microb Pathog* **43**: 234-242.

Yoshida S & Mizuguchi Y (1986) Multiplication of *Legionella pneumophila* Philadelphia-1 in cultured peritoneal macrophages and its correlation to susceptibility of animals. *Can J Microbiol* **32**: 438-442.

ARTICLE



<http://mc.manuscriptcentral.com/fems>

Passage through *Tetrahymena tropicalis* enhances the resistance to stress and the infectivity of *Legionella pneumophila* Lens

Journal:	<i>FEMS Microbiology Letters</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Research Letter
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Koubar, Mohamad; Université de Poitiers, UMR CNRS 6008 Rodier, Marie-Hélène; Université de Poitiers, UMR CNRS 6008 Garduno, Rafael; Dalhousie University, Microbiology-Immunology and Medicine Frère, Jacques; Université de Poitiers, UMR CNRS 6008
Keywords:	Legionella survival, Mature Intracellular Forms, Tetrahymena pellets

SCHOLARONE™
Manuscripts

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1 Passage through *Tetrahymena tropicalis* enhances the resistance to stress and the
2 infectivity of *Legionella pneumophila* Lens

3 Mohamad Koubar ¹, Marie-Hélène Rodier ¹, Rafael A. Garduño ², Jacques Frère ^{1*}

4 ¹Laboratoire de Chimie et Microbiologie de l'Eau, UMR CNRS 6008, Poitiers University,
5 1 rue Georges Bonnet, 86022 Poitiers cedex, France

6 ²Department of Microbiology and Immunology, and Department of Medicine – Division of Infectious
7 Diseases, Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia, B3H 4H7, Canada

10 **Running title:** *T. tropicalis* enhances *Legionella* resistance and infectivity

12 **Keywords:** *Legionella* survival, Mature Intracellular Forms, *Tetrahymena* pellets

22 Corresponding author:
23 Pr. Jacques Frère
24 Laboratoire de Chimie et Microbiologie de l'Eau
25 PBS-IBMIG-B36, 1 rue Georges Bonnet
26 BP 633, 86022 Poitiers cedex, France
27 E-mail address: jacques.frere@univ-poitiers.fr
28 Tel: 0033 (0) 5 49 45 39 17
29 Fax: 0033 (0) 5 49 45 35 03

Abstract

L. pneumophila is a gram-negative bacterium prevalent in fresh water, which accidentally infects humans being responsible of the disease called legionellosis. In natural environments, *L. pneumophila* replicates inside protozoan hosts, primarily amoebae. Of importance for the transmission of legionellosis is the fact that growth in amoeba leads to an increase of *L. pneumophila* survival and infectivity. Ciliates of the genus *Tetrahymena* are ubiquitous in surface freshwater and capable of supporting the multiplication of *L. pneumophila*. However, intracellular growth of *L. pneumophila* in *Tetrahymena* is inconsistent, and in the species *T. tropicalis* Stationary-Phase Forms (SPFs) of *L. pneumophila* differentiate into Mature Intracellular Forms (MIFs) without apparent bacterial replication. Our results presented here show that MIFs released from *T. tropicalis* are more resistant to gentamicin, survive better in a nutrient-poor environment, and are more infectious to the human pneumocyte cells than SPFs. These results strongly suggest a potential role of ciliates in increasing the risk of legionellosis.

Introduction

Legionella pneumophila, an ubiquitous Gram negative freshwater bacteria, is an intracellular pathogen of freshwater amoeba that, when aerosolized, can cause, in susceptible individuals, a severe pneumonia known as legionellosis or Legionnaires' disease (Fields *et al.*, 2002). Legionellosis is considered an environmental disease because person-to-person transmission does not occur. Therefore, transmission of legionellosis is primarily linked to man-made devices (i.e., cooling towers, whirlpool spas) that produce aerosols from warm water contaminated with *Legionella*.

Relationships between *L. pneumophila* and protozoa have been described as very important for two main reasons: (i) protozoa provide protection against environmental stresses (Barbaree *et al.*, 1986), and (ii) protozoa, particularly amoeba, provide the principal natural haven for *Legionella* replication (Rowbotham, 1980; Borella *et al.*, 2005). In this respect, it is known that *L. pneumophila* multiplies inside free-living amoebae and could be released as free bacterial cells or as groups of cells enclosed into vesicles (for recent reviews refer to Borella *et al.*, 2005; Bichai *et al.*, 2008). The role of vesicles as complex infectious particles has been hypothesized to be important in the transmission of *L. pneumophila* and legionellosis (Rowbotham, 1983).

Tetrahymena spp. are ciliated protozoa that, depending on the temperature of incubation, can support the growth of *Legionella* (Fields *et al.*, 1984; Barbaree *et al.*, 1986; Berk *et al.*, 2008). In the species *T. tropicalis*, *L. pneumophila* is efficiently ingested but does not replicate inside food vacuoles, in spite of resisting digestion. Consequently, live *L. pneumophila* resides transiently (1-2 h) in the food vacuoles before being expelled in the form of pellets. *Legionella* pellets are clusters of up to 100-200 *L. pneumophila* cells kept together by outer membrane fragments derived from a few digested legionellae reflecting massive ingestion by *Tetrahymena*, and perhaps a ciliate-derived material from the lumen of food vacuoles (Berk *et al.*, 2008). In addition, the survivor *L. pneumophila* cells present in the pellets expelled by *T. tropicalis* have all the morphological characteristics of Mature Intracellular Forms (MIFs) (Faulkner *et al.*, 2008), initially described in HeLa cells (Garduño *et al.*, 2002). In a previous study, we observed that passage of *L. pneumophila* in free living amoebae produces legionellae able to survive numerous adverse conditions such as starvation and antibiotic presence (Bouyer *et al.*, 2007). The aim of this study was to determine whether passage of *L. pneumophila* in *T. tropicalis* results in similar enhancements, and at the same time discuss the potential risk that the presence of ciliates in aerosol-producing facilities may pose in relation to the transmission of legionellosis.

80
81
82

83 **Materials and methods**

84
85 **Bacteria and cells used in this study:**

86 *L. pneumophila* strain Lens (serogroup 1) was provided by the French National Reference Center for *Legionella* (CNRL) (Lyon, France). *L. pneumophila* Lens was grown at 37°C on buffered charcoal-yeast extract agar (BCYE) or BYE broth as previously described (Hindre *et al.*, 2008).

90 The *T. tropicalis* strain used in this study was originally isolated from a cooling tower biofilm. Cultures of *T. tropicalis* in Plate Count broth, or biphasic medium, were maintained at room temperature in the dark as detailed elsewhere (Berk *et al.*, 2008).

93 Human type II pneumocytes (A549) were cultured in RPMI-FCS (RPMI containing 10% fetal calf serum, Gibco BRL), in cell culture flasks at 37 °C, under 5% CO₂. Monolayers of

attached cells were harvested after moderate trypsin treatment (trypsin-EDTA 0.05%, Gibco BRL).

Production of *L. pneumophila* pellets by *T. tropicalis*

Pellets were produced as described by Berk *et al.* (2008). Briefly, *T. tropicalis* cells, grown in PCB medium, were placed in Osterhout's Buffer (in mg L⁻¹: NaCl, 420; KCl, 9.2; CaCl₂, 4; MgSO₄-7H₂O, 16; MgCl₂-6H₂O, 34). *L. pneumophila* suspensions, cultivated in BYE broth until stationary phase (SPF), were suspended in Osterhout's solution and mixed with *T. tropicalis* at a bacteria:ciliate ratio of 1000:1, and the mixture was incubated in the dark for 48 hours (Ciliate suspension enumerations were done using Fast-Read plates (Biosigma SRL) after iodine treatment (0.2 g L⁻¹) to stop cell mobility). During this step, almost all free bacteria were packaged into pellets expelled by the ciliates. Pellets were then collected by centrifugation (500 g, 10 min, 25 °C). Five successive centrifugations were done. For each one, supernatant was replaced by Osterhout's buffer and tubes were kept 20 min at room temperature in the dark to progressively separate the sedimented pellets from the ciliates, which swim back into the supernatant. As needed, release of individual *L. pneumophila* cells from pellets was done by forcefully passing dense pellet suspensions ten times through a 27-gauge needle.

Scanning electron microscopy

Slides for scanning electron microscopy (SEM) were prepared according to Fratesi *et al.* (2004). Metal-coated specimens were observed with a JEOL 840 microscope and images captured using the technical resources of ImagUP, the platform for biological imaging at the University of Poitiers.

Gentamicin sensitivity assay

Bacterial suspensions (prepared from BYE-grown SPFs or free MIFs released from pellets) were incubated in medium with gentamicin (100 µg mL⁻¹), or in gentamicin-free medium, for one hour at room temperature. Residual amounts of treatment medium (with or without gentamicin) were removed by washing bacteria twice with distilled water. Colony forming units (CFU) were then enumerated by dilution-plating using distilled water as dilution medium, and spreading on BCYE agar plates, which were incubated at 37 °C for at least 3 days before colonies were counted.

Long-term bacterial survival

The ability to survive starvation in a very low nutrient medium was performed as follows: *L. pneumophila* cells (in vitro-grown SPFs or MIFs still contained in pellets) were harvested by centrifugation and resuspended into encystment buffer (0.1 M KCl, 8 mM MgSO₄, 0.4 mM CaCl₂, 1 mM-NaHCO₃, 0.02 M Tris) (Steinert *et al.*, 1998) at a density of 4 x 10⁷ CFU mL⁻¹. Bacterial survival was determined by plating aliquots of the suspensions onto BCYE agar at different times, and scoring the number of colonies formed after incubation at 37 °C.

Infection of human pneumocytes:

L. pneumophila cells (from various sources including MIFs released from *Tetrahymena* pellets aged for different periods) were added into flasks containing adherent human pneumocytes at a multiplicity of infection of 0.0002, 0.002 and 0.02. Then, flasks were centrifuged at 224 g for 5 minutes at room temperature to facilitate bacteria-cell contact, and incubated at 37°C (5% CO₂) for 5 days. Then, cell monolayers were detached and lysed, and bacteria were enumerated by dilution-plating on BCYE agar as described above under Gentamicin sensitivity assay.

Results

Scanning electron microscopy

We observed a large quantity of pellets produced gradually over time and samples were observed by SEM (Day 1 [one day after ciliates – bacteria co-incubation], Day 3 and Day 5, Fig. 1-A 1-B and 1-C respectively). These pellets form aggregates that surround ciliates.

MIFs released from ciliate-produced pellets are resistant to gentamicin.

We exposed three types of *L. pneumophila* suspensions to gentamicin: free SPFs grown in vitro and MIFs released from pellets aged for 7 days, or aged for 90 days in Osterhout's buffer (Fig. 2).

Free SPFs seemed to be highly sensitive to gentamicin since no culturable bacteria were detected after antibiotic treatment. On the other hand, only a reduction of 2 logs in the number of CFU (equivalent to approx. 1% survival) was observed for MIFs released from pellets that were exposed to the antibiotic. Even MIFs released from pellets kept for 90 days in the low nutrient buffer showed survivors after the gentamicin treatment. Our results show that passage through *T. tropicalis* increased the resistance of *L. pneumophila* against gentamicin.

MIFs inside ciliate-produced pellets survive starvation.

Long-term *Legionella* survival in low nutrient medium was estimated for free *L. pneumophila* SPFs and for MIFs still contained in *T. tropicalis*-produced pellets (Fig. 3). Between 0 and 11 days of incubation, survival curves exhibited similar reduction in CFU mL⁻¹ (about 2.5 Logs) for the two cell types. However, after this period, survival curves showed strongly different behaviors. Culturability of free SPFs sharply decreased until no more culturable bacteria were detected after 90 days of incubation. For MIFs in pellets, only a slight decline (about 0.5 Log) was observed between 11 and 50 days of incubation. After this period, the population seemed to remain stable (at ~5 x 10⁴ CFU mL⁻¹) for up to four months of incubation.

MIFs released from ciliate-produced pellets are infectious to human pneumocytes.

We infected human pneumocytes (A549) with free *L. pneumophila* and with bacteria released from pellets kept for 90 days in Osterhout's buffer. Regardless of the inoculum density used to infect the pneumocytes (10², 10³ or 10⁴ mL⁻¹), higher yields from *L. pneumophila* MIFs released from pellets were always obtained in relation to yields from free SPFs (Fig. 4).

Discussion

The factors that determine *Legionella* survival in the environment, as well as the molecular mechanisms involved, are currently not well understood. However, in recent years experimental evidence has indicated that the differentiation of *L. pneumophila* from replicative forms into transmissive forms (SPFs in vitro, and MIFs in vivo) is associated with the expression of genes encoding factors required for environmental fitness and virulence (Molofsky & Swanson, 2004; Bruggemann *et al.*, 2006; Garduño *et al.*, 2008). Free-living freshwater amoebae play a crucial role in supporting the replication of *L. pneumophila*, as well as enhancing the survival and infectivity of this bacterium, by promoting differentiation into transmissive forms. Numerous studies have addressed the relationships between amoeba and *Legionella* ever since the early reports by Rowbotham (1980) and Anand *et al.* (1983). *Legionella* are most probably unable to replicate by themselves without protozoans in natural environment. In laboratory, specific medium containing iron and cysteine are needed to cultivate these bacteria.

1
2
3 195 However, the role that other protozoa, such as the ciliate *Tetrahymena* spp., play in promoting
4 196 the differentiation of *L. pneumophila* into transmissible forms, as well as the environmental
5 197 fitness and virulence of this pathogen, has not been elucidated. Ciliates of the genus
6 198 *Tetrahymena* are able to support replication of *L. pneumophila* at temperatures higher than 30
7 199 °C (Fields *et al.*, 1984; Barbaree *et al.*, 1986). These protozoa are normally present in natural
8 200 water environments, but are also readily recovered from man-made equipment and facilities,
9 201 such as cooling towers (Berk *et al.*, 2008), which could hold warm waters. Thus,
10 202 *Tetrahymena* could play a role in the survival and dissemination of *Legionella* and could be
11 203 implicated as a risk factor in the transmission of legionellosis linked to cooling towers. In
12 204 particular, we were interested in the recently described packaging of *Legionella* into spherical
13 205 clusters expelled from *Tetrahymena*, called pellets, which contain numerous differentiated
14 206 MIFs (Faulkner *et al.*, 2008). *Tetrahymena tropicalis* produces such pellets without detectable
15 207 replication of the legionellae (Faulkner *et al.*, 2008). Pellets may contain hundreds of MIFs
16 208 and may also form large aggregates that could be deposited on surfaces (Fig. 1). These
17 209 aggregates seem to limit ciliates mobility, as we observed by optical microscopy (data not
18 210 shown).
19 211
20 212 To determine whether the MIFs produced in *Tetrahymena* have similar phenotypes as those
21 213 emerging after replication in amoeba, we tested sensitivity to gentamicin, an antibiotic
22 214 extensively used to study intracellular bacterial pathogens in cell culture systems (Kihlstrom,
23 215 1977; Isberg & Falkow, 1985; Fernandez *et al.*, 1989). Our results showed that passage
24 216 through *T. tropicalis* enhances antibiotic resistance. This resistance was intrinsic to the
25 217 differentiated MIFs and not due to physical barriers imposed by the pellet configuration,
26 218 simply because we released the MIFs from the pellets and tested them as free bacteria. This
27 219 resistance was also conserved in MIFs released from pellets aged for 90 days in Osterhout's
28 220 buffer. Garduño *et al.* (2002) previously observed that MIFs recovered from HeLa cells were
29 221 also resistant to gentamicin, as did Bouyer *et al.* (2007) when working with *Legionella*-
30 222 containing vesicles released from amoebae. The latter authors suggested a possible role of the
31 223 vesicle's membrane in the protection of *Legionella*, but also considered a partial intrinsic
32 224 resistance. Taken together, these observations suggest that MIFs produced in amoeba or in
33 225 ciliates share a common phenotype regarding gentamicin resistance.
34 226 Survival of *Legionella* in the freshwater environment must include an ability to resist
35 227 starvation for long periods. Thus, we studied the long-term survival in a low-nutrient

environment of *Legionella* pellets and free SPFs. For the two types of suspensions, we observed a rapid decrease of culturability in the encystment buffer till 11 days (Fig. 3).

After that, evident differences appeared. Culturability of free *Legionella* continue to strongly decrease, as previously reported by Bouyer *et al.* (2007), and no more culturable bacteria were detected at 90 days. In contrast, *Tetrahymena*-derived pellets of MIFs still contained culturable *Legionella* after four months (Fig. 3). It is therefore clear that pellets protect *Legionella* from starvation, however, and intrinsic MIF starvation resistance phenotype cannot be ruled at this point, simply because the survival of MIFs released from pellets was not tested. However, we observed by optical microscopy that large aggregates after an aging period of 90 days are still present (data not shown), suggesting that these structures could persist in the environment.

MIF obtained from HeLa cells were previously reported to be highly infectious for macrophages or HeLa cells (Garduño *et al.*, 2002). We observed here that MIFs derived from *Tetrahymena* are also infectious to pneumocytes (Fig. 4). Furthermore, our results showed that these MIFs retained their infectivity after an aging period of 90 days, being capable of exhibiting a higher capacity to multiply into pneumocytes, in relation to SPFs freshly grown in vitro.

Taken together, our results demonstrate that *Tetrahymena*, as previously reported for amoeba, could participate in determining the environmental fitness and infectivity of *Legionella*, and thus play a critical role in the dissemination of this bacterium. To our knowledge, this work is the first report concerning the behavior of *Legionella* expelled from *Tetrahymena*, a field of research that should be more accurately studied.

Acknowledgment

We acknowledge Dr Emile Béré, from the ImagUP platform of the University of Poitiers for his help for the SEM preparations.

References

Anand CM, Skinner AR, Malic A & Kurtz JB (1983) Interaction of *L. pneumophila* and a free living amoeba (*Acanthamoeba palestinensis*). *J Hyg (Lond)* **91**: 167-178.

1
2
3 263 Barbaree JM, Fields BS, Feeley JC, Gorman GW & Martin WT (1986) Isolation of protozoa
4 264 from water associated with a legionellosis outbreak and demonstration of intracellular
5 265 multiplication of *Legionella pneumophila*. *Appl Environ Microbiol* **51**: 422-424.
6 266
7
8 267 Berk SG, Faulkner G, Garduño E, Joy MC, Ortiz-Jimenez MA & Garduño RA (2008)
9 268 Packaging of live *Legionella pneumophila* into pellets expelled by *Tetrahymena* spp. does not
10 269 require bacterial replication and depends on a Dot/Icm-mediated survival mechanism. *Appl*
11 270 *Environ Microbiol* **74**: 2187-2199.
12 271
13
14 272 Bichai F, Payment P & Barbeau B (2008) Protection of waterborne pathogens by higher
15 273 organisms in drinking water: a review. *Can J Microbiol* **54**: 509-524.
16 274
17 275 Borella P, Guerrieri E, Marchesi I, Bondi M & Messi P (2005) Water ecology of *Legionella*
18 276 and protozoan: environmental and public health perspectives. *Biotechnol Annu Rev* **11**: 355-
19 277 380.
20 278
21
22 279 Bouyer S, Imbert C, Rodier MH & Hechard Y (2007) Long-term survival of *Legionella*
23 280 *pneumophila* associated with *Acanthamoeba castellanii* vesicles. *Environ Microbiol* **9**: 1341-
24 281 1344.
25 282
26
27 283 Bruggemann H, Hagman A, Jules M, *et al.* (2006) Virulence strategies for infecting
28 284 phagocytes deduced from the in vivo transcriptional program of *Legionella pneumophila*. *Cell*
29 285 *Microbiol* **8**: 1228-1240.
30 286
31
32 287 Faulkner G, Berk SG, Garduño E, Ortiz-Jimenez MA & Garduño RA (2008) Passage through
33 288 *Tetrahymena tropicalis* triggers a rapid morphological differentiation in *Legionella*
34 289 *pneumophila*. *J Bacteriol* **190**: 7728-7738.
35 290
36 291 Fernandez RC, Lee SH, Haldane D, Sumarah R & Rozee KR (1989) Plaque assay for virulent
37 292 *Legionella pneumophila*. *J Clin Microbiol* **27**: 1961-1964.
38 293
39
40 294 Fields BS, Benson RF & Besser RE (2002) *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of
41 295 investigation. *Clin Microbiol Rev* **15**: 506-526.
42 296
43 297 Fields BS, Shotts EB, Jr., Feeley JC, Gorman GW & Martin WT (1984) Proliferation of
44 298 *Legionella pneumophila* as an intracellular parasite of the ciliated protozoan *Tetrahymena*
45 299 *pyriformis*. *Appl Environ Microbiol* **47**: 467-471.
46 300
47
48 301 Fratesi SE, Lynch FL, Kirkland BL & Brown LR (2004) Effects of SEM preparation
49 302 techniques on the appearance of bacteria and biofilms in the carter sandstone. *J. Sedim.*
50 303 *Research* **74**: 858-867
51 304
52
53 305 Garduño RA, Garduño E, Hiltz M & Hoffman PS (2002) Intracellular growth of *Legionella*
54 306 *pneumophila* gives rise to a differentiated form dissimilar to stationary-phase forms. *Infect*
55 307 *Immun* **70**: 6273-6283.
56 308
57
58 309 Garduño RA, Chong A & Faulkner G (2008) Developmental cycle - Differentiation of
59 310 *Legionella pneumophila*. In: *Legionella: Mol Microbiol* (edited by Heuner K & Swanson M).
60 311 Caister Academic Press, Norfolk, UK, pp. 55-73.
312

- 313 Hindre T, Bruggemann H, Buchrieser C & Hechard Y (2008) Transcriptional profiling of
314 *Legionella pneumophila* biofilm cells and the influence of iron on biofilm formation.
315 *Microbiology* **154**: 30-41.
- 317 Isberg RR & Falkow S (1985) A single genetic locus encoded by *Yersinia pseudotuberculosis*
318 permits invasion of cultured animal cells by *Escherichia coli* K-12. *Nature* **317**: 262-264.
- 320 Kihlstrom E (1977) Infection of HeLa cells with *Salmonella typhimurium* 395 MS and MR10
321 bacteria. *Infect Immun* **17**: 290-295.
- 323 Molofsky AB & Swanson MS (2004) Differentiate to thrive: lessons from the *Legionella*
324 *pneumophila* life cycle. *Mol Microbiol* **53**: 29-40.
- 326 Rowbotham TJ (1980) Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for
327 freshwater and soil amoebae. *J Clin Pathol* **33**: 1179-1183.
- 329 Rowbotham TJ (1983) Isolation of *Legionella pneumophila* from clinical specimens via
330 amoebae, and the interaction of those and other isolates with amoebae. *J Clin Pathol* **36**: 978-
331 986.
- 333 Steinert M, Birkness K, White E, Fields B & Quinn F (1998) *Mycobacterium avium* bacilli
334 grow saprozoically in coculture with *Acanthamoeba polyphaga* and survive within cyst walls.
335 *Appl Environ Microbiol* **64**: 2256-2261.

Figure legends

Fig. 1: Scanning electron microscopy of *Tetrahymena tropicalis* and its expelled pellets containing MIF *Legionella*

A: a *Tetrahymena* cell surrounded by three pellets (Day 1: one day after ciliates – bacteria co-incubation)

B: aggregated expelled pellets (Day 3)

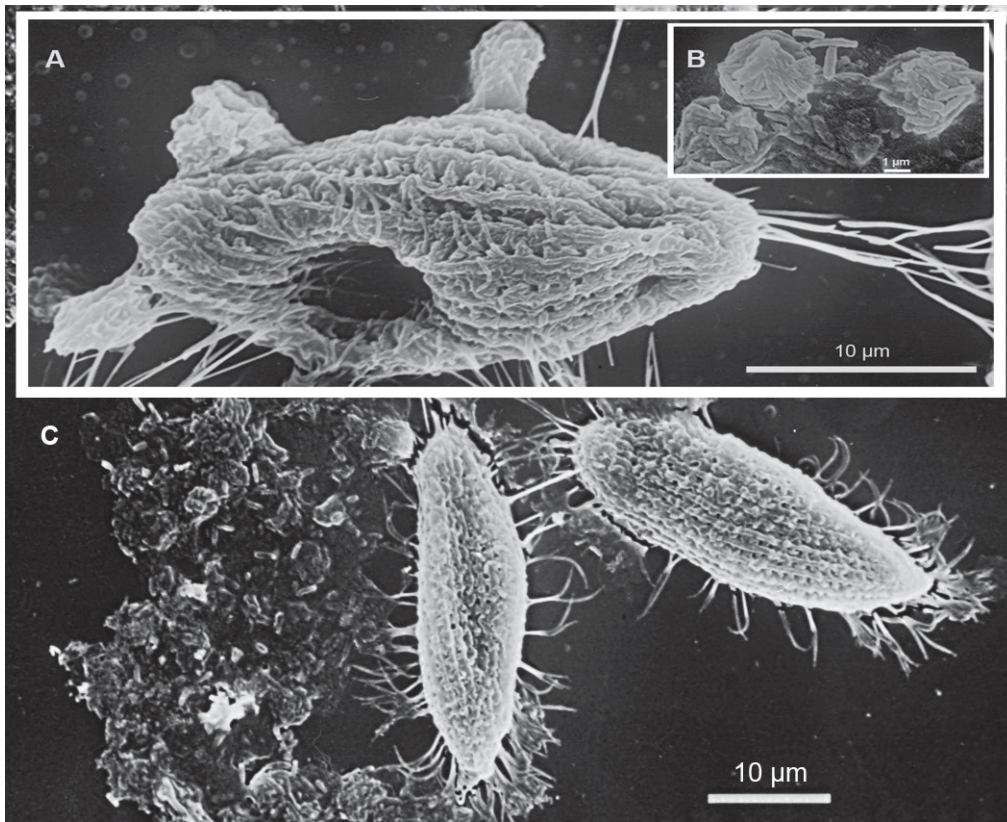
C: general view of aggregated pellets expelled by protozoa (Day 5)

Fig. 2: Culturability of *L. pneumophila* after gentamicin treatment. Samples were treated (+) or not (-) with gentamicin (100µg mL⁻¹). The error bars represent the standard deviation from four independent experiments.

Fig. 3: Long time survival of free *L. pneumophila* (■) and *L. pneumophila* after incubation with *T. tropicalis* (◆). Experiments were performed in encystment buffer at room temperature and samples were seeded on BCYE agar plate for numeration at days 0, 1.5, 3, 5, 11, 46, 90 and 120. The error bars represent the standard deviation from three independent experiments.

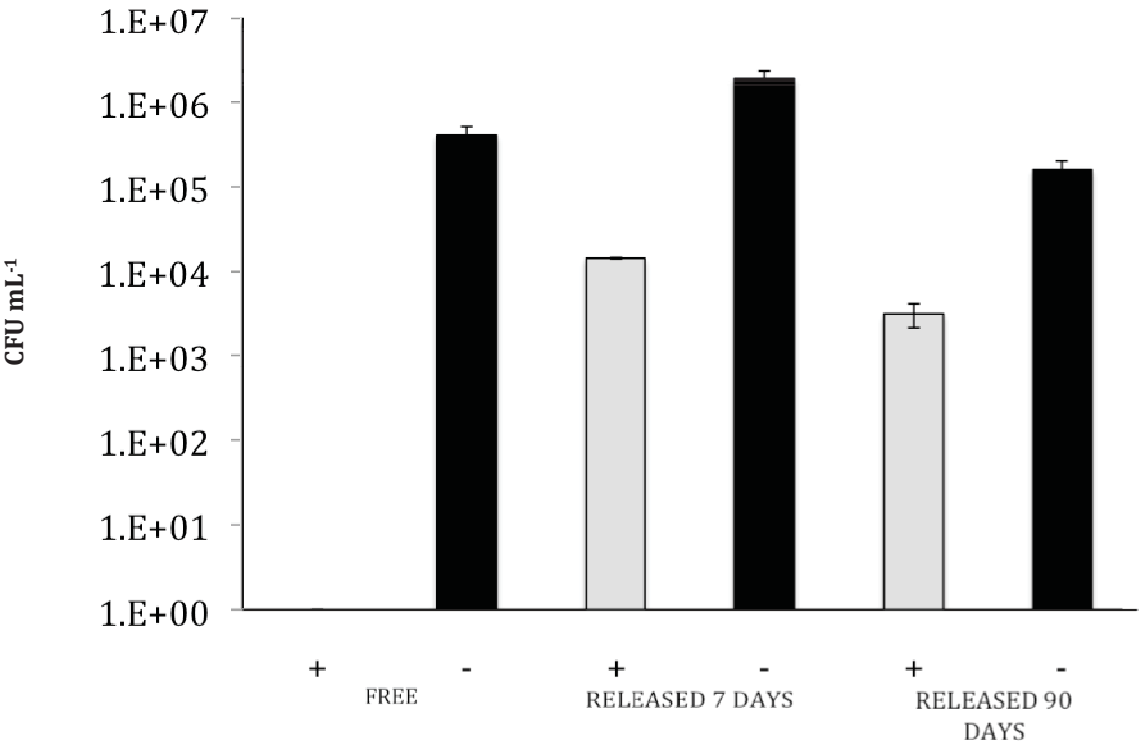
Fig. 4: Intracellular multiplication of *Legionella* in cultured pneumocytes (A549 cells). Free *Legionella* (SPFs) or *Legionella* released from pellets aged for 90 days were used to infect pneumocytes. Three infection essays were done with different bacterial concentrations (10², 10³ and 10⁴ CFU mL⁻¹) and the same pneumocyte cells concentration (5 x 10⁵ cell mL⁻¹). The error bars represent the standard deviation from three independent experiments.

Fig 1



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

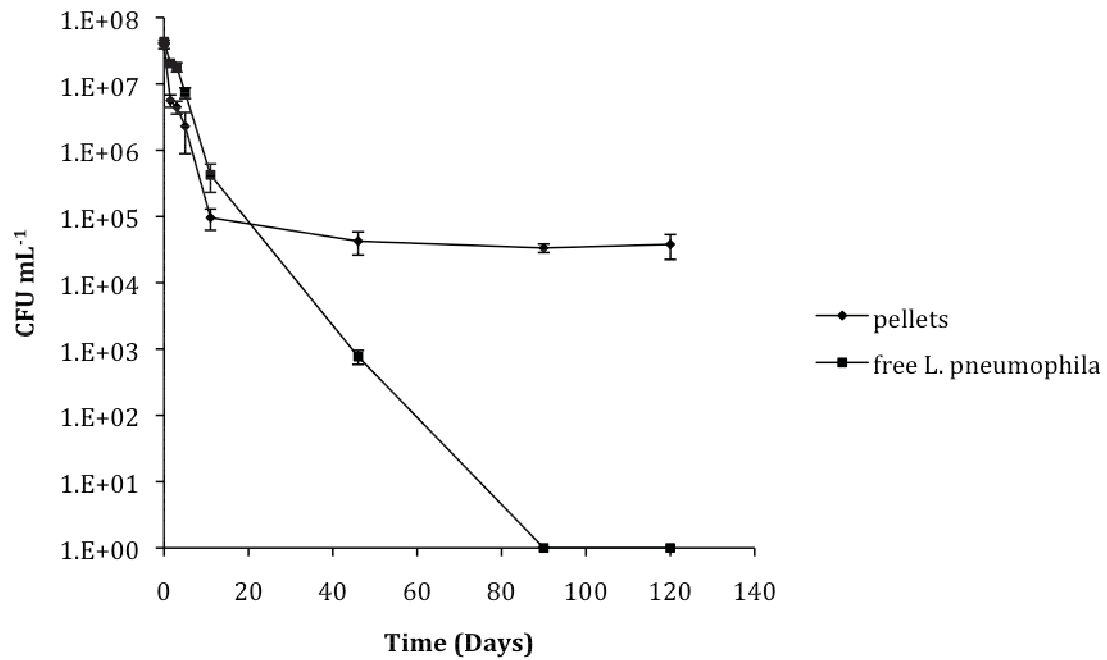
1 Fig 2
2
3
4
5
6
7
8
9



6

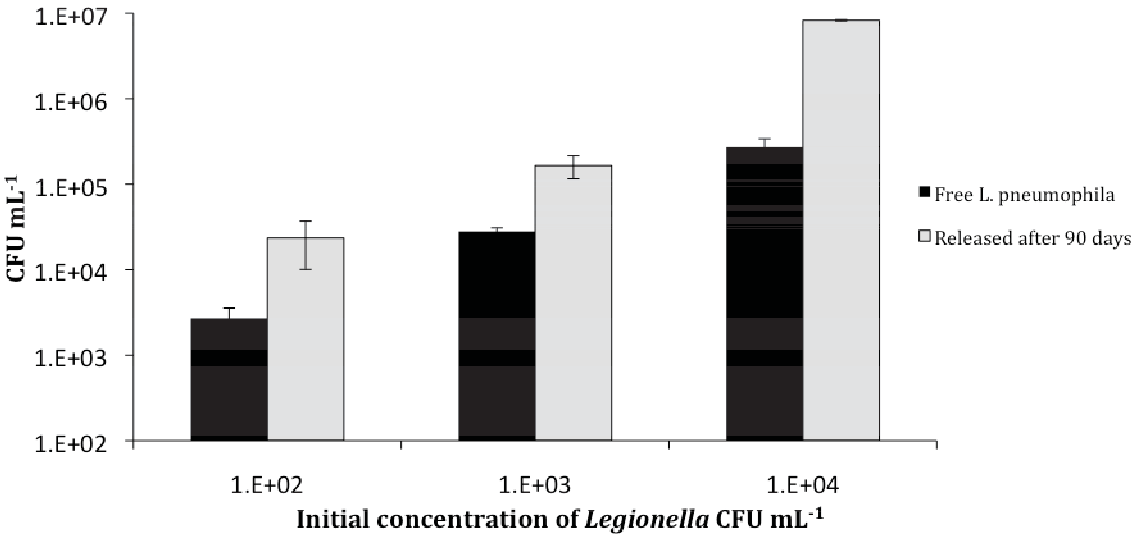
view

Fig 3



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Fig 4



Review

Implication des facteurs environnementaux sur l'état physiologique et l'infectiosité de *Legionella pneumophila*

Lens

Nous avons étudié l'impact de différents facteurs environnementaux tel que la présence de matières minérales ou organiques sur le comportement de *L. pneumophila* dans le milieu hydrique. Nous n'avons pas observé d'influence importante de la présence des matières minérales ou organiques sur la survie des légionelles dans l'eau. Cependant, la présence de matières minérales, notamment le calcium, favorise l'adhérence de *L. pneumophila* aux surfaces. Nous observons que le maintien de la bactérie dans une solution de chlorure de calcium, par rapport à de l'eau distillée, provoque des modifications du profil protéique.

Nous avons également étudié l'impact du passage de *Legionella* à travers *Tetrahymena tropicalis*, un cilié d'eau douce isolé dans les mêmes niches écologiques de *Legionella*. Le travail réalisé montre que les légionelles post-*Tetrahymena* deviennent plus résistantes à différentes conditions de stress (antibiotiques, carence nutritionnelle) et plus infectieuses pour les pneumocytes humains par rapport à des légionelles cultivées en phase stationnaire. L'impact important que semble jouer ces protozoaires sur le risque légionelle devrait donc être pris en compte et la relation légionelles-*Tetrahymena* être étudiée de façon plus intensive.

Nous avons également évalué l'infectiosité de différents phénotypes de *L. pneumophila* sur cellules humaines (macrophages, pneumocytes) et sur modèle murin (souris A/J, expérimentations réalisées dans l'Unité INSERM U151 sous la direction du Dr Florence ADER), en utilisant des bactéries ayant séjournées dans l'eau distillée ou dans l'eau minérale et des bactéries post-amibes, répliquées dans l'amibe *Acanthamoeba castellanii*. Nos résultats montrent que les bactéries post-amibes infectent mieux les cellules humaines que les autres phénotypes. En ce qui concerne le modèle murin, les suspensions en eau distillée n'ont pas été testées et deux méthodes d'infection différentes ont été utilisées, la voie intra-nasale et l'exposition aux aérosols. Nos résultats semblent montrer que les légionelles post-amibes ont tendance à plus facilement infecter les souris et à mieux se disséminer à partir des poumons vers le foie et la rate.

Notre travail confirme le rôle important du passage dans les amibes sur l'infectiosité des légionelles pour des cellules humaines ainsi que pour le modèle murin. L'infection des souris avec des aérosols a montré que la forme aérosol est plus efficace pour infecter les souris que la forme intra-nasale et que le phénotype post-amibes est le plus infectieux parmi les phénotypes aérosolisés testés.

Involvement of environmental factors on the physiological status and infectivity of *Legionella pneumophila*

Lens

We studied the impact of various environmental factors such as presence of minerals or organic matters on the behavior of *L. pneumophila* in water. We did not observe any significant influence of the presence of organic or mineral matters on the survival of *Legionella* in water. However, the presence of minerals, especially calcium, promotes adhesion of *L. pneumophila* to surfaces. We observed that the sustenance of the bacteria in a calcium chloride solution, compared with distilled water, causes changes in the protein profile.

We also studied the impact of the passage of *Legionella* through *Tetrahymena tropicalis*, a freshwater ciliate isolated from the same ecological niche of *Legionella*. The work done indicates that *Legionella* post-*Tetrahymena* become more resistant to various stress conditions (antibiotics, nutritional deficiency) and more infectious to human pneumocytes with respect to stationary form. The role that these protozoa appear to play in *Legionella* risk should be investigated and the *Legionella-Tetrahymena* relationship needs to be further extended.

Using bacteria cultured in either distilled or mineral water and post-amoebae bacteria replicated in *Acanthamoeba castellanii*, we evaluated the infectivity of various phenotypes of *L. pneumophila* on human cells (macrophages, pneumocytes) and in a mouse model (A / J mice, experiments performed at the INSERM Unit U151 under the direction of Dr. Florence ADER). Our results show that bacteria post-amoebae infect human cells better than other phenotypes. Regarding the mouse model, two different infection methods were used: the intranasal infection and aerosol exposure. Bacterial suspensions cultured in distilled water were not tested. Our results suggest that post-amoebae *Legionella* tend to more easily infect mice and to better disseminate from lungs to liver and spleen.

Our works confirm the important role of the passage through amoebae on *Legionella* infectivity on human cells as well as in the murine model. Infection of mice with aerosols showed that the aerosolized form of the bacteria infects mice more efficiently than the intra-nasal form and the post-amoeba phenotype is most infectious among the aerosolized phenotypes tested.