

UNIVERSITE DE POITIERS
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

THESE

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS

(Diplôme National – Arrêté du 7 août 2006)

Discipline : Microbiologie

Présentée et soutenue publiquement par :

Sabrina BOUYER

le 19 décembre 2008

Différenciation d'*Acanthamoeba castellanii* et rôle dans l'interaction avec *Legionella pneumophila*

DIRECTEURS DE THESE

Yann Héchard, MCU, Université de Poitiers

Marie-Hélène Rodier, PU-PH, Université de Poitiers

JURY

RAPPORTEURS : Sophie Jarraud, MCU-PH, HDR, Université de Lyon Nord

Loïc Favennec, PU-PH, HDR, Université de Rouen

EXAMINATEURS : Pierre Grève, PU, Université de Poitiers

France Wallet, Médecin, Service des Etudes Médicales, EDF

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES	5
LISTE DES TABLEAUX	7
LISTE DES ABREVIATIONS	8
CHAPITRE I. LES AMIBES LIBRES	10
I.1. Historique	11
I.2. Classification	13
I.3. Description des amibes du genre <i>Acanthamoeba</i>	15
I.3.1. Morphologie	15
I.3.2. Locomotion	18
I.3.3. Nutrition	19
I.4. Conditions de développement	21
I.5. Différenciation	22
I.5.1. Enkystement	22
I.5.2. Désenkystement	27
I.6. Ecologie	28
I.6.1. Environnement naturel	28
I.6.2. Environnement artificiel	29
I.7. Risques sanitaires liés aux amibes libres de genre <i>Acanthamoeba</i>	30
I.7.1. Pathologies humaines	30
I.7.2. Rôle indirect dans certaines maladies	34
CHAPITRE II. RELATIONS ENTRE AMIBES LIBRES ET LEGIONELLES	35
II.1. <i>Legionella</i>	35
II.1.1. Historique	35
II.1.2. Taxonomie	36
II.1.3. Caractères bactériologiques	38
II.1.4. Ecologie	41
II.1.5. Cycle de développement	43
II.1.6. Facteurs de virulence	44
II.1.7. Pouvoir pathogène de <i>L. pneumophila</i>	45
II.2. Interactions entre amibes libres et légionelles	47
II.2.1. Les amibes libres impliquées	47
II.2.2. Mécanismes	48

CHAPITRE III. OBJECTIFS _____ 54

CHAPITRE IV. MATERIEL ET METHODES _____ 55

IV.1. Organismes et milieux de culture _____ 55

IV.1.1. Amibes _____ 55

IV.1.2. Légionelles _____ 56

IV.2. Solutions d'acides aminés _____ 56

IV.3. Co-cultures _____ 57

IV.4. Traitement antibiotique _____ 58

IV.4.1. Préparation des témoins _____ 58

IV.4.2. Traitement par la gentamicine _____ 58

IV.5. Microscopie électronique _____ 59

IV.6. Extraction protéique _____ 59

IV.6.1. Lyse cellulaire _____ 59

IV.6.2. Précipitation des protéines _____ 60

IV.6.3. Dosage des protéines _____ 60

IV.7. Electrophorèse bidimensionnelle _____ 61

IV.7.1. Réhydratation _____ 61

IV.7.2. 1^{ère} dimension _____ 61

IV.7.3. 2^{nde} dimension _____ 62

IV.7.4. Analyse des spots _____ 63

IV.8. Extraction d'ARN _____ 64

IV.8.1. Préparation des extraits _____ 64

IV.8.2. Dosage des ARN _____ 66

IV.8.3. Contrôle des ARN _____ 66

IV.9. RT-PCR (Reverse transcriptase-PCR) _____ 66

IV.9.1. Traitement des solutions d'ARN _____ 67

IV.9.2. Préparation des ADNc _____ 67

IV.9.3. PCR en temps réel _____ 68

CHAPITRE V. RESULTATS ET DISCUSSION _____ 73

V.1. Etude des protéines et de l'expression de leurs gènes au cours de l'enkystement _____ 73

V.1.1. Evolution du protéome au cours de l'enkystement et du désenkystement _____ 76

V.1.2. Expression des gènes _____ 88

V.1.3. Conclusion _____ 91

V.2. Recherche de molécules induisant le désenkystement _____ 94

V.2.1. Définition des conditions opératoires et du témoin « négatif » _____ 95

V.2.2. Rôle des composants du milieu DGM-21A _____ 97

V.2.3. Rôle des acides aminés _____ 100

V.2.4. Conclusion _____ 1007

V.3. Survie de <i>L. pneumophila</i> Lens en association à <i>A. castellanii</i> ATCC 30234	108
V.3.1. Cinétique de survie de <i>L. pneumophila</i> Lens en présence des amibes	110
V.3.2. Etude de la localisation des bactéries	112
V.3.3. Effet de la gentamicine sur la suspension d'amibes infectées	115
V.3.4. Conclusion	117
 CHAPITRE VI. CONCLUSION GENERALE	 119
 CHAPITRE VII. BIBLIOGRAPHIE	 122
 ARTICLE	 136

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Trophozoïte d' <i>Acanthamoeba</i> en microscopie électronique à balayage	16
Figure 2 : Organisation cellulaire d'un trophozoïte d'amibe libre.....	16
Figure 3 : Acanthapodes d'un trophozoïte d' <i>Acanthamoeba</i> en microscopie à balayage	17
Figure 4 : Kystes d' <i>Acanthamoeba</i>	17
Figure 5 : Phagocytose de levures par <i>A. castellanii</i>	20
Figure 6 : Microscopie à balayage montrant la "bouche" d'un phagosome	20
Figure 7 : Présence d'une « food cup » à la surface d'un trophozoïte d' <i>A. culbertsoni</i>	21
Figure 8 : Les différentes étapes de l'enkystement d' <i>A. castellanii</i>	24
Figure 9 : Les différentes étapes du déenkystement d' <i>A. culbertsoni</i>	27
Figure 10 : Kystes d' <i>Acanthamoeba</i> dans une biopsie cérébrale.....	32
Figure 11 : Aspect de l'abcès cornéen amibien (anneau cornéen).....	33
Figure 12 : <i>L. pneumophila</i> en coloration de Gram	38
Figure 13 : Aspect des colonies de <i>L. pneumophila</i> sur gélose BCYE.....	40
Figure 14 : Cycle de vie biphasique de <i>L. pneumophila</i>	43
Figure 15 : Evolution du nombre de cas de légionellose survenus en France, 1988-2007	46
Figure 16 : Phagocytose de <i>L. pneumophila</i> par <i>H. vermiformis</i> vue par microscopie électronique en transmission.	49
Figure 17 : Modèle de cytolysse d' <i>A. polyphaga</i> après répllication intracellulaire par <i>L. pneumophila</i>	52
Figure 18 : Principe de la détection des produits de PCR par le SYBR Green.....	69
Figure 19 : Préparation et analyse par électrophorèse bidimensionnelle des extraits protéiques d' <i>A. castellanii</i> à différents temps d'enkystement à partir d'une culture de trophozoïtes.	74
Figure 20 : Préparation et analyse par électrophorèse bidimensionnelle des extraits protéiques d' <i>A. castellanii</i> à différents temps de déenkystement à partir d'une suspension de kystes	75

Figure 21 : Gels d'électrophorèse bidimensionnelle obtenus avec les extraits protéiques d' <i>A. castellanii</i> après 0 h, 6 h, 24 h et 8 jours d'enkystement.....	77
Figure 22 : Gels d'électrophorèse bidimensionnelle obtenus avec les extraits protéiques d' <i>A. castellanii</i> après 0 h, 24 h et 72 h de désenkystement	80
Figure 23 : Protocole suivi pour l'étude du désenkystement d' <i>A. castellanii</i>	95
Figure 24 : Numération des trophozoïtes d' <i>A. castellanii</i> apparus au cours du temps en fonction du milieu testé.	96
Figure 25 : Pourcentage de désenkystement d' <i>A. castellanii</i> en fonction des différents composants du milieu DGM-21A : milieux sans acides aminés.	98
Figure 26 : Pourcentage de désenkystement d' <i>A. castellanii</i> en fonction des différents composants du milieu DGM-21A : milieux avec acides aminés.....	99
Figure 27 : Pourcentage de désenkystement d' <i>A. castellanii</i> en fonction des groupes d'acides aminés testés	101
Figure 28: Pourcentage de désenkystement d' <i>A. castellanii</i> en fonction des acides aminés testés	103
Figure 29 : Pourcentage de désenkystement d' <i>A. castellanii</i> en fonction de la présence de tryptophane	105
Figure 30 : Pourcentage de désenkystement d' <i>A. castellanii</i> en fonction des milieux testés	106
Figure 31 : Protocole d'étude de la survie de <i>L. pneumophila</i> en association avec les amibes libres	109
Figure 32 : Survie de <i>L. pneumophila</i> Lens associée à <i>A. castellanii</i> ATCC 30234 dans le TEnk	110
Figure 33 : Trophozoïte d' <i>A. castellanii</i> infecté après 1 jour d'incubation..	112
Figure 34 : Suspension d' <i>A. castellanii</i> infectées après 4 jours d'incubation	113
Figure 35 : Suspension d' <i>A. castellanii</i> infectées après 180 jours d'incubation.....	114
Figure 36 : Survie de <i>L. pneumophila</i> après traitement par la gentamicine.....	116

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Résumé de la classification des amibes libres	14
Tableau 2 : Nombre de cas d'atteintes du système nerveux dus aux amibes libres et estimation des cas de kératites amibiennes dans le monde, au 1er janvier 2001	31
Tableau 3 : Evolution du nombre de souches d'origine cliniques isolées en France depuis 1998 et répartition des isollements de légionelles par espèces et par sérogroupe.....	37
Tableau 4 : Amorces utilisées en PCR en temps réel.	70
Tableau 5 : Masse moléculaire apparente et point isoélectrique estimé des protéines sélectionnées par électrophorèse bidimensionnelle.	78
Tableau 6 : Identification des spots d'intérêt par LC-MS/MS.....	83
Tableau 7 : Variation de l'expression des ARNm du 18S et du TPBF au cours de l'enkystement d' <i>A. castellanii</i>	89
Tableau 8 : Variation de l'expression des ARN des protéines d'intérêt d' <i>A. castellanii</i> au cours de l'enkystement après correction par rapport au gène de référence (TPBF).....	89

LISTE DES ABREVIATIONS

2D : électrophorèse bidimensionnelle

ACES : N-(2-acétoamido)-2-aminoethanesulfonic acid

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

AMPc : adénosine monophosphate cyclique

ARN : acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ATCC : American type culture collection

ATP : adénosine tri-phosphate

BCYE : buffered charcoal yeast extract

BET : bromure d'éthidium

CDC : centers for disease control

CHAPS : 3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate

CNR : centre national de référence

CSP 21 : cyst specific protein 21

DEPC : diéthylpyrocarbonate

DTT : dithiothreitol

EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid (acide éthylène-diamine-tétraacétique)

EEA : encystment-enhancing activity

EF2 : elongating factor 2

EGA : encéphalite granulomateuse amibienne

EST : expressed sequence tag

FBA : fructose biphosphate aldolase

HPLC : high performance liquid chromatography

HTP : human tumor protein

HSP 70 : heat shock rotein 70

LC : liquid chromatography

LLAP : *Legionella*-like Amoebal pathogens

MIF : mature intracellular form

MM : masse moléculaire

MS : mass spectrometry

MEAP : méningo-encéphalite amibienne primitive

MOI : multiplicity of infection

pI : point isoélectrique

PMSF : phenylmethanesulfonylfluoride

PYG : Protéose peptone, Yeast extract, Glucose

RAPD : random amplified of polymorphic DNA

RER : réticulum endoplasmique rugueux

RT-PCR : reverse transcriptase – polymerase chain reaction

SBT : Sequence-Based Typing

SDS-PAGE : sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis

siRNA : silencing RNA

SSUrRNA : small sub-unit of ribosomal RNA (petite sous-unité de l'ARN ribosomal)

SubSP : subtilisin-like serine proteinase

TA : tampon « amibes »

TCA : trichloroacetic acid (acide trichloroacétique)

TEnk : tampon d'enkystement

TCTP : translationally-controlled tumor proteins

TPBF : TATA box-binding protein Promoter Binding Factor

UFC : unité formant colonie

UV : ultra violet

VBNC : viable but non cultivable

Chapitre I. Les amibes libres

Les amibes (du grec *amoibê* qui signifie « transformation ») sont des protozoaires appartenant à la classe des Rhizopodes. On distingue deux groupes d'amibes en fonction de leur habitat :

- les amibes parasites sont en permanence à la recherche d'un hôte, elles survivent dans l'environnement mais s'y développent généralement peu. Elles vivent et se développent essentiellement dans le tube digestif de l'homme, dans les pays tropicaux et tempérés (*Entamoeba histolytica*, *E. dispar*). La prévalence de ces protozoaires varie considérablement dans les différents groupes de population et est généralement étroitement liée aux conditions socio-économiques. Les taux les plus élevés sont retrouvés dans des endroits dépourvus d'installations sanitaires comme les égouts et l'eau potable. Il arrive que certaines amibes parasites ne déclenchent pas de syndrome pathologique chez l'hôte ; on parlera alors préférentiellement de commensalisme.

- les amibes libres ou telluriques, totalement indépendantes de l'homme et capables de mener une existence autonome dans le milieu naturel (aquatique et sol humide). Certains genres sont capables d'amphizoïdie, c'est-à-dire qu'ils sont tantôt libres dans le milieu extérieur, tantôt parasites chez l'animal ou l'homme en y induisant une pathologie le plus souvent grave (cérébrale, oculaire, cutanée, auditive, sinusienne...). Dans ce cas, elles ne sont jamais pathogènes par ingestion, mais uniquement par effraction.

Les amibes libres évoluent en général en milieu fortement aqueux et riche en matières organiques ; les amibes principalement rencontrées dans l'environnement appartiennent aux genres *Hartmannella*, *Vahlkampfia*, *Naegleria*, *Acanthamoeba* et *Balamuthia*, les 3 derniers étant décrits comme pathogènes pour l'homme.

I.1. Historique

Les amibes sont décrites pour la première fois par August Johann Rösel von Rosenhof, un microscopiste amateur, entomologiste et dessinateur, en 1755.

En 1841, Felix Dujardin décrit la famille des amibiens et définit ainsi les organismes de cette famille : «animaux formés d'une substance glutineuse, sans tégument, sans organisation appréciable, changeant de forme à chaque instant par la protension ou la rétraction d'une partie de leur corps, d'où résultent des expansions variables» (Dujardin, 1841). C'est à Saint Petersbourg en 1875 que Lösch découvre pour la première fois des trophozoïtes mobiles qu'il nomme *Amoeba coli* dans les selles d'un agriculteur atteint de dysenterie chronique. A l'autopsie de sujets morts de dysenterie, Koch décèle en 1883, dans des ulcérations intestinales, des amibes que Councilman et Lafleur décriront dans des abcès hépatiques et baptiseront, en 1891, *Entamoeba dysenteriae*. Schaudinn lui donne son nom actuel d'*E. histolytica* en 1903.

La première description d'une amibe libre eut lieu en 1899 par Schardinger. Il découvre une amibe ayant la capacité de se transformer en forme flagellée et la nomme *Amoeba gruberi*. Le genre *Naegleria* sera suggéré plus tard par Alexeieff en 1912. La même année, Chatton et Lalung-Bonnaire (1912) décrivent le genre *Vahlkampfia*. Le genre *Acanthamoeba* sera décrit par Volkonsky en 1931.

En 1957, Jahnes et Fullmer trouvent accidentellement une amibe dans des cultures de reins de singe lors d'une préparation de vaccin antipoliomyélitique. Ils observent en effet des éléments arrondis, semblables à des cellules modifiées par l'effet cytopathogène induit par certains virus simiens. Un examen plus approfondi montra qu'il s'agissait de kystes d'amibes (Jahnes & Fullmer, 1957). Culbertson *et al.* montrent que cette souche d'amibe, inoculée par voie nasale au singe et à la souris entraîne une méningo-encéphalite mortelle en 4 à 7 jours. Ils suspectent également cette amibe de pouvoir pénétrer l'organisme par ses propres moyens sans inoculation préalable (Culbertson *et al.*, 1959). Le pouvoir pathogène des amibes libres est confirmé en Australie, quand Fowler suspecte le premier cas humain. La même année, 4 cas de méningite amibienne sont décrits, survenus chez des sujets jeunes qui avaient nagé dans des piscines ou collections d'eau. Les auteurs suspectent alors une amibe de genre *Acanthamoeba* comme l'agent responsable (Fowler & Carter, 1965). Un an plus tard, l'amibe est isolée et identifiée : il s'agit de *Naegleria fowleri*. Cette pathologie est alors dénommée

Méningo-Encéphalite Amibienne Primitive (MEAP). En 2007, le CDC estime à plus de 120 cas le nombre de MEAP observées aux Etats-Unis depuis 1937 (CDC, 2008). En apparence, on peut croire que la fréquence de la maladie augmente, cependant cette augmentation est surtout due à un meilleur diagnostic de la part des cliniciens et à l'évolution des techniques d'explorations médicales et anatomopathologiques.

Le premier cas humain de méningo-encéphalite à *Acanthamoeba*, dans un premier temps attribué à *Hartmannella*, est décrit en 1972. Une étude rétrospective montrera que l'amibe en cause était *A. culbertsoni* (Willaert *et al.*, 1978). Le nom d'« Encéphalite granulomateuse amibienne » (EGA) est alors donné à cette infection pour la distinguer des infections à *Naegleria*. Environ 150 cas d'EGA ont été décrits dans le monde (Schuster & Visvesvara, 2004).

Par la suite, en 1975, Jones décrit le premier cas de kératite amibienne à *Acanthamoeba* (Jones *et al.*, 1975). L'incidence de cette maladie n'a depuis cessé d'augmenter, parallèlement à l'accroissement du port de lentilles, facteur de risque retrouvé dans plus de 80 % des cas. Néanmoins, des kératites amibiennes peuvent se développer chez des non porteurs, à la faveur d'un traumatisme ou plus rarement spontanément (Lakomy, 2005).

En 1993, une nouvelle espèce d'amibes libres pathogène pour l'homme est décrite par Visvesvara, *Balamuthia mandrillaris*. Sa pathogénicité est très proche de celle des *Acanthamoeba* (Visvesvara *et al.*, 1993).

L'étude des parasites et symbiotes des amibes libres est relativement récente, puisque c'est seulement en 1956 que Drozanski décrit la présence d'un micro-organisme intracellulaire lysant les amibes. Puis, en 1975, Proca-Ciobanu démontre la présence d'endosymbiotes dans les amibes de genre *Acanthamoeba*. La première évocation d'un rôle de réservoir de bactéries pathogènes fut faite par Krishnan-Prasad en 1978. Cette découverte accrut l'intérêt des microbiologistes pour l'étude des interactions entre amibes libres et micro-organismes résistants aux amibes et depuis, de nombreuses bactéries, virus ou champignons sont régulièrement décrits comme étant potentiellement associés aux amibes dans l'environnement et sont appelés « micro-organismes résistants aux amibes libres » (Greub & Raoult, 2004).

I.2. Classification

Leurs mouvements amoeboïdes impliquent que les amibes ne possèdent pas de forme cellulaire stable. Par conséquent, les caractéristiques morphologiques distinctives sont très limitées et l'identification et la classification des amibes sur des critères morphologiques est hasardeuse.

Depuis les premières études des amibes, différentes classifications ont été proposées (Bolivar *et al.*, 2001) ; (Smirnov *et al.*, 2005). En 1926, Schaeffer suggère une classification basée sur la morphologie en microscopie optique. Plus tard, certains auteurs évoquent une classification basée sur la division nucléaire (Singh en 1952 et Chatton en 1953) mais ces différentes propositions se sont révélées inadéquates. Par la suite, en 1965, Jahn et Bovee créent un système basé sur les mouvements du cytoplasme, système rapidement limité dans la distinction des espèces. L'augmentation du nombre d'espèces difficiles à reconnaître a par la suite amplifié le besoin de clarifier les critères d'identification et de créer une classification appropriée. Dans les années 80, l'évolution de la microscopie et l'apparition de la microscopie électronique en pratique courante ont permis la découverte de caractéristiques ultrastructurales spécifiques chez de nombreuses amibes. Une re-description d'amibes déjà décrites ainsi qu'une description de nouvelles espèces d'amibes fut alors possible. Puis, une taxonomie combinant caractéristiques ultrastructurales et caractéristiques biologiques et physiologiques fut développée par Page en 1987.

Cette classification est depuis régulièrement révisée, grâce aux données de la biologie moléculaire. En 2005, un consortium de 28 biologistes a publié un article de synthèse sur la nouvelle classification des Eucaryotes (Adl *et al.*, 2005). Les auteurs ont présenté une hiérarchie simplifiée pour chaque rang, sans titre formel, souhaitant ainsi affranchir leur classification des anciens systèmes hiérarchiques assez contraignants (Tableau 1).

Tableau 1 : Résumé de la classification des amibes libres (d'après Adl *et al.*, 2005).

Super-règne :	EUKARYOTA
Règne :	PROTOZOA
Sous-règne :	SARCOMASTIGOTA
Phylum :	AMOEBOZOA
☛ TUBULINEA	
☛ TUBULINIDA	
Genre <i>HARTMANNELLA</i>	
Espèce : <i>Hartmannella vermiformis</i>	
☛ ACANTHAMOEBAE	
Genre <i>ACANTHAMOEBA</i>	
Espèces : <i>Acanthamoeba astronyxis</i> , <i>A. castellanii</i> , <i>A. culbertsoni</i> , <i>A. lenticulata</i> , <i>A. mauritaniensis</i> , <i>A. polyphaga</i> ...	
Genre : <i>BALAMUTHIA</i>	
Espèce : <i>Balamuthia mandrillaris</i>	
☛ EUMYCETOZOA	
☛ DICTYOSTELIA	
Genre <i>DICTYOSTELIUM</i>	
Espèce : <i>Dictyostelium dendriticum</i>	
Phylum :	EXCAVATA
☛ HETEROLOBOSEA	
☛ VAHLKAMPFIIDAE	
Genre <i>NAEGLERIA</i>	
Espèces : <i>Naegleria andersoni</i> , <i>N. australiensis</i> , <i>N. chilensis</i> , <i>N. fowleri</i> , <i>N. gruberi</i> , <i>N. indonesiensis</i> , <i>N. jadini</i> , <i>N. lovaniensis</i> ...	
Genre <i>VAHLKAMPFIA</i>	
Espèce : <i>Vahlkampfia avara</i> , <i>V. inornata</i> , <i>V. lobospinosa</i>	

Nous avons choisi de travailler sur le genre *Acanthamoeba*, ces amibes étant fréquemment utilisées dans la littérature, particulièrement pour l'étude des interactions amibes/légionelles.

Le genre *Acanthamoeba* comprend 25 espèces. En 1977, Pussard et Pons ont proposé une clé dichotomique pour la détermination des espèces d'*Acanthamoeba* basée sur la morphologie de la paroi kystique (nombre et répartition des ostioles, aspect de l'exine) et proposent 3 groupes (Pussard & Pons, 1977) :

- Groupe I (*A. astronyxis*, *A. comandoni*, *A. echinulata*, et *A. tubiashi*) : kystes de taille supérieure ou égale à 18 µm, endokyste étoilé et ectokyste sphérique lisse.

- Groupe II (*A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. rhysodes*, *A. mauritaniensis*, *A. divionensis*, *A. griffini*, *A. lugdunensis*, *A. quina*, *A. hatchetti* et *A. triangularis*) : kystes de taille inférieure à 18 µm, endokyste polygonal ou étoilé, ectokyste irrégulier ou ridé.

- Groupe III (*A. culbertsoni*, *A. lenticulata*, *A. palestinensis*, *A. pustulosa* et *A. royreba*) : kystes de taille inférieure à 18 µm, endokyste arrondi ou légèrement angulaire, ectokyste fin et lisse, voire légèrement ridé.

Cette identification d'espèces basée sur la morphologie kystique a été largement utilisée mais est remplacée maintenant par les techniques de biologie moléculaire (ARN ribosomal 18S, SSUrRNA) (Gast *et al.*, 1996; Ledee *et al.*, 2003). Ces études moléculaires ont permis d'identifier au moins 15 génotypes, désignés T1, T2... (Booton *et al.*, 2005). Certains de ces génotypes sont depuis connus pour être associés à une pathogénicité plus importante (le génotype T4 en particulier).

I.3. Description des amibes du genre *Acanthamoeba*

I.3.1. Morphologie

Les *Acanthamoeba* se présentent sous deux formes

- une forme végétative ou trophozoïte,
- une forme kystique.

A la différence des amibes du genre *Naegleria*, *Acanthamoeba* ne présente pas de forme flagellée.

I.3.1.1. Forme trophozoïte

La forme végétative ou trophozoïte (Figure 1) est la forme biologiquement active, capable de se mouvoir, de se nourrir et de se diviser. Les trophozoïtes mesurent de 25 à 40 µm en fonction des espèces. C'est uniquement sous cette forme que les amibes se multiplient, la reproduction s'effectuant par division binaire.

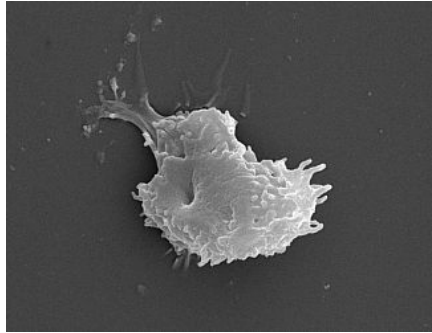


Figure 1 : Trophozoïte d'*Acanthamoeba* en microscopie électronique à balayage (Source : Institut de parasitologie, Berne ; www.labor-spiez.ch/fr/the/ar/bs/frthearbsbak03.htm).

L'organisation cellulaire correspond typiquement à celle d'une cellule eucaryote (Figure 2) ; on retrouve ainsi un noyau avec un large nucléole central, un appareil de Golgi, un réticulum endoplasmique lisse et rugueux, des ribosomes, des mitochondries, des microtubules et différentes vacuoles. Les vacuoles cytoplasmiques sont des vacuoles contractiles permettant le contrôle du contenu en eau de la cellule, ainsi que des vacuoles de sécrétion (contenant des enzymes spécifiques de certaines fonctions) ou des vacuoles de phagocytose (Bowers & Korn, 1968).

Le cytoplasme se compose de deux parties :

- l'ectoplasme, hyalin et homogène, de viscosité importante,
- l'endoplasme, granuleux et vacuolaire, qui contient des organites, le noyau, des substances cristallisées et des inclusions diverses.

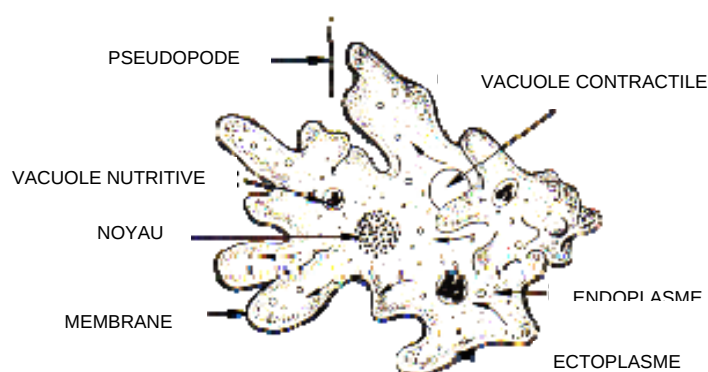


Figure 2 : Organisation cellulaire d'un trophozoïte d'amibe libre (Source : Pearson Scott Foresman, donated to the Wikimedia Foundation, <http://en.wikipedia.org/wiki/Amoeba>).

Ces amibes sont nues, c'est à dire qu'elles ne sont pas entourées d'une cuticule épaisse. La membrane plasmique est trilamellaire. A la surface de cette membrane plasmique, on distingue de petites projections appelées acanthapodes, caractéristiques du genre (Figure 3). Une vacuole contractile proéminente contrôlant l'hydratation de l'amibe ainsi qu'un noyau avec un large nucléole central sont également des caractéristiques distinctives du genre (Marciano-Cabral & Cabral, 2003).

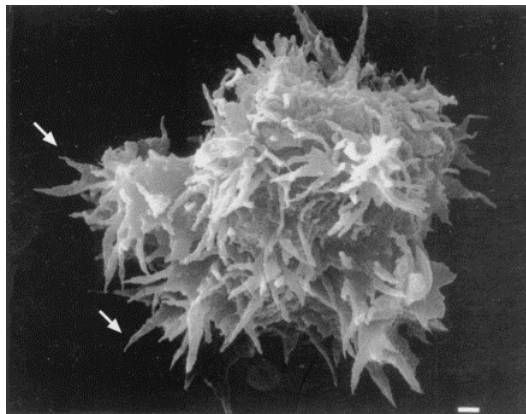


Figure 3 : Acanthapodes d'un trophozoïte d'*Acanthamoeba* en microscopie à balayage. Barre = 1 μ m (d'après Marciano-Cabral, 2003).

I.3.1.2. Forme kystique

Le kyste (Figure 4) est la forme de résistance, biologiquement inactive. Les kystes mesurent de 13 à 20 μ m en fonction des espèces.



Figure 4 : Kystes d'*Acanthamoeba*. Barre = 2 μ m. (Source : www.med-chem.com).

Les kystes se forment lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables à la forme végétative (froid, dessiccation ou épuisement du milieu nutritif) et permettent aux amibes de survivre longtemps en état de latence, avec une activité métabolique réduite. La forme kystique permet également une dissémination aquatique ou aérienne et l'implantation dans de nouveaux biotopes.

Le protoplasme kystique possède un cytoplasme fortement déshydraté, ce qui entraîne une augmentation de sa densité. De nombreuses vacuoles sont observables, certaines d'entre elles contiennent le matériel nécessaire à l'édification ou au maintien de la paroi kystique. D'autres, riches en ribonucléoprotéines, sont probablement par autophagocytose, une source énergétique pour le protoplasme (Bowers & Korn, 1969).

Les kystes sont plus résistants que les trophozoïtes aux biocides, à la chloration et aux antibiotiques et peuvent survivre à des températures extrêmes (-20°C à 56°C) (Bouyer *et al.*, 2007; Marciano-Cabral & Cabral, 2003). Mazur *et al.* ont démontré que les kystes restaient viables et potentiellement infectants après 24 ans dans de l'eau à 4°C (Mazur *et al.*, 1995). Il a cependant été démontré qu'un traitement par le fréon ou l'oxyde de méthylène ou l'autoclavage permettait de détruire les kystes (Meisler *et al.*, 1985).

Quand les conditions de vie redeviennent favorables, l'eau pénètre par osmose dans le kyste et réhydrate le cytoplasme. Les synthèses et métabolismes reprennent. Le trophozoïte sort du kyste par un ostiole ayant perdu son opercule et reprend une vie libre.

I.3.2. Locomotion

Les trophozoïtes d'*Acanthamoeba* se déplacent lentement et dans toutes les directions. L'association de mouvements amoeboïdes polarisés et de l'adhésion des trophozoïtes au substrat est à l'origine de la mobilité des amibes.

Les trophozoïtes sont en effet capables de mouvements amoeboïdes dus à l'émission de pseudopodes, correspondant à une déformation de la membrane plasmique causée par des interactions de type actine/myosine. Les pseudopodes sont formés des deux types de cytoplasme : l'endoplasme fluide entouré de l'ectoplasme gélifié riche en myosine et en microfilaments d'actine fixés à la membrane plasmique. Le mouvement se fait grâce à un courant endoplasmique qui va des pseudopodes en rétraction, avec dépolymérisation de

l'actine, vers les pseudopodes en extension, avec une gélification par polymérisation de l'actine (Puytorac *et al.*, 1987).

Les déplacements des trophozoïtes ne se font pas au hasard et sont influencés par des phénomènes de chimiotactisme. En 1996, Schuster démontre que les trophozoïtes d'*A. castellanii* sont attirés par une variété de produits bactériens (peptide bactérien, lipopolysaccharide, lipide A), suggérant la présence de récepteurs pour ces produits bactériens à la surface de l'amibe (Schuster & Levandowsky, 1996).

I.3.3. Nutrition

Les amibes se nourrissent de bactéries, d'algues et de levures rencontrées dans l'environnement. Certaines sont également capables de vivre dans des milieux liquides axéniques sans particules où elles intègrent les nutriments par pinocytose (Bowers & Olszewski, 1972).

Les amibes du genre *Acanthamoeba*, et en particulier *A. castellanii*, sont connues pour leur capacité importante de phagocytose de particules en milieu de culture liquide (bactéries mortes ou vivantes, levures ou particules de latex), ce qui a permis de nombreuses études de ce phénomène. La phagocytose se fait par formation de pseudopodes qui entourent la particule (Figures 5 et 6), et permet la formation d'un phagosome dans laquelle la phagocytose et la digestion ont lieu après fusion avec les lysosomes. Selon Bowers, l'ingestion d'une particule est rapide ; elle est entourée par un pseudopode et transportée dans le cytoplasme dans un phagosome en 40 secondes (Bowers, 1980).

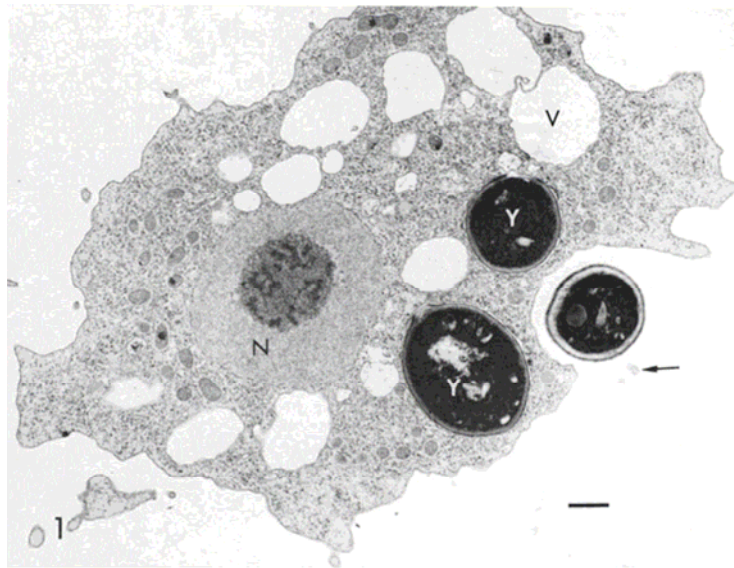


Figure 5 : Phagocytose de levures par *A. castellanii* : 2 levures (Y) ont été phagocytées, la troisième est entourée par un acanthapode (V = vacuole, N = noyau). Barre = 1 μm (d'après Bowers *et al.*, 1980).

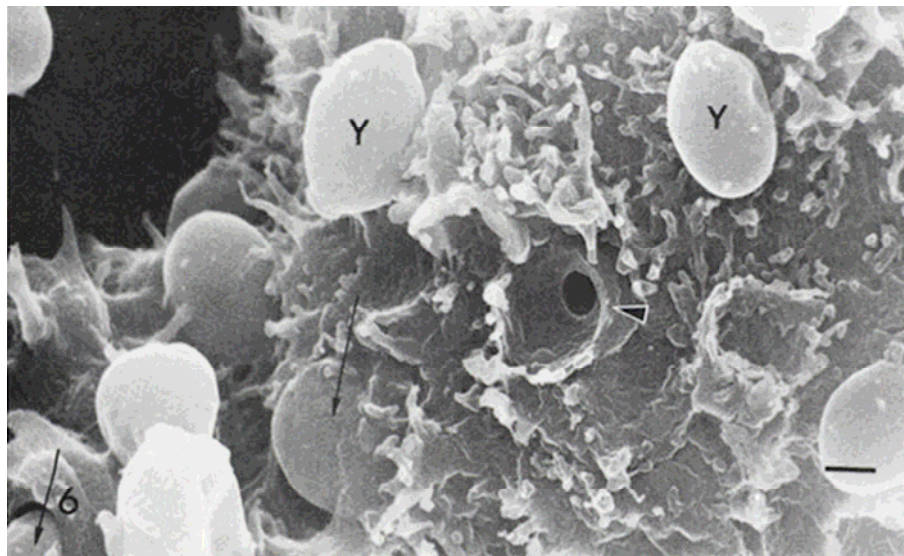


Figure 6 : Microscopie à balayage montrant la “bouche” d’un phagosome (flèche pleine noire). La surface de l’amibe est parsemée de multiples acanthapodes, certains entourant des levures (Y). Les flèches indiquent 2 levures en cours d’ingestion. Barre = 1 μm (d'après Bowers *et al.*, 1980).

Certains auteurs ont également décrit la formation de « food cup » à la surface des trophozoïtes (Figure 7), structures temporaires se formant afin de capter les bactéries, levures ou débris cellulaires (Marciano-Cabral & Cabral, 2003).

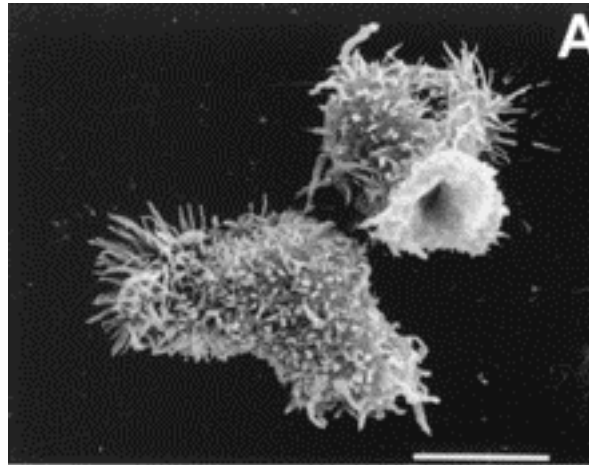


Figure 7 : Présence d'une « food cup » à la surface d'un trophozoïte d'*A. culbertsoni*. Barre = 10 μm (d'après Marciano-Cabral, 2003).

I.4. Conditions de développement

Les amibes du genre *Acanthamoeba* sont facilement cultivables en laboratoire, les conditions de culture pouvant être variables. Les amibes prolifèrent en présence de bactéries mais les cultures sans bactéries (milieux axéniques) sont possibles dans des milieux liquides enrichis, contenant de la peptone, de l'extrait de levure et du glucose. Les études effectuées afin de trouver des conditions de culture axénique ont utilisé des bactéries tuées par autoclavage. Ces milieux sont donc des intermédiaires entre culture xénique et axénique, facilement utilisables en pratique courante.

Les amibes sont généralement cultivées sur des géloses contenant de l'agar (2% en général) recouvertes de bactéries vivantes ou tuées par autoclavage. En général, les bactéries de choix sont des souches non mucoïdes comme *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp. et *Escherichia coli*. Les produits pathologiques (grattages cornéens, lentilles, biopsies cérébrales...) sont déposés sur la gélose, puis les géloses sont observées au microscope inversé pendant plusieurs jours à la recherche de trophozoïtes ou de kystes d'amibes.

Le milieu de culture liquide le plus utilisé est le milieu PYG contenant de la protéose peptone (lysate protéique), de l'extrait de levure et du glucose. Il est souvent supplémenté en antibiotiques afin d'éviter les contaminations bactériennes. Ce milieu de culture axénique a été décrit la première fois par Jensen *et al.* Dans leurs conditions, ils obtenaient un temps de doublement de 6 heures (Jensen *et al.*, 1970). Les amibes des autres genres, en particulier *Naegleria* et *Balamuthia*, sont beaucoup plus exigeantes que les *Acanthamoeba* en milieu liquide car elles nécessitent une supplémentation plus importante (sérum de veau fœtal, vitamines...).

Des milieux de culture définis ont été décrits pour différentes espèces, contenant différents acides aminés, des vitamines et du glucose en quantité variables (Schuster, 2002). Ces milieux définis permettent la croissance mais souvent le temps de génération est plus long (40 à 60 heures). Byers *et al.* ont donc formulé un milieu minimum défini permettant d'obtenir une croissance plus rapide des amibes ; ce milieu, appelé DGM-21A, permet d'obtenir un temps de doublement de 13 heures (Byers *et al.*, 1980).

I.5. Différenciation

I.5.1. Enkystement

I.5.1.1. Initiation

L'enkystement des amibes libres est induit lorsque l'environnement devient défavorable à la forme végétative (déplétion nutritive, dessiccation, modifications de la température ou du pH, agressions chimiques...) (Marciano-Cabral & Cabral, 2003). *In vitro*, l'enkystement peut être provoqué par déplétion nutritive et/ou ajout d'ions calcium ou magnésium, mais il est également induit par des substances telles que la taurine, l'épinéphrine, la norépinéphrine, la tyramine (Krishna-Murti & Shukla, 1984) ou le bromure d'éthidium, certains composés de la famille des diamidines (l'hydroxystilbamidine, le diminazene aceturate) (Byers *et al.*, 1991). L'hyperosmolarité permet également de déclencher l'enkystement (Cordingley *et al.*, 1996).

Il a été démontré que l'enkystement induit par les différents agents chimiques est favorisé par un facteur extracellulaire appelé EEA (Encystment-Enhancing Activity). Ce facteur est produit par les amibes et est abondant dans les cultures de haute densité cellulaire. Il n'a par lui-même aucun effet sur l'enkystement mais stimule la différenciation induite par

les agents chimiques ou la déplétion carbonée (Byers *et al.*, 1991). Les auteurs ont déterminé certaines propriétés de ce facteur leur permettant de supposer qu'il s'agit d'un nucléotide modifié, mais ils n'ont cependant pas réussi à le purifier.

Différentes études ont été menées afin de déterminer les conditions optimales permettant d'obtenir un taux d'enkystement maximal *in vitro*. Ainsi, il a été démontré que les cultures d'*A. castellanii* en phase exponentielle ont un taux d'enkystement faible (5 à 8%) après 72 heures dans un tampon d'enkystement, alors que 50 à 70% des cellules provenant de cultures en phase stationnaire s'enkystent après seulement 20 à 30 heures dans ce même tampon (Stöhr *et al.*, 1987). Ces mêmes auteurs ont également étudié le cycle cellulaire des trophozoïtes ; ils ont montré l'absence de phase G1, une phase G2 majoritaire (90% de la durée du cycle), les phases S et M étant courtes (environ 10% du cycle). Leurs résultats montrent également que l'enkystement est initié à un point particulier de la phase G2 tardive et que, contrairement aux cellules en phase exponentielle, l'importante capacité d'enkystement des cellules en phase stationnaire est due à un arrêt de ces cellules à ce point particulier du cycle. Ce point particulier du cycle ou phase de transition du développement, a également été décrit chez une autre amibe, *Dictyostelium discoideum* (Maeda *et al.*, 1989).

I.5.1.2. Modifications morphologiques

Les différentes étapes de l'enkystement, et en particulier les modifications structurales, sont les suivantes (Khunkitti *et al.*, 1998) :

- la phase de préenkystement : les cellules ne sont pas distinguables morphologiquement des trophozoïtes (Figure 8a). Cependant, des modifications progressives du volume, de la concentration en protéines, lipides et carbohydrates et de l'activité de certaines enzymes sont observées.
- la phase d'initiation du kyste : les cellules s'arrondissent (Figure 8b), perdant leur pseudopodes et leur capacité d'adhérer au support.
- la phase de synthèse de la paroi kystique : au bout de 7 jours dans un milieu propice à l'enkystement, la plupart des cellules sont des kystes matures entourés de leur paroi cellulosique (Figure 8c). La synthèse de cette paroi s'effectue en deux temps : synthèse de l'exine dure et épaisse (le composant majoritaire est la cellulose) puis synthèse de l'intine,

adhérant très étroitement au protoplasme amibien. Ces deux parois fusionnent à certains endroits pour former des pores, ou ostioles, obstrués par un opercule. L'observation, dans le cytoplasme des amibes en cours d'enkystement, de vésicules denses contenant un matériel fibreux similaire à celui retrouvé dans la paroi suggère une implication de ces structures dans le transport à la membrane des composants cellulotiques (Chavez-Munguia *et al.*, 2005).

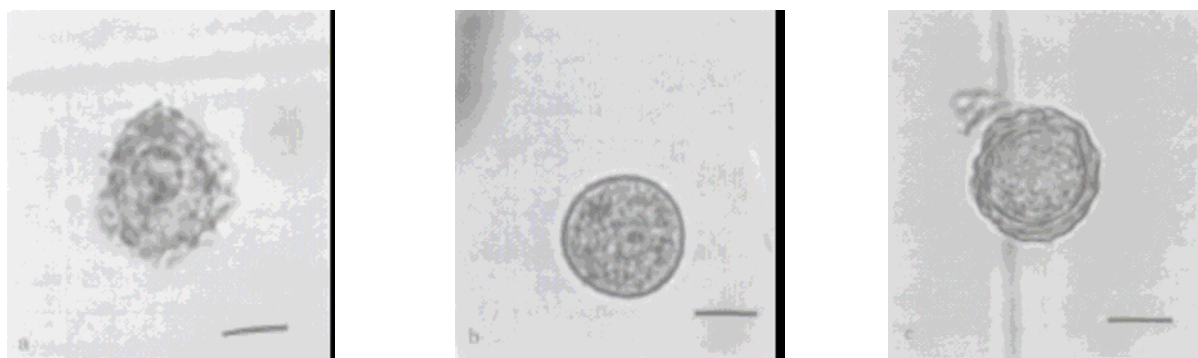


Figure 8 : Les différentes étapes de l'enkystement d'*A. castellanii* (d'après Khunkitti *et al.*, 1998). (a) trophozoïte ; (b) kyste jeune ; (c) kyste mature. Barre = 10 μ m.

Les différentes modifications physiologiques induites ont été décrites par Bowers et Korn en 1969. Ils rapportent que l'enkystement induit une diminution d'environ 65% de la surface cellulaire et de 80% du volume de la cellule, principalement par déshydratation. Le volume de l'appareil de Golgi augmente pendant l'enkystement puis revient à son volume original dans les kystes matures. Ils décrivent également l'apparition précoce d'autolysosomes dans le cytoplasme des cellules en cours d'enkystement (contenant des mitochondries, des lipides et du glycogène) ainsi que l'excrétion du contenu de vacuoles nutritives. Ces phénomènes sont en adéquation avec leurs résultats montrant au cours de l'enkystement une diminution du poids sec, des protéines, des phospholipides et du glycogène (Bowers & Korn, 1969).

I.5.1.3. Mécanismes moléculaires

Au début des travaux de cette thèse, peu d'informations étaient disponibles concernant les mécanismes précis et les différentes molécules impliquées dans le phénomène d'enkystement des amibes libres. L'enkystement, la structure et la composition des parois

kystiques d'autres protozoaires, et en particulier *Giardia intestinalis* et *Entamoeba invadens*, était bien plus documentés (Jarroll & Sener, 2003). Ainsi, chez *Giardia intestinalis*, 3 protéines de la paroi kystique (CWP1-2-3) étaient identifiées. Ces 3 protéines étaient localisées aussi bien dans la paroi de kystes matures que dans les vésicules sécrétoires permettant le transport à la membrane des constituants pariétaux dans les cellules en cours d'enkystement. De plus, il avait été montré que les transcrits correspondant à ces protéines étaient surexprimés de 100 à 140 fois au cours de l'enkystement. Chez *Entamoeba*, une protéine majeure de paroi kystique, appelée Jacob, était décrite, cette protéine jouant un rôle dans la synthèse de chitine, constituant de la paroi.

Dans le cas d'*Acanthamoeba*, seule une protéine spécifique du kyste, la protéine CSP21, était décrite, mais sa fonction était inconnue (Chen *et al.*, 2004b; Hirukawa *et al.*, 1998).

Concernant les mécanismes de déclenchement de l'enkystement, une étude avait montré que la taurine ou les amines biogènes déclenchaient l'enkystement d'*A. culbertsoni* en se fixant sur un récepteur spécifique à la membrane des trophozoïtes, activant ainsi une adénylate cyclase, et provoquant une accumulation d'AMPc dans la cellule. Une protéine cytosolique était suspectée de se lier à l'AMPc mais la nature de cette protéine restait inconnue (Krishna-Murti & Shukla, 1984).

Différents travaux avaient également été menés afin d'étudier les variations de la composition protéique au cours de l'enkystement ainsi que la régulation de l'expression des gènes. Ainsi, Jantzen avait montré que la synthèse d'actine était complètement arrêtée pendant les derniers stades de l'enkystement. La quantité relative d'ARNm restait cependant constante, alors que la synthèse d'actine était réduite de 20 fois. Les auteurs concluaient que l'expression de l'actine pendant la différenciation était contrôlée par des mécanismes inhibant la traduction (Jantzen, 1981). Une autre étude montrait une diminution de la synthèse des protéines ribosomales au cours de l'enkystement, la régulation du nombre de ribosomes étant liée aux besoins protéiques de la cellule (Schulze & Jantzen, 1982). Dans une étude des variations du profil protéique d'*A. castellanii* au cours de l'enkystement, 67 protéines d'intérêt avaient été détectées : 51 protéines disparaissaient et 16 protéines étaient nouvellement synthétisées pendant l'enkystement. Une seule de ces protéines était identifiée, la subtilisin-like serine proteinase, cette protéine étant spécifique de la forme kystique (Park *et al.*, 2002).

Au cours des quatre dernières années, différents auteurs se sont également intéressés aux molécules liées à l'enkystement chez *Acanthamoeba*. Les travaux récents de Moon *et al.* ont ainsi permis d'identifier certaines protéines pouvant être impliquées dans les mécanismes d'enkystement d'*Acanthamoeba*. En utilisant la RT-PCR suivie d'une étude d'expression différentielle des gènes, les auteurs ont mis en évidence la surexpression de 6 gènes, dont un codant la protéine DEG14 (Moon *et al.*, 2007). Cette protéine possède 77% de similitude avec la subtilisin-like serine proteinase (SubSP) décrite par Hong comme étant une enzyme sécrétée et un facteur de virulence potentiel (Hong *et al.*, 2000). Dans une autre étude, Moon *et al.* ont effectué une analyse des EST (Expressed Sequence Tag) obtenus à partir de kystes d'*A. castellanii*, et ont identifié 23 gènes absents des EST issus de trophozoïtes. Ces EST codaient des protéines déjà décrites (comme la CSP 21 ou la SubSP), mais également de nouvelles protéines (l'énolase, la culline 4 ou la protéine autophagique 8) qui pourraient être liées aux processus d'enkystement (Moon *et al.*, 2008b).

Par la suite, ces mêmes auteurs se sont plus particulièrement intéressés au rôle joué par la SubSP dans l'enkystement. La plupart des études réalisées jusqu'à présent sur les enzymes protéolytiques d'*Acanthamoeba*, avait montré leur implication majeure dans la pathogénicité (Kim *et al.*, 2006; Lorenzo-Morales *et al.*, 2005; Sissons *et al.*, 2006). Dans leurs travaux, Moon *et al.* retrouvent une surexpression du gène codant la SubSP au cours de l'enkystement. Des études de localisation intra-cellulaire leur permettent également de montrer que la protéine est localisée dans les autophagosomes pendant l'enkystement, suggérant son implication dans les phénomènes de recyclage moléculaire survenant au cours de la différenciation (Moon *et al.*, 2008a).

L'implication des sérines protéases dans la différenciation d'*A. castellanii* a été récemment confirmée par des travaux montrant l'inhibition de l'enkystement par incubation des trophozoïtes avec un inhibiteur de sérines protéases, le PMSF, ou avec des siRNA (small interfering RNA) synthétisés en utilisant la séquence de la SubSP, de façon à se lier aux ARNm spécifiques et empêcher la synthèse de la protéine (Dudley *et al.*, 2008).

I.5.2. Désenkystement

Le désenkystement est le retour de l'amibe d'un statut de cellule en dormance vers un statut métaboliquement actif. Ce phénomène s'observe quand les conditions redeviennent favorables à la survie de la forme végétative. *In vitro*, le désenkystement est déclenché par l'apport de substances nutritives (hydrolysats protéiques, extraits bactériens...). Des études de désenkystement utilisant certaines fractions d'extraits d'*E. coli* ont montré que les effecteurs étaient stables à la chaleur, dialysables et de bas poids moléculaire. De plus, la plupart des fractions induisant un désenkystement étaient des fractions riches en acides aminés (Krishna-Murti & Shukla, 1984).

Les modifications morphologiques observées (Figure 9) sont un mouvement du protoplasme pour se localiser dans une zone du kyste, puis l'apparition d'une ouverture au niveau d'un ostiole de la paroi kystique va permettre l'émergence du trophozoïte à l'extérieur du kyste. Ce phénomène serait rendu possible par la sécrétion précoce par les kystes de 2 protéases, une cellulase et une chitinase (Krishna-Murti & Shukla, 1984).

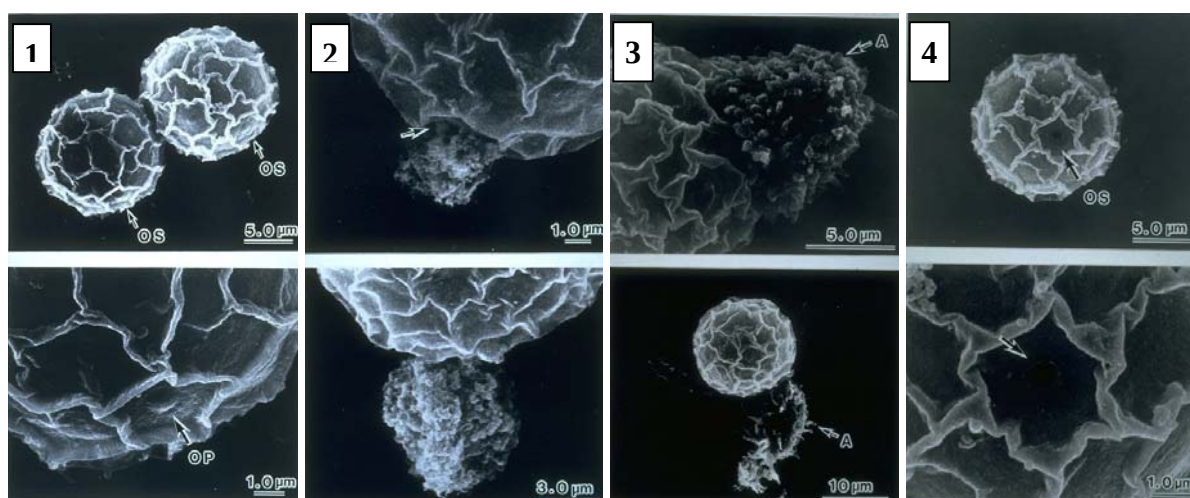


Figure 9 : Les différentes étapes du désenkystement d'*A. culbertsoni*. (1) Kyste mature ; (2) Pré-émergence ; (3) Emergence du trophozoïte ; (4) Kyste vide (Source : <http://protist.i.hosei.ac.jp/PDB/Images/Sarcodina/acanth/03.html>).

Les études d'inhibition des sérines protéases menées par Dudley ont montré que ces protéases jouent un rôle particulier dans la différenciation d'*A. castellanii*, aussi bien dans les

mécanismes d'enkystement que dans le déenkystement. En effet, le déenkystement est clairement inhibé quand les kystes sont incubés en milieu PYG en présence de PMSF ou de siRNA interférant avec les ARNm de la SubSP (Dudley *et al.*, 2008).

I.6. Ecologie

Acanthamoeba est une amibe libre ubiquitaire présente dans tous types d'environnements. L'augmentation récente du nombre de kératites, liée à l'utilisation des lentilles de contact, est probablement due à l'omniprésence de cet organisme dans l'environnement, largement facilitée par la résistance des kystes à la désinfection et la dessiccation.

I.6.1 Environnement naturel

Des amibes libres du genre *Acanthamoeba* ont été isolées de toutes sortes d'environnements naturels : les sols, les poussières, les eaux douces (lacs, rivières, canaux) et de mer mais elles ont été également retrouvées sur les végétaux et certains animaux (poissons, amphibiens, reptiles et mammifères) (Marciano-Cabral & Cabral, 2003).

En 1981, Jacquemin *et al.* étudient le réseau d'alimentation en eaux de la ville de Poitiers. Soixante seize prélèvements sont effectués aussi bien au niveau des eaux de sources, souterraines et de surface, qu'au niveau des stations de traitement et du réseau de distribution en eau potable. Ainsi, les milieux naturels et artificiels sont étudiés. A tous les niveaux de prélèvement, des amibes ont été retrouvées : les $\frac{3}{4}$ appartenant au genre *Acanthamoeba* et environ $\frac{1}{4}$ au genre *Hartmannella*. Seules deux souches du genre *Naegleria* ont été retrouvées (Jacquemin *et al.*, 1981).

Ces protozoaires peuvent aussi être présents dans l'air sous forme de kystes, ce qui permet une dissémination aérienne. Une étude menée au Nigeria a permis de démontrer la présence d'amibes aéroportées. En effet, pendant la saison sèche souffle, du nord vers le sud-ouest, un vent sec chargé de sable, l'Harmattan ; après exposition à ce vent pendant 30 minutes à 4 heures de géloses recouvertes d'*E. coli* tuées, les auteurs ont pu isoler 38 souches d'amibes libres (Lawande, 1983).

I.6.2. Environnement artificiel

Les nombreuses constructions humaines offrent de nouveaux biotopes de choix pour ces protozoaires. Les amibes y trouvent toutes les conditions de vie favorables à leur bon développement : température, humidité, nourriture et protection. Ainsi les piscines chauffées, spas, aquariums, humidificateurs, réseaux de distribution d'eau mais aussi les eaux de refroidissement des machines industrielles ou des réacteurs des centrales nucléaires, les systèmes de climatisation favorisent la multiplication de la flore de l'eau et particulièrement des amibes libres.

Riviera *et al.* ont ainsi retrouvé de nombreuses amibes libres dans les prélèvements effectués dans les piscines de Mexico City : 29 souches appartenant à 8 genres sont isolées, majoritairement des *Acanthamoeba*. Dans leur étude, aucune amibe n'a été retrouvée dans les eaux contenant plus de 5,31 mg.ml⁻¹ de chlore (Riviera *et al.*, 1993).

En 2005, une étude microbiologique des piscines et bains à remous d'Helsinki a montré la présence d'amibes libres dans 14 des 34 prélèvements effectués. Un seul prélèvement, effectué dans une piscine extérieure, était positif à *Acanthamoeba*. Les résultats montrent que 67% des échantillons contenant un taux de chlore libre inférieur aux normes en vigueur (> 0,5 mg.l⁻¹) étaient positifs, mais des amibes étaient également retrouvées dans l'échantillon contenant le taux de chlore libre le plus important (3,3 mg.l⁻¹). De plus, 71% des amibes étaient retrouvées dans des échantillons de qualité bactériologique correcte (Vesaluoma *et al.*, 1995).

De même, les spas, les eaux thermales et même les piscines thérapeutiques d'hôpitaux sont parfois contaminés par les amibes malgré une chloration appropriée. Plusieurs études ont montré la présence d'amibes libres, de genre *Naegleria* ou *Acanthamoeba*, parfois hautement pathogènes, dans ces eaux chaudes (De Jonckheere, 1982; Scaglia *et al.*, 1983; Sukthana *et al.*, 2005).

Les effluents ayant servi au refroidissement des réacteurs des centrales nucléaires sont également des milieux privilégiés pour la prolifération des amibes libres. Ces effluents sont particulièrement contrôlés afin d'éviter cette prolifération, surtout celle de *N. fowleri*.

Des amibes libres ont également été mises en évidence dans des systèmes d'air conditionné, généralement en association avec *Legionella pneumophila* (Lasheras *et al.*, 2006; Srikanth & Berk, 1993). Ainsi, Berk *et al.* ont démontré en 2006 que le risque de trouver des

amibes infectées était 16 fois plus élevé dans les tours aéroréfrigérantes que dans les environnements naturels aquatiques (Berk *et al.*, 2006).

Il y a encore quelques années, les eaux de consommation (eaux minérales, eaux du robinet ou eaux de source) n'échappaient pas à la colonisation par les amibes. En 1979, Dive *et al.* ont évalué la contamination amibienne dans les eaux d'alimentation sur 836 échantillons d'eau d'origines diverses. La moitié était contaminée quelle que soit l'origine de l'eau. Les amibes étaient retrouvées en plus grand nombre dans les eaux de source que dans les eaux minérales. Elles étaient également retrouvées en faible quantité dans les eaux gazeuses, malgré la présence de CO₂ qui leur est normalement néfaste (Dive *et al.*, 1979).

En 1981, une étude réalisée sur les trois eaux minérales les plus vendues au Mexique montrait la présence de quatre souches d'amibes libres : *N. gruberi*, *A. astronyxis* et *V. vahlkampfi* et *Bodomorpha minima*. La découverte de *Naegleria* et d'*Acanthamoeba*, deux genres potentiellement pathogènes, avait fortement inquiété la population (Rivera *et al.*, 1981).

De nos jours, des amibes de genre *Acanthamoeba* sont régulièrement isolées d'échantillons d'eau du robinet, en particulier au domicile de patients porteurs de lentilles de contact et pris en charge pour une kératite amibienne (Boost *et al.*, 2008; Kilvington *et al.*, 2004).

I.7. Risques sanitaires liés aux amibes libres de genre *Acanthamoeba*

I.7.1. Pathologies humaines

Les pathologies dues aux amibes libres, dont le nombre de cas décrits ne cesse d'augmenter et de se diversifier, sont observées dans toutes les régions du monde sans discrimination de sexe ou d'origine. L'augmentation du nombre de cas est certainement dû à plusieurs facteurs : mise en évidence de leur rôle pathogène dans certaines méningo-encéphalites jusqu'ici non expliquées, contact de plus en plus fréquent avec l'homme du fait de la multiplication d'habitats favorables à leur développement et augmentation des patients

immunodéprimés (séropositifs au VIH, sidéens, sous traitements immunosuppresseurs ou anti-rejets).

L'étude de leur répartition dans les différents continents permet d'observer que ce sont les Etats Unis qui sont les plus touchés puis viennent l'Australie et l'Europe. Cette prédominance s'explique probablement par la capacité de ces pays à diagnostiquer la maladie.

Les données regroupées dans le tableau 2 sont issues du 9^{ème} Meeting International sur la Biologie et la Pathologie des Amibes Libres, qui s'est tenu à Paris du 8 au 14 juillet 2001.

Tableau 2 : Nombre de cas d'atteintes du système nerveux dus aux amibes libres et estimation des cas de kératites amibiennes dans le monde, au 1er janvier 2001.

	EGA. à <i>Acanthamoeba</i>	Kératite (estimation)
Nombre de cas aux USA	84 (dont 50 cas de SIDA)	> 1000
Nombre de cas dans le reste du monde	40	> 350
Nombre total de cas	124	> 1350

I.7.1.1. Atteintes du système nerveux

En ce qui concerne les affections par *Acanthamoeba*, la symptomatologie est variée. Elles touchent électivement des sujets fragilisés avec des défenses immunitaires amoindries, inexistantes ou inefficaces (patients immunodéprimés ou atteints d'affections chroniques et débilitantes). Ces cas sont donc actuellement en augmentation parallèlement à la pandémie de SIDA et à l'utilisation de traitements immunosuppresseurs.

L'inoculation s'effectue soit à partir de l'appareil respiratoire par inhalation, soit à partir de la peau ou de l'œil après effraction. La diffusion est hématogène ou par ascension le long des voies nerveuses optiques ou olfactives. Les amibes sont alors responsables de la formation

dans le système nerveux central de granulomes tissulaires chroniques centrés par des kystes (Figure 10).

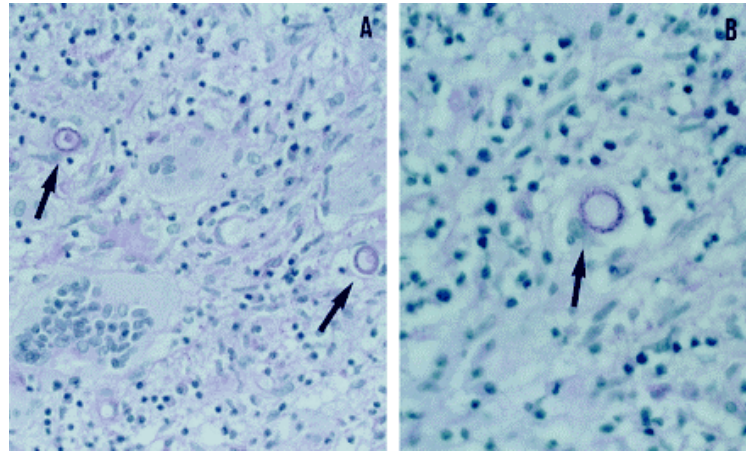


Figure 10 : Kystes d'*Acanthamoeba* dans une biopsie cérébrale (d'après (Seijo Martinez *et al.*, 2000)).

Après une incubation de quelques semaines à plusieurs mois, les symptômes retrouvés par ordre de fréquence décroissante sont : troubles du comportement, céphalées, fièvre, convulsions, raideur de la nuque, nausées, vomissements et plus rarement diplopie, anorexie, photophobie, troubles du sommeil et de l'audition. L'évolution s'effectue le plus souvent vers la mort en quelques semaines à quelques mois.

I.7.1.2. Kératites amibiennes et ulcères cornéens

Ce type de maladie est en forte augmentation dans les pays développés à cause du port des lentilles de contact. Contrairement aux atteintes du système nerveux central, qui affectent essentiellement des personnes immunodéprimées, les kératites amibiennes se développent également chez des personnes immunocompétentes. Les atteintes par *Acanthamoeba spp* sont actuellement les plus fréquentes des kératites amibiennes (80% des cas sont des porteurs de lentilles de contact, les autres cas étant liés à un traumatisme oculaire ou ne retrouvant pas de cause évidente).

Les kératites amibiennes sont aussi des affections des pays en voie de développement où la contamination par les kystes est aérienne avec les poussières et le phénomène de l'Harmattan (Lawande, 1983).

Elles sont dues aux trophozoïtes qui adhèrent et se développent sur l'épithélium cornéen. Après dépôt des amibes sur la cornée, l'incubation est brève. Les trophozoïtes sécrètent différentes protéases, en particulier collagénolytiques provoquant un abcès cornéen (Kim *et al.*, 2006). Les principaux symptômes associent rougeur, douleur, larmoiement, œdème palpébral, plus rarement photophobie. Un aspect très évocateur est l'apparition d'un abcès cornéen en forme d'anneau paracentral (Figure 11), avec un centre clair ou relativement clair. L'évolution se fait en surface et en profondeur, pouvant conduire à une névrite, une chorioretinite voire une perforation oculaire. Cette infection oculaire insidieuse est très douloureuse et invalidante pouvant aller jusqu'à la perte de l'œil.



Figure 11 : Aspect de l'abcès cornéen amibien (anneau cornéen). (Source : <http://www.snof.org>).

A la surface de la cornée, on trouve des kystes et des trophozoïtes. Ces kératites sont très difficiles à traiter, en particulier quand le diagnostic est tardif. C'est pour cela qu'il est fortement déconseillé de rincer ses lentilles de contact (surtout les souples) à l'eau du robinet ou de nager en piscine ou en rivière avec ses lentilles.

I.7.1.3. Atteintes cutanées

Elles surviennent à la suite d'une blessure, même minime, principalement chez des sujets immunodéprimés. Après une incubation silencieuse de durée variable, on retrouve soit un tableau d'ulcère cutané soit un tableau pseudo-tumoral. L'évolution peut se poursuivre pendant de longs mois, par l'apparition de lésions satellites ou à distance (diffusion hématogène), puis par atteinte métastatique du cerveau (EGA).

I.7.2. Rôle indirect dans certaines maladies

Les amibes libres se nourrissent de bactéries. Mais plusieurs auteurs ont déjà montré que certains pathogènes survivent à la phagocytose : *Legionella pneumophila*, *Helicobacter pylori*, *Coxiella burnetti*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Cryptococcus neoformans*, certaines mycobactéries...(Greub & Raoult, 2004).

Dans le cas des *Legionella*, elles jouent un rôle d'amplificateur et de vecteur. En effet, les amibes libres phagocytent ces bactéries qui ne vont pas être détruites dans le phagosome. *Legionella*, au contraire, se multiplie dans les amibes comme un endosymbiote. Les amibes étant adaptées à des conditions environnementales hostiles (dessiccation, températures élevées, désinfectants), elles offrent aux *Legionella* un lieu de survie et de croissance très favorable (Greub & Raoult, 2004).

Segal et Shuman ont identifié, en 1999, des gènes de *L. pneumophila* permettant sa croissance dans *A. castellanii*. Il s'agit des mêmes gènes que ceux permettant sa multiplication dans les macrophages humains (Segal & Shuman, 1999).

C'est ce rôle de vecteur et de protecteur de microorganismes pathogènes qui peut présenter un risque sanitaire notamment en milieu hospitalier ou thermal.

Chapitre II. Relations entre amibes libres et légionelles

II.1. *Legionella*

Les légionelles sont des bacilles Gram négatifs aérobies strictes responsables d'une maladie respiratoire humaine potentiellement mortelle : la maladie des légionnaires.

II.1.1. Historique

La découverte des légionelles remonte au mois de juillet 1976, lorsqu'une épidémie de pneumonie aiguë frappa un groupe de vétérans de l'American Legion, réunis pour leur congrès annuel à Philadelphie. Sur les 4400 participants, 182 personnes tombèrent grièvement malades et parmi celles-ci, 29 décédèrent (taux de létalité 16%) (Fraser *et al.*, 1977).

L'agent causal, un bacille Gram négatif fut isolé environ 6 mois plus tard. Le genre *Legionella* sera créé en 1979, et cette bactérie sera dénommée *Legionella pneumophila* (Brenner *et al.*, 1979). C'est par l'intermédiaire du système de climatisation de l'un des hôtels habités par les participants au congrès que l'infection s'était propagée.

L'isolement de la bactérie a rendu possible la mise au point d'un diagnostic sérologique. L'étude des sérums provenant d'épidémies antérieures de pneumonies non expliquées a permis de montrer la responsabilité de *L. pneumophila*.

Rétrospectivement, *L. pneumophila* fut également identifiée comme agent responsable d'une épidémie qui s'était déclarée en 1968 à Pontiac (Michigan). L'infection, qui n'avait causé aucun décès, s'était manifestée par une forte fièvre (d'où le nom de fièvre de Pontiac) accompagnée de myalgies et symptômes neurologiques (Glick *et al.*, 1978). L'analyse de diverses sérothèques a permis de confirmer d'autres épisodes épidémiques imputables aux légionelles, dont le plus ancien remontait à 1947 (McDade *et al.*, 1979).

II.1.2. Taxonomie

Après les travaux de McDade (McDade *et al.*, 1979), ayant permis l'isolement de *L. pneumophila*, et les techniques d'hybridation de l'ADN mises en œuvre par Brenner (Brenner *et al.*, 1979), une nouvelle famille est créée, celle de *Legionellaceae*.

Le genre *Legionella* et la famille des *Legionellaceae* forment un groupe cohérent placé dans l'ordre des *Legionellales* (classe des *Gammaproteobacteria*, phylum des *Proteobacteria*, domaine des *Eubacteria*). La famille des *Legionellaceae* comprend pour le moment le seul genre *Legionella* et 49 espèces sont décrites.

La structure antigénique (lipopolysaccharide, protéine majeure de membrane externe, autres antigènes protéiques) permet de reconnaître 64 sérogroupes parmi le genre *Legionella*, qui peuvent être divisés en sous-types. Au moins 15 sérogroupes de *L. pneumophila* ont été décrits dont certains semblent particulièrement virulents.

L. pneumophila est responsable de la majorité des maladies humaines (Tableau 3). Selon les régions, entre 70% et 90% des cas de légionellose sont dus au séro groupe 1. D'autres espèces pathogènes, mais sensiblement plus rares sont : *L. anisa*, *L. bozemanii*, *L. cincinnatiensis*, *L. dumoffii*, *L. feeleeii*, *L. gormanii*, *L. jordanis*, *L. longbeachae*, *L. micdadei* (Pittsburgh Pneumonia Agent), *L. oakridgensis*, *L. parisiensis*, *L. tucsonensis*...

Tableau 3 : Evolution du nombre de souches d'origine cliniques isolées en France depuis 1998 et répartition des isollements de légionelles par espèces et par sérogroupes (Source : Bilan annuel d'activité 2006 du CNR, Lyon, <http://dm3.univ-lyon1.fr/>).

	Nombre d'isollements								
	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006
<i>L. pneumophila</i>	112	100	133	150	179	179	227	272	220
Sérogroupe 1	95	85	119	144	167	172	222	263	188
Sérogroupe 2	2	2		1	1			1	
Sérogroupe 3	4	7	4	1	3	2		1	4
Sérogroupe 4	1								
Sérogroupe 5			1				2	1	1
Sérogroupe 6	3	1			2	2	3	2	2
Sérogroupe 7			1						1
Sérogroupe 8						2		2	1
Sérogroupe 10									1
Sérogroupe indéterminé	7	5	8	4	3	1		2	2
<i>Legionella non pneumophila</i>	0	5	2	0	0	2	0	4	2
<i>L. dumoffii</i>			1						
<i>L. micdadei</i>									1
<i>L. longbeachae</i>		4				1	2	1	1
<i>L. anisa</i>		1			2				
<i>L. tucsonensis</i>					1				
<i>L. gormanii</i>						1			
<i>L. bozemanii</i>								1	
<i>L. feeleyi</i>								1	
<i>L. ciniciensis</i>								1	
Total	112	105	135	150	179	181	227	276	222

II.1.3. Caractères bactériologiques

II.1.3.1. Morphologie et structure

Les légionelles sont des petits bacilles Gram négatifs de 0,3 à 0,9 μm de diamètre sur 2 à 3 μm de long, pouvant donner des formes filamenteuses (de 20 μm ou plus) après culture *in vitro* (Figure 12). Ces bactéries sont aérobies strictes, non sporulées, non capsulées, à métabolisme non fermentatif. L'activité catalasique est positive (réaction parfois faiblement positive), elles ne réduisent pas les nitrates et ne synthétisent pas d'uréase. La plupart des espèces sont mobiles grâce à la présence d'un ou de plusieurs flagelles polaires, subpolaires ou latéraux.

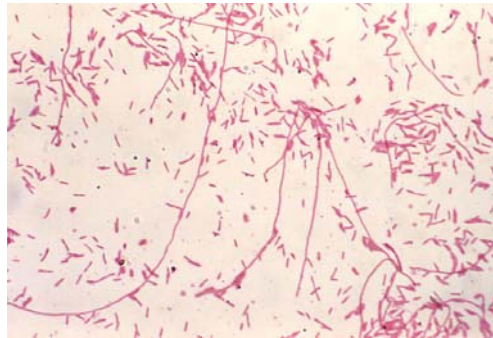


Figure 12 : *L. pneumophila* en coloration de Gram. (Source = http://de.wikipedia.org/wiki/Bild:LegionellaPneumophila_Gram.jpg).

La paroi de *Legionella* est caractérisée par la présence de peptidoglycane de structure proche de celle des autres bacilles Gram négatif et d'une membrane externe dont l'analyse électrophorétique (SDS-PAGE) révèle chez toutes les souches de *L. pneumophila* la présence d'une protéine, dite majeure, ayant un poids moléculaire de 29 kDa. Cette protéine majeure a été identifiée en 1985 et s'est révélée être une porine (Gabay *et al.*, 1985).

Les bactéries de genre *Legionella* diffèrent des autres bactéries Gram négatif par leur composition en acides gras ramifiés cellulaires. Ces acides gras ramifiés sont fréquents chez les bacilles Gram négatif mais toujours en faible quantité. Chez *Legionella*, ils arrivent à constituer jusqu'à 90% de l'ensemble des acides gras (Lambert & Moss, 1989).

L'analyse quantitative des acides gras a ainsi été utilisée pour la caractérisation du genre *Legionella*, puis l'analyse des profils des acides gras estérifiés en chromatographie phase

gazeuse a montré son intérêt pour différencier les espèces de *Legionella*, chaque espèce ayant un profil caractéristique (Diogo *et al.*, 1999).

II.1.3.2. Caractères métaboliques et facteurs de croissance

Les acides aminés ont un rôle indispensable dans le métabolisme des *Legionella* lors de leur croissance. Parmi les plus importants, on peut citer l'arginine, l'acide L-glutamique, source d'énergie et la L-cystéine. L'exigence en L-cystéine, caractéristique des *Legionella*, est un élément fondamental de leur identification. Cet acide aminé est d'ailleurs indispensable à leur culture.

Pour leur croissance dans les milieux de culture, les *Legionella* ont des exigences en fer particulièrement élevées (supérieures à 10 μM), sous forme de pyrophosphate ferrique, de citrate ferrique ou de chlorure ferrique.

II.1.3.3. Caractères cultureux

Les *Legionella* sont des bactéries aérobies strictes. Elles cultivent en milieu légèrement acide, pH 6,9 mais tolèrent des pH inférieurs à 6,5 et même à 5,5 ; ces pH maintiendraient la cystéine nécessaire à leur culture à l'état réduit. La température optimale est de 35°C mais *L. pneumophila* peut se développer à 42°C.

Le milieu gélosé qui convient à la culture des *Legionella* est le milieu BYCE (Buffered Charcoal Yeast Extract) agar à base d'extrait de levure (source de protéines) et de charbon, supplémenté en L-cystéine, en pyrophosphate ferrique et en tampon ACES. Sur ce milieu la croissance est visible en 3 à 7 jours à partir de produits pathologiques, parfois plus tard. Les colonies sont grises, muqueuses, polymorphes (Figure 13) et présentent un aspect dit en « verre fritté » lorsqu'elles sont observées à la loupe binoculaire.

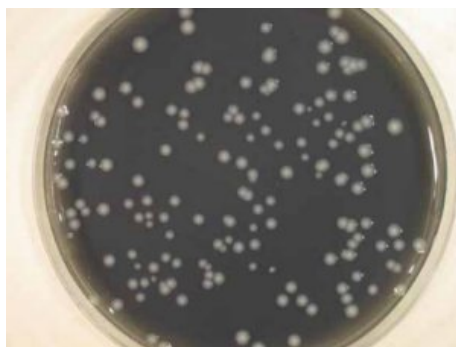


Figure 13 : Aspect des colonies de *L. pneumophila* sur gélose BCYE.

La culture de certaines légionelles est difficile : *L. lytica* ainsi que les souches de LLAP (*Legionella*-Like Amoebal Pathogens) n'ont pas été cultivées *in vitro*.

Il a été également démontré que les légionelles pouvaient être présentes dans un état viable mais non cultivable. Elles ne retrouvent alors leur caractère cultivable que si la culture est effectuée en présence de protozoaires (Steinert *et al.*, 1997). Cette observation a conduit à mettre en œuvre des techniques de co-cultures légionelles/protozoaires.

II.1.3.4. Identification

Les méthodes sérologiques utilisant des immun-sérums sont largement utilisées par les laboratoires pour l'identification des espèces de *Legionella* et des différents sérogroupes (immunofluorescence directe, agglutination de particules de latex). L'existence de réactions croisées limite cependant la spécificité de cette identification qui reste utile pour les espèces les plus fréquemment rencontrées.

Des techniques d'identification plus complexes ont été décrites, en particulier celles basées sur la composition cellulaire en acides gras et ubiquinones. Une discrimination plus importante a été obtenue en étudiant les profils des acides gras hydroxylés par chromatographie en phase gazeuse (Diogo *et al.*, 1999), mais ces techniques restent d'interprétation difficile.

Les analyses génotypiques sont largement utilisées pour l'identification des micro-organismes de classement difficile. Ces techniques ont l'avantage de ne pas être affectées par les conditions de culture et, contrairement aux techniques chromatographiques, ne sont pas

dépendantes des conditions d'extraction et chromatographiques. La plupart de ces techniques génotypiques utilisent le séquençage de la sous-unité 16S des ARN ribosomiaux. Pour les espèces du genre *Legionella*, l'étude de cette séquence a été rapportée (Hookey *et al.*, 1995), mais de nombreux auteurs utilisent le séquençage du gène *mip*, codant pour une immunophiline de la classe des FK506 binding protein, protéine de membrane externe impliquée dans la survie de la bactérie dans les phagosomes (Ratcliff *et al.*, 1998).

Les techniques de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) et de ribotypage ont également montré leur intérêt dans l'identification des espèces de *Legionella*, en permettant l'obtention de profils spécifiques d'espèces (Salloum *et al.*, 2002). Plus récemment, la méthode de SBT (Sequence-Based Typing) s'est révélée particulièrement efficace pour le typage des différents isolats de *L. pneumophila*. Un protocole commun a été proposé par les membres du EWGLI (European Working Group for Legionella Infections) utilisant la séquence partielle de 7 gènes (Ratzow *et al.*, 2007).

II.1.4. Ecologie

Les légionelles sont des germes de l'environnement (saprophytes ubiquitaires) qui se développent dans les milieux aquatiques naturels et les niches hydriques artificielles : eau courante, eau stagnante, eaux d'évacuation, eaux thermales, conduites d'eau potable, robinets, pommes des douches, dispositifs de refroidissement à eau, systèmes de climatisation, bains bouillonnants (jacuzzi, spa), circuits avec recyclage d'eau, installations industrielles...

En résumé, on peut affirmer que dans les milieux hydriques naturels les légionelles sont présentes un peu partout, mais généralement en faible quantité ; dans les systèmes humides créés par l'homme en revanche, elles peuvent trouver des conditions très favorables à leur prolifération.

Le premier facteur affectant l'évolution des *Legionella* dans l'eau est la température. Ces bactéries se multiplient entre 20 et 42°C, et de façon optimale entre 30 et 40°C, à un pH neutre ou légèrement acide. Les *Legionella* sont donc présentes surtout dans les eaux tièdes, en particulier les systèmes de conditionnement d'air, les tours aéroréfrigérantes et les réseaux d'eau chaude sanitaire.

La première incrimination des systèmes de climatisation date de 1968 avec l'épidémie de Pontiac au Michigan (U.S.A.). Depuis, les systèmes de climatisation ont été incriminés de nombreuses fois, notamment lors de la célèbre épidémie de légionellose de Philadelphie (U.S.A.), en 1976. Depuis, régulièrement, des épidémies surviennent avec comme source de contamination les tours aéroréfrigérantes de systèmes de climatisation (Brown *et al.*, 1999; Garcia-Fulgueiras *et al.*, 2003; Kirrage *et al.*, 2007; Sabria *et al.*, 2006).

Legionella est également isolée fréquemment dans les systèmes de distribution d'eau chaude des collectivités, tels qu'hôpitaux (Garcia-Nunez *et al.*, 2008), hôtels (Erdogan & Arslan, 2007) et immeubles collectifs (Bornstein *et al.*, 1986).

Parallèlement à leur succès, les spas collectifs sont également incriminés dans de nombreuses épidémies. De par leur volume, leurs conditions d'utilisation et la température de l'eau, les spas constituent, en effet, des milieux particulièrement favorables à la prolifération de microorganismes tels que *L. pneumophila*, mais également des amibes libres (Foster *et al.*, 2006).

Pourtant, à ce jour, aucune étude n'a pu montrer que les *Legionella* étaient en mesure de se multiplier par elles même dans l'eau. L'hypothèse de la multiplication extra-cellulaire des *Legionella* dans les biofilms est évoquée mais dans la plupart des expérimentations, la multiplication des bactéries ne s'effectue qu'en présence de protozoaires (Declerck *et al.*, 2007b; Leclerc, 2006).

Le fait que les amibes libres et d'autres protozoaires soient des hôtes naturels et des « amplificateurs » de *Legionella* est une réalité largement décrite (Greub & Raoult, 2004). Les amibes libres les plus fréquemment impliquées sont les *Acanthamoeba*, les *Naegleria*, les *Hartmannella* et les *Tetrahymena*. Elles sont présentes dans les mêmes niches écologiques que les légionelles, en particulier les eaux réchauffées. Ainsi, la présence commune des protozoaires et des *Legionella* dans les milieux hydriques, la capacité reconnue des amibes à ingérer ces bactéries et à favoriser leur croissance intracellulaire, la difficulté voire l'impossibilité des *Legionella* à se multiplier de façon extracellulaire sont autant d'arguments pour faire des protozoaires les seuls pourvoyeurs de *Legionella* (Leclerc, 2006).

II.1.5. Cycle de développement

Le cycle de *L. pneumophila* est composé de 2 phases : répllicative et transmissive (Figure 14). Les bactéries libres sous leur forme transmissive sont phagocytées et s'installent dans les phagosomes échappant à la fusion lysosomale (Figure 14-1). Quand les conditions sont favorables à la réplication, les caractères de transmission sont réprimés et la bactérie intracellulaire se multiplie (Figure 14-2). Quand les nutriments deviennent insuffisants, les bactéries entrent dans leur phase transmissive, réprimant la multiplication et exprimant des caractères leur permettant d'échapper à la cellule hôte, de survivre sous forme planctonique et de réinfecter un nouveau phagocyte (macrophage ou amibe) pour rétablir une phase multiplicative (Figure 14-3). Après une période prolongée, la bactérie peut continuer à se développer en une forme mature intracellulaire, ou MIF, résistante au stress environnemental (Figure 14-4). Les bactéries sont libérées par lyse de la cellule hôte (Figure 14-5) ; dans l'attente de rencontrer un nouveau phagocyte, les bactéries peuvent alors s'établir dans les biofilms (Figure 14-6 et 14-7) (Molofsky & Swanson, 2004).

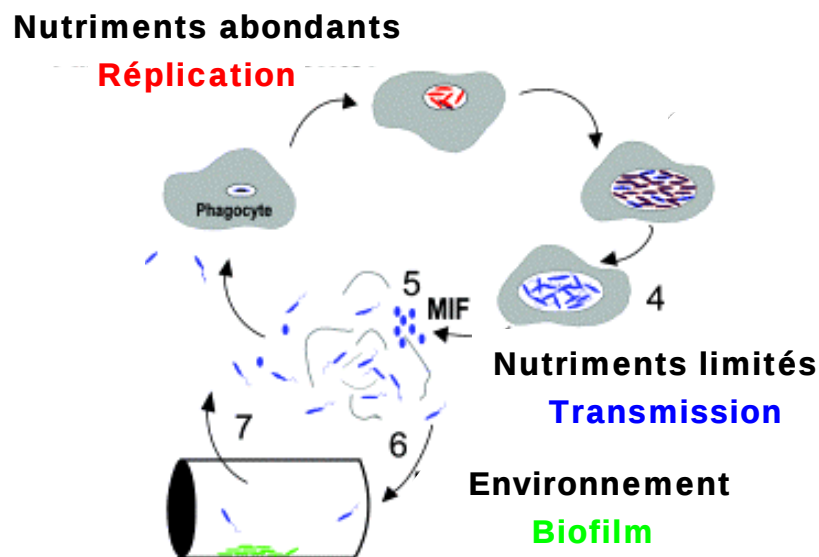


Figure 14 : Cycle de vie biphasique de *L. pneumophila* (d'après Molofski et Swanson, 2004).

Selon Molofski et Swanson, les principaux caractères exprimés par les bactéries en phase transmissive sont :

- les facteurs permettant l'évasion du phagocyte
- le flagelle permettant la mobilité
- la résistance au stress (chaleur, UV, pression osmotique, déplétion nutritive)
- les facteurs permettant d'empêcher la fusion des lysosomes avec le phagosome.

Aucun de ces caractères n'est exprimé pendant la phase répllicative et tous sont impliqués dans la dissémination de *L. pneumophila* et sa transmission à un autre phagocyte.

L. pneumophila est également capable d'entrer dans un état viable mais non cultivable (VBNC). Cette perte de cultivabilité est la conséquence d'une déplétion nutritive ou toute autre condition stressante pour la bactérie (température élevée, biocides...). Cette forme permet à la bactérie de survivre dans l'environnement en l'absence de cellules hôtes. Le retour à une forme cultivable est alors permis par passage dans les amibes libres, les bactéries « ressuscitées » ayant conservé leur virulence (Steinert *et al.*, 1997).

II.1.6. Facteurs de virulence

Pour établir une infection intracellulaire avec succès, les bactéries pathogènes doivent perturber les échanges métaboliques et échapper à la réponse immunitaire de la cellule infectée. Elles font appel à des appareils de sécrétion, des composants macromoléculaires qui sont localisés à la surface de la bactérie et dont certains sont sécrétés dans la cellule cible et agissent comme effecteurs.

Les systèmes de sécrétion de *L. pneumophila* ont été largement étudiés à cause du rôle essentiel de la sécrétion protéique dans l'infektivité de cette bactérie. Deux systèmes de sécrétion principaux ont été décrits comme impliqués dans l'infektivité de *L. pneumophila* : le système de sécrétion de type II PilD dépendant et le système de sécrétion de type IV codé par les gènes *dot/icm* (De Buck *et al.*, 2007).

L'appareil de sécrétion de type II a été décrit suite à la découverte de la prépiline peptidase PilD. Cette protéine PilD est impliquée dans la biogénèse et l'assemblage des pili de type IV permettant l'adhésion à l'hôte cellulaire et aux biofilms. Attachée à la membrane cytoplasmique, elle est, de plus, directement engagée dans le développement de l'appareil de sécrétion de type II par mobilisation et assemblage de pseudopilines. L'analyse des mutants

knock out *pilD* a montré que cette protéine est nécessaire à la croissance intracellulaire des *Legionella* dans les amibes comme dans les macrophages ((De Buck *et al.*, 2007).

Le système de sécrétion de type IV est de beaucoup le plus important du point de vue de la virulence. Il est codé par les gènes *dot* (defective organelle trafficking) ou *icm* (intracellular multiplication), au nombre de 25 et situés en deux régions séparées du chromosome. La plupart de ces gènes codent des protéines membranaires, composants structuraux du système de sécrétion. Les gènes *icmS*, *-R*, *-Q* et *-W* codent des protéines cytoplasmiques qui auraient des propriétés de protéines chaperonnes jouant un rôle dans le transfert d'effecteurs *via* le système de sécrétion. Certains de ces effecteurs comme RalF, LidA, SidC, LepA et LepB ont été identifiés comme étant exportés dans la cellule hôte (Abu-Zant *et al.*, 2005).

Ce système de sécrétion est absolument indispensable au processus infectieux de *L. pneumophila*. Il n'est pas requis pour la croissance cellulaire en tant que telle mais son rôle est crucial pour la formation d'un phagosome capable d'échapper à la destruction lysosomale et d'assurer la multiplication intracellulaire.

II.1.7. Pouvoir pathogène de *L. pneumophila*

La transmission de *L. pneumophila* est aérienne, par inhalation d'eau contaminée diffusée en aérosol. Sa virulence est liée à sa capacité à se multiplier dans les monocytes, les macrophages et les cellules épithéliales alvéolaires de type I et II.

II.1.7.1. La maladie des Légionnaires

Les individus de plus de 50 ans sont les plus sensibles à cette maladie, particulièrement s'ils sont de grands fumeurs, alcooliques, atteints par une maladie chronique (diabète, maladie cardiaque) ou s'ils sont immunodéprimés (cancer, hémopathie, traitements immuno-suppresseurs, corticoïdes).

La maladie se traduit par une pneumonie aiguë de gravité variable, parfois mortelle (mortalité estimée entre 7 et 10%). La durée d'incubation varie de 2 à 10 jours, puis les signes cliniques s'installent sur 2 à 3 jours et associent une asthénie, une fièvre, des céphalées, des myalgies, une toux non productive. Des troubles digestifs et neurologiques peuvent être

associés, et certaines complications graves peuvent survenir (insuffisance respiratoire, insuffisance rénale aiguë, rhabdomyolyse...). La rapidité de mise en place et l'efficacité d'un traitement thérapeutique joue un rôle crucial dans le pronostic de cette affection (Jarraud, 2007).

En France, depuis 1987 (décret n°87-1012 du 11 décembre 1987), la surveillance de la légionellose repose sur le système de déclaration obligatoire (D.O.). Depuis le renforcement de la surveillance et la mise en place d'un nouveau test de diagnostic rapide urinaire en 1997, le nombre de cas diagnostiqués et déclarés est passé de 80 en 1996 à 1428 en 2007 (Figure 15).

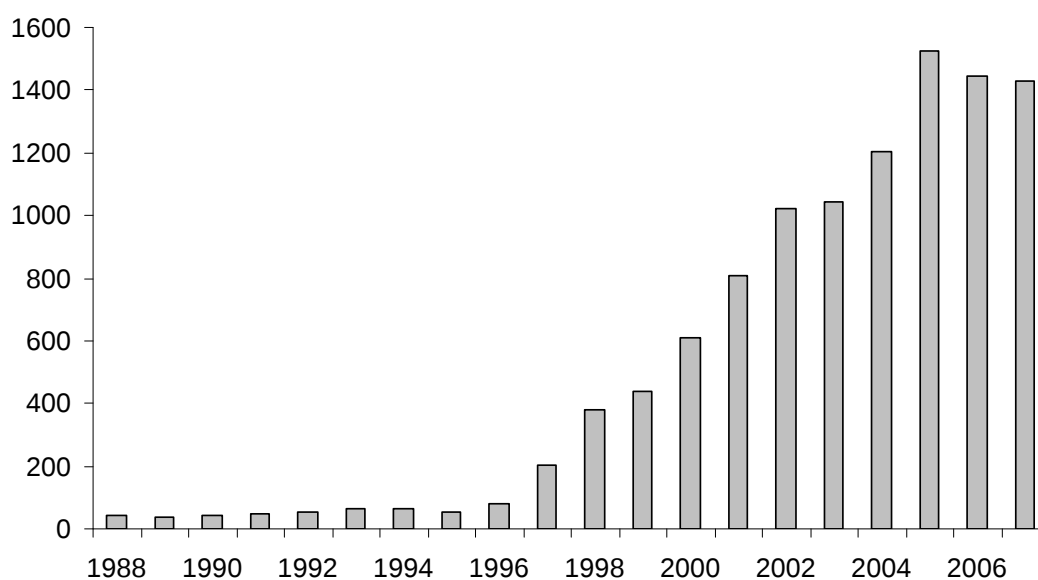


Figure 15 : Evolution du nombre de cas de légionellose survenus en France, 1988-2007. (Source : www.invs.sante.fr).

II.1.7.2. La fièvre de Pontiac

D'un point de vue clinique, la fièvre de Pontiac ne peut être distinguée des divers syndromes viraux. Cette maladie se présente sous la forme d'un syndrome pseudo-grippal, avec un accès brutal de fièvre, des céphalées, des étourdissements, des douleurs musculaires. Il n'apparaît pas de pneumonie.

Une guérison spontanée survient en 2 à 5 jours. Il n'a pas été rapporté de décès suite à une fièvre de Pontiac.

II.2. Interactions entre amibes libres et légionelles

L'aspect le plus remarquable de la survie et de la persistance de *Legionella* dans le milieu aquatique est sa croissance intracellulaire dans les protozoaires. Les *Legionella* semblent en effet incapables d'une multiplication extracellulaire dans l'environnement aqueux (Abu Kwaik *et al.*, 1998b).

Les protozoaires représenteraient le réservoir naturel de nombreux microorganismes et en particulier des *Legionella* dans l'environnement, comme de multiples exemples le laissent penser (Atlas, 1999). Il est admis que de nombreux protozoaires de l'eau sont les hôtes naturels des *Legionella* qui peuvent s'y multiplier activement après leur ingestion par phagocytose.

Les amibes ont donc un rôle majeur dans l'épidémiologie de la légionellose, puisqu'elles sont reconnues capables de protéger les bactéries internalisées vis-à-vis des désinfectants ou des conditions environnementales difficiles et qu'elles permettent également à la bactérie d'acquérir certaines caractéristiques, comme une résistance aux antibiotiques, aux biocides, à la chaleur, et une augmentation de son infectivité (Greub & Raoult, 2004).

II.2.1. Les amibes libres impliquées

Le fait que des amibes libres pouvaient être infectées par des bactéries Gram négatifs a été observé par Nägler dès 1910 (Rowbotham, 1986). En 1980, Rowbotham a été le premier à montrer que les amibes des genres *Acanthamoeba* (*A. castellanii*, *A. polyphaga*) et *Naegleria* pouvaient être infectées par *L. pneumophila*, étude initiant de nombreuses investigations de cette relation (Rowbotham, 1980). Depuis, des études confirment la présence d'amibes infectées par des légionelles dans des réseaux d'eau hospitaliers ou des échantillons d'eaux incriminés dans des épidémies. Parmi celles-ci, les principaux genres retrouvés sont *Hartmannella*, *Acanthamoeba* et *Naegleria* (Philippe *et al.*, 2006).

II.2.2. Mécanismes

II.2.2.1. Attachement et phagocytose

Le pouvoir de coloniser les protozoaires et une grande variété de cellules animales (cellules phagocytaires ou non) suggère chez la bactérie l'existence de mécanismes d'attachement diversifiés.

En 1998, Abu Kwaik identifie certaines molécules impliquées dans l'interaction entre *H. vermiformis* et *L. pneumophila*. Il suggère que l'interaction initiale entre *L. pneumophila* et le protozoaire se ferait entre un pili bactérien, le pili de type IV ou CAP, et une lectine amibienne de 170 kDa. Cette interaction est inhibée en présence de galactose/N-acétylgalactosamine (Abu Kwaik *et al.*, 1998a).

La même année, Harb *et al.* ajoutent un degré de complexité à ces interactions en montrant que les mécanismes d'attachement sont différents selon l'espèce amibienne étudiée. En effet, ils retrouvent l'inhibition importante de l'attachement de *L. pneumophila* à *H. vermiformis* en présence de galactose/N-acétylgalactosamine, mais ces sucres sont sans effet sur l'attachement de *L. pneumophila* à *A. polyphaga*. Ils observent également que certains mutant de *L. pneumophila* n'ont pas la capacité de s'attacher à *A. polyphaga* alors qu'ils peuvent interagir avec *H. vermiformis*. Ces observations suggèrent la présence de récepteurs différents impliqués dans l'attachement de *L. pneumophila* sur ces deux amibes (Harb *et al.*, 1998). En 2007, Declerck *et al.* montrent que *L. pneumophila* possède une forte affinité pour le récepteur liant le mannose d'*A. castellanii*, alors que son affinité est grande pour le récepteur liant le N-acétyl-D-galactosamine de *N. lovaniensis* (Declerck *et al.*, 2007a).

Ces 2 dernières études montrent la complexité des interactions entre amibes et légionelles et suggèrent l'existence d'autres récepteurs impliqués chez d'autres amibes (14 espèces d'amibes étant connues pour servir d'hôte à *Legionella*).

L'équipe d'Abu Kwaik décrit également en 1998 avec précision les mécanismes de transduction du signal dans l'amibe après la liaison avec la bactérie. L'attachement de *L. pneumophila* au récepteur d'*H. vermiformis* déclenche un signal de transduction dans l'amibe qui se manifeste par une déphosphorylation de la tyrosine de ce même récepteur et d'autres protéines. Parmi ces protéines, on retrouve des protéines du cytosquelette amibien, la paxilline, la vinculline et la pp125^{FAK}, ce qui perturbe sa structure et facilite certainement l'entrée par endocytose de *L. pneumophila* (Venkataraman *et al.*, 1998). Dans cette étude,

l'internalisation de la bactérie se fait majoritairement par endocytose, avec formation d'une invagination de la membrane plasmique (Figure 16, c et d).

Un autre mode de phagocytose a été décrit chez *H. vermiformis* et *A. castellanii*, l'enroulement du cytoplasme autour de la bactérie ou « coiling phagocytosis » (Figure 16, a et b) (Bozue & Johnson, 1996; Venkataraman *et al.*, 1998).

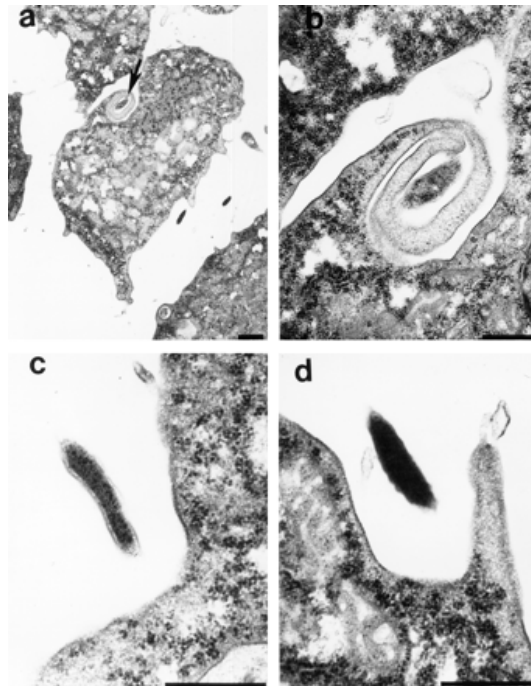


Figure 16 : Phagocytose de *L. pneumophila* par *H. vermiformis* vue par microscopie électronique en transmission (d'après Venkataraman *et al.*, 1998). (a) : phagocytose de *L. pneumophila* par la structure enroulée de *H. vermiformis* (flèche noire), agrandi en (b) ; (c) et (d) : différents stades d'invagination de la membrane plasmique d'*H. vermiformis* pour internaliser *L. pneumophila*. Barre = 1 μm (a), 0.5 μm (b, c et d).

II.2.2.2. Modification du phagosome et évitement de la protéolyse

Dans les premières minutes suivant son internalisation dans la cellule hôte, amibe ou macrophage, le phagosome contenant la bactérie est entouré d'organelles cytoplasmiques, vésicules, mitochondries et réticulum endoplasmique (RER) (Molmeret *et al.*, 2004). Il ne fusionne pas immédiatement avec le compartiment lysosomal, comme cela a été décrit depuis plus de 20 ans (Horwitz, 1983).

Les premières descriptions de la mobilisation du RER par les bactéries internalisées ont été faites après l'étude de la phagocytose de *L. pneumophila* par des cellules phagocytaires humaines (Swanson & Isberg, 1995). En 1996, Abu Kwaik décrit un mécanisme identique lors de la phagocytose de *L. pneumophila* par *H. vermiformis*. Il conclut que la capacité des légionelles à survivre et à se répliquer dans les amibes est dépendante de sa capacité à mobiliser le RER (Abu Kwaik, 1996).

Ce mécanisme sera décrit plus précisément en 2001, par Tilney *et al.* Ils étudient alors les mécanismes de la phagocytose des légionelles par des monocytes humains et suggèrent l'existence de fusions ou d'échanges de bicouches lipidiques entre des vésicules de RER et le phagosome, la membrane du phagosome devenant aussi fine que le RER et en acquérant les caractéristiques. Ils décrivent un mécanisme en 4 étapes pour expliquer l'installation de la bactérie dans son phagosome (Tilney *et al.*, 2001). Durant la première étape, *L. pneumophila* inhibe la fusion des lysosomes avec le phagosome dans lequel elle est installée. Ce processus requiert le système de sécrétion de type IV Dot/Icm. La deuxième étape voit l'attachement de vésicules du RER à la membrane du phagosome. Cette étape est également médiée par le système de sécrétion Dot/Icm, plus précisément par des protéines injectées dans le phagosome par *L. pneumophila*. Pendant la troisième phase, la membrane du phagosome devient plus fine puis la quatrième phase est caractérisée par l'attachement de ribosomes à la surface du nouveau phagosome. Les résultats de cette étude suggèrent que *L. pneumophila*, en induisant une modification de la membrane du phagosome, pour mimer la membrane du réticulum endoplasmique, modifie un processus cellulaire normal afin de se protéger de la protéolyse.

II.2.2.3. Réplication intracellulaire

Une fois dans ce phagosome modifié, la réplication bactérienne commence. *L. pneumophila*, jusqu'alors sous sa forme transmissive, se différencie sous sa forme répllicative, tolérante à l'acidité, n'exprimant plus certains facteurs de virulence liés au système Dot/Icm, et en particulier les facteurs bloquant la fusion avec le compartiment lysosomal.

Ainsi, la multiplication intracellulaire de *L. pneumophila* est liée, non pas à une inhibition de la fusion phagosome/lysosome, mais à un retardement de cette fusion permettant à la bactérie de s'adapter à l'environnement lysosomal. Swanson et Hammer ont en effet montré que, 18 heures après l'infection, 70% des phagosomes contiennent la glycoprotéine de

membrane lysosomale LAMP-1, et 50% contiennent de la cathepsine D, une enzyme lysosomale. Selon ces auteurs, la réplication bactérienne s'effectue dans cet environnement difficile mais riche, jusqu'à ce que les bactéries aient épuisé les réserves locales d'acides aminés. A ce moment, les bactéries expriment des facteurs de virulence leur permettant de s'échapper de leur hôte afin d'infecter un nouveau phagocyte (Swanson & Hammer, 2000).

II.2.2.4. Echappement de la cellule hôte

Une étape fondamentale dans le cycle d'un pathogène intracellulaire est sa capacité à sortir de la cellule hôte après la phase de réplication intracellulaire, afin d'infecter de nouvelles cellules.

La lyse des cellules macrophagiques humaines implique une induction par la bactérie de l'apoptose par activation de la caspase-3 associée à une induction de la nécrose cellulaire par formation de pores dans les membranes cellulaires (Harb *et al.*, 2000).

Chez les protozoaires infectés, la mort cellulaire survient par nécrose, l'induction de l'apoptose n'ayant pas été démontrée (Gao & Kwaik, 2000). Comme pour les cellules humaines, la nécrose est induite par la toxine Rib (Release of Intracellular Bacteria) formatrice de pores. Le modèle d'évasion des *Legionella* de leur cellules hôtes se présenterait ainsi en trois étapes (Figure 17) : (1) en fin de phase exponentielle de croissance, des pores d'évasion sont insérés dans la membrane phagosomale, conduisant à sa destruction, (2) les bactéries sont alors libérées dans le cytoplasme, (3) la destruction de la membrane plasmique par des pores cytolytiques provoque alors la lyse cellulaire.

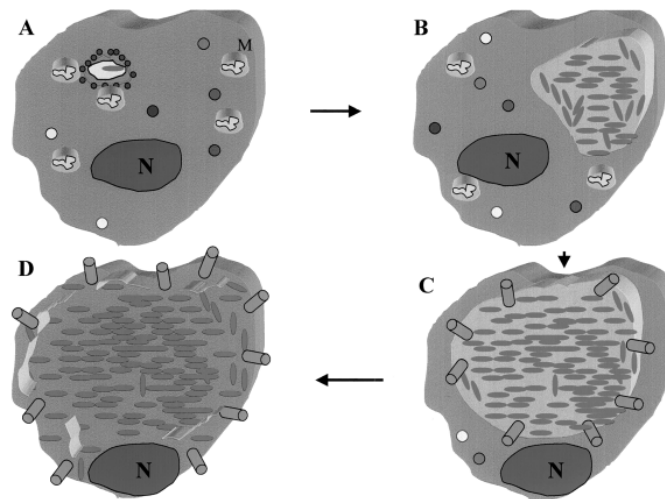


Figure 17 : Modèle de cytolysé d'*A. polyphaga* après répliqué intracellulaire par *L. pneumophila* (d'après Harb *et al.*, 2000). (A) Le phagosome contenant *L. pneumophila* est entouré de RER et de mitochondries (M), (B) puis la répliqué bactérienne a lieu. L'intégrité de la cellule hôte est maintenue pour assurer la prolifération bactérienne. (C) À la fin de la phase répliqué, l'activité de formation de pores est déclenchée, induisant l'insertion de pores dans la membrane de la vacuole répliqué. (D) Les bactéries sont alors libérées dans le cytoplasme amibien et des pores sont insérés dans la membrane plasmique, conduisant à la lyse de la cellule hôte.

Il semble cependant que la sortie de *L. pneumophila* des protozoaires puisse s'effectuer également par un mécanisme non lytique. En effet, certains auteurs ont décrit la production par les amibes infectées de vésicules contenant de nombreuses bactéries (Anand *et al.*, 1983; Berk *et al.*, 1998; Greub & Raoult, 2003; Rowbotham, 1986). Ces vésicules, de taille comprise entre 2 et 6 μm , peuvent contenir plusieurs centaines de bactéries. De plus, ces bactéries restent en partie viables après exposition à des biocides ou après congélation ou sonication (Berk *et al.*, 1998). Les vésicules infectées expulsées par les amibes pourraient donc être impliquées dans la survie de *Legionella* dans l'environnement et dans la transmission de la légionellose.

L'étude de Chen *et al.* en 2004 a suggéré que les légionelles semblaient pouvoir « commander » l'amibe qu'elles infectent et provoquer l'exocytose des vésicules les contenant (Chen *et al.*, 2004a). En effet, l'analyse du génome de *Legionella* a permis aux auteurs de mettre en évidence 2 cadres ouverts de lecture codant les protéines LepA et LepB

ayant des homologies de structure avec les protéines SNARE (protéines impliquées dans la fusion des vésicules de transport intracellulaire avec la membrane plasmique des cellules de mammifères). En étudiant l'infection d'amibes par des mutants *lepA/lepB*, ils ont montré que ces 2 protéines étaient impliquées dans l'exocytose de vésicules infectées par les amibes hôtes, suggérant une participation active des bactéries internalisées dans leur propre relargage.

Chapitre III. Objectifs

L'importance des amibes libres en santé publique est liée à leur grande répartition dans l'environnement et à leur pouvoir pathogène induisant des maladies rares mais gravissimes. Il est également reconnu que ces protozoaires possèdent la capacité de favoriser la survie et/ou la prolifération de bactéries pathogènes dans l'environnement, comme par exemple pour *L. pneumophila*. La formation des kystes est un élément particulièrement important de la résistance des amibes aux différents traitements chimiques et physiques, et à leur survie dans l'environnement. En outre les kystes sont susceptibles de protéger des bactéries intracellulaires, comme *L. pneumophila*.

Les différentes étapes de la formation des kystes ou du désenkystement sont décrites mais les mécanismes moléculaires sont peu connus. Au début de notre étude, une seule protéine caractéristique des kystes avait été identifiée.

Notre objectif a été d'étudier certains mécanismes de différenciation des amibes et leur implication sur la survie de *Legionella*.

Dans une première partie, nous avons recherché des protéines pouvant être spécifiques d'un stade et dont la fonction, éventuellement connue, pouvait améliorer notre connaissance des mécanismes de l'enkystement. Pour cela, nous avons utilisé des techniques d'électrophorèse bidimensionnelle afin de comparer les profils protéiques des formes trophozoïte et kystique et d'isoler les protéines spécifiques d'un stade.

D'autre part, nous avons recherché les éléments nutritifs capables d'induire le désenkystement. L'émergence des trophozoïtes à partir des kystes étant liée à l'enrichissement du milieu, nous avons souhaité identifier des composants du milieu capables de déclencher le désenkystement.

Dans la dernière partie de notre étude, nous nous sommes intéressés au rôle joué par les amibes en cours d'enkystement dans la survie de *L. pneumophila*. Nous avons alors réalisé des études de co-cultures amibes/légionelles, afin d'étudier la survie des bactéries et leur localisation dans les amibes au cours du temps.

Chapitre IV. Matériel et méthodes

IV.1. Organismes et milieux de culture

IV.1.1. Amibes

IV.1.1.1. Culture

La souche d'amibe utilisée dans notre étude est *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30234.

Les amibes sont cultivées pendant 3 jours à 25°C dans du milieu PYG (protéose peptone 2%, yeast extract 0,1%, glucose 0,1 M, MgSO₄ 4 mM, CaCl₂ 0,4 M, sodium citrate dihydrate 0,1%, Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ 6H₂O 0,05 mM, NaH₂PO₃ 2,5 mM, K₂HPO₃ 2,5 mM) dans des flasques de culture cellulaire de 175 cm².

IV.1.1.2. Co-culture

Pour les expérimentations de co-culture, les trophozoïtes adhérents à la flasque sont lavés 3 fois par du tampon « amibes » ou TA (MgSO₄ 4 mM, CaCl₂ 0,4 M, sodium citrate dihydrate 0,1%, Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ 6H₂O 0,05 mM, NaH₂PO₃ 2,5 mM, K₂HPO₃ 2,5 mM), puis remis en suspension et ajustés à une concentration de 5.10⁵ amibes.ml⁻¹ dans ce même tampon.

IV.1.1.3. Enkystement

Après 3 jours de culture en PYG, la suspension d'amibes est centrifugée pendant 7 minutes à 500 g, puis le culot cellulaire est lavé 2 fois avec du tampon d'enkystement (TEnk) (0.1 M KCl, 0.02 M tris(2-amino-2-hydroxyméthyl)-1,3-propandiol, 8 mM MgSO₄, 0.4 mM CaCl₂, 1 mM NaHCO₃). Après le deuxième lavage, les cellules sont incubées dans ce même tampon pendant 8 jours à 25°C.

IV.1.1.4. Désenkystement

Les kystes sont remis en suspension par tapotement et incubés à -20°C pendant 1h30 afin d'éliminer les éventuels trophozoïtes résiduels. Les flasques sont ensuite décongelés à température ambiante puis les suspensions de kystes sont réparties dans des tubes Falcon® et centrifugées 10 minutes à 800 g.

Les surnageants sont éliminés et chaque culot de kystes est lavé par chaque milieu à tester. Après numération, les kystes sont ajustés à une concentration de 5.10^5 cellules.ml⁻¹ dans chacun des milieux à tester et 2 ml sont distribués dans les puits d'une microplaque 24 puits. La plaque est recouverte de parafilm afin d'éviter l'évaporation et est incubée à 25°C pendant 7 jours. Un témoin « positif » (PYG) et un témoin « négatif » (TEnk) sont inclus à chaque expérimentation.

Le nombre de trophozoïtes et de kystes est évalué par comptage en cellule de Kova (cellule à numération à usage unique, avec une grille quadrillée contenant 0,9 µl) à J1, J2, J3, J5 et J7.

IV.1.2. Légionelles

La souche de *L. pneumophila* Lens (séro groupe 1) nous a été gracieusement fournie par le Centre National de Référence (CNR) des Légionelles (Lyon, France). Elle est conservée à -20°C sur des billes de verre dans du sang de mouton. L'ensemencement se fait sur des géloses BCYE (Buffered Charcoal-Yeast Extract) qui sont incubées à 37°C sous 5% de CO₂ pendant 3 jours. Les bactéries sont ensuite mises en suspension dans du TA et ajustées à une concentration de 10^5 bactéries.ml⁻¹.

IV.2. Solutions d'acides aminés

Les solutions d'acides aminés sont préparées à partir de poudre pure de chaque acide aminé (L-amino acids, Sigma-Aldrich), dissoutes dans le TEEnk.

Les solutions-mères sont préparées de façon à obtenir des concentrations 10 fois supérieures à celles décrites par Schuster dans le milieu minimum DGM-21A (Schuster, 2002), soit :

L-Alanine	2 g.l ⁻¹	L-leucine	9 g.l ⁻¹
L-Asparagine	5 g.l ⁻¹	L-Lysine.HCL	10 g.l ⁻¹
L-Acide aspartique	3 g.l ⁻¹	L-Méthionine	3 g.l ⁻¹
L-Arginine.HCL	10 g.l ⁻¹	L-Phénylalanine	9 g.l ⁻¹
L-Cystéine	2 g.l ⁻¹	L-Proline	8 g.l ⁻¹
L-Acide glutamique	5 g.l ⁻¹	L-Sérine	2 g.l ⁻¹
L-Glutamine	5 g.l ⁻¹	L-Thréonine	5 g.l ⁻¹
Glycine	15 g.l ⁻¹	L-Tryptophane	2 g.l ⁻¹
L-Histidine.HCL	2 g.l ⁻¹	L-Valine	7 g.l ⁻¹
L-Isoleucine	6 g.l ⁻¹		

Ces solutions-mères sont ensuite stérilisées par filtration.

Les milieux à tester sont préparés par mélange de ces différentes solutions d'acides aminés de façon à obtenir des concentrations finales identiques à celles du milieu DGM-21A.

Pour 2 acides aminés, la L-Cystine et la L-Tyrosine, la préparation de solutions-mères à 10X n'a pas pu être réalisée à cause de leur plus faible solubilité dans le TEnk. Ces 2 acides aminés sont donc dissous directement dans les milieux à tester de façon à obtenir les concentrations 1X du milieu DGM-21A, soit : L-Cystine 0,1 g.l⁻¹, L-Tyrosine 0,2 g.l⁻¹.

Les milieux à tester contenant ces 2 acides sont ensuite stérilisés par filtration.

IV.3. Co-cultures

A J0, *A. castellanii* ATCC 30234 est infectée par *L. pneumophila* Lens à une MOI = 0.002 (Multiplicity Of Infection = nombre d'amibes / nombre de bactéries), soit 1 bactérie pour 500 amibes.

L'infection est effectuée en ajoutant 300 µl de suspension de légionelles à 10⁵ bactéries.ml⁻¹ dans des flasques contenant 30 ml de suspension amibienne à 5.10⁵ amibes.ml⁻¹.

Les flasques contenant la co-culture sont incubées pendant 24 heures à 37°C sous 5% de CO₂ afin de permettre l'internalisation des bactéries par les amibes.

A J1, la co-culture est centrifugée pendant 7 minutes à 400 g. Le culot est lavé, remis en suspension dans du TEnk, puis la suspension est incubée à 25°C pendant 6 mois. Le tampon d'enkystement a été choisi afin de permettre la formation des kystes.

Un témoin « amibes seules » (vérification de l'absence de bactéries intra-amibiennes) ainsi qu'un témoin « bactéries seules » (témoin de la survie des bactéries seules dans le tampon d'enkystement) sont également réalisés en parallèle.

IV.4. Traitement antibiotique

IV.4.1. Préparation des témoins

- suspension de bactéries libres : *L. pneumophila* Lens estensemencée sur gélose BCYE et incubée 3 jours à 37°C sous 5% de CO₂. Les bactéries sont ensuite mises en suspension dans du TEnk et ajustées à une concentration de 10³ bactéries.ml⁻¹.

- bactéries intra-amibiennes : une culture d'*A. castellanii* de 3 jours en PYG est lavée par du TA et infectée par *L. pneumophila* Lens en utilisant une MOI = 1. La co-culture est incubée pendant 24 heures à 37°C sous 5% de CO₂ puis le tapis cellulaire adhérent est lavé (élimination des bactéries non internalisées) et remis en suspension dans du TA.

IV.4.2. Traitement par la gentamicine

Chaque suspension bactérienne est traitée à volume égal par une solution de gentamicine à 200 µg.ml⁻¹. Après 1 heure d'incubation à 25°C, la suspension est centrifugée pendant 5 minutes à 8000 g puis le culot est repris par 500 µl d'eau distillée stérile. Cent microlitres sont ensuiteensemencés sur 2 gélases BCYE qui sont incubées à 37°C sous 5% de CO₂ pendant 3 jours pour numération des UFC (Unité Formant Colonie).

IV.5. Microscopie électronique

L'analyse de nos échantillons a été effectuée dans le Service de pathologie ultrastructurale et expérimentale (Pr Goujon) du CHU de Poitiers.

Après différents temps d'incubation, un échantillon d'amibes infectées est centrifugé pendant 30 minutes à 400 g puis fixé pendant 1 heure à 4°C dans un tampon phosphate 0,1 M contenant 4% de glutaraldéhyde. Les cellules sont lavées 4 fois dans du PBS et fixées pendant 1 heure à 4°C dans un tampon phosphate 0,1 M contenant 1% d'OsO₄.

L'échantillon est ensuite déshydraté en acétone et inclus dans l'araldite. Les sections de la préparation sont colorées à l'acétate d'uranyl et au nitrate de plomb avant d'être examinées avec un microscope électronique Jeol 1010.

IV.6. Extraction protéique

Des extraits protéiques sont préparés à partir d'amibes en cours d'enkystement (après 0 heure, 2 heures, 6 heures, 24 heures, 48 heures ou 8 jours d'incubation à 26°C dans du TEnk).

Afin d'étudier les protéines au cours du déenkystement, les extraits protéiques sont préparés à partir d'amibes en cours de déenkystement. Pour cela, les kystes sont lavés dans du milieu nutritif PYG et incubés à 26°C dans ce même milieu pendant 0, 6, 24 ou 72 heures.

IV.6.1. Lyse cellulaire

Les cellules (trophozoïtes et kystes à différents temps d'enkystement ou de déenkystement) sont lavées 3 fois dans un tampon Tris HCl 40 mM pH 8 EDTA 10 mM et centrifugées à 500 g pendant 10 minutes à 4°C. Le culot obtenu est repris par du tampon Tris HCl 40 mM pH 8 EDTA 10 mM additionné d'inhibiteur de protéase de façon à obtenir une concentration de 10⁸ cellules.ml⁻¹.

Un millilitre de cette suspension est transféré dans des tubes Fast Prep (Lysing matrix A, Q-Biogène) contenant une matrice permettant une lyse mécanique (granit et bille de céramique), puis les tubes sont fortement agités dans l'appareil Fast Prep (Q-Biogène) (3 cycles de 45 secondes puissance 6,5 alternés).

Les tubes sont ensuite centrifugés pendant 15 minutes à 16000 g afin d'éliminer la matrice et les débris cellulaires. Le surnageant est récolté dans un nouveau microtube.

IV.6.2. Précipitation des protéines

Les protéines contenues dans le surnageant du lysat cellulaire sont précipitées par ajout d'acétone, TCA 10% et DTT 20 mM (-20°C) à raison de 3 volumes du mélange acétone/TCA/DTT pour 1 volume de surnageant. Le mélange est incubé pendant au moins 2 heures à -20°C.

Les tubes sont centrifugés pendant 30 minutes, 16000 g à 4°C, puis le surnageant est éliminé et le culot protéique est lavé avec 500 µl d'acétone pur.

Les tubes sont incubés ouverts pendant 10 minutes à température ambiante afin de permettre l'évaporation de l'acétone puis le culot est dissous dans une solution de réhydratation (Urée 8 M, CHAPS 4%, DTT 20 mM, Ampholytes 0,2%, Orange G 0,001%), le volume de solution de réhydratation étant identique au volume de surnageant initial (environ 700 µl).

IV.6.3. Dosage des protéines

Le dosage est effectué selon le protocole du kit « RC DC protein assay » (BioRad).

A 25 µl de chaque échantillon sont ajoutés 125 µl de RC Reagent I. Après 1 minute d'incubation à température ambiante, 125 µl de RC Reagent II sont ajoutés, le mélange est agité puis centrifugé (5 minutes, 15000 g).

Le surnageant est éliminé par retournement sur du papier absorbant, puis la première opération est renouvelée avec 12 µl de RC Reagent I et 40 µl de RC Reagent II. Après centrifugation et élimination du surnageant, 127 µl de Reagent A (5 µl de DC Reagent S + 250 µl de DC Reagent A) sont ajoutés afin de dissoudre le précipité.

Après dissolution complète, 1 ml de DC Reagent B est ajouté et la solution est agitée puis incubée pendant 15 minutes à température ambiante.

Une gamme d'étalonnage est effectuée avec une solution d'albumine dans la solution de réhydratation (1,6-0,8-0,4-0,2-0,1 mg.ml⁻¹).

La densité optique des différentes solutions est lue à 750 nm, les concentrations protéiques des extraits sont établies grâce à la courbe d'étalonnage.

IV.7. Electrophorèse bidimensionnelle

IV.7.1. Réhydratation

Les différents extraits protéiques à tester sont ajustés à la concentration de 1 mg.ml⁻¹ afin d'obtenir une quantité optimale de protéines sur les gels (300 µg/gel).

Trois cents microlitres de l'extrait à étudier sont déposés sur un gel à gradient de pH immobilisé ou strip (IPG Ready Strip[®] pH4-7 17 cm, BioRad), puis le strip est recouvert d'huile minérale et incubé à température ambiante pendant une nuit afin de permettre sa réhydratation (réhydratation passive).

IV.7.2. 1^{ère} dimension

La première dimension est réalisée dans une cuve Bio-Rad de type Protean IEF cell. Un papier buvard imprégné de 8 µl d'eau distillée est déposé au niveau de chaque électrode de la cuve de migration. L'isoélectrofocalisation est réalisée en plusieurs étapes. Durant la première étape, dite de conditionnement, les excès de sels sont éliminés en appliquant une tension faible de 250 V pendant 15 minutes. La deuxième étape est une montée graduelle de la tension, qui comprend un passage de 250 à 10000 V en 3 heures. La troisième étape, dite de focalisation finale, se déroule à 10000 V.h⁻¹ constants jusqu'à atteindre un total de 60000V (soit pendant environ 6 heures).

Après la première dimension, les strips sont stockés à -80°C jusqu'à réalisation de la 2^{nde} dimension.

IV.7.3. 2nde dimension

IV.7.3.1. Equilibration

Avant de réaliser la deuxième dimension, les strips IPG subissent une équilibration. Ceci permet d'ioniser les protéines avec le SDS et de les réduire par le DTT. Divers constituants sont éliminés tels que : l'urée, la thiourée, les ampholytes, les détergents.

L'agent réducteur étant du DTT, on procède à une seconde incubation avec de l'iodoacétamide. Ceci prévient la ré-oxydation des protéines au cours de l'électrophorèse et permet d'alkyler les thiols (DTT, ou β -mercaptoethanol) minimisant ainsi les traînées verticales sur le gel.

Les strips sont incubés pendant 10 minutes sous agitation dans un premier tampon d'équilibration (Urée 6 M, SDS 2%, Tris HCl pH 8,8 0,375 M, Glycérol 20%, DTT 130 mM, bleu de bromophénol).

Après élimination de ce premier tampon, les strips sont incubés pendant 10 minutes sous agitation dans un deuxième tampon (Urée 6 M, SDS 2%, Tris HCl pH 8,8 0,375 M, Glycérol 20%, iodoacétamide 135 mM, bleu de bromophénol).

IV.7.3.2. Migration

La complexation des protéines avec le SDS leur confère une charge négative qui rend négligeable leur charge native. La séparation des protéines se fera alors en fonction de leur masse moléculaire et est effectuée dans un gel d'acrylamide/bis-acrylamide à 12%. La migration s'effectue dans les cuves Bio-Rad PROTEAN II XL pour gels de 20 x 20 cm.

Le gel est coulé entre 2 plaques de verre de façon à obtenir des gels de 1 mm d'épaisseur. Après 30 minutes de polymérisation, le strip équilibré est déposé sur le haut du gel d'acrylamide. Une solution d'agarose à 1% est déposée sur le strip afin de le fixer sur le haut du gel d'agarose.

Le tampon de migration (Tris 25 mM, glycine 192 mM, SDS 0,1%) est versé dans la cuve puis la migration s'effectue avec un ampérage de 24 mA/gel pendant environ 6 heures. Pendant la migration, un système de refroidissement permet d'éviter l'échauffement du gel en maintenant une température à 10°C.

Après la migration, le gel est récupéré et incubé pendant une nuit dans une solution de fixation (acide acétique 10% + méthanol 40%), puis le gel est coloré pendant 24 heures dans du bleu de Coomassie colloïdal.

La solution de coloration est préparée extemporanément comme suit :

- solution C = 98% de solution A (100 g de sulfate d'ammonium, 11,76 ml d'acide orthophosphorique à 85%, qsp 1 litre) + 2% de solution B (5% de Bleu de Coomassie colloïdal G250 dans l'eau). Cette solution C est mise à agiter grâce à un barreau aimanté pendant une nuit.

- le jour de la coloration des gels, la solution de coloration est préparée en mélangeant 80% de solution C avec 20% de méthanol.

La décoloration du gel est effectuée dans plusieurs bains d'eau distillée, puis le gel est conservé dans l'eau distillée jusqu'à ce qu'il soit scanné.

IV.7.4. Analyse des spots

Les gels d'électrophorèse bidimensionnelle sont inspectés et comparés visuellement. Les spots d'intérêt sont excisés et conservés dans des microtubes à -20°C, puis ils sont analysés pour identification des protéines correspondantes. Cette analyse a été effectuée par Alain Guillot, Plateau d'Analyse Protéomique par Séquençage et Spectrométrie de Masse (PAPSS) de l'INRA de Jouy en Josas.

L'identification des protéines de nos échantillons est effectuée par interprétation de spectres de fragmentation obtenus grâce à un spectromètre de masse en tandem couplé en amont avec une chaîne HPLC (LC MS/MS).

Les spots sont traités par la trypsine pH 8 pendant une nuit à 37°C afin d'hydrolyser les protéines puis les peptides sont extraits par un mélange acétonitrile/acide formique.

Avant d'être introduits dans le spectromètre de masse, les peptides sont séparés en amont par l'intermédiaire d'une chaîne chromatographique liquide haute performance.

Le spectromètre de masse permet dans un premier temps de mesurer la masse des peptides issus de l'hydrolyse enzymatique des protéines (MS simple) et fragmenter ces mêmes peptides (spectres MS/MS) pour accéder à la structure de ces derniers.

Les identifications des protéines sont ensuite basées sur 2 méthodes différentes : une méthode comparant les empreintes de fragmentation et une méthode comparant les séquences de peptides.

- la méthode d'empreintes de fragmentation ou « mass matching » compare la masse des peptides analysés et la masse des fragments de peptides obtenus en MS/MS avec les masses déduites à partir des séquences présentes dans les banques (à l'aide du logiciel Bioworks 3.3.1). Cette approche ne permet d'identifier un peptide que s'il est rigoureusement identique à un peptide présent dans les banques.

- la méthode comparant les séquences de peptide ou « de novo », consiste à interpréter les empreintes de fragmentation pour les traduire en séquence primaire d'acides aminés (à l'aide des logiciels Peaks studio ou PepNovo). Ces séquences sont ensuite utilisées pour identifier les protéines par alignement de séquences (logiciels Fasts et MSBLAST). Cette méthode permet d'identifier des peptides dont la séquence est identique ou similaire à un peptide présent dans les banques.

Les banques utilisées ont été :

- une banque contenant les séquences d'EST (expressed sequenced tag) d'*Acanthamoeba*, traduite dans les 6 cadres de lecture, correspondant à 7628 protéines
- une banque de protéines d'*Acanthamoeba* contenant seulement 284 séquences
- la banque de protéines de tous les organismes, contenant 2 102 801 protéines

IV.8. Extraction d'ARN

IV.8.1. Préparation des extraits

Toutes les solutions utilisées dans cette étude sont préparées avec de l'eau distillée traitée au diéthylpyrocarbonate (DEPC) afin d'éliminer la contamination par des RNases (la réaction avec le DEPC dégrade les protéines et en particulier les RNases). Pour cela, 0,1% de

DEPC sont ajoutés dans des flacons d'eau distillée, les flacons sont incubés pendant 24 heures à 37°C puis autoclavés afin de dégrader le DEPC résiduel.

Les cellules (trophozoïtes et kystes à différents temps d'enkystement) sont centrifugées à 500 g pendant 15 minutes à 20°C. Le culot est repris par la solution RNAPro (FastRNA Pro Green Kit, Q-Biogène) de façon à obtenir une concentration de 10^8 cellules.ml⁻¹. Les suspensions cellulaires sont ensuite transférées dans des tubes FastPrep (Lysing Matrix D, FastRNA Pro Green Kit, Q-Biogène) contenant une matrice permettant une lyse mécanique (sphères de céramique), puis les tubes sont fortement agités dans l'appareil Fast Prep (Q-Biogène) (3 cycles de 45 secondes puissance 6,5 alternés avec un passage de 5 minutes dans la glace).

Les tubes sont ensuite centrifugés pendant 15 minutes à 14000 g à 4°C afin d'éliminer la matrice et les débris cellulaires. Le surnageant est récupéré et incubé 5 minutes à température ambiante.

Le protocole d'extraction des ARN est celui indiqué dans le kit utilisé (FastRNA Pro Green Kit, Q-Biogène).

Trois cent microlitres de chloroforme sont ajoutés au surnageant, agités au vortex pendant 10 secondes puis le tube est incubé 5 minutes à température ambiante. Après une centrifugation de 5 minutes à 12000 g à 4°C, la phase supérieure est transférée dans un nouveau microtube et les ARN sont précipités par ajout de 500 µl d'éthanol absolu (-20°C). Le tube est retourné 5 fois et incubé au minimum 30 minutes à -20°C. Après une nouvelle centrifugation de 15 minutes à 12000 g à 4°C, le surnageant est éliminé et le culot lavé avec 500 µl d'éthanol à 75% froid.

Le tube est incubé bouchon ouvert pendant 5 minutes à température ambiante afin de permettre l'évaporation de l'éthanol résiduel puis les ARN sont solubilisés dans 100 µl d'eau distillée traitée au DEPC. Les différentes solutions d'ARN sont ensuite stockées à -80°C jusqu'à utilisation.

IV.8.2. Dosage des ARN

Les solutions d'ARN préparées sont dosées par lecture au spectrophotomètre à 260 nm après avoir effectué une dilution au 1/100^{ème}. La concentration en ARN de chaque échantillon est obtenue en utilisant la relation :

$$\text{Concentration } (\mu\text{g.ml}^{-1}) = \text{DO}_{260\text{nm}} \times 40 \times \text{facteur de dilution de l'échantillon}$$

IV.8.3. Contrôle des ARN

Afin de vérifier la qualité des solutions d'ARN préparées, une migration en gel dénaturant est réalisée.

Les échantillons sont préparés de façon à déposer 1 μg d'ARN par puits ; 20 μl de chaque solution d'ARN à 50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ additionnés de 5 μl de tampon de charge (formaldéhyde, MOPS, H₂O DEPC, bleu de bromophénol) sont dénaturés pendant 5 minutes à 65°C.

Puis les échantillons sont déposés dans les puits d'un gel d'agarose à 1,2% préparé dans du tampon MOPS et dans lequel du 0,5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ de BET (Bromure d'éthidium) a été incorporé. La migration est effectuée pendant environ 1 heure à 50 V.

Après migration, le gel est exposé aux UV afin de vérifier l'intégrité des ARN présents (présence de 2 bandes sans traînées).

IV.9. RT-PCR (Reverse transcriptase-PCR)

Dans notre étude, nous avons utilisé une technique de RT-PCR en temps réel associant une étape de transcription inverse et de PCR quantitative en temps réel. Cette technique est utile pour la détection des ARNm présents dans une cellule même en faible quantité.

Le principe consiste à extraire les ARNm des cellules et les copier in vitro en ADNc monocaténaire, grâce à une transcriptase inverse. Pour éviter la contamination de nos préparations par de l'ADN génomique, les solutions d'ARN sont traitées par une DNase avant l'étape de transcription inverse.

Les molécules d'ADN obtenues servent alors de matrice à une réaction de PCR utilisant un couple d'amorces spécifiques de la séquence de l'ARN d'intérêt.

Afin de pouvoir évaluer la quantité relative de chaque ARNm dans nos échantillons au cours de l'enkystement, les ARN totaux sont dosés et ajustés à la même concentration dans chaque échantillon et un gène de contrôle dont l'expression n'est pas modifiée au cours de l'enkystement est utilisé comme standard interne.

IV.9.1. Traitement des solutions d'ARN

Les échantillons sont traités à la DNase selon le protocole indiqué dans le kit (RQ1 Rnase-free DNase, Promega). Les concentrations des solutions d'ARN sont ajustées à 500 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$, puis les solutions sont traitées comme suit :

Solution d'ARN	6 μl (3 μg)
RQ1 DNase	3 μl (3U)
RQ1 RNase Free DNase 10X buffer	1 μl

Après 30 minutes d'incubation à 37°C, la réaction est arrêtée par ajout de 1 μl de RQ1 DNase Stop et incubation pendant 10 minutes à 65°C.

IV.9.2. Préparation des ADNc

Nous utilisons comme amorces un mélange d'hexamères synthétisés au hasard (Random Primers, Promega). Le protocole utilisé est le suivant :

Solution d'ARN traités	10 μl (2,5 μg)
Random Primers (0,5 $\mu\text{g}.\mu\text{l}^{-1}$)	4 μl (2 μg)

Le mélange est incubé pendant 5 minutes à 70°C, puis pendant 5 minutes dans la glace.

L'étape de transcription inverse s'effectue grâce à l'utilisation d'une ADN polymérase ARN dépendante (M-MLV Reverse Transcriptase, RNase H Minus, Point Mutant, Promega).

Le mélange réactionnel est préparé comme suit :

Tampon M-MLV RT 5X	5 μ l
dATP, 10 mM	1,25 μ l
dCTP, 10 mM	1,25 μ l
dGTP, 10 mM	1,25 μ l
dTTP, 10 mM	1,25 μ l
Transcriptase inverse	1 μ l (200 U)

Puis ce mélange réactionnel est ajouté au microtube contenant les 14 μ l d'ARN et de Random Primers. Le microtube est incubé pendant 10 minutes à température ambiante puis 50 minutes à 50°C afin d'éliminer les ARN résiduels.

Un témoin de la contamination de nos ARN par l'ADN est préparé en parallèle (même protocole mais sans ajout de la transcriptase inverse).

Les solutions d'ADNc ainsi obtenus sont conservés à -80°C.

IV.9.3. PCR en temps réel

Pour la PCR en temps réel, la mesure et la visualisation de l'amplification se font en temps réel et sont liées à l'émission de fluorescence à chaque cycle PCR. Pour la détection de l'ADN, nous avons choisi d'utiliser un kit utilisant un fluorophore, le SYBR-Green, un agent intercalant très stable qui peut s'insérer dans la chaîne d'ADN uniquement si elle se trouve sous la forme double brin (Figure 18). En solution, le SYBR-Green n'est pas fluorescent lorsqu'il est sous sa forme libre, alors qu'il est très fluorescent lorsqu'il est lié à l'ADN.

La quantification est basée sur l'augmentation de fluorescence générée par le mélange SYBR-Green lorsqu'il est intercalé dans le double brin d'ADN.

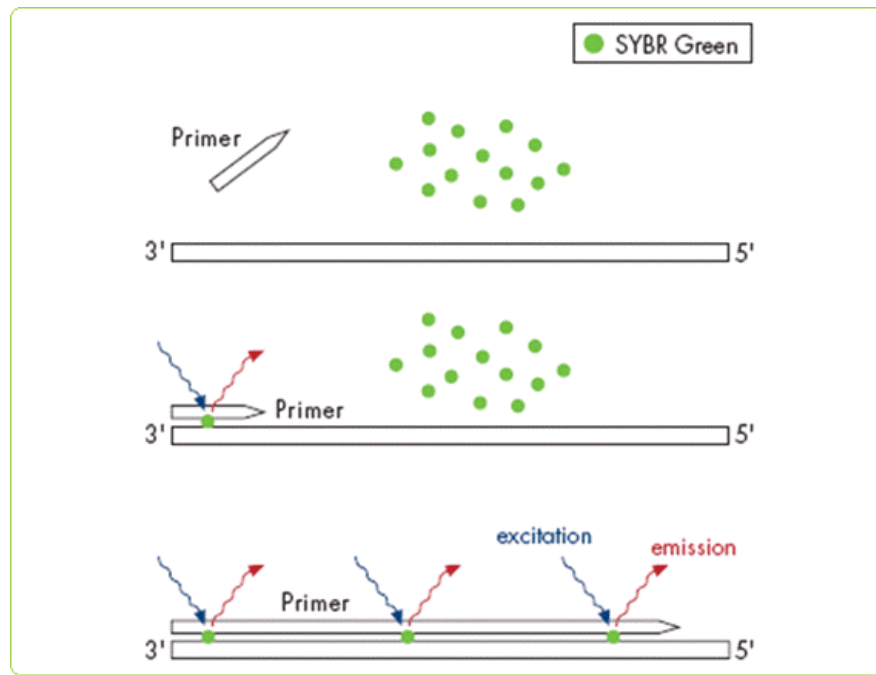


Figure 18 : Principe de la détection des produits de PCR par le SYBR Green.

Nous avons choisi d'étudier l'expression des gènes correspondant aux 9 protéines identifiées par LC-MS/MS.

Nous avons également étudié l'expression du gène codant la protéine CSP21, protéine décrite comme spécifique de la forme kystique (Hirukawa *et al.*, 1998).

L'expression de ces différents gènes est étudiée par comparaison avec 2 gènes de référence, le gène codant la sous-unité 18S des ARN ribosomiaux, classiquement utilisé comme gène de référence en PCR temps réel, et le TPBF décrit comme ayant une expression inchangée au cours de l'enkystement (Orfeo & Bateman, 1998).

Les amorces utilisées sont présentées dans le tableau 4.

Tableau 4 : Amorces utilisées en PCR en temps réel.

Gène	Nom	Séquence
Actophorine	acto-R1	CAAGATGAACGCCTCCAAC
	acto-F1	GAGCTGCGACTTGAAATCC
Enolase	eno-R1	GCAGTCTCAATGCGCTTGGG
	eno-F1	AGGCTCTCGGCAAGGATGTG
EF2	EF2-R1	ACTCCATGACGGGCAGGTAG
	EF2-F1	AGATCCAGTGCCCTGAGTCG
FBA	FBA-R1	TGTAGGTCTCGCCGTTGGTG
	FBA-F1	CAAGGGTATCCTGCCCGGTATC
Filamine	fil-R1	GTCGTCGAGCGTGATGTTG
	fil-F1	TACCTTCGACGGTGCCTAC
HTP	HTP-R1	GAGCACAATCATGCCGTTGTCTG
	HTP-F1	TCAGGGCTTCGTCAAGAAGGTC
HSP 70	HSP-R1	GATCTTGTCGTCGCGGATGG
	HSP-F1	GATCGAGCGCATGGTCAAGG
Proteine S12	S12-R1	GCCGGGAGTGTATTGGAAAGC
	S12-F1	ACTTCCGCACCAACAAGGC
SubSP	sub-R1	TTCTCGACCGACGAGTAG
	sub-F1	GTCATCTCCGGCATTCAG
RBP	RBP-R1	GCGACTGGAAGGTCACAAAGC
	RBP-F1	GGGCACCGATGAGAACAAGC
CSP21	CSP21-R1	TCGCGGTTGGAACCGTAGTC
	CSP21-F1	TGGTCCACGGCAAGTACGAG
18S	18S-R1	TGCCTTCCTTAGAAGTGGTAGC
	18S-F1	AACGGGTAAACGGAGAATTAGGG
TPBF	TPBF-R1	GTCGGTGAAGTAGACGCGGAAG
	TPBF-F1	GCCGGACAAGAAGCGAAGGAAG

Les solutions d'ADNc sont utilisées diluées au 1/5^{ème} (1/100^{ème} pour les amorces 18S).

Notre procédure utilise le kit « LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I » (Roche Diagnostics), le mélange réactionnel étant réalisé dans des capillaires (20 µl, Roche Diagnostics) comme indiqué ci-dessous :

Amorce F1 (10 µM)	1 µl
Amorce R1 (10 µM)	1 µl
Master Mix	2 µl
H ₂ O PCR grade	1 µl
ADNc	5 µl

Les capillaires sont ensuite bouchés et centrifugés 10 secondes dans la centrifugeuse (LC Carousel Centrifuge 2.0, Roche Diagnostics), puis introduits dans le LightCycler 2.0 Real-Time PCR System (Roche Diagnostics).

Le programme utilisé pour réaliser l'amplification des ADN est le suivant :

Dénaturation :	95°C, 10 minutes
Amplification :	95°C, 10 secondes
	58°C, 5 secondes
	72°C, 15 secondes
Fusion :	65°C, 15 secondes puis 0,1°C/sec jusqu'à 95°C

Chaque réaction de PCR est réalisée en double exemplaire sur 3 extraits d'ADNc préparés à partir de 3 extraits d'ARN distincts (3 cultures d'amibes distinctes).

Les résultats obtenus sont exprimés en nombre de cycles de PCR (ou Ct pour « Cycle Threshold ») nécessaire pour que la quantité d'ADN amplifié soit suffisante et que la fluorescence soit détectable. Ces résultats obtenus sont corrigés par rapport aux gènes de référence, ce qui nous permet d'effectuer une quantification relative. La correction par rapport au gène de référence va permettre de compenser d'éventuels biais de PCR provenant :

- des variations dans la quantité et la qualité des échantillons
- du rendement d'extraction différent entre échantillons
- des variations dues au pipetage
- des variations d'efficacité de transcription inverse.

Pour cela, à partir des valeurs obtenues avec les amorces TPBF, on calcul les écarts entre le Ct obtenu avec l'extrait T0h et les Ct des extraits T6h, T24h et T8j.

$$\Delta Ct_{TPBF1} = Ct_{0h_{TPBF}} - Ct_{6h_{TPBF}}$$

$$\Delta Ct_{TPBF2} = Ct_{0h_{TPBF}} - Ct_{24h_{TPBF}}$$

$$\Delta Ct_{TPBF3} = Ct_{0h_{TPBF}} - Ct_{8j_{TPBF}}$$

Puis, l'expression de ce gène de référence étant considérée constante au cours de l'enkystement, on soustrait chacun de ces ΔCt aux valeurs de Ct obtenues avec l'ARN du gène à quantifier :

$$Ct_{6h_{corrigé}} = Ct_{6h} - \Delta Ct_{TPBF1}$$

$$Ct_{24h_{corrigé}} = Ct_{24h} - \Delta Ct_{TPBF2}$$

$$Ct_{24h_{corrigé}} = Ct_{8j} - \Delta Ct_{TPBF3}$$

Chapitre V. Résultats et discussion

V.1. Etude des protéines et de l'expression de leurs gènes au cours de la différenciation

L'enkystement et le déenkystement des *Acanthamoeba* ont été décrits par quelques auteurs, descriptions essentiellement ultrastructurales, mais peu de données sont retrouvées sur les mécanismes et les modifications moléculaires de ces phénomènes. Ainsi, au début de notre étude, peu de données étaient disponibles sur les différents effecteurs impliqués dans la différenciation d'*Acanthamoeba*. Seule une protéine spécifique de kyste était décrite, la protéine CSP21 mais sa fonction était inconnue (Hirukawa *et al.*, 1998).

Nous avons voulu étudier les modifications du profil protéique des amibes au cours de l'enkystement et du déenkystement, afin de rechercher des protéines spécifiques de chacune des formes trophozoïte ou kystique. Notre but était d'identifier des protéines dont la fonction serait connue et permettrait d'émettre des hypothèses sur les mécanismes moléculaires de la différenciation amibienne. Ces protéines pourraient en effet être des cibles intéressantes afin de rechercher des molécules capables d'inhiber l'enkystement, responsable de la persistance des amibes dans l'environnement.

Pour cela, les profils protéiques des amibes dans différentes conditions ont été déterminés par électrophorèse bidimensionnelle.

Pour l'étude de l'enkystement, 2 séries de 6 extraits sont préparées à partir de 2 cultures distinctes d'amibes en PYG. Chaque extrait est analysé 2 fois par électrophorèse bidimensionnelle, soit 2 gels par extrait (Figure 19).

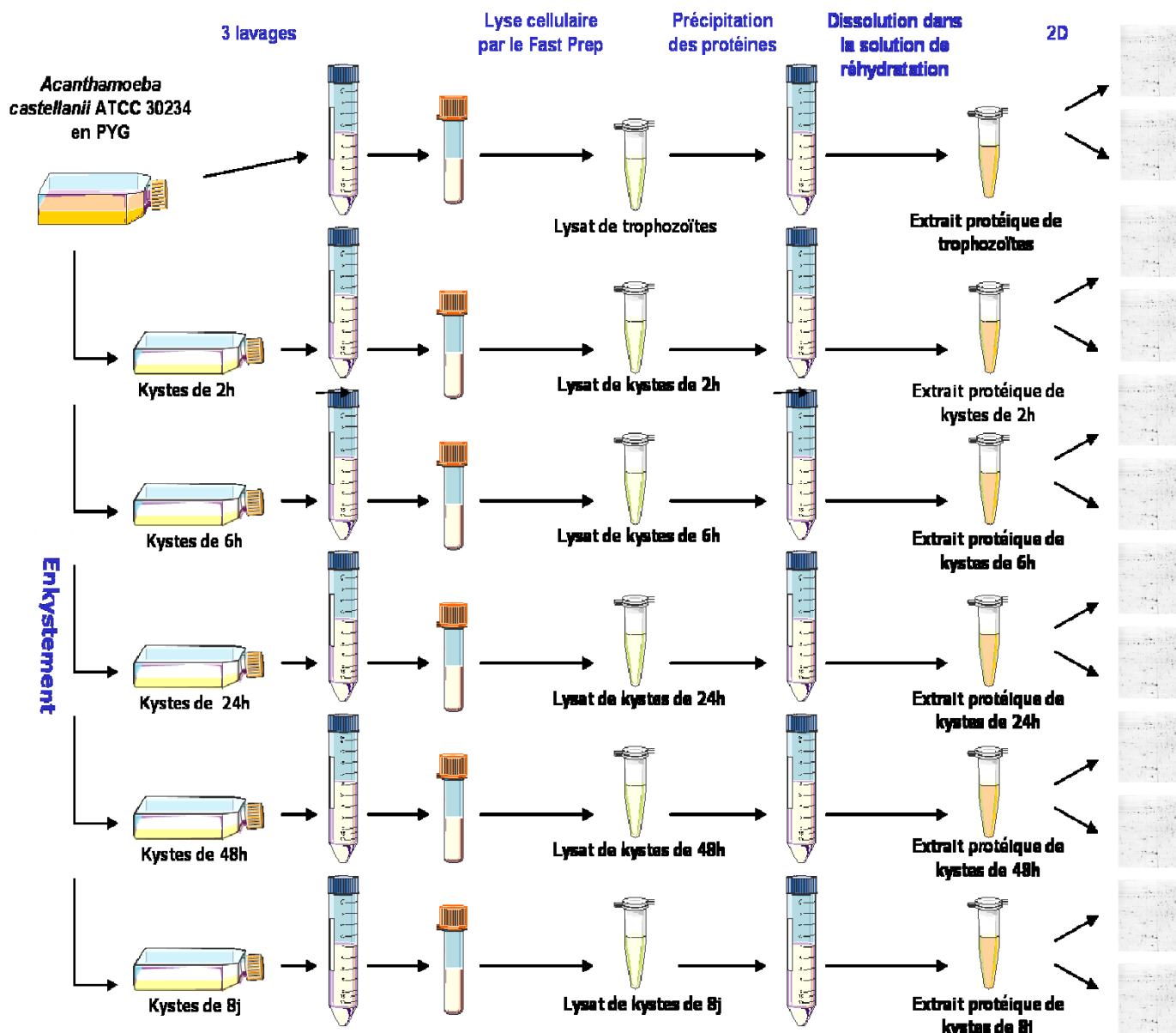


Figure 19 : Préparation et analyse par électrophorèse bidimensionnelle des extraits protéiques d'*A. castellanii* à différents temps d'enkystement à partir d'une culture.

Pour l'étude du déenkystement, 2 séries de 4 extraits sont préparées à partir de 2 suspensions de kystes distinctes. Chaque extrait est analysé 2 fois par électrophorèse bidimensionnelle, soit 2 gels par extrait (Figure 20).

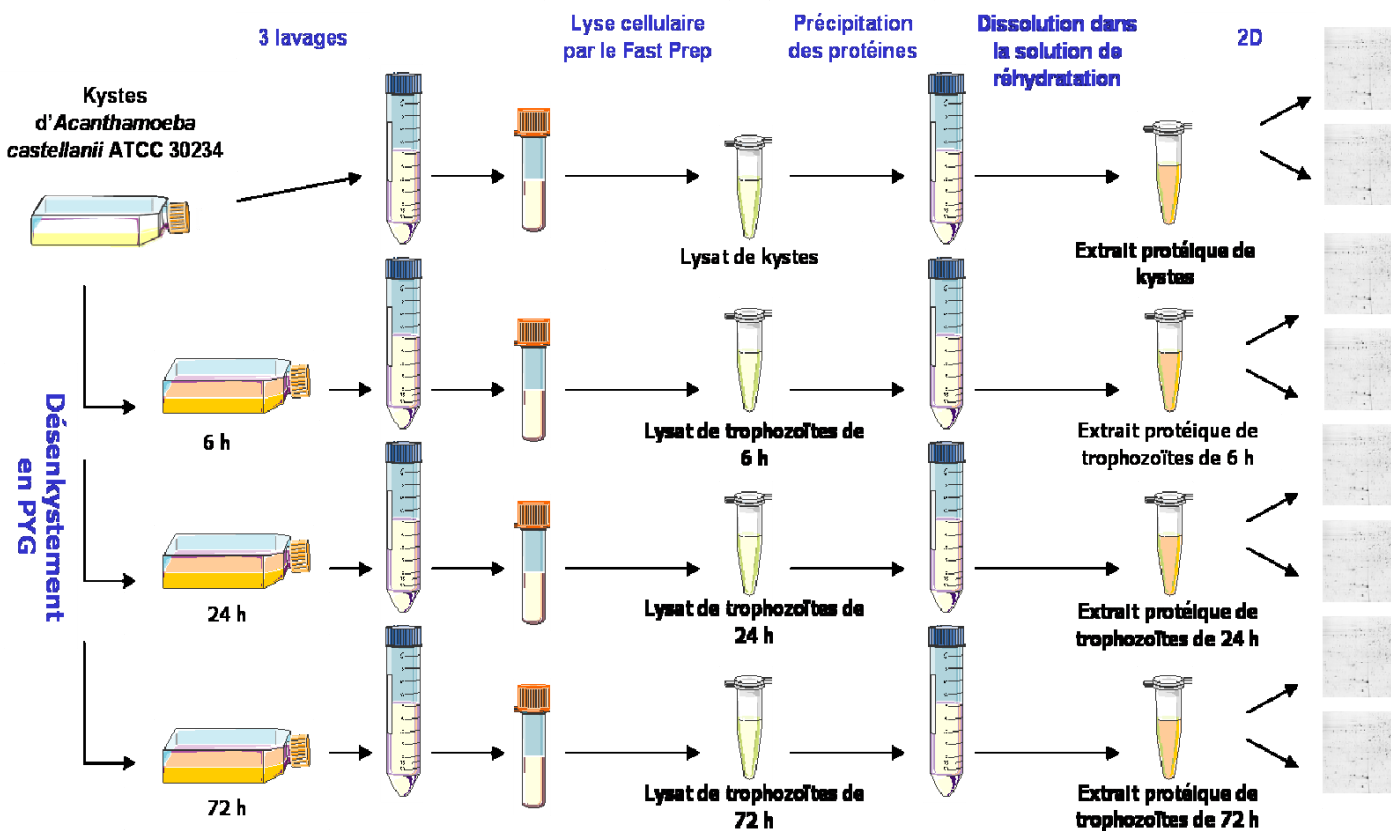


Figure 20 : Préparation et analyse par électrophorèse bidimensionnelle des extraits protéiques d'*A. castellanii* à différents temps de désenkystement à partir d'une suspension de kystes.

V.1.1 Evolution du protéome au cours de l'enkystement et du déenkystement

V.1.1.1. Etude de l'enkystement

Des extraits protéiques ont été préparés à différents temps d'enkystement : T0h (trophozoïtes), T2h, T6h, T24h, T48h et T8j. Pour chaque temps, nous disposons de 4 gels.

Après coloration au bleu de Coomassie, les 4 gels obtenus pour chaque condition ont été inspectés visuellement et comparés entre eux. Certains spots d'intérêt sont découpés et analysés par spectrométrie de masse. Pour le choix de ces spots, nous avons décidé de nous intéresser uniquement aux spots apparaissant ou disparaissant au cours de l'enkystement. De plus, nous n'avons sélectionné que les spots retrouvés sur au moins 3 des 4 gels réalisés.

L'analyse visuelle des différents gels montre que le gel obtenu avec l'extrait T2h est sensiblement superposable au gel obtenu avec l'extrait T0h. De même, le gel obtenu avec l'extrait T48h est superposable au gel obtenu avec l'extrait T24h, aucune variation majeure n'étant observée entre ces 2 gels.

Par souci de clarté, nous avons donc choisi de ne représenter que les photographies des gels obtenus à partir des extraits T0h, T6h, T24h et T8j (Figure 21).

L'analyse visuelle des gels obtenus pour chaque condition a permis de sélectionner 10 spots correspondant à des protéines disparaissant au cours de l'enkystement (spots 1 à 5) ou apparaissant au cours de l'enkystement (spots 6 à 10).

Les spots 1 à 5 correspondraient donc à des protéines spécifiques des trophozoïtes, les spots 6 à 10, à des protéines spécifiques des kystes.

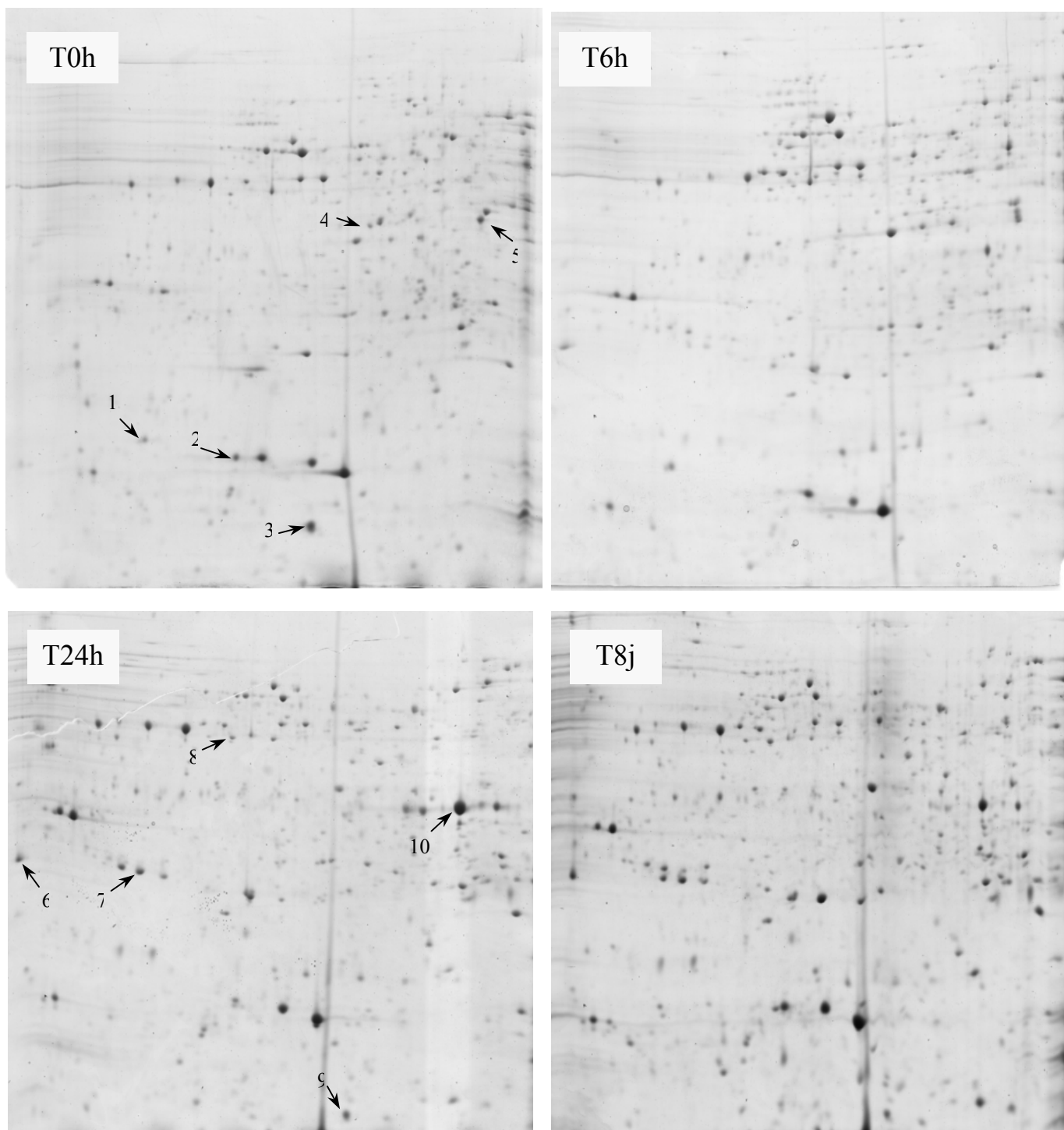


Figure 21 : Gels d'électrophorèse bidimensionnelle obtenus avec les extraits protéiques d'amibes après 0 h, 6 h, 24 h et 8 jours d'enkystement (coloration au bleu de Coomassie). Les flèches noires indiquent les spots sélectionnés.

Les masses moléculaires apparentes des différents spots sélectionnés sont obtenues par utilisation d'un marqueur de poids moléculaire intégré au gel de 2^{ème} dimension. Les points isoélectriques sont estimés par rapport au gradient de pH utilisé (Tableau 5).

Tableau 5 : Masse moléculaire apparente et point isoélectrique estimé des protéines sélectionnées par électrophorèse bidimensionnelle.

	Masse moléculaire apparente (kDa)	Point isoélectrique estimé
	Protéines spécifiques de trophozoïtes	
Spot 1	18	4,9
Spot 2	16	5,4
Spot 3	10	5,8
Spot 4	24	5,6
Spot 5	38	6,7
	Protéines spécifiques de kystes	
Spot 6	25	4,3
Spot 7	25	5,1
Spot 8	40	5,5
Spot 9	7	6,1
Spot 10	33	6,6

V.1.1.2. Etude du désenkystement

Des extraits protéiques ont été préparés à différents temps de désenkystement : T0h (kystes), T6h, T24h et T72h. Pour chaque temps, nous disposons de 4 gels.

Après coloration au bleu de Coomassie, les 4 gels obtenus pour chaque condition ont été inspectés visuellement et comparés entre eux. Les protéines sélectionnées à l'occasion de l'étude de l'enkystement sont recherchées afin de vérifier que les protéines spécifiques de kystes disparaissaient au cours du désenkystement et que les protéines spécifiques de trophozoïtes réapparaissaient.

Par souci de clarté, nous avons choisi de ne représenter que les images des gels obtenus à partir des extraits T0h, T24h et T72h (Figure 22), le gel obtenu avec l'extrait T6h ne présentant pas de variations majeurs par rapport au gel obtenu avec l'extrait T0h.

L'analyse de ces gels montre qu'au cours du désenkystement, on observe une disparition des protéines spécifiques de kystes (spots 6 à 10) ainsi qu'une réapparition des protéines spécifiques des trophozoïtes (spots 1 à 5) après 72 heures d'incubation dans du PYG.

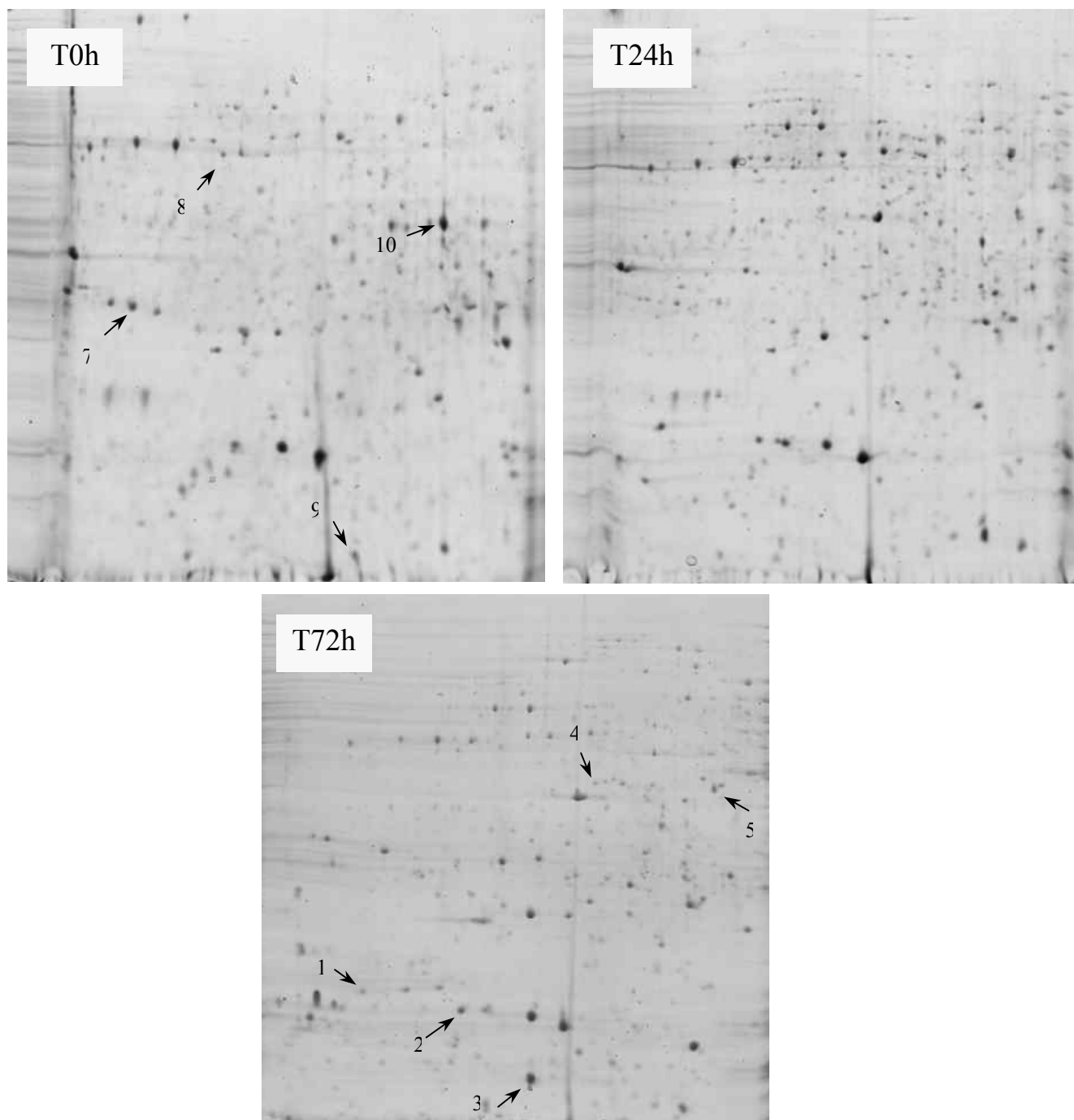


Figure 22 : Gels d'électrophorèse bidimensionnelle obtenus avec les extraits protéiques après 0 h, 24 h et 72 h de désenkystement (coloration bleu de Coomassie). Les flèches noires indiquent les protéines spécifiques de kystes ou de trophozoïtes.

V.1.1.3. Analyse des protéines sélectionnées

Après excision, les spots sont adressés pour identification des protéines à Alain Guillot, Plateau d'Analyse Protéomique par Séquençage et Spectrométrie de masse (PAPSS, Unité de Recherche en Biochimie Bactérienne, INRA, Jouy en Josas, France).

Les protéines contenues dans les spots d'intérêt sont digérées à la trypsine pendant une nuit à 37°C à pH 8. Les peptides extraits sont séparés par chromatographie liquide en phase inverse et analysés par un spectromètre de masse de type trappe.

Les spectres de masse obtenus sont analysés par les techniques décrites dans Matériels et Méthodes. En résumé, deux types d'approches ont été utilisés :

- l'utilisation d'empreintes de fragmentation qui vise à comparer les masses mesurées des peptides fragmentés avec des masses théoriques de fragmentation générées à partir des bases de données
- l'interprétation des spectres de fragmentation MS/MS pour les traduire en séquence primaire d'acides aminés. Les séquences obtenues sont ensuite utilisées pour identifier les protéines par homologie de séquence avec les banques de données.

Cette analyse a ainsi permis d'identifier 10 spots sur les 10 analysés (Tableau 6).

Pour les spots correspondant à des protéines spécifiques des trophozoïtes, l'identification des spots 1, 4 et 5 est sans ambiguïté. Ils correspondent respectivement aux protéines suivantes : l'HTP (Human Tumor Protein), l'EF2 (Elongating Factor 2) et la FBA (Fructose Biphosphate Aldolase). La comparaison des MM et des pI des spots et des protéines identifiées confirme la caractérisation de l'HTP et de la FBA. Cependant les valeurs de MM et de pI de la protéine EF2 ne correspondent pas à celles du spot 4. Il est possible que cette protéine soit hydrolysée ou maturée in vivo aboutissant à l'obtention d'un fragment d'environ 24 kDa au lieu des 93 kDa de la protéine mature.

L'analyse du spot 2, conduit à l'identification de 2 protéines, l'actophorine et la protéine 40S ribosomale S12 (protéine S12). Si l'on compare la MM et le pI de ce spot avec celui des 2 protéines, il ressort que l'actophorine est un meilleur candidat car elle correspond à la fois en MM et en pI. Il est toujours possible dans un spot d'avoir un mélange de protéines. Selon Alain Guillot, même une contamination de 1/1000 sera détectée par spectrométrie de masse et il est difficile de distinguer la protéine majoritaire de la minoritaire. En outre, les protéines

ribosomales sont principalement basiques et elles ont parfois du mal à focaliser en première dimension conduisant à l'apparition de trainées sur le gel. L'ensemble de ces arguments conduit donc à privilégier l'actophorine.

Parmi les spots correspondant à des protéines spécifiques de kystes, l'analyse des spots 9 et 10 conduit à l'identification respective de la filamine B et de la subtilisin-like serine proteinase (SubSP). Cette dernière est cependant synthétisée sous forme d'une protéine de 43 kDa mais sa maturation a été décrite et conduit à l'obtention d'un fragment de 33 kDa (voir ci-dessous).

L'analyse des spots 7 et 8 conduit par contre à l'identification de 2 protéines. Le spot 7 permet l'identification de l'actine et de l'HSP 70. La comparaison des MM et des pI ne permet pas de trancher en faveur de l'une ou l'autre. Le spot 8 permet l'identification de l'actine et de l'énolase. Là encore, la comparaison des MM et des pI ne permet pas de trancher en faveur de l'une ou l'autre.

Enfin, l'analyse du spot 3 et du spot 6 conduit à une séquence protéique identique. Cette séquence est retrouvée dans de nombreuses « glycine-rich RNA-binding proteins » isolées de plantes. Ces protéines ayant des MM et des pI variées, il ne nous est pas possible de confirmer la caractérisation de ces 2 spots par comparaison avec les MM et pI observés sur nos gels. Les spots 3 et 6, isolés sur nos gels, possèdent des MM et des pI très différents, ce qui indique qu'il s'agit bien de deux protéines distinctes. Pour expliquer que ces 2 spots conduisent à la même protéine nous pouvons proposer que cette protéine soit maturée dans les trophozoites et pas dans les kystes, expliquant ainsi la différence de MM et de pI des 2 spots. Il est également possible qu'un de ces 2 spots ait été mal référencés pour l'analyse en spectrométrie de masse.

Tableau 6 : Identification des spots d'intérêt par LC-MS/MS.

		Identification				
		MM apparente	pI estimé	Protéine	MM	pI
Protéines spécifiques de trophozoïtes	Spot 1	18	4,9	Human Tumor Protein (HTP)	19,5	4,8
	Spot 2	16	5,4	Actophorine	15,5	5,9
				Protéine S12	14,9	6,7
	Spot 3	10	5,8	Glycine-rich RNA-binding protein (RBP)	Variable	
	Spot 4	24	5,6	Elongation factor 2 (EF2)	93,3	6,3
Protéines spécifiques de kystes	Spot 5	38	6,7	Fructose biphosphate aldolase (FBA)	38,9	7
	Spot 6	25	4,3	Glycine-rich RNA-binding protein (RBP)	Variable	
	Spot 7	25	5,1	Actine	41,6	5,3
				Heat shock protein 70 (HSP 70)	69,7	5,5
	Spot 8	40	5,5	Enolase	47	5,7
				Actine	41,6	5,3
	Spot 9	7	6,1	Filamine B	92,2	4,7
	Spot 10	33	6,6	Subtilisin-like serine proteinase (SubSP)	43,7	6,6

V.1.1.3.1. Protéines spécifiques de trophozoïtes

L'HTP, identifiée à partir du spot 1, est une protéine de la famille des Translationally-controlled Tumor Proteins (TCTP) humaine. Les protéines de cette famille sont des protéines hautement conservées retrouvées chez tous les organismes eucaryotes. Elles sont connues pour leur importance dans certains processus cellulaires, comme la croissance cellulaire, la progression du cycle cellulaire ou la protection contre le stress et l'apoptose. La première des

fonctions reconnues de ces protéines est la liaison du calcium et la stabilisation des microtubules. D'autre part, les TCTP décrites chez les protozoaires sont impliquées dans la pathogénicité : comme facteurs sécrétés, elles sont responsables d'un processus inflammatoire par stimulation des polynucléaires éosinophiles et relargage d'histamine par les polynucléaires basophiles (Bommer & Thiele, 2004). Il est ainsi possible que la production de cette protéine impliquée dans la croissance et le cycle cellulaire soit réprimée lorsque l'amibe passe d'un état physiologiquement actif à un état de dormance.

L'actophorine est une protéine appartenant au groupe des ADF/cofilines. Ce sont des protéines de faible poids moléculaire ayant une activité de fragmentation des filaments d'actine et de liaison aux monomères d'actine. Décrite chez *A. castellanii* en 1986, cette protéine est impliquée dans la dépolymérisation des filaments d'actine et la stabilisation des monomères d'actine (Cooper *et al.*, 1986). Elle est donc particulièrement impliquée dans le maintien de la forme et les différents mouvements cellulaires (locomotion, phagocytose...). L'identification de cette protéine à partir d'un spot disparaissant au cours de l'enkystement est cohérente : l'actophorine est impliquée dans des mécanismes nécessaires à la forme trophozoïte mais inexistant chez la forme kystique.

La protéine EF2 est un facteur d'élongation essentiel à la synthèse protéique, en intervenant dans la translocation de la protéine en cours de synthèse du site A vers le site P des ribosomes. Il est donc indispensable à la prolifération cellulaire. La synthèse protéique étant diminuée au cours de l'enkystement (Bowers & Korn, 1969), il est donc possible que la production des facteurs impliqués dans cette synthèse protéique soient inhibée. Cependant la différence entre MM réelle et MM estimée pourrait indiquer soit une mauvaise identification de la protéine, soit une maturation post-traductionnelle importante.

La FBA est une enzyme de la glycolyse catalysant la transformation de fructose-1,6-phosphate en glycéraldéhyde-3-phosphate. Cette enzyme est donc nécessaire à la génération d'ATP par la cellule, c'est-à-dire à la production énergétique indispensable aux différentes fonctions cellulaires. La forme kystique est une forme quiescente des amibes, les différentes fonctions cellulaires étant mises au repos pour entrer dans un état de dormance. La modification de l'expression de protéines impliquées dans la glycolyse pourrait permettre une adaptation de la cellule à l'enkystement. Une autre protéine impliquée dans la glycolyse, l'énolase, est d'ailleurs surexprimée dans les kystes (cf. ci-dessous).

Les RNA-binding protéines (RBP) sont des protéines cytoplasmiques et nucléaires s'associant aux ARN afin de former des complexes ribonucléoprotéiques. Les RBP jouent un rôle important dans la stabilisation, la maturation, le transport, la localisation cellulaire, la traduction et la dégradation des ARN. Une famille particulière de RBP, les glycine-rich RNA-binding protéines (GRP), a été identifiée chez de nombreuses variétés de plantes, ces protéines semblant jouer un rôle dans la réponse au stress, leurs ARNm étant augmentés particulièrement après exposition au froid, mais aussi en cas de déplétion hydrique ou d'infections virales (Kim *et al.*, 2007). Jusqu'à présent, les GRP ont été isolées chez les plantes, les cyanobactéries, la souris et l'homme où elles sont induites par l'exposition aux basses températures (Nishiyama *et al.*, 1997). Il est probable que de telles protéines soient présentes chez *Acanthamoeba*, jouant un rôle dans l'adaptation au stress des amibes. Cependant, la même protéine RBP a été identifiée à partir d'un spot exprimé dans les kystes, il est donc difficile de conclure sur la spécificité d'expression (trophozoites ou kystes) de cette protéine.

V.1.1.3.2. Protéines spécifiques de kystes

Les subtilisin-like serine protéases (SubSP) sont des enzymes protéolytiques appartenant à la famille des subtilases, dont on a montré récemment l'implication dans l'enkystement d'*Acanthamoeba*. Ces enzymes sont très répandues chez les procaryotes et les eucaryotes, différentes fonction leur étant attribuées : rôle dans la nutrition et les défenses lorsqu'elles sont sécrétées, maturation protéique lorsqu'elles sont intracellulaires (Nonaka *et al.*, 2004). Une protéine SubSP a déjà été identifiée chez *A. healyi*, et il a été montré qu'elle subissait une maturation après synthèse par coupure d'une séquence signal réduisant la pré-protéine initiale d'une masse de 43 kDa à 33 kDa (Hong *et al.*, 2000), cette MM correspondant exactement à la masse observée sur nos gels. Cette SubSP est connue pour son implication dans la pathogénicité des *Acanthamoeba* (Hong *et al.*, 2000) et d'autres études ont déjà retrouvé une surexpression de son gène dans les kystes (Moon *et al.*, 2008a; Park *et al.*, 2002). La SubSP joue un rôle particulier dans les mécanismes d'enkystement puisque l'ajout de PMSF, un inhibiteur des sérines protéases, ou de siRNA, bloquant l'expression du gène, inhibent la formation des kystes (Moon *et al.*, 2008a). Une autre étude, visant à inihier l'expression ou l'activité de sérines protéases, a montré le rôle de ces enzymes dans l'enkystement. Là encore, des inhibiteurs de protéases comme le PMSF et l'EDTA bloquent

l'enkystement d'*Acanthamoeba* (Dudley *et al.*, 2008). De plus, il a été montré que la SubSP était localisée dans les autophagosomes pendant l'enkystement (Moon *et al.*, 2008a). Ces autophagosomes sont des structures permettant la destruction de composants cellulaires ou molécules n'étant plus nécessaires à la cellule. La localisation de la SubSP dans ces structures suggère son implication dans le phénomène d'autophagie permettant à l'amibe d'éliminer les composants cellulaires non nécessaires à la survie sous forme kystique. Chez *Entamoeba invadens*, il a été démontré l'importance de l'autophagie dans l'enkystement, l'utilisation d'un inhibiteur de la formation des autophagosomes inhibant également l'enkystement des amibes (Picazarri *et al.*, 2008).

L'HSP 70 appartient à la famille des protéines de choc thermique dont le rôle est crucial pour les cellules eucaryotes et procaryotes, car elles assurent la protection, le maintien et la régulation des fonctions des protéines auxquelles elles sont associées. Cette protéine est produite à la suite d'un stress thermique mais aussi à la suite de différentes agressions physiques ou chimiques. L'induction de l'enkystement est réalisée par transfert des trophozoïtes dans un milieu pauvre, ces conditions induisant un stress compatible avec la synthèse d'HSP 70. Il est probable que cette protéine soit importante afin d'assurer la protection de certaines protéines au cours de l'enkystement, pendant lequel un grand nombre de structures cellulaires et protéines sont dégradées par autophagie (Bowers & Korn, 1969).

L'actine est une protéine majeure du cytosquelette des cellules eucaryotes. Les amibes de genre *Acanthamoeba* sont particulièrement riches en actine puisqu'elle représente 15 % du poids total en protéines (Gordon *et al.*, 1976). C'est une protéine retrouvée sous 2 formes dans la cellule : l'actine G (globulaire) qui est la forme monomérique et l'actine F (filamenteuse) correspondant aux monomères d'actine G polymérisés. Associée à différentes protéines régulatrices, l'actine est impliquée dans le maintien de la forme cellulaire, la division cellulaire, la migration ou la phagocytose. Il est donc logique que son expression ou sa polymérisation soit affectée au cours de l'enkystement. Par contre, une diminution de sa synthèse a été montrée au cours de l'enkystement (Jantzen, 1981). Finalement, l'identification de l'actine dans 2 spots (spots 7 et 8) peut être le résultat d'une contamination de nos spots par des traînées d'actine, cette protéine étant très abondante.

L'énolase est une métalloenzyme, dont le cofacteur est le magnésium, catalysant la transformation du 2-phosphoglycérate en phosphoénolpyruvate au cours de la glycolyse. Dans l'étude de Moon, une surexpression de cette enzyme a été montrée au cours de l'enkystement

(Moon *et al.*, 2007). Par ailleurs, l'énolase de *Toxoplasma gondii* est également surexprimée au cours de l'enkystement (Coppin *et al.*, 2003). Il nous paraît logique que l'activité métabolique des formes kystiques étant extrêmement réduite, la synthèse des enzymes impliquées dans la glycolyse doit être modulée. Nos résultats suggèrent des mécanismes de régulation complexes de la glycolyse, certaines enzymes étant réprimées, d'autres surexprimées, ceci afin d'orienter le métabolisme amibien vers d'autres synthèses au cours de l'enkystement, et peut-être vers la synthèse de la cellulose qui constitue la molécule principale de la paroi des kystes.

La filamine B est une protéine comportant un domaine N-terminal liant l'actine, suivi d'une série de motifs répétés d'environ 10 kDa dont le nombre varie en fonction des espèces. Le spot identifié correspond à un de ces motifs, il correspond donc probablement à la filamine B maturée ou à une autre protéine possédant ce motif. Cette protéine, retrouvée chez tous les eucaryotes, agit en maintenant le réseau d'actine par liaison avec les filaments d'actine et intervient dans l'organisation et la stabilisation de ces réseaux en les reliant aux protéines et récepteurs membranaires. De plus, elle est impliquée dans la transduction des différents signaux reçus par la cellule par interaction avec de nombreuses molécules de la signalisation cellulaire. Chez *Dictyostelium*, elle est en effet impliquée dans les phénomènes de phototactisme (Khaire *et al.*, 2007). C'est probablement son rôle dans la signalisation cellulaire qui peut expliquer l'identification de cette protéine à partir d'un spot spécifique de kyste, le transfert des amibes dans le TEnk activant très probablement différentes voies de signalisation.

L'analyse des protéines dont l'expression est induite dans les kystes n'a pas permis de retrouver la CSP21, qui était au début du travail la seule protéine spécifique de kystes décrite dans la littérature. Ce résultat est explicable par nos conditions opératoires. Nous avons en effet utilisé un gradient de pH compris entre 4 et 7, afin d'obtenir une meilleure séparation de nos spots, et la CSP21 a un pI de 9,2. Il est donc logique de ne pas la retrouver parmi les protéines spécifiques de kystes que nous avons analysées.

V.1.2. Expression des gènes

L'étude de l'expression des gènes des protéines sélectionnées précédemment a été réalisée dans le but d'observer si les modifications d'expression des protéines identifiées par LC-MS/MS sont corrélées à une modification de la quantité des ARNm correspondants. La détermination de l'expression des ARNm en fonction du temps d'enkystement a été réalisée avec 3 extraits d'ARN distincts (soit 3 cultures distinctes) et à 4 temps d'enkystement différents (T0h, T6h, T24h et T8j).

Les expressions des gènes correspondants aux protéines d'intérêt ainsi que des 2 gènes de référence choisis (18S et TPBF) sont étudiées sur chaque échantillon par RT-PCR. Le gène 18S est classiquement utilisé comme gène de référence pour de nombreux organismes et dans de nombreuses conditions. Néanmoins, une publication a montré que, au cours de l'enkystement, le gène TPBF avait une expression stable contrairement au gène 18S. Nous avons également inclus à nos tests les amorces correspondant au gène de la CSP21 (Cyst Specific Protein de 21kDa). Cette protéine étant spécifique des kystes, elle est utilisée comme témoin pour valider nos résultats.

Les résultats obtenus sont exprimés en nombre de cycles de PCR (ou Ct pour « Cycle Threshold ») nécessaires pour que la quantité d'ADN amplifié soit suffisante et que la fluorescence soit détectable. Ainsi, plus la quantité d'ARN initiale est faible, plus le nombre de cycles de PCR nécessaire au dépassement du seuil de fluorescence sera élevé. Inversement, une grande quantité d'ARN initiale donnera un Ct bas.

Concernant les 2 gènes de référence, les résultats obtenus (Tableau 7) montrent que l'expression du gène codant le TPBF semble plus stable au cours de l'enkystement que celle du gène codant l'ARNr 18S, comme cela a été montré précédemment (Orfeo & Bateman, 1998). En effet, dans nos conditions opératoires, nous n'observons qu'une variation d'un cycle de PCR entre les 4 temps testés pour le TPBF alors que la différence observée pour le 18S entre T0h et T8j atteint 3 cycles de PCR.

Nous avons donc choisi d'utiliser l'expression du gène du TPBF comme référence pour l'étude de l'expression des gènes codant pour les protéines sélectionnées. Ainsi, pour chaque gène étudié, les valeurs de nombre de cycles obtenues sont ajustées par rapport aux valeurs obtenues pour le TPBF (Tableau 8).

Tableau 7 : Variation de l'expression des ARNm du 18S et du TPBF au cours de l'enkystement d'*A. castellanii*.

	Moyenne des Ct $\pm$ écart-type			
	T0h	T6h	T24h	T8j
18S	15,58 $\pm$ 3,51	14,48 $\pm$ 2,29	13,84 $\pm$ 1,19	12,73 $\pm$ 0,49
TPBF	28,89 $\pm$ 0,69	28,15 $\pm$ 2,10	28,30 $\pm$ 1,62	27,81 $\pm$ 1,49

Tableau 8 : Variation de l'expression des ARNm des protéines d'intérêt d'*A. castellanii* au cours de l'enkystement après correction par rapport au gène de référence (TPBF).

		Moyenne des Ct $\pm$ écart-type			
		T0h	T6h	T24h	T8j
Protéines spécifiques de trophozoïtes	HTP	23,28 $\pm$ 1,43	22,77 $\pm$ 1,15	21,94 $\pm$ 1,98	23,60 $\pm$ 1,27
	Actophorine	31,55 $\pm$ 1,76	31,05 $\pm$ 1,37	29,50 $\pm$ 2,16	34,78 $\pm$ 2,57
	Protéine S12	27,54 $\pm$ 2,66	27,58 $\pm$ 1,95	26,95 $\pm$ 2,71	30,14 $\pm$ 2,81
	EF2	24,19 $\pm$ 1,29	24,15 $\pm$ 1,82	23,87 $\pm$ 1,14	24,84 $\pm$ 1,79
	FBA	23,56 $\pm$ 3,40	22,89 $\pm$ 2,41	22,59 $\pm$ 2,11	24,58 $\pm$ 1,38
	RBP	26,95 $\pm$ 2,17	28,06 $\pm$ 1,05	27,15 $\pm$ 2,73	28,76 $\pm$ 1,19
Protéines spécifiques de kystes	HSP 70	26,38 $\pm$ 1,53	27,31 $\pm$ 2,23	25,66 $\pm$ 3,02	27,08 $\pm$ 1,26
	Enolase	25,38 $\pm$ 2,47	24,46 $\pm$ 1,70	24,59 $\pm$ 1,21	27,22 $\pm$ 1,67
	Filamine	23,57 $\pm$ 2,33	23,58 $\pm$ 1,78	24,31 $\pm$ 2,39	27,40 $\pm$ 1,43
	SubSP	33,76 $\pm$ 5,89	34,13 $\pm$ 5,63	29,52 $\pm$ 5,31	32,23 $\pm$ 9,95
	CSP 21	>41	>41	34,87 $\pm$ 2,35	>41

Les ARN ont été quantifiés à différents temps d'enkystement, de 0 heures à 8 jours. Cependant, ce dernier point correspond à des cellules sous forme kystes dans lesquelles le métabolisme est par définition ralenti. Ainsi, nous avons choisi de n'évaluer les variations des quantités d'ARN que pendant les 24 premières heures de l'enkystement.

L'analyse de ces résultats (Tableau 8) montre que les variations d'expression observées au cours de l'enkystement pour les gènes sélectionnés sont peu importantes par comparaison avec les résultats retrouvés avec la CSP21.

Pour les gènes codant l'HTP, la protéine S12, l'EF2, la FBA, la RBP, l'HSP 70, l'énolase et la filamine, la variation maximale (ΔCt) est inférieure à 2 cycles entre 0 et 24 heures d'enkystement, différence qui ne nous semble pas suffisamment importante pour être prise en compte. Les gènes pour lesquels la variation d'expression est la plus importante ($\Delta Ct > 2$) sont les gènes codant pour l'actophorine et la SubSP.

Pour l'actophorine, on observe une diminution d'environ 2 cycles entre T0h et T24h, ce qui correspond à une quantité d'ARNm de l'actophorine 4 fois supérieure dans les kystes de 24 heures que dans les trophozoïtes. Cette protéine ayant été identifiée à partir d'un spot disparaissant au cours de l'enkystement, elle paraît spécifique de la forme trophozoïte. Il est donc étonnant d'observer une augmentation de ces ARNm dans les premiers stades de l'enkystement.

Pour la SubSP, nous observons une diminution de l'expression des ARNm de plus de 4 cycles entre T0h et T24h, ce qui correspond à une quantité d'ARNm 16 fois supérieure dans les kystes précoces que dans les trophozoïtes. Par la suite, comme pour la CSP 21, la quantité de ces ARNm diminue de façon importante après 24 heures. Nos résultats suggèrent que la SubSP est une protéine surexprimée dans les premiers stades de l'enkystement. Ceci est en accord avec les données de la littérature évoquant un rôle de cette protéine dans les premiers stades de l'enkystement (Moon *et al.*, 2008b).

L'analyse des résultats confirme au niveau des ARNm les résultats obtenus par Hirukawa concernant la protéine CSP21. Dans nos conditions opératoires, les ARNm codant cette protéine sont indétectables à T0h, c'est-à-dire dans les formes trophozoïtes. Les ARNm

deviennent détectables après 24 heures d'enkystement, puis leur nombre diminue de nouveau pour être indétectable dans les kystes de 8 jours. Ces résultats sont comparables à ceux décrits par Hirukawa *et al.* qui avaient observé l'accumulation d'ARNm codant la CSP 21 après 12 heures d'enkystement suivie de l'apparition de la protéine (Hirukawa *et al.*, 1998). Ils décrivent également une limitation de l'expression de ces ARNm aux premiers stades de l'enkystement puisqu'ils observent leur disparition dans les kystes de 7 jours, suggérant que la biosynthèse de la CSP21 soit régulée au niveau des ARNm. Ils font alors l'hypothèse que cette protéine serait impliquée dans les premiers stades de l'enkystement, comme par exemple la biosynthèse de la paroi kystique.

Nous préférons cependant rester prudents sur l'interprétation de ces résultats de quantification d'ARN, peu de variations ayant été retrouvées et les résultats obtenus pour l'actophorine semblant contradictoires avec notre analyse protéique. Finalement, la corrélation entre expression protéique et quantité des ARNm correspondants n'est pas toujours retrouvée et, pour étudier un phénomène biologique, il est plus intéressant de suivre la quantité des protéines.

V.1.3. Conclusion

L'analyse des mécanismes précis menant à l'enkystement est nécessaire afin de trouver des thérapeutiques ou des biocides capables d'empêcher la formation des kystes. Nos résultats suggèrent que la différenciation des amibes induit : 1) une augmentation de la quantité de la SubSP au cours de l'enkystement ; 2) une réorientation du métabolisme au niveau de la glycolyse ; 3) une modification de l'organisation du cytosquelette.

Dans l'étude récente de Moon *et al.*, l'analyse comparative des EST des formes trophozoïte et kystique a mis en évidence l'implication de certaines protéines déjà décrites chez différents protozoaires comme liées au phénomène d'enkystement (la CSP21, la protéine kinase C, le protéasome et l'ubiquitine), ou de nouvelles protéines (la culline 4, la protéine autophagique 8, l'énolase, la SubSP et les enzymes de conjugaison d'ubiquitine) (Moon *et al.*, 2008b). Nos résultats sont en accord avec cette étude concernant l'expression de l'énolase et de la SubSP.

D'une part, nos résultats, associés à ceux obtenus par Moon *et al.*, montrent que la SubSP possède un rôle important dans les premières phases de l'enkystement. Une étude effectuée chez *Entamoeba invadens*, montre que le traitement des trophozoïtes par un inhibiteur des sérines protéinase affecte clairement l'enkystement de ce protozoaire. De plus, cette inhibition semble liée à la perturbation de la synthèse de chitine indispensable à la formation de la paroi kystique. Les auteurs concluent à une probable implication des sérines protéinases dans l'activation de la forme zymogène de la chitine synthase (Riahi & Ankri, 2000). Chez *Acanthamoeba*, la paroi kystique est composée de cellulose et non de chitine comme chez les autres protozoaires formant des kystes (Linder *et al.*, 2002). Par des mécanismes proches, la SubSP pourrait être impliquée dans la formation de la paroi cellulosique des kystes d'*Acanthamoeba* par un mécanisme inconnu, expliquant sa surexpression dans les premières phases de l'enkystement uniquement.

Nous faisons l'hypothèse d'une implication de la SubSP dans la synthèse de la cellulose de la paroi kystique. La cellulose est un composé polysaccharidique majeur de la paroi kystique d'*Acanthamoeba*, représentant plus de 30% des composants de l'endokyste. Elle est formée de chaînes linéaires de glucose liées par des liaisons β -1,4. Les trophozoïtes stockent le glucose au cours de leur croissance sous forme de glycogène. Il a été démontré que ce glycogène représente la source de glucose, utilisée pour la synthèse de cellulose pendant la formation de la paroi kystique, et que le glycogène est la macromolécule la plus rapidement dégradée dans les premières phases de l'enkystement (Weisman *et al.*, 1970). Chez les mammifères, la dégradation du glycogène est régulée par l'activation et l'inactivation d'une glycogène phosphorylase. Cette enzyme a été retrouvée chez *Acanthamoeba*, et de façon intéressante, l'expression de son gène est limitée à la phase précoce de l'enkystement (entre 8 et 24 heures post-induction) (Lorenzo-Morales *et al.*, 2008). Les auteurs ont également montré qu'une inactivation de cette enzyme inhibait l'enkystement. Il est possible que la SubSP intervienne dans la maturation de la glycogène phosphorylase, permettant son activation et l'induction de la dégradation du glycogène indispensable à la synthèse de la cellulose.

D'autre part, la modification de l'expression de l'énolase et de la FBA au cours de la différenciation suggère une réorientation de la glycolyse. La surexpression de l'énolase a déjà décrite au cours de l'enkystement d'*Acanthamoeba*. Les mécanismes précis pouvant expliquer

cette modulation de la quantité des enzymes de la glycolyse, avec une variation différente de la FBA et de l'énolase, nous sont cependant inconnus. Il est possible, là encore, que ces enzymes aient un rôle sur la synthèse de la cellulose. En effet, le contrôle de ces enzymes peut modifier la voie de la glycolyse et moduler la quantité de glucose qui sera disponible pour la synthèse de la cellulose.

Récemment, chez *Saccharomyces cerevisiae*, une nouvelle fonction a été attribuée à l'énolase. Indépendamment de sa fonction catalytique dans la glycolyse, elle interviendrait dans le transport des tRNA vers les mitochondries de la levure (Entelis *et al.*, 2006). Il est possible également que la surexpression de l'énolase au cours de l'enkystement soit liée à une fonction autre que sa fonction dans la glycolyse.

Enfin, quatre protéines, identifiées par électrophorèse bidimensionnelle, ont un lien avec la formation du cytosquelette : l'actophorine, l'actine, filamine B et l'HTP. Il est logique que la différenciation modifie l'organisation du cytosquelette. Une étude a d'ailleurs montré que l'action d'un inhibiteur de la polymérisation de l'actine, la cytochalasine D, bloquait l'enkystement de *Balamuthia mandrillaris* (Siddiqui *et al.*, 2007). Comme pour les protéines impliquées dans la glycolyse, nous ne connaissons pas les mécanismes précis expliquant les variations des protéines liées à l'organisation du cytosquelette. Cependant, il est logique de penser que d'importantes modifications de l'expression des protéines impliquées ont lieu, le passage d'une forme mobile et métaboliquement active à une forme en dormance bouleversant probablement le cytosquelette ambien.

D'une manière générale, la mise en évidence de protéines impliquées dans l'enkystement ainsi que la définition de leur rôle précis sont indispensables à une meilleure compréhension de ces mécanismes. De telles protéines sont en effet des cibles potentielles pour l'élaboration de molécules capables de bloquer ce processus d'enkystement. Par exemple, l'utilisation de molécules inhibant l'activité de la SubSP, comme le PMSF ou l'EDTA, pourrait être envisagée pour limiter l'enkystement.

V.2. Recherche de molécules induisant le désenkystement

L'objectif de cette partie était de tenter de caractériser certaines conditions nutritives capables d'induire le désenkystement d'*A. castellanii*.

Dans des études préliminaires réalisées au Laboratoire de Parasitologie du CHU de Poitiers (données non montrées), il avait été démontré que parmi les différents composants du milieu de culture des amibes, le PYG (Protéose peptone / Yeast nitrogen base / Glucose), seule la protéose peptone induisait le désenkystement de kystes d'*A. castellanii*, *A. culbertsoni* et *A. hatchetti*.

Ce composant est un lysat protéique complexe rendant difficile l'identification d'un élément particulier induisant le désenkystement. Nous avons donc choisi de nous inspirer d'un milieu défini, le DGM-21A (Schuster, 2002)., milieu minimum permettant la multiplication des amibes et composé d'acides aminés, de glucose, de différents sels et vitamines en concentrations définies. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'effet des différents composants de ce milieu sur le désenkystement.

Dans un premier temps, nous avons défini les conditions nous permettant d'observer le moins de désenkystement (définition du témoin « négatif »). Puis, dans un deuxième temps, nous avons recherché s'il existait un ou plusieurs composants plus particulièrement impliqués dans le phénomène de désenkystement. Les expérimentations réalisées dans cette partie de nos travaux sont résumées sur la figure 23.

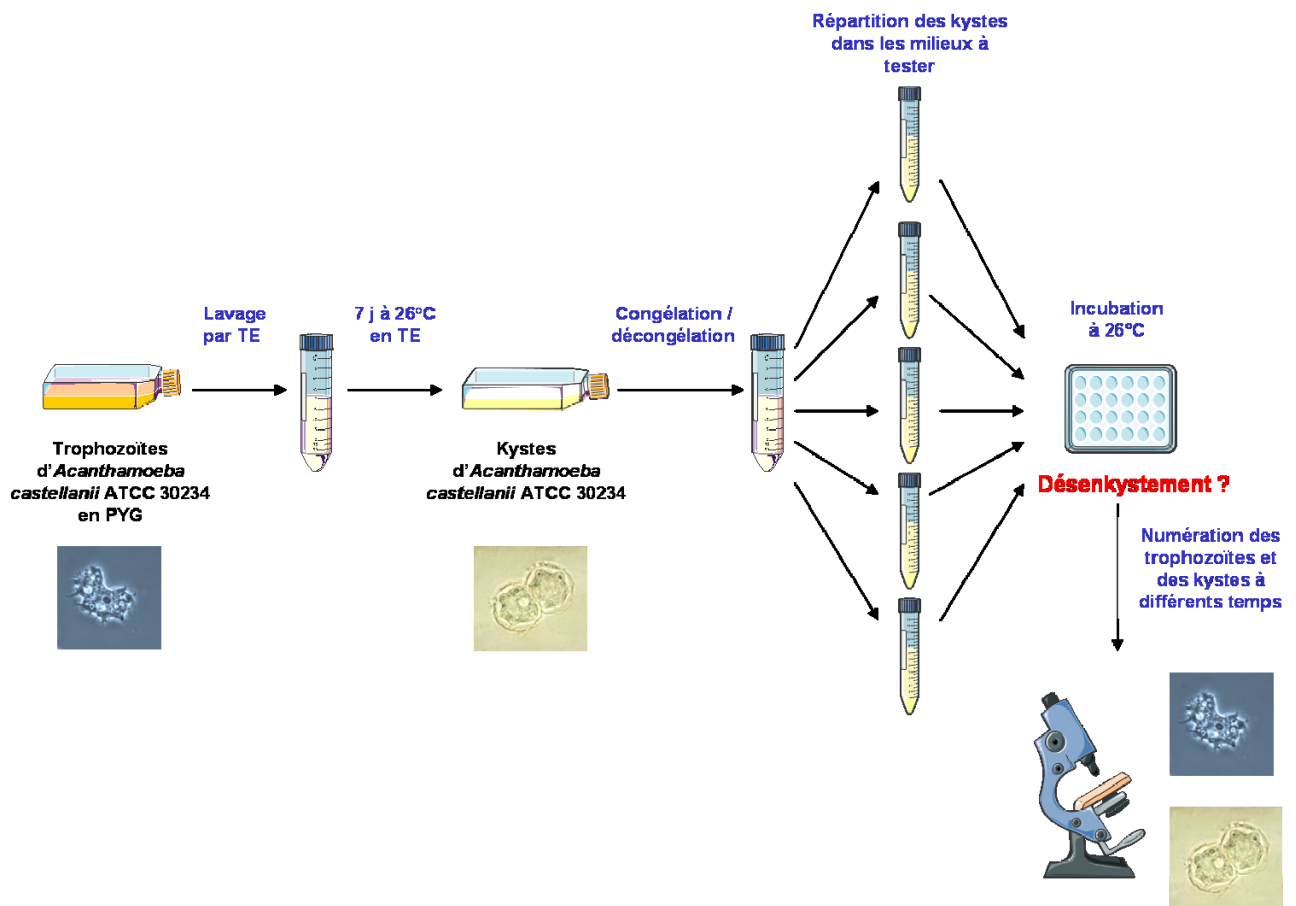


Figure 23 : Protocole suivi pour l'étude du désenkystement d'*A. castellanii*.

V.2.1. Définition des conditions opératoires et du témoin « négatif »

Afin de vérifier l'effet des composants du DGM-21A sur le désenkystement, il est important de définir des conditions opératoires dans lesquelles le désenkystement éventuel est uniquement lié aux éléments étudiés. Pour cela, différents milieux sont testés afin de rechercher un milieu dans lequel on observe le moins de désenkystement.

Nous avons choisi de tester 3 milieux :

- eau distillée stérile
- KCl 0.1M (concentration isotonique pour *Acanthamoeba*, (Neff *et al.*, 1964))
- tampon d'enkystement (TEnk)

Ces 3 milieux sont testés comparativement au milieu de culture PYG, utilisé comme témoin « positif » du désenkystement. Chaque suspension de kystes dans chacun des milieux

à tester est distribuée dans les puits d'une microplaque 24 puits, puis la plaque est incubée à 26°C pendant 2 jours.

Le nombre de trophozoïtes et de kystes est évalué par comptage en cellule de Kova à J0, J1 et J2 (Figure 24). Chaque milieu est évalué en triplicata.

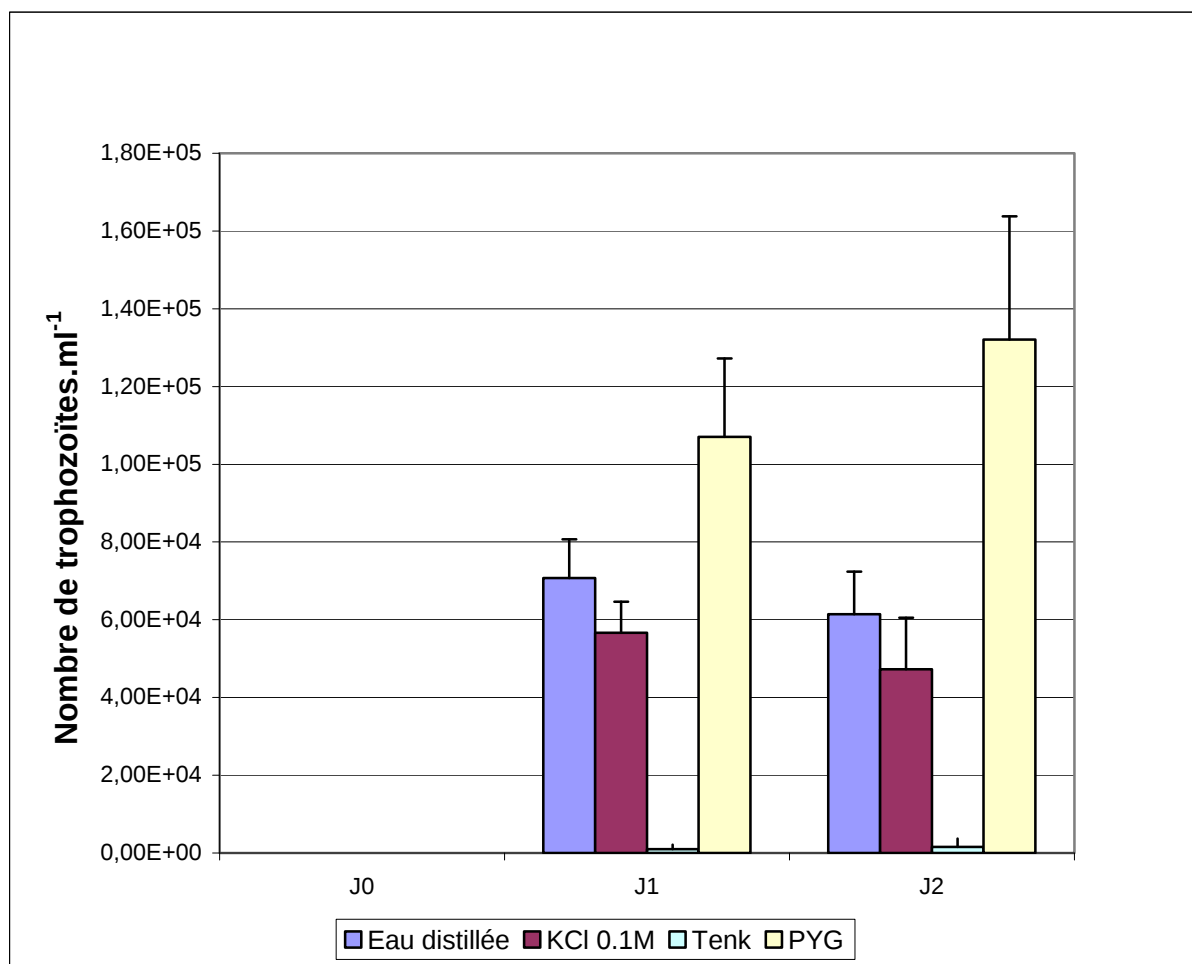


Figure 24 : Numération des trophozoïtes apparus au cours du temps en fonction du milieu testé.

Parmi les 4 milieux testés, on observe un taux de désenkystement important à J1 dans l'eau distillée, le KCl 0,1 M et le PYG (21,25%, 16,94% et 29,32% respectivement). A J2, le nombre de trophozoïtes continue à augmenter uniquement dans le PYG. Le seul milieu dans lequel nous n'observons pas de désenkystement est le Tenk (0,23% à J1 et 0,44% à J2).

Ce résultat est surprenant, l'eau distillée et le KCl 0,1 M n'étant pas des milieux nutritifs. Cependant, il a été démontré que la différenciation n'est pas uniquement liée à la présence ou l'absence de nutriments. L'enkystement d'*A. castellanii* peut être induit dans un milieu riche par ajout de glucose en concentration hyperosmolaire (Cordingley *et al.*, 1996). L'absence d'éléments nutritifs n'est donc pas une condition suffisante à l'induction de l'enkystement, l'amibe étant également capable de sentir des variations d'osmolarité.

Chez *Dictyostelium discoideum*, une amibe dont les formes de résistance sont des spores, une adenylyl cyclase est décrite comme agissant comme un osmorécepteur régulant la germination des spores. La pression osmotique active cet osmorécepteur, provoquant une accumulation d'AMPc à l'intérieur des spores, ce qui inhibe la germination et favorise donc l'état de dormance de l'amibe (van Es *et al.*, 1996). De la même façon, il est possible que chez *Acanthamoeba*, des osmorécepteurs soit présents et puissent capter les variations d'osmolarité du milieu, déclenchant les mécanismes du désenkystement.

Cependant, les variations d'osmolarité n'expliquent pas à elles seules le désenkystement obtenu après transfert des kystes dans l'eau distillée, un désenkystement important étant également observé dans le KCl 0,1 M, alors que ce milieu possède une osmolarité proche de celle du Tenk. Afin d'éviter un désenkystement non lié à l'élément testé, nous avons donc choisi d'utiliser le Tenk comme milieu de base pour préparer les solutions à tester, l'induction d'un éventuel désenkystement étant alors uniquement lié à l'élément ajouté.

V.2.2. Rôle des composants du milieu DGM-21A

Les différents composants du milieu DGM-21A ont été testés séparément ou associés afin de déterminer l'influence de chacun sur le désenkystement d'*A. castellanii* ATCC 30234.

Chaque suspension de kystes dans chacun des milieux à tester est distribuée dans les puits d'une microplaque 24 puits, puis la plaque est incubée à 26°C pendant 7 jours.

Le nombre de trophozoïtes et de kystes est évalué par comptage en cellule de Kova à J0, J1, J2, J3, J5 et J7. Chaque milieu est évalué 2 fois en triplicata. Les résultats sont exprimés en pourcentage de désenkystement (Figures 25 et 26), soit :

$$\% \text{ de désenkystement} = 100 \times (\text{nombre de trophozoïtes} / \text{nombre total de cellules})$$

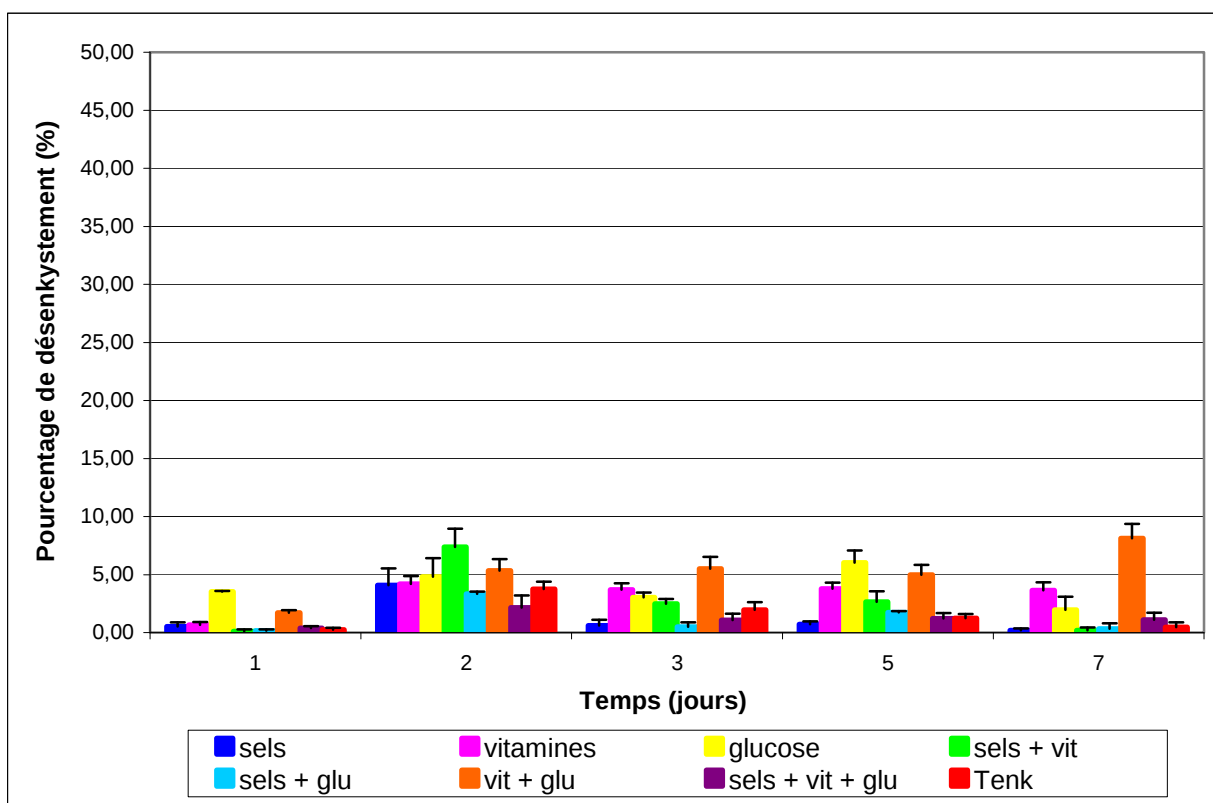


Figure 25 : Pourcentage de désenkystement en fonction des différents composants du milieu DGM-21A : milieux sans acides aminés.

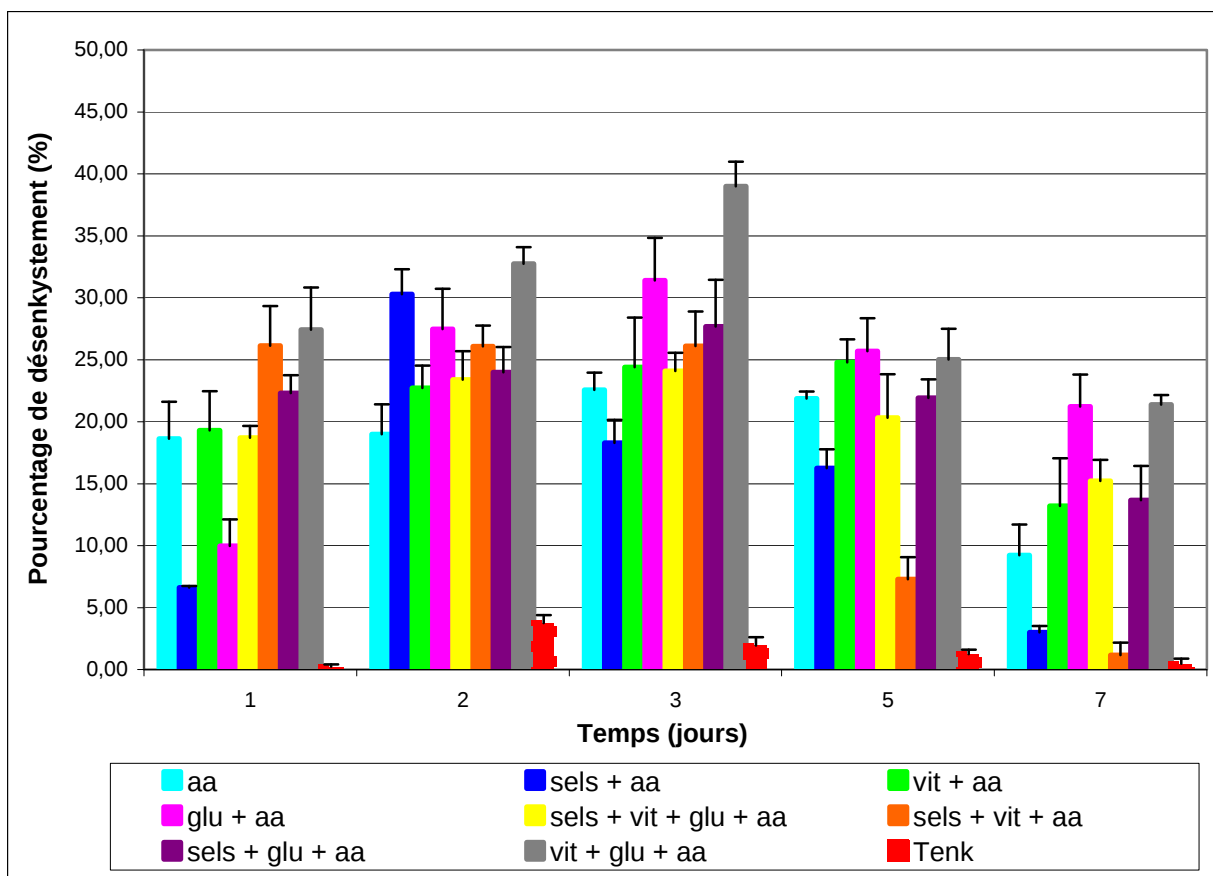


Figure 26 : Pourcentage de désenkystement en fonction des différents composants du milieu DGM-21A : milieux avec acides aminés.

Par souci de clarté, les résultats obtenus avec les milieux sans acides aminés sont représentés sur la figure 25 et ceux contenant les acides aminés sur la figure 26. Ainsi, on observe clairement qu'en l'absence d'acides aminés dans le milieu, le désenkystement est faible. Par contre, dans les milieux contenant des acides aminés et quel que soit le ou les autres composants associés, les amibes semblent percevoir un signal induisant le désenkystement.

Peu d'études ont été menées jusqu'à présent afin de déterminer les éléments responsables du déclenchement de ce désenkystement. Une étude ancienne avait montré qu'un milieu contenant uniquement de la riboflavine et 5 acides aminés (acide glutamique, tryptophane, isoleucine, sérine et proline) permettait d'induire le désenkystement d'une amibe libre, *Schizopyrenus russelli* (Rastogi *et al.*, 1973). De même, une autre étude montrait que les kystes d'*A. culbertsoni* se désenkystaient en présence de peptone, de tryptone ou d'acides

aminés (Kaushal & Shukla, 1977). Plus récemment, une étude plus complète a recherché plus précisément les facteurs du désenkystement. Certaines fractions d'extraits bactériens, en particulier les fractions riches en acides aminés, se sont montrées efficaces pour induire le désenkystement d'*A. culbertsoni* (Krishna-Murti & Shukla, 1984).

Il nous a donc semblé intéressant d'étudier l'effet des acides aminés sur le désenkystement, afin de tenter d'isoler un ou plusieurs acides aminés ayant un rôle déterminant dans ce phénomène.

V.2.3. Rôle des acides aminés

V.2.3.1. Groupe d'acides aminés choisis en fonction de critères physico-chimiques

Nous avons choisi dans un premier temps de tester les acides aminés en les répartissant par groupes en fonction de critères physico-chimiques ; 9 groupes d'acides aminés ont été testés :

- acides aminés hydrophobes (méthionine, phénylalanine, tryptophane, tyrosine, histidine, lysine, thréonine, leucine, isoleucine, valine, cystéine, alanine, glycine).
- acides aminés aromatiques (phénylalanine, tryptophane, tyrosine, histidine).
- acides aminés aliphatiques (valine, leucine, isoleucine).
- acides aminés polaires (tyrosine, tryptophane, histidine, lysine, thréonine, cystéine, sérine, asparagine, acide aspartique, acide glutamique, glutamine, arginine).
- acides aminés basiques (histidine, lysine, arginine).
- acides aminés acides (acide aspartique, acide glutamique).
- petits acides aminés (valine, cystéine, proline, thréonine, acide aspartique, asparagine).
- très petits acides aminés (alanine, glycine, sérine, cystéine).
- 21 acides aminés.

Ces milieux sont testés comparativement au milieu de culture PYG, utilisé comme témoin « positif » du désenkystement et au TEnk, utilisé comme témoin « négatif ».

Chaque suspension de kystes dans chacun des milieux à tester est distribuée dans les puits d'une microplaque 24 puits, puis la plaque est incubée à 26°C pendant 7 jours.

Le nombre de trophozoïtes et de kystes est évalué par comptage en cellule de Kova à J0, J1, J2, J3, J5 et J7. Chaque milieu est évalué 2 fois en duplicata. Les résultats (Figure 27) sont exprimés en pourcentage de désenkystement.

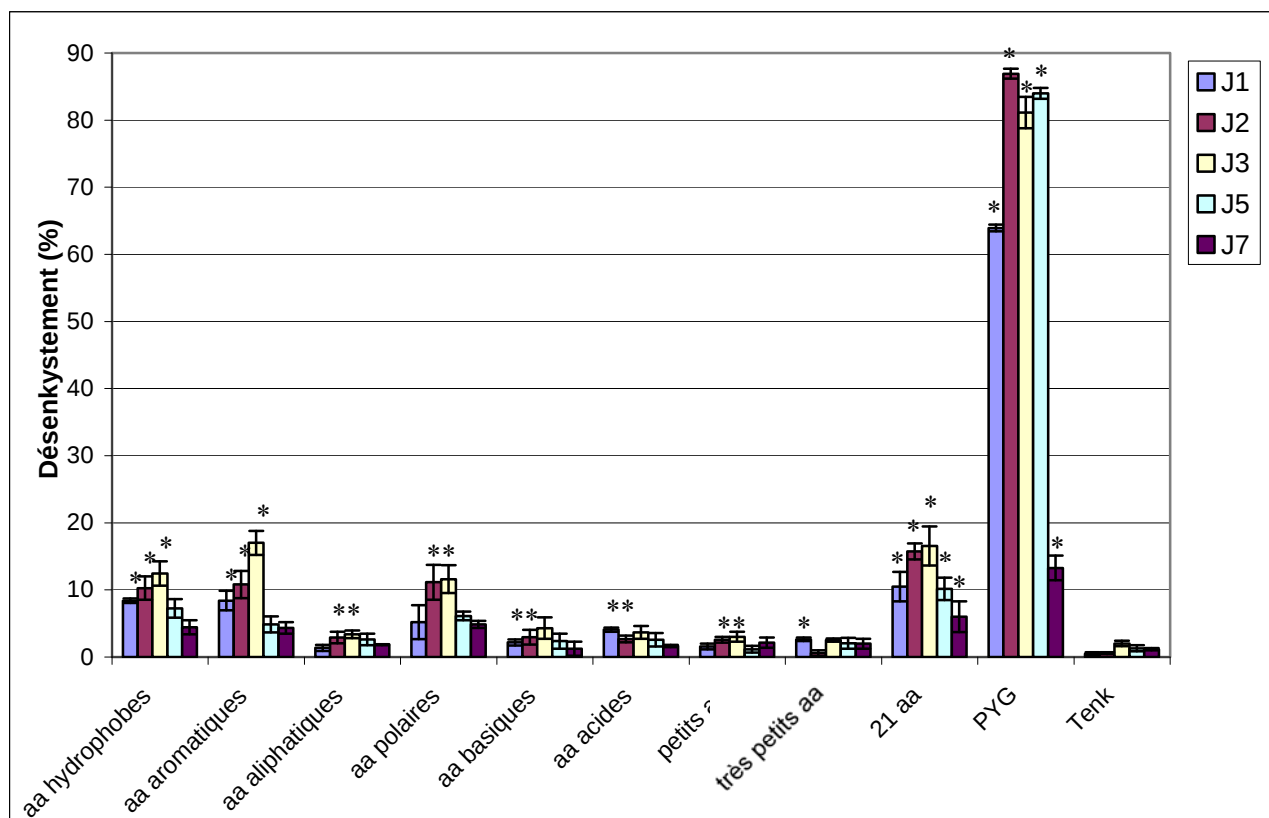


Figure 27 : Pourcentage de désenkystement d'*A. castellanii* en fonction des groupes d'acides aminés testés (* Test de Student, $p < 0.05$ par comparaison au Tenk).

Nous observons un désenkystement dans certains des milieux testés pendant les 3 premiers jours d'incubation, suivi d'un réenkystement, probablement par épuisement du milieu. Il nous semble donc nécessaire de limiter l'étude du désenkystement à 3 jours dans les expérimentations suivantes.

Pendant les 3 premiers jours, la plupart des milieux testés induisent un désenkystement significatif par rapport au Tenk, le désenkystement étant quasi nul dans ce tampon.

Les résultats obtenus à J3 montrent un pourcentage de désenkystement de 16,54% dans

le milieu contenant les 21 acides aminés. Parmi les 8 autres milieux testés, on retrouve un pourcentage de désenkystement à J3 significativement différent du TEnk avec 4 milieux, les acides aminés hydrophobes, les acides aminés aromatiques, les acides aminés aliphatiques et les acides aminés polaires (12,45 %, 17,01%, 3,37% et 11,61% respectivement). Cependant, malgré la significativité du résultat obtenu avec les acides aminés aliphatiques, on note que le taux de désenkystement obtenu avec ce milieu reste faible, 3,37% contre plus de 10% avec les 3 autres milieux.

La composition de ces 3 autres milieux est comparée. Il en ressort que 3 acides aminés sont communs : la tyrosine, le tryptophane et l'histidine. Nous avons émis l'hypothèse que ces acides aminés pourraient jouer un rôle particulier dans l'induction du désenkystement. Des tests supplémentaires sont alors réalisés pour étudier l'effet de ces 3 acides aminés seuls ou associés sur le désenkystement.

V.2.3.2. Rôle de la tyrosine, du tryptophane et de l'histidine

Afin d'étudier l'effet de ces 3 acides aminés sur le désenkystement, différents milieux ont été testés :

- histidine + tryptophane + tyrosine (His+Trp+Tyr)
- tryptophane seul (Trp)
- tyrosine seule (Tyr)
- histidine seule (His)
- phénylalanine seule, acide aminé non commun aux trois groupes d'acides aminés isolés précédemment, utilisé comme témoin « négatif » (Phe)
- 21 acides aminés (21aa)

Le mode opératoire est le même que pour l'expérience précédente, le nombre de trophozoïtes et de kystes étant évalué à J1, J2 et J3. Chaque milieu est testé 3 fois en triplicata. Les résultats (Figure 28) sont exprimés en pourcentage de désenkystement.

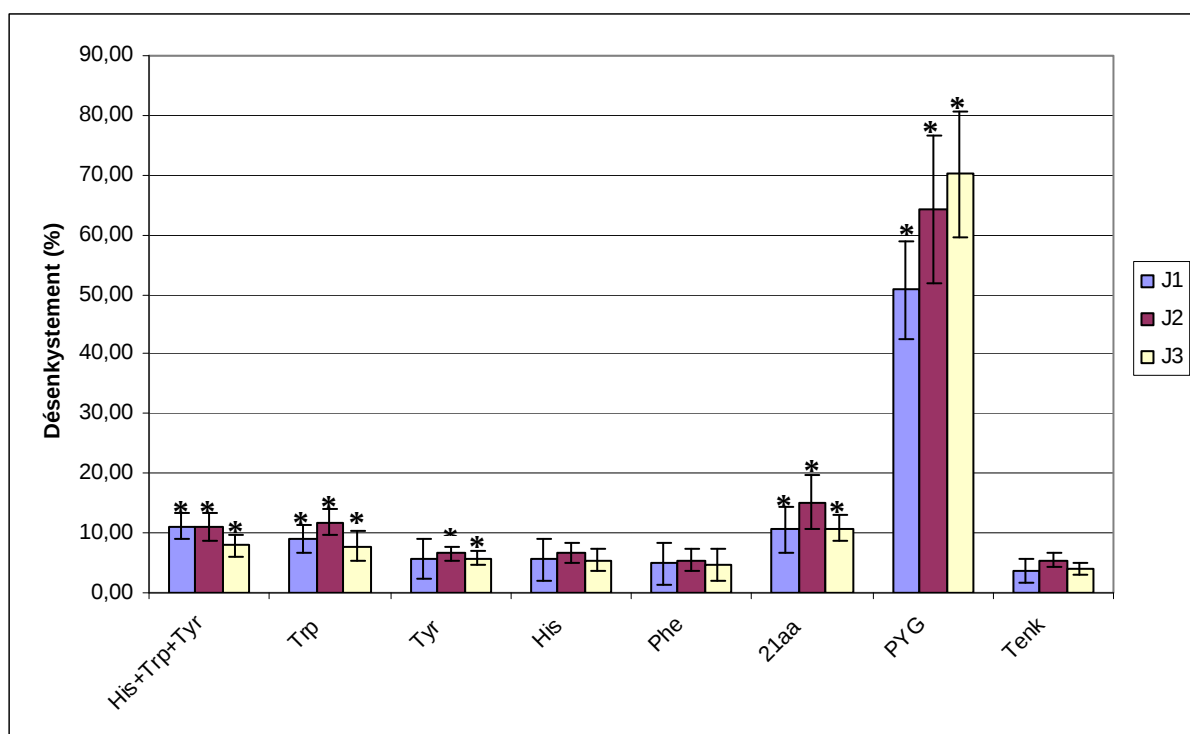


Figure 28: Pourcentage de désenkystement d'*A. castellanii* en fonction des acides aminés testés (* Test de Student, $p < 0.05$ par comparaison au Tenk).

Les résultats obtenus montrent que, à J1, seuls les milieux contenant du tryptophane (milieux « His + Trp + Tyr », « Trp » et « 21aa ») sont capables d'induire un pourcentage de désenkystement significativement différents par rapport au Tenk.

On note également que le milieu « Trp », comme les milieux « His + Trp + Tyr » et « 21aa », est significativement supérieur au Tenk pour induire le désenkystement sur les 3 jours de l'étude.

A J2 et J3, l'analyse statistique montre un pourcentage de désenkystement dans le milieu « Tyr » significativement supérieur à celui obtenu dans le Tenk ($p = 0.04$ à J2, $p = 0.01$ à J3). Cependant, les valeurs de désenkystement observées à J2 restent bien inférieures aux milieux contenant du tryptophane (6,57% contre 11,01% pour le milieu « His + Trp + Tyr » et 11,81% pour le milieu « Trp »). De plus, l'analyse montre que les pourcentages de désenkystement obtenus à J1 et J2 dans les milieux « 21aa » et « Trp » sont comparables ($p = 0.3$ à J1, $p = 0.06$ à J2) alors que la comparaison entre les milieux « Tyr » et « 21aa » montre une différence significative ($p = 0.01$ à J1, $p < 0.001$ à J2).

Ces résultats montrent également une diminution du taux de désenkystement à J3, pour la majorité des milieux testés (excepté le PYG). Ce phénomène pourrait être expliqué par la pauvreté du milieu dans lequel se retrouvent les trophozoïtes fraîchement désenkystés. En effet, les milieux testés sont préparés à partir de TEnk additionné de différents acides aminés. Les fortes concentrations en sels de ces milieux testés ne sont pas des milieux propices à la survie des formes végétatives ce qui pourrait induire un réenkystement. Les acides aminés utilisés ici, et en particulier le tryptophane, semble donc être des signaux pouvant induire le désenkystement sans pouvoir cependant permettre à lui seul la survie de la forme végétative de l'amibe.

Au total, ces résultats suggèrent que le tryptophane seul possède un effet sur l'induction du désenkystement, sans pouvoir pour autant assurer la croissance amibienne. Afin de conforter ce résultat, nous avons étudié par la suite l'effet d'une déplétion en tryptophane sur le désenkystement.

V.2.3.3. Rôle du tryptophane

Afin de vérifier le rôle particulier supposé du tryptophane sur le désenkystement, nous avons choisi de tester l'effet de la suppression du Trp sur le milieu contenant les 21 acides aminés.

Pour cela, les milieux testés sont :

- 20 acides aminés sans tryptophane (21 - Trp)
- tryptophane (Trp)
- 21 acides aminés (21aa)

Le mode opératoire est le même que pour l'expérience précédente. Chaque milieu est évalué 3 fois en triplicata. Les résultats (Figure 29) sont exprimés en pourcentage de désenkystement.

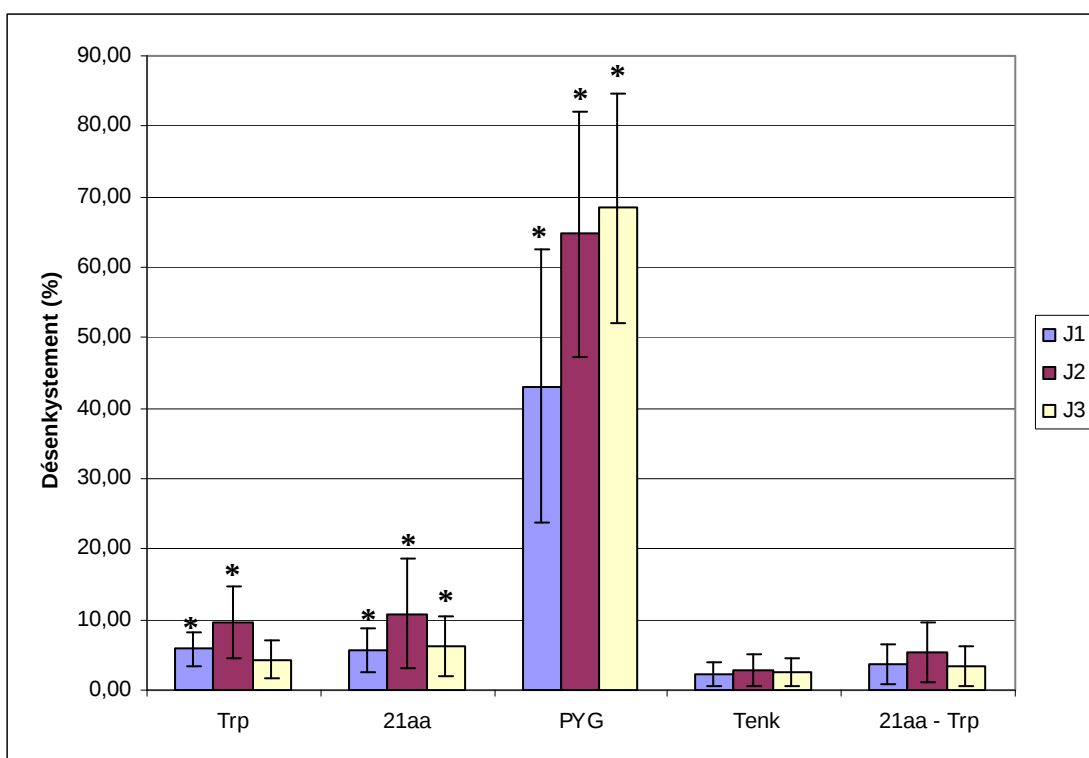


Figure 29 : Pourcentage de désenkystement d'*A. castellanii* en fonction de la présence de tryptophane (* Test de Student, $p < 0.05$ par comparaison au Tenk).

Ces résultats montrent, comme précédemment, un désenkystement significatif dans les milieux « 21aa » et « PYG » pendant les 3 jours de l'expérience.

Le milieu « Trp » induit un désenkystement superposable à celui obtenu avec le milieu « 21aa », ces 2 milieux étant significativement différents du Tenk à J1 et J2. Concernant le milieu déplété en tryptophane, l'analyse statistique ne met pas en évidence de différence significative entre ce milieu et le Tenk.

Ce résultat suggère donc une fois de plus une importance particulière de cet acide aminé dans l'induction du désenkystement.

V.2.3.4. Rôle de la concentration en tryptophane

Afin de savoir si l'effet induit par le tryptophane était « concentration-dépendant », nous avons testé une concentration de cet acide aminé dix fois supérieure.

Les milieux testés sont les suivants :

- tryptophane (Trp)
- tryptophane 10X (10Trp)
- 21 acides aminés (21aa)

Le mode opératoire est le même que pour l'expérience précédente. Chaque milieu est évalué en triplicata. Les résultats (Figure 30) sont exprimés en pourcentage de désenkystement.

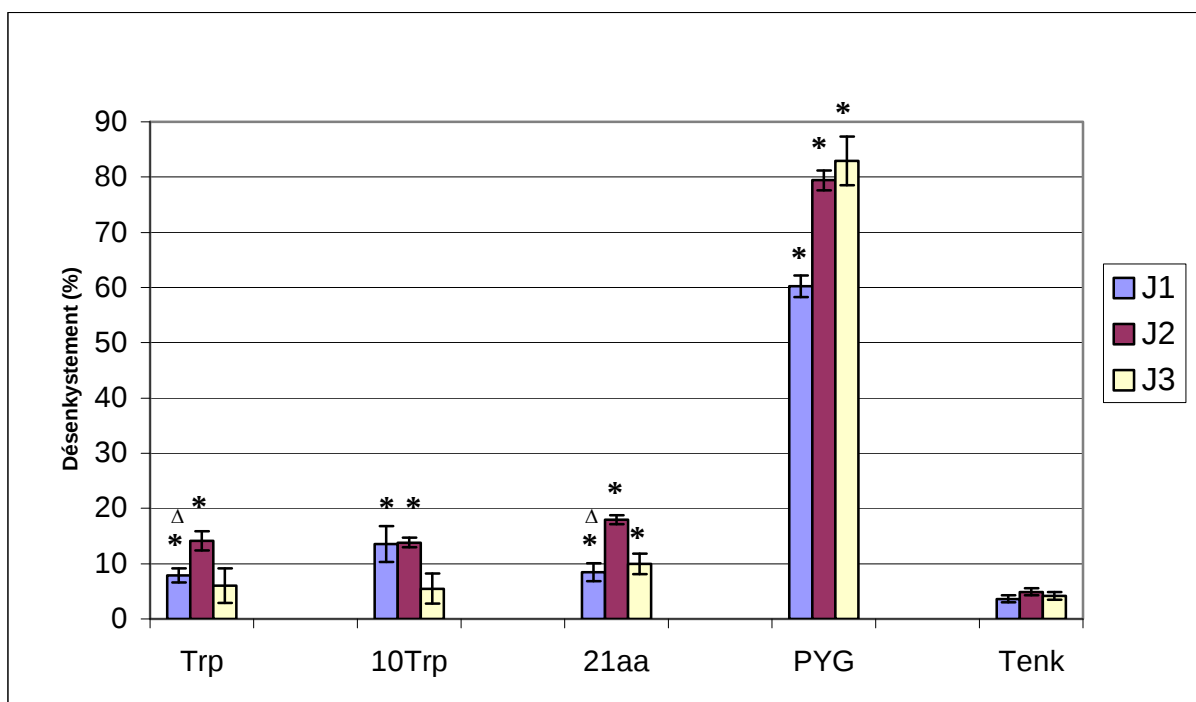


Figure 30 : Pourcentage de désenkystement d'*A. castellanii* en fonction des milieux testés. (* Test de Student, $p < 0.05$ par comparaison au Tenk, $\Delta p < 0.05$ par comparaison au milieu « 10Trp »).

L'analyse statistique des résultats montre que les milieux « Trp » et « 10Trp », comme les milieux « 21aa » et « PYG », induisent un désenkystement significatif par rapport au Tenk.

Nos résultats montrent également un désenkystement significativement plus important dans le milieu 10 fois concentré en tryptophane par rapport au milieu « Trp » et au milieu « 21aa » ($p=0,01$ et $p=0,04$ respectivement) mais uniquement au premier jour.

Dans nos conditions, il est possible que la forte concentration de tryptophane induise plus rapidement le désenkystement mais que le pourcentage final de désenkystement ne soit pas modifié.

V.2.4. Conclusion

Au début de notre étude, peu de données récentes étaient disponibles concernant les mécanismes conduisant au désenkystement des amibes libres. Comme pour d'autres protozoaires parasites, l'enkystement est un phénomène de défense pour les amibes libres, lui permettant de se protéger des conditions environnementales hostiles, en particulier la déplétion nutritive, en évoluant vers un état de dormance. Il est connu depuis longtemps que ces protozoaires enkystés peuvent quitter leur état de dormance quand les conditions redeviennent favorables à la survie des formes végétatives, c'est-à-dire en présence d'un environnement riche (Chavez-Munguia *et al.*, 2007).

Les acides aminés sont indispensables à la croissance amibienne, comme le montrent les différents milieux « minimum » utilisables pour les cultures d'*Acanthamoeba* et composés uniquement d'acides aminés, de glucose et de vitamines. Parmi les acides aminés, certains semblent plus importants que d'autres, certains de ces milieux ne contenant parfois que 6 acides aminés (Schuster, 2002). L'effet des acides aminés sur le désenkystement des amibes libres a également été démontré (Kaushal & Shukla, 1977; Rastogi *et al.*, 1973), une seule étude ayant recherché l'implication plus particulière de certains de ces acides aminés chez *Acanthamoeba*. Dans cette étude, l'acide glutamique, la sérine, la thréonine et l'alanine ont montré l'activité la plus importante (Krishna-Murti & Shukla, 1984).

Nos résultats sont en adéquation avec ces observations : dans nos conditions expérimentales, parmi les différents composants du milieu DGM-21A, seuls les acides aminés sont capables d'induire un désenkystement significatif d'*A. castellanii*. Nous avons montré également que le tryptophane seul a un effet comparable au milieu contenant les 21 acides aminés. L'effet particulier du tryptophane n'avait pourtant pas été mis en évidence dans

l'étude de Krishna-Murti, mais cet acide aminé était retrouvé dans le milieu étudié par Rastogi.

Le tryptophane est un acide aminé aromatique, apolaire et hydrophobe. C'est le précurseur de la sérotonine, hormone décrite comme étant produite par certains protozoaires. Ainsi, l'étude des amibes de genre *Tetrahymena* a révélé la production de différentes hormones par ces amibes (insuline, calcitonine, histamine, sérotonine...) ainsi que de récepteurs à ces hormones et de systèmes de transduction du signal. Dans le cas de la sérotonine, elle interviendrait dans différents processus physiologiques et en particulier, il a été démontré son effet sur l'augmentation de l'activité phagocytaire de *Tetrahymena* (Csaba, 2008). Il est envisageable que des systèmes identiques soient présents chez *Acanthamoeba*, et que le tryptophane, éventuellement par le biais de la synthèse de sérotonine, soit impliqué dans certains processus physiologiques comme le désenkystement. Chez un autre protozoaire parasite, *Trypanosoma*, le tryptophane est un élément indispensable à la croissance *in vitro* et intervient dans la synthèse de facteurs de pathogénicité de ce parasite (Vincendeau *et al.*, 1999).

V.3. Survie de *L. pneumophila* Lens en association à *A. castellanii* ATCC 30234

De nombreuses études ont démontré le rôle prépondérant des amibes libres dans la prolifération de bactéries pathogènes dans l'environnement aqueux. Certaines bactéries ont en effet élaboré des mécanismes de résistance à la phagocytose par les amibes libres et utilisent l'environnement intracellulaire pour se multiplier. Ce phénomène est démontré pour *L. pneumophila* et permet à cette bactérie exigeante de proliférer dans l'environnement.

La protection et la résistance de *L. pneumophila* dans l'environnement est assurée par différents phénomènes comme la formation de biofilms ou le passage à un état VBNC. Il semble que les amibes libres puissent également jouer un rôle dans la protection de cette bactérie depuis la description par certains auteurs de bactéries intra-kystiques (Kilvington et Price, 1990 ; Greub et Raoult, 2003), suggérant la possibilité pour les bactéries de rester dans l'amibe au cours de son enkystement et d'être ainsi protégées par les structures kystiques très résistantes.

Dans cette étude, notre but est d'étudier les mécanismes permettant la survie de *L. pneumophila* dans un milieu pauvre quand elle est associée à *A. castellanii* ATCC 30234, en faisant l'hypothèse que cette survie était liée aux kystes.

Les différentes étapes de l'étude de la survie de *L. pneumophila* à l'intérieur des amibes sont résumées dans la figure 31.

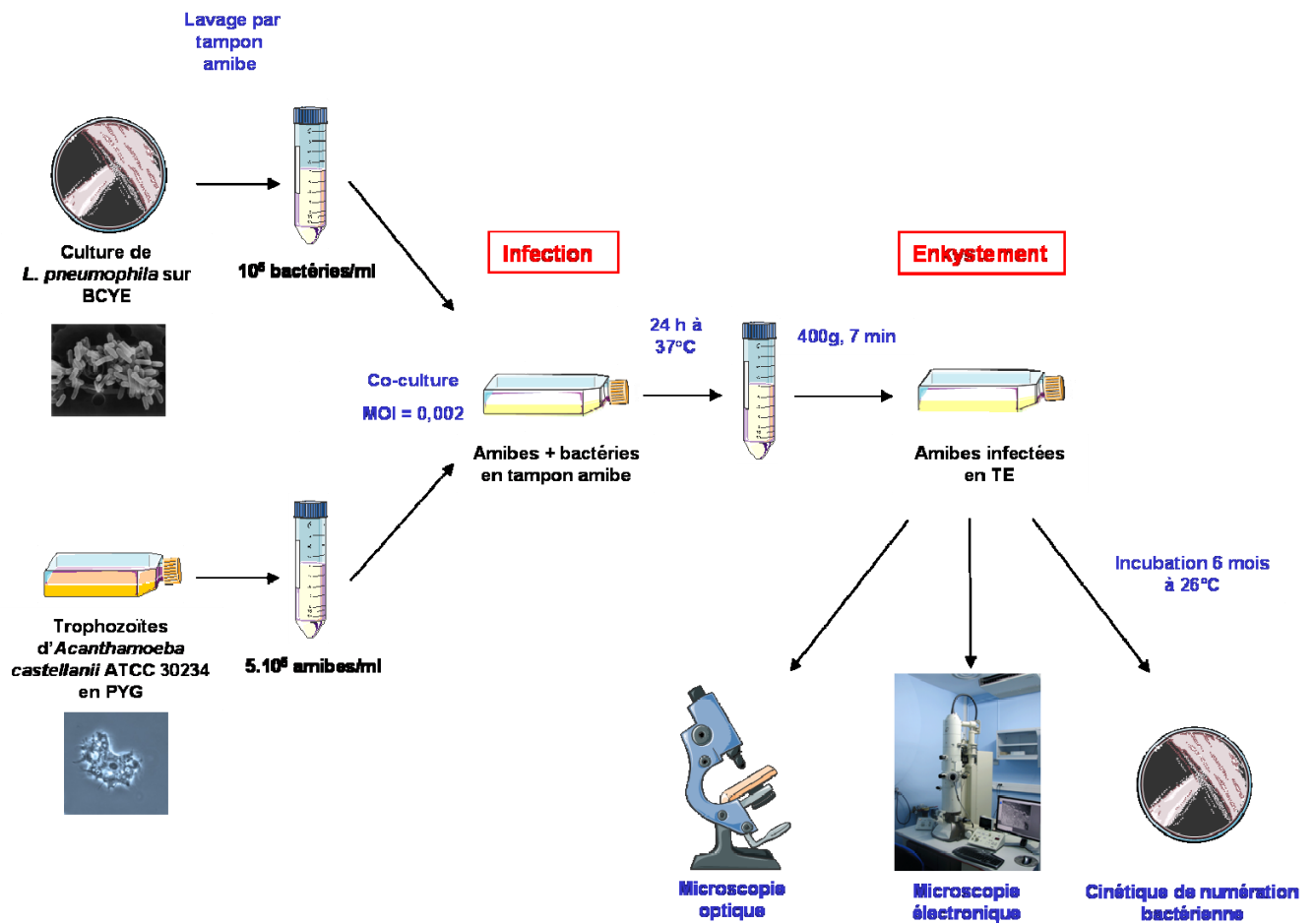


Figure 31 : Protocole d'étude de la survie de *L. pneumophila* en association avec les amibes libres.

V.3.1. Cinétique de survie de *L. pneumophila* Lens en présence des amibes

Les co-cultures sont réalisées en utilisant une MOI très faible, protocole inspiré des travaux de Steinert *et al.* (la majorité des bactéries ajoutées est considérée internalisée par les amibes, ce qui permet d'éviter une étape de traitement par la gentamicine des co-cultures afin d'éliminer les bactéries non internalisées) (Steinert *et al.*, 1998).

Après 24 heures de co-culture en TA, les suspensions d'amibes infectées sont centrifugées à 400 g pendant 7 minutes puis remises en suspension dans du TEnk afin d'induire leur enkystement. Un échantillon contrôle, contenant uniquement des *Legionella*, est réalisé en parallèle afin d'évaluer la survie de *L. pneumophila* seule dans ce milieu pauvre.

Afin de suivre la survie de *L. pneumophila* Lens au cours du temps, 100 µl de la co-culture et des témoins sont dilués et ensemencés sur 2 géloses BCYE après différents temps d'incubation (1, 2, 3, 4, 5, 7, 11, 15, 30, 60, 120, 180 jours). Les géloses sont incubées 5 jours à 37°C sous 5% de CO₂ puis le nombre de UFC est déterminé (Figure 32).

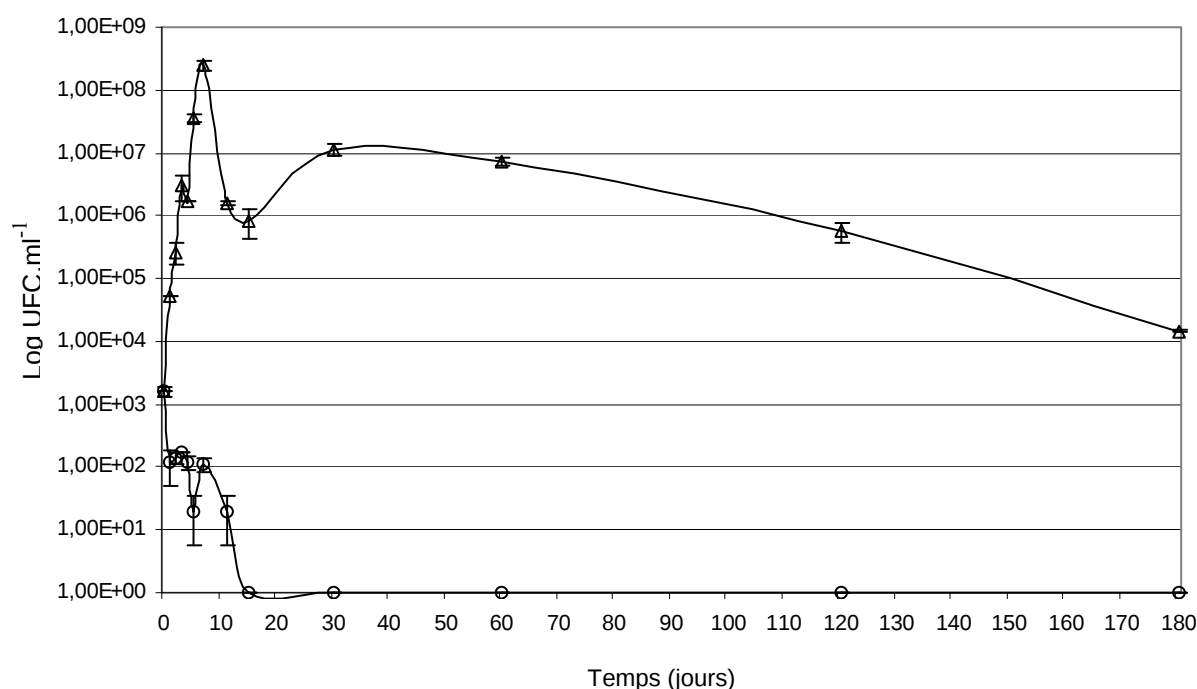


Figure 32 : Survie de *L. pneumophila* Lens associée à *A. castellanii* ATCC 30234 dans le TEnk. Les barres d'erreur représentent l'écart type entre 2 expériences. Δ : *L. pneumophila* Lens en co-culture avec *A. castellanii* ATCC 30234 ; O : *L. pneumophila* Lens seule.

Dans l'échantillon d'amibes infectées, *L. pneumophila* se multiplie pendant les 7 premiers jours. Il est reconnu que les amibes libres et en particulier *Acanthamoeba*, sont des hôtes privilégiés pour *L. pneumophila* facilitant leur multiplication dans l'environnement. Le transfert des cocultures après J1 dans un milieu pauvre (TEnk) n'affecte pas cette multiplication puisque la croissance de *L. pneumophila* dans nos flasques reste très importante pendant les 7 premiers jours de l'étude.

Le nombre de bactéries viables diminue ensuite entre le 7^{ème} et le 15^{ème} jour, pour de nouveau augmenter entre le 15^{ème} et le 30^{ème} jour. Notre hypothèse concernant cette observation est qu'après 7 jours, le TEnk a induit l'enkystement des amibes, les trophozoïtes ont donc disparu. Les bactéries libérées dans le milieu après multiplication intra-amibienne ne peuvent plus réinfecter de nouvelles amibes. Ces bactéries ne sont donc plus protégées par les amibes et leur temps de survie dans le TEnk diminue, expliquant la décroissance du nombre de bactéries après 7 jours.

Concernant la stabilisation et la ré-augmentation du nombre de bactéries après 15 jours, nous pensons qu'après disparition des bactéries libres dans le milieu, ne persistent que les bactéries associées à certaines structures amibiennes. Il est possible que dans ces structures, les bactéries aient encore la capacité de se multiplier, expliquant l'augmentation d'un log entre le 15^{ème} et le 30^{ème} jour. Par la suite, les bactéries semblent entrer dans un état de quiescence, avec une décroissance très progressive de leur nombre pendant les 6 mois de l'étude.

De façon intéressante, un nombre important de bactéries viables ($1,45.10^4$.ml⁻¹ soit 10 fois plus que l'inoculum de départ) est retrouvé en culture après 180 jours d'incubation. Au contraire, on remarque dans le contrôle « *L. pneumophila* seule » une disparition rapide (après 11 jours d'incubation) du nombre de bactéries cultivables.

Ces résultats démontrent clairement que *L. pneumophila* ne peut pas se multiplier et survivre seule dans un milieu pauvre comme le TEnk. Par contre, dans nos conditions opératoires, son association avec *A. castellanii* ATCC 30234 permet d'une part une multiplication importante de la bactérie mais aussi une survie à long terme d'au moins 6 mois.

V.3.2. Etude de la localisation des bactéries

Afin de vérifier l'hypothèse selon laquelle les légionelles seraient internalisées et protégées à l'intérieur des kystes, nous avons analysé des échantillons de nos co-cultures en microscopie électronique à différents temps d'incubation afin de déterminer la localisation des bactéries. Une sélection des images observées est représentée sur les figures 32, 33 et 34.

Pendant les 3 premiers jours d'enkystement, seules des formes trophozoïtes sont observées, quelques unes étant infectées par *L. pneumophila* (Figure 33).

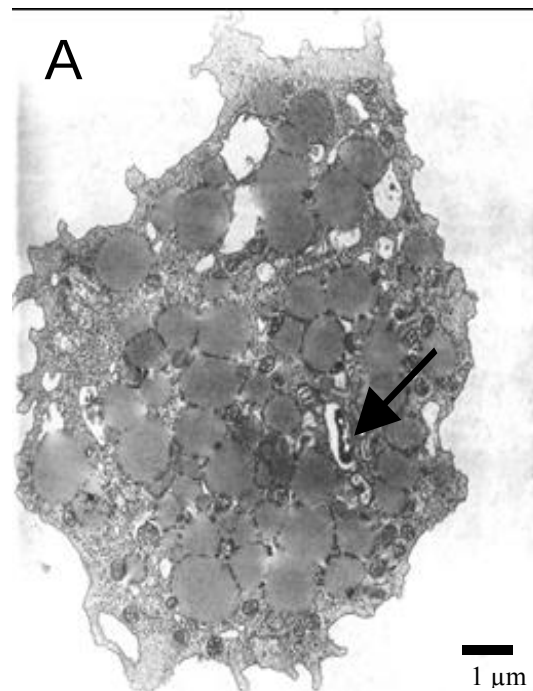


Figure 33 : Trophozoïte d'*A. castellanii* infecté après 1 jour d'incubation. La bactérie est indiquée par une flèche noire.

Après 4 jours, des formes kystiques matures d'*A. castellanii* apparaissent (Figure 34C) ainsi que des structures particulières ne ressemblant ni aux trophozoïtes, ni aux kystes et contenant des bactéries. Ces structures sont morphologiquement semblables aux vésicules précédemment décrites dans certaines études portant sur les amibes infectées (Berk *et al.*, 1998). Ces vésicules infectées sont retrouvées libres dans le milieu (Figure 34B). Leur taille varie entre 2 et 8 μm de diamètre. De façon intéressante, nous observons des structures de

taille comparable et contenant également des bactéries, les vacuoles répliques, dans le cytoplasme de certains trophozoïtes à ce stade de co-culture (Figure 34A).

L'observation concomitante de ces deux types de structures remplies de bactéries suggère que vésicules et vacuoles répliques pourraient être une même entité, les vésicules étant en fait des vacuoles répliques rejetées dans le milieu par les amibes au cours de leur enkystement.

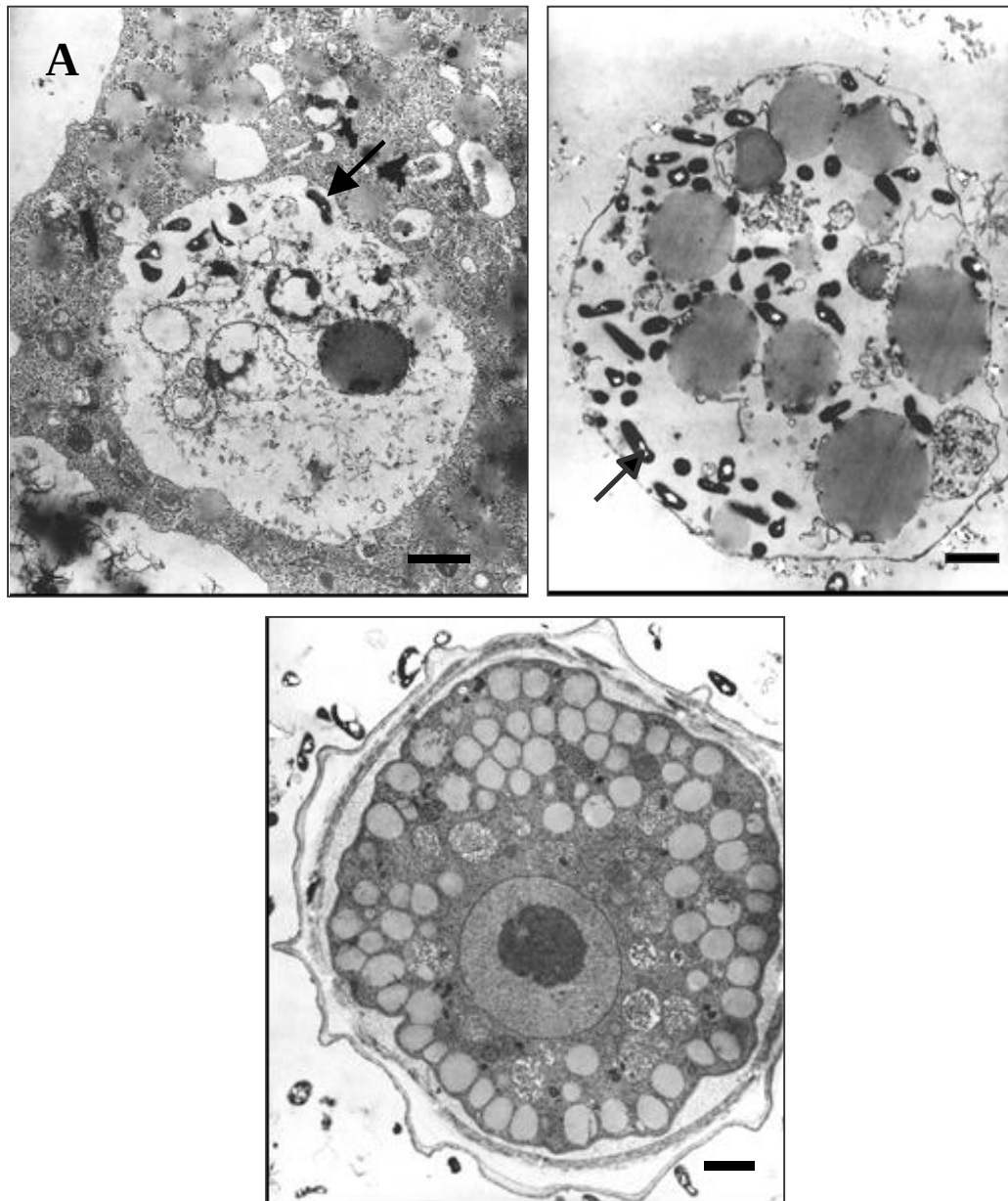


Figure 34 : Suspension d'*A. castellanii* infectées après 4 jours d'incubation : (A) bactéries dans une vésicule à l'intérieur d'un trophozoïte d'*Acanthamoeba*, (B) vésicule extracellulaire contenant des légionelles, (C) kyste mature non infecté. Les bactéries sont indiquées par une flèche noire.

Après 7 jours, seuls des kystes et des vésicules sont retrouvés dans le milieu, *L. pneumophila* n'étant retrouvée qu'à l'intérieur des structures vésiculaires (résultats non montrés).

Après 180 jours, les vésicules infectées sont encore retrouvées dans le milieu (Figure 35B). Malgré une morphologie clairement affectée, les bactéries contenues dans ces vésicules sont encore viables, puisque l'ensemencement des suspensions à J180 sur BCYE montre la croissance de nombreuses colonies et que les bactéries ne sont observées que dans ces vésicules infectées.

Bien que nous ayons observé une centaine de kystes (Figures 34C et 35A), nous n'avons observé aucun kyste infecté au cours des différents prélèvements effectués.

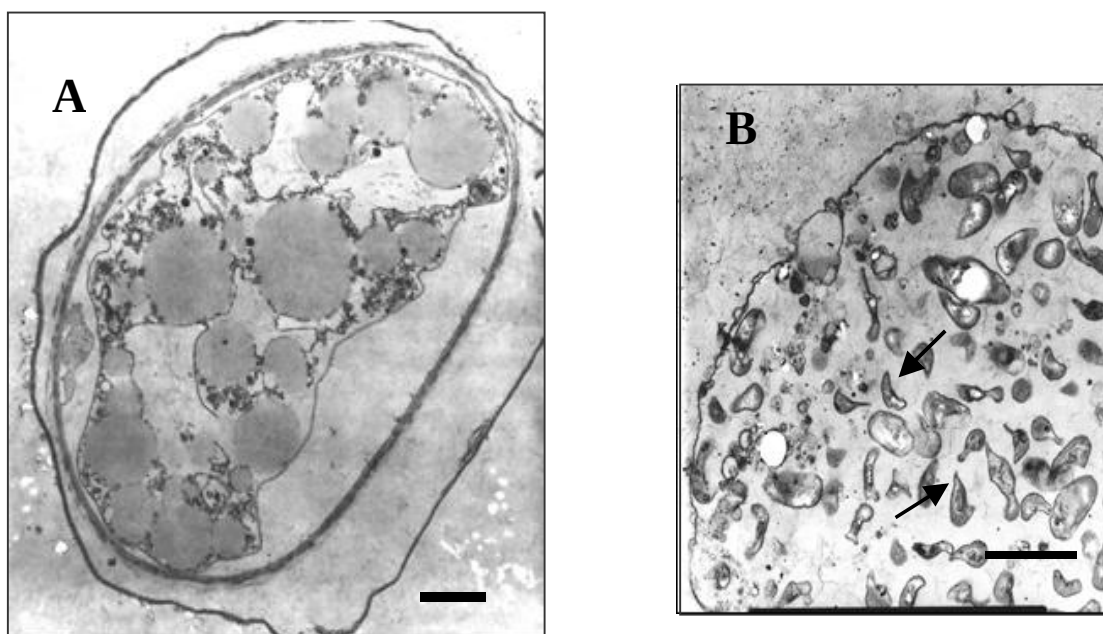


Figure 35 : Suspension d'*A. castellanii* infectées après 180 jours d'incubation : (A) kyste mature non infecté, (B) vésicule extracellulaire contenant des légionelles. Les bactéries sont indiquées par une flèche noire.

Ces résultats montrent que la survie de *L. pneumophila* dans nos conditions semble liée à la production de vésicules, plutôt qu'à l'internalisation des bactéries dans les kystes.

Schuster a été le premier à rapporter la présence de vacuoles nutritives expulsées par les amibes dans le milieu au cours de l'enkystement (Schuster, 1979). Nos résultats sont en adéquation avec cette observation, les premières vésicules infectées apparaissant dans le milieu simultanément aux formes kystiques. *L. pneumophila* a déjà été décrit dans de telles structures chez *Acanthamoeba* (Berk *et al.*, 1998; Rowbotham, 1986). Ces deux auteurs émettent l'hypothèse que les vésicules, puisque pour la plupart ayant une taille respirable, peuvent être impliquées dans la transmission de la légionellose quand elles sont inhalées. Des vésicules contenant *L. pneumophila* ont également été retrouvées lors de l'infection d'amibes de genre *Hartmannella* (Greub & Raoult, 2003). De façon similaire à nos observations, ces auteurs n'ont pas mis en évidence de kystes infectés au cours de leur étude.

Selon Rowbotham, l'expulsion des vésicules infectées pourrait être un mécanisme de défense de l'amibe contre ces bactéries capables d'échapper à la digestion lysosomale (Rowbotham, 1986). Cependant, une étude plus récente a démontré que les protéines LepA et LepB de *Legionella* sont impliquées dans les mécanismes non lytiques d'expulsion des vésicules infectées. Selon les auteurs, *L. pneumophila* serait capable d'orienter le processus d'exocytose de l'amibe et ainsi, de favoriser sa propre dissémination (Chen *et al.*, 2004a).

V.3.3. Effet de la gentamicine sur la suspension d'amibes infectées

Un échantillon de la co-culture après 180 jours d'incubation dans le TENk ainsi qu'une suspension de bactéries fraîches et une suspension d'amibes infectées de 24 heures ont été traités par la gentamicine afin d'évaluer son effet sur les bactéries.

Le nombre de bactéries viables est évalué par comptage des UFC avant et après traitement par la gentamicine (Figure 36).

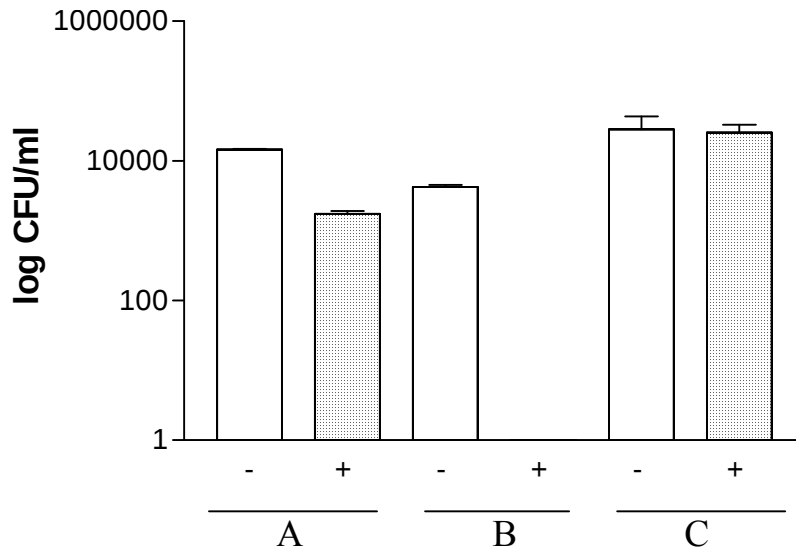


Figure 36 : Survie de *L. pneumophila* après traitement par la gentamicine (+). (A) Co-culture *L. pneumophila*/A. castellanii après 6 mois (B) *L. pneumophila* sans amibes (témoin) (C) Trophozoïtes infectés après 24 heures de coculture. Les barres d'erreur représentent la déviation standard de 2 expériences.

Le traitement de la co-culture à J180 a permis d'obtenir une réduction d'un log du nombre de bactéries cultivables (Figure 36A). En comparaison, un traitement similaire de bactéries libres tue 100% des *L. pneumophila* (Figure 36B) et est sans effet sur des bactéries intra-trophozoïtes (Figure 36C).

Ces résultats suggèrent que les vésicules peuvent protéger partiellement les bactéries internalisées contre la gentamicine.

Nous avons émis plusieurs hypothèses pouvant expliquer ces observations. La gentamicine est un antibiotique ne pénétrant pas à l'intérieur des trophozoïtes mais il pourrait pénétrer partiellement à l'intérieur des vésicules, suggérant que les membranes des trophozoïtes et des vésicules sont différentes. Cette hypothèse est à rapprocher d'une étude qui avait montré que la membrane des vacuoles répliquatives d'amibes dans lesquelles *L. pneumophila* se multiplie, est plus fine que la membrane plasmique et ressemble à la membrane du réticulum endoplasmique (Tilney *et al.*, 2001).

Une autre hypothèse envisageable à ce résultat serait que la sensibilité aux antibiotiques des bactéries après 6 mois dans les vésicules soit modifiée par rapport aux bactéries fraîches. Il a déjà été décrit une modification de la sensibilité aux antibiotiques de *L. pneumophila*

après passage dans les amibes, l'apparition d'une résistance accrue pouvant être due à des modifications phénotypiques survenues au cours de la réplication intracellulaire (Barker *et al.*, 1995). En accord avec cette hypothèse, les *L. pneumophila* intracellulaires existent sous 2 formes, la forme répliquative et la forme intracellulaire mature (MIF) apparaissant tardivement dans les phagocytes infectés. Ces formes MIF ont une morphologie particulière, sont plus courtes et contiennent des inclusions cytoplasmiques. Elles ont également plus virulentes et plus résistantes aux antibiotiques (Garduno *et al.*, 2002).

Ainsi, l'observation de bactéries à la morphologie clairement modifiée après 180 jours (Figure 35B) et l'augmentation de leur résistance à la gentamicine sont des arguments pouvant montrer que les bactéries présentes dans ces vésicules sont des formes MIF.

V.3.4. Conclusion

Legionella est relativement difficile à cultiver *in vitro*, puisqu'elle nécessite un milieu de culture supplémenté particulier. Dans l'environnement, cette bactérie exigeante est cependant capable de survivre pendant de longues périodes malgré des conditions hostiles. Cette persistance est attribuée par certains auteurs à la capacité de cette bactérie à s'établir dans des biofilms. Dans les réseaux de distribution d'eau, la majorité des légionelles sont en effet retrouvées plutôt associées à des biofilms que sous forme planctonique (Rogers *et al.*, 1994). L'association de *Legionella* à ces biofilms peut expliquer, au moins en partie, la difficulté à éradiquer ces bactéries des réseaux d'eau, le biofilm conférant une protection contre les biocides et la chloration. Une autre explication à la survie de *L. pneumophila* est la capacité de cette bactérie à entrer dans un état temporairement viable mais non cultivable. Ces formes VBNC sont incapables de se diviser mais sont métaboliquement actives (Borella *et al.*, 2005). Les amibes ont jusqu'à présent été incriminées pour leur rôle crucial dans la prolifération de *Legionella* dans l'environnement. Quelques études ont également montré que *Legionella* pouvait se retrouver dans les kystes, favorisant ainsi la protection contre les biocides (Kilvington & Price, 1990; King *et al.*, 1988). Comme le montrent nos résultats, *Legionella* peut être retrouvée au sein de vésicules, dont l'expulsion peut être déclenchée par l'enkystement.

Nos résultats montrent également que dans nos conditions, la survie de *L. pneumophila* à long terme est liée à cette production de vésicules infectées par les amibes. Il a déjà été démontré que les bactéries contenues dans ces vésicules restaient viables après exposition à un biocide (un dérivé d'isothiazolone et un ammonium quaternaire) ou après un choc thermique (congélation-décongélation) (Berk *et al.*, 1998). La survie d'autres bactéries, comme *Salmonella* (Brandl *et al.*, 2005) et *Francisella* (Abd *et al.*, 2003), a également été démontrée comme liée à la présence de vésicules expulsées par les amibes. De plus, il est probable que, dans ces vésicules, *L. pneumophila* évolue sous sa forme MIF, favorisant ainsi sa survie dans le tampon d'enkystement pendant 6 mois.

Chapitre VI. Conclusion générale

Les amibes libres sont des micro-organismes complexes, représentant un modèle cellulaire intéressant pour deux raisons principales.

D'une part, ces protozoaires ubiquitaires sont responsables d'infections humaines certes rares mais au pronostic redoutable. Il est maintenant admis que les amibes sont un problème de santé publique de par leur large répartition dans notre environnement et la difficulté à les éradiquer. La résistance des amibes dans l'environnement est favorisée par leur capacité à s'enkyster, les kystes étant des formes extrêmement résistantes à de nombreux traitements physiques ou chimiques utilisés habituellement.

D'autre part, les amibes interagissent avec des bactéries pathogènes telles que les *Legionella*, se transformant ainsi en un véritable réservoir de germes. La capacité de *L. pneumophila* à se multiplier à l'intérieur de certaines amibes libres est connue depuis le début des années 1980 grâce aux travaux de Rowbotham. Il apparaît désormais évident que, de ce fait, les amibes libres jouent un rôle fondamental dans l'écologie, la pathogénicité et la virulence de *L. pneumophila* vis-à-vis des macrophages alvéolaires humains, et probablement dans la transmission de la légionellose.

L'enkystement est selon nous un élément clé dans la pathogénicité des amibes, que ce soit leur pathogénicité propre ou leur implication dans la dissémination et la survie de bactéries pathogènes dans l'environnement. Une élimination des amibes libres dans les niches écologiques où elles posent problème (réseaux de distribution d'eau, système de climatisation...) passe par une meilleure compréhension des différents mécanismes impliqués dans la formation des kystes et des phénomènes pouvant induire le désenkystement. En effet, si les kystes sont des formes résistantes aux traitements utilisables sans conséquences néfastes sur l'environnement, les trophozoïtes sont plus fragiles donc plus faciles à éradiquer avec des techniques conventionnelles.

La première partie de notre étude a montré que le profil protéique d'*A. castellanii* était modifié au cours de l'enkystement, certaines de ces protéines, et en particulier la subtilisin-like proteinase, pouvant être impliquées dans les mécanismes conduisant à la formation des kystes matures.

Nous avons fait l'hypothèse que la SubSP pourrait intervenir dans la synthèse de la cellulose, en permettant l'activation de l'enzyme de dégradation du glycogène et donc la libération du glucose nécessaire à cette synthèse. De façon similaire, la modulation de l'expression de la FBA et de l'énolase, enzymes de la glycolyse, pourrait avoir un effet sur la synthèse de la cellulose. Afin de confirmer ces hypothèses, il pourrait être intéressant d'étudier l'effet de l'inhibition de l'expression de ces protéines sur la synthèse de la cellulose, en utilisant par exemple une technique de « silencing » de leur gène.

Dans la deuxième partie de nos travaux concernant l'étude du désenkystement, nous montrons l'implication du tryptophane dans l'induction du désenkystement, par un mécanisme restant pour l'instant inconnu. Il serait intéressant de tenter de mettre en évidence les gènes induits par la présence de tryptophane, en étudiant l'expression différentielle des gènes d'*A. castellanii* entre une suspension de kystes avec tryptophane et une autre sans tryptophane. Les gènes potentiellement induits pourraient orienter vers des protéines effectrices. Ces protéines seraient alors des cibles intéressantes pour la recherche de molécules capables de déclencher le désenkystement des amibes, y compris dans des conditions défavorables à ce phénomène.

Dans la troisième partie, nous avons montré le rôle prépondérant des vésicules dans la survie à long terme de *L. pneumophila in vitro*. Il serait intéressant d'estimer le rôle respectif des kystes et des vésicules dans la survie de *Legionella* dans l'environnement, car nous pensons qu'*in vivo*, *Legionella* peut être retrouvée dans ces deux structures. De plus, la morphologie des légionelles observées après 6 mois est similaire à celle des formes MIF. Ces formes étant plus virulentes et plus résistantes aux traitements, il reste à vérifier si ces caractères sont retrouvés dans les bactéries intra-vésiculaires. Si tel est le cas, ces formes pourraient avoir un rôle primordial dans l'épidémiologie de la légionellose.

Finalement, une perspective commune à l'ensemble de nos travaux serait d'imaginer des moyens d'éviter la formation des kystes ou d'induire un désenkystement. Par exemple, des inhibiteurs de sérines protéases, comme le PMSF et l'EDTA, pourraient permettre de limiter l'enkystement des amibes et des molécules comme le tryptophane pourraient permettre le retour à la forme trophozoïte après enkystement. L'inhibition de l'enkystement des amibes ou l'induction de leur désenkystement permettrait à la fois d'augmenter l'efficacité des traitements, car les trophozoïtes sont plus sensibles que les kystes, et de limiter la dissémination de *L. pneumophila* par production de vésicules.

Chapitre VII. Bibliographie

- Abd, H., Johansson, T., Golovliov, I., Sandstrom, G. & Forsman, M. (2003).** Survival and growth of *Francisella tularensis* in *Acanthamoeba castellanii*. *Appl Environ Microbiol* **69**, 600-606.
- Abu-Zant, A., Santic, M., Molmeret, M., Jones, S., Helbig, J. & Abu Kwaik, Y. (2005).** Incomplete activation of macrophage apoptosis during intracellular replication of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* **73**, 5339-5349.
- Abu Kwaik, Y. (1996).** The phagosome containing *Legionella pneumophila* within the protozoan *Hartmannella vermiformis* is surrounded by the rough endoplasmic reticulum. *Appl Environ Microbiol* **62**, 2022-2028.
- Abu Kwaik, Y., Venkataraman, C., Harb, O. S. & Gao, L. Y. (1998a).** Signal transduction in the protozoan host *Hartmannella vermiformis* upon attachment and invasion by *Legionella micdadei*. *Appl Environ Microbiol* **64**, 3134-3139.
- Abu Kwaik, Y., Gao, L. Y., Stone, B. J., Venkataraman, C. & Harb, O. S. (1998b).** Invasion of protozoa by *Legionella pneumophila* and its role in bacterial ecology and pathogenesis. *Appl Environ Microbiol* **64**, 3127-3133.
- Adl, S. M., Simpson, A. G., Farmer, M. A., Andersen, R. A., Anderson, O. R., Barta, J. R., Bowser, S. S., Brugerolle, G., Fensome, R. A., Fredericq, S., James, T. Y., Karpov, S., Kugrens, P., Krug, J., Lane, C. E., Lewis, L. A., Lodge, J., Lynn, D. H., Mann, D. G., McCourt, R. M., Mendoza, L., Moestrup, O., Mozley-Standridge, S. E., Nerad, T. A., Shearer, C. A., Smirnov, A. V., Spiegel, F. W. & Taylor, M. F. (2005).** The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J Eukaryot Microbiol* **52**, 399-451.
- Anand, C. M., Skinner, A. R., Malic, A. & Kurtz, J. B. (1983).** Interaction of *L. pneumophila* and a free living amoeba (*Acanthamoeba palestinensis*). *J Hyg (Lond)* **91**, 167-178.
- Atlas, R. M. (1999).** *Legionella*: from environmental habitats to disease pathology, detection and control. *Environ Microbiol* **1**, 283-293.

- Barker, J., Scaife, H. & Brown, M. R. (1995).** Intraphagocytic growth induces an antibiotic-resistant phenotype of *Legionella pneumophila*. *Antimicrob Agents Chemother* **39**, 2684-2688.
- Berk, S. G., Ting, R. S., Turner, G. W. & Ashburn, R. J. (1998).** Production of respirable vesicles containing live *Legionella pneumophila* cells by two *Acanthamoeba* spp. *Appl Environ Microbiol* **64**, 279-286.
- Berk, S. G., Gunderson, J. H., Newsome, A. L., Farone, A. L., Hayes, B. J., Redding, K. S., Uddin, N., Williams, E. L., Johnson, R. A., Farsian, M., Reid, A., Skimmyhorn, J. & Farone, M. B. (2006).** Occurrence of infected amoebae in cooling towers compared with natural aquatic environments: implications for emerging pathogens. *Environ Sci Technol* **40**, 7440-7444.
- Bolivar, I., Fahrni, J. F., Smirnov, A. & Pawlowski, J. (2001).** SSU rRNA-based phylogenetic position of the genera *Amoeba* and *Chaos* (Lobosea, Gymnamoebia): the origin of gymnamoebae revisited. *Mol Biol Evol* **18**, 2306-2314.
- Bommer, U. A. & Thiele, B. J. (2004).** The translationally controlled tumour protein (TCTP). *Int J Biochem Cell Biol* **36**, 379-385.
- Boost, M., Cho, P., Lai, S. & Sun, W. M. (2008).** Detection of *Acanthamoeba* in tap water and contact lens cases using polymerase chain reaction. *Optom Vis Sci* **85**, 526-530.
- Booton, G. C., Visvesvara, G. S., Byers, T. J., Kelly, D. J. & Fuerst, P. A. (2005).** Identification and distribution of *Acanthamoeba* species genotypes associated with nonkeratitis infections. *J Clin Microbiol* **43**, 1689-1693.
- 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.
- Bornstein, N., Vieilly, C., Nowicki, M., Paucod, J. C. & Fleurette, J. (1986).** Epidemiological evidence of legionellosis transmission through domestic hot water supply systems and possibilities of control. *Isr J Med Sci* **22**, 655-661.
- Bouyer, S., Imbert, C., Daniault, G., Cateau, E. & Rodier, M. H. (2007).** Effect of caspofungin on trophozoites and cysts of three species of *Acanthamoeba*. *J Antimicrob Chemother* **59**, 122-124.
- Bowers, B. (1980).** A morphological study of plasma and phagosome membranes during endocytosis in *Acanthamoeba*. *J Cell Biol* **84**, 246-260.

- Bowers, B. & Korn, E. D. (1968).** The fine structure of *Acanthamoeba castellanii*. I. The trophozoite. *J Cell Biol* **39**, 95-111.
- Bowers, B. & Korn, E. D. (1969).** The fine structure of *Acanthamoeba castellanii* (Neff strain). II. Encystment. *J Cell Biol* **41**, 786-805.
- Bowers, B. & Olszewski, T. E. (1972).** Pinocytosis in *Acanthamoeba castellanii*. Kinetics and morphology. *J Cell Biol* **53**, 681-694.
- Bozue, J. A. & Johnson, W. (1996).** Interaction of *Legionella pneumophila* with *Acanthamoeba castellanii*: uptake by coiling phagocytosis and inhibition of phagosome-lysosome fusion. *Infect Immun* **64**, 668-673.
- Brandl, M. T., Rosenthal, B. M., Haxo, A. F. & Berk, S. G. (2005).** Enhanced survival of *Salmonella enterica* in vesicles released by a soilborne *Tetrahymena* species. *Appl Environ Microbiol* **71**, 1562-1569.
- Brenner, D. J., Steigerwalt, A. G. & McDade, J. E. (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.
- Brown, C. M., Nuorti, P. J., Breiman, R. F., Hathcock, A. L., Fields, B. S., Lipman, H. B., Llewellyn, G. C., Hofmann, J. & Cetron, M. (1999).** A community outbreak of Legionnaires' disease linked to hospital cooling towers: an epidemiological method to calculate dose of exposure. *Int J Epidemiol* **28**, 353-359.
- Byers, T. J., Kim, B. G., King, L. E. & Hugo, E. R. (1991).** Molecular aspects of the cell cycle and encystment of *Acanthamoeba*. *Rev Infect Dis* **13 Suppl 5**, S373-384.
- Byers, T. J., Akins, R. A., Maynard, B. J., Lefken, R. A. & Martin, S. M. (1980).** Rapid growth of *Acanthamoeba* in defined media; induction of encystment by glucose-acetate starvation. *J Protozool* **27**, 216-219.
- CDC (2008).** Primary amebic meningoencephalitis--Arizona, Florida, and Texas, 2007. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **57**, 573-577.
- Chavez-Munguia, B., Omana-Molina, M., Gonzalez-Lazaro, M., Gonzalez-Robles, A., Bonilla, P. & Martinez-Palomo, A. (2005).** Ultrastructural study of encystation and excystation in *Acanthamoeba castellanii*. *J Eukaryot Microbiol* **52**, 153-158.

- Chavez-Munguia, B., Omana-Molina, M., Gonzalez-Lazaro, M., Gonzalez-Robles, A., Cedillo-Rivera, R., Bonilla, P. & Martinez-Palomo, A. (2007).** Ultrastructure of cyst differentiation in parasitic protozoa. *Parasitol Res* **100**, 1169-1175.
- Chen, J., de Felipe, K. S., Clarke, M., Lu, H., Anderson, O. R., Segal, G. & Shuman, H. A. (2004a).** *Legionella* effectors that promote nonlytic release from protozoa. *Science* **303**, 1358-1361.
- Chen, L., Orfeo, T., Gilmartin, G. & Bateman, E. (2004b).** Mechanism of cyst specific protein 21 mRNA induction during *Acanthamoeba* differentiation. *Biochim Biophys Acta* **1691**, 23-31.
- Cooper, J. A., Blum, J. D., Williams, R. C., Jr. & Pollard, T. D. (1986).** Purification and characterization of actophorin, a new 15,000-dalton actin-binding protein from *Acanthamoeba castellanii*. *J Biol Chem* **261**, 477-485.
- Coppin, A., Dzierszinski, F., Legrand, S., Mortuaire, M., Ferguson, D. & Tomavo, S. (2003).** Developmentally regulated biosynthesis of carbohydrate and storage polysaccharide during differentiation and tissue cyst formation in *Toxoplasma gondii*. *Biochimie* **85**, 353-361.
- Cordingley, J. S., Wills, R. A. & Villemez, C. L. (1996).** Osmolarity is an independent trigger of *Acanthamoeba castellanii* differentiation. *J Cell Biochem* **61**, 167-171.
- Csaba, G. (2008).** Hormonal imprinting: phylogeny, ontogeny, diseases and possible role in present-day human evolution. *Cell Biochem Funct* **26**, 1-10.
- Culbertson, C. G., Smith, J. W., Cohen, H. K. & Minner, J. R. (1959).** Experimental infection of mice and monkeys by *Acanthamoeba*. *Am J Pathol* **35**, 185-197.
- De Buck, E., Anne, J. & Lammertyn, E. (2007).** The role of protein secretion systems in the virulence of the intracellular pathogen *Legionella pneumophila*. *Microbiology* **153**, 3948-3953.
- De Jonckheere, J. F. (1982).** Hospital hydrotherapy pools treated with ultra violet light: bad bacteriological quality and presence of thermophilic *Naegleria*. *J Hyg (Lond)* **88**, 205-214.
- Declerck, P., Behets, J., De Keersmaecker, B. & Ollevier, F. (2007a).** Receptor-mediated uptake of *Legionella pneumophila* by *Acanthamoeba castellanii* and *Naegleria lovaniensis*. *J Appl Microbiol* **103**, 2697-2703.

- Declerck, P., Behets, J., Margineanu, A., van Hoef, V., De Keersmaecker, B. & Ollevier, F. (2007b).** Replication of *Legionella pneumophila* in biofilms of water distribution pipes. *Microbiol Res.*
- Diogo, A., Verissimo, A., Nobre, M. F. & da Costa, M. S. (1999).** Usefulness of fatty acid composition for differentiation of *Legionella* species. *J Clin Microbiol* **37**, 2248-2254.
- Dive, D., Picard, J. P. & Leclerc, H. (1979).** [Amoebae in the water supply: an epidemiological study (author's transl)]. *Ann Microbiol (Paris)* **130 A**, 487-498.
- Dudley, R., Alsam, S. & Khan, N. A. (2008).** The role of proteases in the differentiation of *Acanthamoeba castellanii*. *FEMS Microbiol Lett.*
- Dujardin, F. (1841).** *Histoire naturelle des zoophytes. Infusoires.*
- Entelis, N., Brandina, I., Kamenski, P., Krasheninnikov, I. A., Martin, R. P. & Tarassov, I. (2006).** A glycolytic enzyme, enolase, is recruited as a cofactor of tRNA targeting toward mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **20**, 1609-1620.
- Erdogan, H. & Arslan, H. (2007).** Colonization of *Legionella* species in hotel water systems in Turkey. *J Travel Med* **14**, 369-373.
- Foster, K., Gorton, R. & Waller, J. (2006).** Outbreak of legionellosis associated with a spa pool, United Kingdom. *Euro Surveill* **11**, E060921 060922.
- Fowler, M. & Carter, R. F. (1965).** Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* sp.: a preliminary report. *Br Med J* **2**, 740-742.
- Fraser, D. W., Tsai, T. R., Orenstein, W., Parkin, W. E., Beecham, H. J., Sharrar, R. G., Harris, J., Mallison, G. F., Martin, S. M., McDade, J. E., Shepard, C. C. & Brachman, P. S. (1977).** Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. *N Engl J Med* **297**, 1189-1197.
- Gabay, J. E., Blake, M., Niles, W. D. & Horwitz, M. A. (1985).** Purification of *Legionella pneumophila* major outer membrane protein and demonstration that it is a porin. *J Bacteriol* **162**, 85-91.
- Gao, L. Y. & Kwaik, Y. A. (2000).** The mechanism of killing and exiting the protozoan host *Acanthamoeba polyphaga* by *Legionella pneumophila*. *Environ Microbiol* **2**, 79-90.

- Garcia-Fulgueiras, A., Navarro, C., Fenoll, D., Garcia, J., Gonzalez-Diego, P., Jimenez-Bunuales, T., Rodriguez, M., Lopez, R., Pacheco, F., Ruiz, J., Segovia, M., Balandron, B. & Pelaz, C. (2003).** Legionnaires' disease outbreak in Murcia, Spain. *Emerg Infect Dis* **9**, 915-921.
- Garcia-Nunez, M., Sopena, N., Ragull, S., Pedro-Botet, M. L., Morera, J. & Sabria, M. (2008).** Persistence of *Legionella* in hospital water supplies and nosocomial Legionnaires' disease. *FEMS Immunol Med Microbiol* **52**, 202-206.
- Garduno, R. A., Garduno, E., Hiltz, M. & Hoffman, P. S. (2002).** Intracellular growth of *Legionella pneumophila* gives rise to a differentiated form dissimilar to stationary-phase forms. *Infect Immun* **70**, 6273-6283.
- Gast, R. J., Ledee, D. R., Fuerst, P. A. & Byers, T. J. (1996).** Subgenus systematics of *Acanthamoeba*: four nuclear 18S rDNA sequence types. *J Eukaryot Microbiol* **43**, 498-504.
- Glick, T. H., Gregg, M. B., Berman, B., Mallison, G., Rhodes, W. W., 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.
- Gordon, D. J., Eisenberg, E. & Korn, E. D. (1976).** Characterization of cytoplasmic actin isolated from *Acanthamoeba castellanii* by a new method. *J Biol Chem* **251**, 4778-4786.
- Greub, G. & Raoult, D. (2003).** Morphology of *Legionella pneumophila* according to their location within *Hartmanella vermiformis*. *Res Microbiol* **154**, 619-621.
- Greub, G. & Raoult, D. (2004).** Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin Microbiol Rev* **17**, 413-433.
- Harb, O. S., Gao, L. Y. & 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, O. S., Venkataraman, C., Haack, B. J., Gao, L. Y. & Kwaik, Y. A. (1998).** Heterogeneity in the attachment and uptake mechanisms of the Legionnaires' disease bacterium, *Legionella pneumophila*, by protozoan hosts. *Appl Environ Microbiol* **64**, 126-132.
- Hirukawa, Y., Nakato, H., Izumi, S., Tsuruhara, T. & Tomino, S. (1998).** Structure and expression of a cyst specific protein of *Acanthamoeba castellanii*. *Biochim Biophys Acta* **1398**, 47-56.

- Hong, Y. C., Kong, H. H., Ock, M. S., Kim, I. S. & Chung, D. I. (2000).** Isolation and characterization of a cDNA encoding a subtilisin-like serine proteinase (ahSUB) from *Acanthamoeba healyi*. *Mol Biochem Parasitol* **111**, 441-446.
- Hookey, J. V., Birtles, R. J. & Saunders, N. A. (1995).** Intergenic 16S rRNA gene (rDNA)-23S rDNA sequence length polymorphisms in members of the family Legionellaceae. *J Clin Microbiol* **33**, 2377-2381.
- Horwitz, M. A. (1983).** Formation of a novel phagosome by the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) in human monocytes. *J Exp Med* **158**, 1319-1331.
- Jacquemin, J. L., Simitzis-Le Flohic, A. M. & Chauveau, N. (1981).** [Free-living Amoebae in fresh water. Study of the water supply of the town of Poitiers (France) (author's transl)]. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* **74**, 521-524.
- Jahnes, W. G. & Fullmer, H. M. (1957).** Free living amoebae as contaminants in monkey kidney tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med* **96**, 484-488.
- Jantzen, H. (1981).** Control of actin synthesis during the development of *Acanthamoeba castellanii*. *Dev Biol* **82**, 113-126.
- Jarraud, S. (2007).** Légionellose. *Presse Med* **36**, 279-287.
- Jarroll, E. L. & Sener, K. (2003).** Potential drug targets in cyst-wall biosynthesis by intestinal protozoa. *Drug Resist Updat* **6**, 239-246.
- Jensen, T., Barnes, W. G. & Meyers, D. (1970).** Axenic cultivation of large populations of *Acanthamoeba castellanii* (JBM). *J Parasitol* **56**, 904-906.
- Jones, D. B., Visvesvara, G. S. & Robinson, N. M. (1975).** *Acanthamoeba polyphaga* keratitis and *Acanthamoeba* uveitis associated with fatal meningoencephalitis. *Trans Ophthalmol Soc U K* **95**, 221-232.
- Kaushal, D. C. & Shukla, O. P. (1977).** Excystment of axenically prepared cysts of *Hartmannella culbertsoni*. *J Gen Microbiol* **98**, 117-123.
- Khaire, N., Muller, R., Blau-Wasser, R., Eichinger, L., Schleicher, M., Rief, M., Holak, T. A. & Noegel, A. A. (2007).** Filamin-regulated F-actin assembly is essential for morphogenesis and controls phototaxis in *Dictyostelium*. *J Biol Chem* **282**, 1948-1955.

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

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

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

Kim, J. S., Park, S. J., Kwak, K. J., Kim, Y. O., Kim, J. Y., Song, J., Jang, B., Jung, C. H. & Kang, H. (2007). Cold shock domain proteins and glycine-rich RNA-binding proteins from *Arabidopsis thaliana* can promote the cold adaptation process in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* **35**, 506-516.

Kim, W. T., Kong, H. H., Ha, Y. R., Hong, Y. C., Jeong, H. J., Yu, H. S. & Chung, D. I. (2006). Comparison of specific activity and cytopathic effects of purified 33 kDa serine proteinase from *Acanthamoeba* strains with different degree of virulence. *Korean J Parasitol* **44**, 321-330.

King, C. H., Shotts, E. B., Jr., Wooley, R. E. & Porter, K. G. (1988). Survival of coliforms and bacterial pathogens within protozoa during chlorination. *Appl Environ Microbiol* **54**, 3023-3033.

Kirrage, D., Reynolds, G., Smith, G. E. & Olowokure, B. (2007). Investigation of an outbreak of Legionnaires' disease: Hereford, UK 2003. *Respir Med* **101**, 1639-1644.

Krishna-Murti, C. R. & Shukla, O. P. (1984). Differentiation of pathogenic amoebae : encystation and excystation of *Acanthamoeba culbertsoni* - A model. *Journal of Biosciences* **6**, 475-489.

Lakomy (2005). Une kératite   amibes libres chez un non porteur de lentilles de contact. *Annales de Biologie Clinique* **63**, 531-534.

Lambert, M. A. & Moss, C. W. (1989). Cellular fatty acid compositions and isoprenoid quinone contents of 23 *Legionella* species. *J Clin Microbiol* **27**, 465-473.

Lasheras, A., Boulestreau, H., Rogues, A. M., Ohayon-Courtes, C., Labadie, J. C. & Gachie, J. P. (2006). Influence of amoebae and physical and chemical characteristics of

- water on presence and proliferation of *Legionella* species in hospital water systems. *Am J Infect Control* **34**, 520-525.
- Lawande, R. V. (1983).** Recovery of soil amoebae from the air during the harmattan in Zaria, Nigeria. *Ann Trop Med Parasitol* **77**, 45-49.
- Leclerc, H. (2006).** Les *Legionella* : de l'environnement à la maladie chez l'homme. *European Journal of Water Quality* **37**, 9-20.
- Ledee, D. R., Booton, G. C., Awwad, M. H., Sharma, S., Aggarwal, R. K., Niszl, I. A., Markus, M. B., Fuerst, P. A. & Byers, T. J. (2003).** Advantages of using mitochondrial 16S rDNA sequences to classify clinical isolates of *Acanthamoeba*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**, 1142-1149.
- Linder, M., Winiecka-Krusnell, J. & Linder, E. (2002).** Use of recombinant cellulose-binding domains of *Trichoderma reesei* cellulase as a selective immunocytochemical marker for cellulose in protozoa. *Appl Environ Microbiol* **68**, 2503-2508.
- Lorenzo-Morales, J., Ortega-Rivas, A., Foronda, P., Abreu-Acosta, N., Ballart, D., Martinez, E. & Valladares, B. (2005).** RNA interference (RNAi) for the silencing of extracellular serine proteases genes in *Acanthamoeba*: molecular analysis and effect on pathogenicity. *Mol Biochem Parasitol* **144**, 10-15.
- Lorenzo-Morales, J., Kliescikova, J., Martinez-Carretero, E., De Pablos, L. M., Profotova, B., Nohynkova, E., Osuna, A. & Valladares, B. (2008).** Glycogen phosphorylase in *Acanthamoeba* spp.: determining the role of the enzyme during the encystment process using RNA interference. *Eukaryot Cell* **7**, 509-517.
- Maeda, Y., Ohmori, T., Abe, T., Abe, F. & Amagai, A. (1989).** Transition of starving *Dictyostelium* cells to differentiation phase at a particular position of the cell cycle. *Differentiation* **41**, 169-175.
- Marciano-Cabral, F. & Cabral, G. (2003).** *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin Microbiol Rev* **16**, 273-307.
- 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, J. E., Brenner, D. J. & Bozeman, F. M. (1979).** Legionnaires' disease bacterium isolated in 1947. *Ann Intern Med* **90**, 659-661.

- Meisler, D. M., Rutherford, I., Bican, F. E., Ludwig, I. H., Langston, R. H., Hall, G. S., Rhinehart, E. & Visvesvara, G. S. (1985).** Susceptibility of *Acanthamoeba* to surgical instrument sterilization techniques. *Am J Ophthalmol* **99**, 724-725.
- Molmeret, M., Bitar, D. M., Han, L. & Kwaik, Y. A. (2004).** Disruption of the phagosomal membrane and egress of *Legionella pneumophila* into the cytoplasm during the last stages of intracellular infection of macrophages and *Acanthamoeba polyphaga*. *Infect Immun* **72**, 4040-4051.
- Molofsky, A. B. & Swanson, M. S. (2004).** Differentiate to thrive: lessons from the *Legionella pneumophila* life cycle. *Mol Microbiol* **53**, 29-40.
- Moon, E. K., Chung, D. I., Hong, Y. C. & Kong, H. H. (2007).** Differentially expressed genes of *Acanthamoeba castellanii* during encystation. *Korean J Parasitol* **45**, 283-285.
- Moon, E. K., Chung, D. I., Hong, Y. C. & Kong, H. H. (2008a).** Characterization of a serine proteinase mediating encystation of *Acanthamoeba*. *Eukaryot Cell* **7**, 1513-1517.
- Moon, E. K., Chung, D. I., Hong, Y. C., Ahn, T. I. & Kong, H. H. (2008b).** *Acanthamoeba castellanii*: gene profile of encystation by ESTs analysis and KOG assignment. *Exp Parasitol* **119**, 111-116.
- Neff, R. J., Ray, S. A., Benton, W. F. & Wilborn, M. (1964).** Induction of synchronous encystment (differentiation) in *Acanthamoeba* sp. *Methods Cell Physiol* **1**, 55-83.
- Nishiyama, H., Itoh, K., Kaneko, Y., Kishishita, M., Yoshida, O. & Fujita, J. (1997).** A glycine-rich RNA-binding protein mediating cold-inducible suppression of mammalian cell growth. *J Cell Biol* **137**, 899-908.
- Nonaka, T., Fujihashi, M., Kita, A., Saeki, K., Ito, S., Horikoshi, K. & Miki, K. (2004).** The crystal structure of an oxidatively stable subtilisin-like alkaline serine protease, KP-43, with a C-terminal beta-barrel domain. *J Biol Chem* **279**, 47344-47351.
- Orfeo, T. & Bateman, E. (1998).** Transcription by RNA polymerase II during *Acanthamoeba* differentiation. *Biochim Biophys Acta* **1443**, 297-304.
- Park, J., Jeong, Y. & Ahn, T. (2002).** Changes in profiles of major proteins in encysting *Acanthamoeba castellanii*. *Korean J Biol Sci* **6**, 341-347.
- Philippe, C., Bleh, M. F. & 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.

- Picazarri, K., Nakada-Tsukui, K. & Nozaki, T. (2008).** Autophagy during proliferation and encystation in the protozoan parasite *Entamoeba invadens*. *Infect Immun* **76**, 278-288.
- Pussard, M. & Pons, R. (1977).** Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). *Protistologica* **13**, 557-610.
- Puytorac, P. d., Grain, J. & Mignot, J. P. (1987).** *Précis de protistologie*. Paris.
- Rastogi, A. K., Sagar, P. & Agarwala, S. C. (1973).** Role of riboflavin and certain amino acids in the excystment of *Schizopyrenus russelli*. *J Protozool* **20**, 453-455.
- Ratcliff, R. M., Lanser, J. A., Manning, P. A. & Heuzenroeder, M. W. (1998).** Sequence-based classification scheme for the genus *Legionella* targeting the mip gene. *J Clin Microbiol* **36**, 1560-1567.
- Ratzow, S., Gaia, V., Helbig, J. H., Fry, N. K. & Luck, P. C. (2007).** Addition of neuA, the gene encoding N-acetylneuraminyl transferase, increases the discriminatory ability of the consensus sequence-based scheme for typing *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. *J Clin Microbiol* **45**, 1965-1968.
- Riahi, Y. & Ankri, S. (2000).** Involvement of serine proteinases during encystation of *Entamoeba invadens*. *Arch Med Res* **31**, S187-189.
- Rivera, F., Galvan, M., Robles, E., Leal, P., Gonzalez, L. & Lacy, A. M. (1981).** Bottled mineral waters polluted by protozoa in Mexico. *J Protozool* **28**, 54-56.
- Rivera, F., Ramirez, E., Bonilla, P., Calderon, A., Gallegos, E., Rodriguez, S., Ortiz, R., Zaldivar, B., Ramirez, P. & Duran, A. (1993).** Pathogenic and free-living amoebae isolated from swimming pools and physiotherapy tubs in Mexico. *Environ Res* **62**, 43-52.
- Rogers, J., Dowsett, A. B., Dennis, P. J., Lee, J. V. & Keevil, C. W. (1994).** Influence of temperature and plumbing material selection on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in a model potable water system containing complex microbial flora. *Appl Environ Microbiol* **60**, 1585-1592.
- Rowbotham, T. J. (1980).** Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J Clin Pathol* **33**, 1179-1183.
- Rowbotham, T. J. (1986).** Current views on the relationships between amoebae, legionellae and man. *Isr J Med Sci* **22**, 678-689.

- Sabria, M., Alvarez, J., Dominguez, A., Pedrol, A., Sauca, G., Salleras, L., Lopez, A., Garcia-Nunez, M. A., Parron, I. & Barrufet, M. P. (2006).** A community outbreak of Legionnaires' disease: evidence of a cooling tower as the source. *Clin Microbiol Infect* **12**, 642-647.
- Salloum, G., Meugnier, H., Reyrolle, M., Grimont, F., Grimont, P. A., Etienne, J. & Freney, J. (2002).** Identification of *Legionella* species by ribotyping and other molecular methods. *Res Microbiol* **153**, 679-686.
- Scaglia, M., Strosselli, M., Grazioli, V., Gatti, S., Bernuzzi, A. M. & de Jonckheere, J. F. (1983).** Isolation and identification of pathogenic *Naegleria australiensis* (Amoebida, Vahlkampfiidae) from a spa in northern Italy. *Appl Environ Microbiol* **46**, 1282-1285.
- Schulze, I. & Jantzen, H. (1982).** Coordinate regulation of synthesis of ribosomal proteins during encystation of *Acanthamoeba castellanii*. *Eur J Biochem* **126**, 285-292.
- Schuster, F. (1979).** Small amebas and ameboflagellates. In *Biochemistry and physiology of protozoa*, pp. 215-285. Edited by M. Levandowski & S. H. Hunter. New York: Academic Press.
- Schuster, F. L. (2002).** Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amebas. *Clin Microbiol Rev* **15**, 342-354.
- Schuster, F. L. & Levandowsky, M. (1996).** Chemosensory responses of *Acanthamoeba castellanii*: visual analysis of random movement and responses to chemical signals. *J Eukaryot Microbiol* **43**, 150-158.
- Schuster, F. L. & Visvesvara, G. S. (2004).** Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int J Parasitol* **34**, 1001-1027.
- Segal, G. & Shuman, H. A. (1999).** *Legionella pneumophila* utilizes the same genes to multiply within *Acanthamoeba castellanii* and human macrophages. *Infect Immun* **67**, 2117-2124.
- Seijo Martinez, M., Gonzalez-Mediero, G., Santiago, P., Rodriguez De Lope, A., Diz, J., Conde, C. & Visvesvara, G. S. (2000).** Granulomatous amebic encephalitis in a patient with AIDS: isolation of *Acanthamoeba* sp. Group II from brain tissue and successful treatment with sulfadiazine and fluconazole. *J Clin Microbiol* **38**, 3892-3895.

- Siddiqui, R., Matin, A., Warhurst, D., Stins, M. & Khan, N. A. (2007).** Effect of antimicrobial compounds on *Balamuthia mandrillaris* encystment and human brain microvascular endothelial cell cytopathogenicity. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 4471-4473.
- Sissons, J., Alsam, S., Goldsworthy, G., Lightfoot, M., Jarroll, E. L. & Khan, N. A. (2006).** Identification and properties of proteases from an *Acanthamoeba* isolate capable of producing granulomatous encephalitis. *BMC Microbiol* **6**, 42.
- Smirnov, A., Nasonova, E., Berney, C., Fahrni, J., Bolivar, I. & Pawlowski, J. (2005).** Molecular phylogeny and classification of the lobose amoebae. *Protist* **156**, 129-142.
- Srikanth, S. & Berk, S. G. (1993).** Stimulatory effect of cooling tower biocides on amoebae. *Appl Environ Microbiol* **59**, 3245-3249.
- 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.
- Stöhr, M., Bommert, K., Schulze, I. & Jantzen, H. (1987).** The cell cycle and its relationship to development in *Acanthamoeba castellanii*. *Journal of Cell Science* **88**, 579-589.
- Sukthana, Y., Lekkla, A., Sutthikornchai, C., Wanapongse, P., Vejjajiva, A. & Bovornkitti, S. (2005).** Spa, springs and safety. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* **36 Suppl 4**, 10-16.
- Swanson, M. S. & Isberg, R. R. (1995).** Association of *Legionella pneumophila* with the macrophage endoplasmic reticulum. *Infect Immun* **63**, 3609-3620.
- Swanson, M. S. & Hammer, B. K. (2000).** *Legionella pneumophila* pathogenesis: a fateful journey from amoebae to macrophages. *Annu Rev Microbiol* **54**, 567-613.
- Tilney, L. G., Harb, O. S., Connelly, P. S., Robinson, C. G. & Roy, C. R. (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.

- van Es, S., Viridy, K. J., Pitt, G. S., Meima, M., Sands, T. W., Devreotes, P. N., Cotter, D. A. & Schaap, P. (1996).** Adenylyl cyclase G, an osmosensor controlling germination of *Dictyostelium* spores. *J Biol Chem* **271**, 23623-23625.
- Venkataraman, C., Gao, L. Y., Bondada, S. & Kwaik, Y. A. (1998).** Identification of putative cytoskeletal protein homologues in the protozoan host *Hartmannella vermiformis* as substrates for induced tyrosine phosphatase activity upon attachment to the Legionnaires' disease bacterium, *Legionella pneumophila*. *J Exp Med* **188**, 505-514.
- Vesaluoma, M., Kalso, S., Jokipii, L., Warhurst, D., Ponka, A. & Tervo, T. (1995).** Microbiological quality in Finnish public swimming pools and whirlpools with special reference to free living amoebae: a risk factor for contact lens wearers? *Br J Ophthalmol* **79**, 178-181.
- Vincendeau, P., Lesthelle, S., Bertazzo, A., Okomo-Assoumou, M. C., Allegri, G. & Costa, C. V. (1999).** Importance of L-tryptophan metabolism in trypanosomiasis. *Adv Exp Med Biol* **467**, 525-531.
- Visvesvara, G. S., Schuster, F. L. & Martinez, A. J. (1993).** *Balamuthia mandrillaris*, N. G., N. Sp., agent of amebic meningoencephalitis in humans and other animals. *J Eukaryot Microbiol* **40**, 504-514.
- Weisman, R. A., Spiegel, R. S. & McCauley, J. G. (1970).** Differentiation in *Acanthamoeba*: glycogen levels and glycogen synthetase activity during encystment. *Biochim Biophys Acta* **201**, 45-53.
- Willaert, E., Stevens, A. R. & Healy, G. R. (1978).** Retrospective identification of *Acanthamoeba culbertsoni* in a case of amoebic meningoencephalitis. *J Clin Pathol* **31**, 717-720.