



HAL
open science

Plasticité fonctionnelle et structurale chez *Legionella pneumophila* - Impact des protéines de type histone sur la virulence et génotypage par les séquences d'insertion

Mike Richard Vergnes

► To cite this version:

Mike Richard Vergnes. Plasticité fonctionnelle et structurale chez *Legionella pneumophila* - Impact des protéines de type histone sur la virulence et génotypage par les séquences d'insertion. Bactériologie. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2010. Français. NNT : . tel-00670047

HAL Id: tel-00670047

<https://theses.hal.science/tel-00670047>

Submitted on 14 Feb 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER – GRENOBLE I

THESE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
Discipline : Virologie, Microbiologie, Immunologie

VERGNES Mike

**Plasticité fonctionnelle et structurale chez
*Legionella pneumophila***

**Impact des protéines de type histone sur la
virulence et génotypage par les séquences
d'insertion**

Jury

Mr Bertrand TOUSSAINT
Mme Sophie JARRAUD
Mr Yann HECHARD
Mme Sophie COURTOIS
Mr Dominique SCHNEIDER
Mme Elisabeth KAY

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directeur de thèse
Co-directeur de thèse

Soutenu le 13 décembre 2010

Thèse préparée au sein du Laboratoire Adaptation et Pathogénie des Microorganismes
UMR5163 CNRS / Université Joseph Fourier
Institut Jean Roget

Sommaire

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique	7
Introduction	8
I. <i>Legionella</i> et légionellose	10
I.1. Historique.....	10
I.2. Présentation clinique	11
I.2.1. La fièvre de Pontiac	11
I.2.2. La légionellose ou maladie du légionnaire	12
I.3. Le genre <i>Legionella</i>	13
I.3.1. Caractéristiques taxonomiques	13
I.3.2. Caractéristiques épidémiologiques	14
I.3.3. Caractéristiques bactériologiques et biochimiques	15
I.3.4. Caractéristiques génomiques	17
I.4. Ecologie	21
I.4.1. Formation de biofilms.....	22
I.4.2. Interactions avec les hôtes eucaryotes	23
I.5. L'Etat Viable Non Cultivable (VBNC)	26
I.5.1. Définition	26
I.5.2. Etudes moléculaires de l'état VBNC chez les bactéries	29
I.5.3. Mise en évidence de l'état VBNC chez <i>Legionella</i>	30
I.5.4. Induction de l'état VBNC chez les bactéries du genre <i>Legionella</i>	31
II. Détection et Typage des bactéries du genre <i>Legionella</i>	33
II.1. Détection des souches de <i>Legionella</i>	33
II.1.1. La culture	33
II.1.2. Mise en évidence de marqueurs moléculaires et biochimiques.....	34
II.2. Méthodes de typage	39
II.2.1. Généralités	39
II.2.2. MAb (Monoclonal Antibodies)	40
II.2.3. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)	41
II.2.4. L'électrophorèse en champs pulsés (PFGE).....	42
II.2.5. Sequence-Based Typing (SBT)	43

III. Facteurs de virulence chez les bactéries du genre <i>Legionella</i>	44
III.1. Les facteurs impliqués dans la phase réplivative.....	45
III.1.1. Facteurs impliqués dans l'acquisition du fer et d'acides aminés	45
III.1.2. Protéines de stress	47
III.1.3. Systèmes de sécrétion.....	48
III.1.4. La protéine Mip	55
III.1.5. Facteurs impliqués dans l'infection des macrophages	55
III.2. Les facteurs impliqués dans la phase transmissive	56
III.2.1. Facteurs impliqués dans l'adhésion.....	56
III.2.2. Le flagelle.....	57
III.2.3. Les cytotoxines.....	59
III.3. Régulation du cycle biphasique de <i>Legionella</i>	60
IV. Topologie de l'ADN bactérien.....	65
IV.1. Les protéines contrôlant la topologie de l'ADN	67
IV.1.1. Les topoisomérases	67
IV.1.2. Les protéines de type histone (PTH).....	70
IV.2. Impact de la superhélicité de l'ADN sur l'expression génique.....	79
V. Objectifs	81
Chapitre 2 : Rôles de la protéine Dps chez <i>L. pneumophila</i>	83
Chapitre 3 : Rôles de la protéine IHF chez <i>L. pneumophila</i>.....	113
Chapitre 4 : Utilisation des séquences d'insertion IS comme marqueurs moléculaires	162
Chapitre 5 : Conclusions et perspectives.....	205
I. Implication des protéines IHF et Dps dans la virulence	206
II. Réseau de régulation des protéines de type histone.....	209
III. Les séquences d'insertion comme marqueurs moléculaires.....	211
Références bibliographiques	214

Tableaux

Tableau 1 : Principales caractéristiques génomiques de sept souches de *L. pneumophila*.....20

Figures

Figure 1 : Comparaison de la structure des génomes de <i>L. longbeachae</i> D4968 et de quatre souches de <i>L. pneumophila</i> (Corby, Lens, Paris et Philadelphia).....	19
Figure 2 : Gènes spécifiques et communs des plasmides portés par les souches de <i>L. pneumophila</i> Paris et Lens et de <i>L. longbeachae</i> NSW150.....	21
Figure 3 : Phagocytose de <i>L. pneumophila</i> par un macrophage humain.....	25
Figure 4 : Cycle infectieux de <i>Legionella</i> dans une cellule eucaryote.....	26
Figure 5 : L'état VBNC chez <i>Vibrio fulniculus</i> à 5 °C.....	28
Figure 6 : Principe du test d'immuno-fluorescence indirecte.....	35
Figure 7 : Répartition des méthodes de diagnostic des cas de légionelloses en France de 1996-2009 (source INVS).....	36
Figure 8 : Principe du test d'immunographie.....	38
Figure 9 : Organigramme pour la subdivision en sous-groupes monoclonaux de <i>L. pneumophila</i> séro groupe 1, en utilisant le panel de Dresden et MAb3.....	41
Figure 10 : Modèle de système de sécrétion de type II.....	49
Figure 11 : Modèles du système de sécrétion de type IVb chez <i>Legionella</i>	52
Figure 12 : Organisation des gènes codant le système de sécrétion de type IVb Doc/Icm chez <i>Legionella</i>	53
Figure 13 : Modèle de l'appareil de sécrétion de type IVa d' <i>A. tumefaciens</i>	54
Figure 14 : Structure protéique théorique du flagelle bactérien.....	59
Figure 15 : Modèle de régulation du système Dot/Icm de <i>L. pneumophila</i> via les systèmes à deux composantes CpxAR, PmrAB et LetAS.....	62
Figure 16 : Modèle de régulation de la virulence chez <i>L. longbeachae</i> D-4968 par analogie avec <i>L. pneumophila</i>	65
Figure 17 : Activité des différentes topoisomérase.....	67

Figure 18 : Effet de la protéine HU sur l'ADN.....	72
Figure 19 : Effet de la protéine Dps sur l'ADN.....	74
Figure 20 : Effet de la protéine IHF sur l'ADN.....	76
Figure 21 : Effet de la protéine Fis sur l'ADN.....	78
Figure 22 : Intervention potentielle des protéines Dps et IHF au cours du cycle intracellulaire de <i>L. pneumophila</i> dans les macrophages humains.....	209
Figure 23 : Modèle de régulation de la virulence chez <i>L. pneumophila</i>	210

Abréviations

ACES : Acide N-(acétamido-2)-amino-2-éthane sulfonique

ADN : acide désoxyribonucléique

AFLP : amplified fragment length polymorphism

ARN : acide ribonucléique

BCYE : buffered charcoal yeast extract

Dps : DNA-binding Protection from Starved cells

EWGLI : european working group for *Legionella* infections

Fis : factor for inversion stimulation

H-NS : histone-like nucleoid-structuring

IHF : integration host factor

InVS : institut de veille sanitaire

IS : insertion sequence

kb : kilo base

kDa : kilo Dalton

LLAP : *Legionella*-like amoebal pathogens

LPS : lipopolysaccharide

MAB : mononuclear antibodies

NAP : nuclear associated protein

pb : paire de bases

PCR : polymerase chain reaction

PFGE : pulsed-field gel electrophoresis

PTH : protéine de type histone

qPCR : quantitative polymerase chain reaction

SBT : sequence-based typing

subsp. : subspecies

VBNC : viable but non culturable

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

Introduction

Avant la découverte du support de l'information génétique (Avery *et al.*, 1944) et les travaux pionniers de Carl Woese sur la taxonomie (Woese & Fox, 1977), les espèces bactériennes étaient essentiellement définies par leurs caractéristiques phénotypiques et métaboliques puis par leurs propriétés génomiques comme le pourcentage en G+C. Ces critères de classification étaient alors fondés sur la notion que les propriétés phénotypiques et génomiques seraient bien définies et relativement stables, évoluant principalement de par les erreurs provoquées au cours de la réplication du génome. Cependant, il est très rapidement apparu que les génomes présentaient une flexibilité intrinsèque beaucoup plus importante et ce, à deux niveaux : structural et fonctionnel.

La découverte chez les organismes eucaryotes d'éléments génétiques mobiles par Barbara McClintock au milieu du vingtième siècle (McClintock, 1953), puis de leur ubiquité et de leur extraordinaire diversité chez tous les organismes vivants, y compris les organismes microbiens (Mahillon & Chandler, 1998), ont clairement montré la flexibilité structurale et fonctionnelle des génomes. Ceci a été confirmé plus récemment au niveau global grâce au développement de technologies de séquençage à haut débit par l'étude et la comparaison de génomes de divers organismes vivants, dont plusieurs milliers de génomes bactériens présents aujourd'hui dans les bases de données. La détermination des profils globaux de transcription et des protéines a également révélé une dynamique importante de l'expression des génomes. Dans le cas des bactéries, différents mécanismes contribuent à la plasticité du génome, le plus anciennement connu correspondant aux mutations liées aux erreurs de réplication. Le taux de mutation peut varier suivant l'espèce ou la souche bactérienne suite à des modifications du contrôle de la fidélité de la réplication, par exemple suite à des mutations dans les systèmes de réparation de l'ADN. Ces cellules bactériennes deviennent alors hypermutatrices par la forte augmentation des taux de mutation (Denamur & Matic, 2006). Une proportion importante de

souches hypermutatrices a notamment pu être mise en évidence dans des isolats pathogènes de *Salmonella enterica* et *Escherichia coli* (LeClerc *et al.*, 1996; Denamur *et al.*, 2002).

Les autres mécanismes contribuant à la plasticité des génomes bactériens incluent la recombinaison entre séquences homologues présentes sur les génomes, les mouvements des éléments génétiques mobiles (séquences d'insertion IS, plasmides, bactériophages, intégrons) et les transferts horizontaux de gènes (la transformation, la transduction et la conjugaison). Au niveau structural, ces mécanismes peuvent provoquer des réarrangements très importants de l'ADN au sein d'un génome, tels que des insertions, inversions, duplications, amplifications, délétions, translocations. Outre les conséquences structurales de ces mécanismes, ils confèrent également une grande flexibilité fonctionnelle, conduisant à des modifications de l'expression des gènes, mais aussi à des pertes d'information génétique ou à l'acquisition de nouvelles séquences d'ADN et par conséquent de nouvelles fonctions phénotypiques. A titre d'exemples, chez la bactérie archétype *E. coli*, plus de 10 % du génome est issu de transferts horizontaux de gènes (Lawrence & Ochman, 1998) et la comparaison du génome de souches appartenant à l'espèce *Legionella pneumophila* montre que plus de 10 % des gènes sont spécifiques d'une souche, une forte proportion ayant été acquis par transferts horizontaux (Cazalet *et al.*, 2004). De façon plus générale dans le cas de bactéries pathogènes, des modifications de virulence et de résistances à des molécules antibactériennes peuvent résulter de ces mécanismes. Cette plasticité qui caractérise les génomes bactériens est souvent interprétée comme une marque de leur potentiel évolutif et adaptatif. Malgré cette forte plasticité, l'évolution des organismes bactériens se caractérise également par des contraintes fortes au niveau de régions conservées portant des gènes essentiels à la survie.

A côté de ces mécanismes liés à la variabilité génétique, les bactéries présentent un autre niveau de plasticité, celui des réseaux de régulation globale de l'expression des gènes. En effet, à structure génomique et génotype constants, une même souche bactérienne peut

présenter des phénotypes différents, liés à une régulation différentielle de l'expression génique suite à une réponse à une variation environnementale par exemple (Smits *et al.*, 2006). Cette plasticité des réseaux de régulation peut également s'observer entre différents isolats d'une même espèce bactérienne. En effet, l'étude de régulateurs globaux tels que le facteur sigma RpoS (σ^S) a montré que son niveau d'expression était variable dans différents isolats d'*E. coli*, ce qui entraîne des différences phénotypiques importantes (nutrition, vitesse de croissance, résistance à des stress...), indépendantes du génotype (King *et al.*, 2004). D'autres systèmes globaux de régulation (ppGpp, Lrp, Crp, la topologie de l'ADN) permettent une variabilité phénotypique au sein d'une même espèce. Ces réseaux de régulation peuvent également moduler la virulence bactérienne (Heroven *et al.*, 2007).

L'objectif de cette thèse se situe résolument au niveau de l'étude de cette plasticité du génome chez les bactéries, en utilisant la bactérie pathogène *L. pneumophila* comme modèle. En effet, les données de séquençage montrent une grande plasticité génomique et l'observation de souches isolées de l'environnement ou de patients révèle une diversité phénotypique importante (Cazalet *et al.*, 2004). Cette thèse vise d'une part, au niveau fonctionnel, à mettre en évidence l'impact des régulateurs globaux que sont les protéines de type histone sur différents phénotypes adaptatifs de ces bactéries, dont la virulence et d'autre part, au niveau structural, à analyser la variabilité génomique liée aux séquences d'insertion chez *L. pneumophila* et étudier si celle-ci peut être exploitée au niveau épidémiologique.

I. *Legionella* et légionellose

I.1. Historique

Au cours de la 56^{ème} convention de la légion américaine à Philadelphie en 1976, 188 anciens légionnaires ont été atteints d'une pneumonie atypique, mortelle pour 29 d'entre eux (Fraser *et al.*, 1977). L'étude épidémiologique a révélé la présence d'un organisme pathogène

dans l'hôtel où séjournèrent les légionnaires, la contamination semblant se faire par voie aérienne probablement via le système de climatisation. L'agent bactérien responsable de cette épidémie a été isolé en 1977 (McDade *et al.*, 1977) et nommé *Legionella* en référence aux légionnaires victimes de cette épidémie. La maladie a, quant à elle, été appelée « maladie des légionnaires » ou légionellose.

Des analyses rétrospectives, effectuées sur des échantillons isolés antérieurement lors d'épidémies ou de cas isolés de pneumonies et pour lesquels aucune bactérie n'avait pu être clairement identifiée, ont alors permis de mettre en évidence des cas de légionellose bien avant 1976, dans les années 1947 à 1959 (McDade *et al.*, 1979).

I.2. Présentation clinique

Les bactéries du genre *Legionella* sont potentiellement dangereuses pour la santé humaine avec différents niveaux de gravité selon les formes de la maladie : une forme bénigne appelée fièvre de Pontiac et une forme plus sévère correspondant à la légionellose, qui peut évoluer chez certains patients en infections extra-pulmonaires (Palusińska-Szyszk & Cendrowska-Pinkosz, 2009). La contamination des individus se fait par inhalation d'aérosols ou de microgouttelettes d'eau contaminés, qui sont générés au niveau de points d'eau naturels mais aussi au niveau d'installations développées par les activités humaines telles que les tours aérorefrigérantes, les climatiseurs, les douches, les fontaines, les spas... Il s'agit donc d'une pathologie dont l'émergence et la dissémination accrue sont liées au développement technologique humain. Aucune contamination interhumaine n'a été décrite à ce jour.

I.2.1. La fièvre de Pontiac

La première épidémie caractérisée a touché 144 travailleurs ou visiteurs d'un centre médical à Pontiac, dans le Michigan (USA) en 1968 (Glick *et al.*, 1978). La fièvre de Pontiac

peut se définir sur des critères à la fois cliniques et environnementaux (Burnsed *et al.*, 2007). Les symptômes cliniques majeurs se rapprochent de ceux d'une grippe (fièvre, maux de tête, myalgies et frissons) et apparaissent entre 3 à 8 jours après la contamination. Il n'y a ni décès ni complications graves, la guérison étant spontanée au bout de 2 à 8 jours (Tossa *et al.*, 2006). Les critères environnementaux reposent sur la détection d'une concentration de *Legionella* supérieure ou égale à 10^4 bactéries par litre d'eau prélevée au site de la contamination. Cette maladie peut être causée par différentes espèces de *Legionella* : *L. anisa* (Fenstersheib *et al.*, 1990), *L. feeleii* (Herwaldt *et al.*, 1984), *L. micdadei* (Goldberg *et al.*, 1989), ainsi que *L. pneumophila* (Kaufmann *et al.*, 1981; Palusińska-Szyszk & Cendrowska-Pinkosz, 2009).

I.2.2. La légionellose ou maladie du légionnaire

La légionellose est une pneumopathie atypique aiguë, plus sévère que la fièvre de Pontiac. Le taux de mortalité oscille entre 10 et 15 %, pouvant atteindre 60 % chez les individus immunodéprimés (Stout & Yu, 1997). La période d'incubation est de 2 à 10 jours. Les symptômes cliniques couramment observés incluent une forte fièvre, de la toux et des maux de tête. Bien que cette maladie soit généralement localisée au niveau des poumons, il existe des formes extra-pulmonaires qui peuvent affecter de nombreux organes : le cœur (myocardite, péricardite ou endocardite), les yeux (rétinite), les tissus adipeux, le système digestif (péritonite, colite nécrosante, pancréatite), les reins et le système musculaire (rhabdomyolyse) (Mégarbane *et al.*, 2000; McConkey *et al.*, 2006; Han *et al.*, 2010). Ces formes extra-pulmonaires conduisent très souvent à la mort du patient (Palusińska-Szyszk & Cendrowska-Pinkosz, 2009).

Le CNR (Centre National de Référence, localisé à Lyon) des légionelles a mis en évidence plusieurs types de cas de légionellose : sporadiques, c'est-à-dire correspondant à des cas isolés causés par un génotype unique ; épidémiques, c'est-à-dire correspondant à plusieurs

cas causés par un génotype unique et survenus dans la même zone géographique au cours d'une période de temps relativement courte ; et endémiques, c'est-à-dire correspondant à plusieurs cas causés par un génotype unique et non reliés entre eux.

I.3. Le genre *Legionella*

I.3.1. Caractéristiques taxonomiques

La bactérie responsable de la maladie du légionnaire a été caractérisée en 1977 (Brenner *et al.*, 1979). Cette découverte a conduit à la description d'un nouveau genre bactérien, *Legionella*, seul représentant de la famille des *Legionellaceae*. Le genre *Legionella* forme donc un groupe cohérent placé dans l'ordre des *Legionellales* qui est le seul représentant de la subdivision 2 des Gammaprotéobactéries. Les espèces les plus proches phylogénétiquement des bactéries du genre *Legionella* sont *Coxiella burnetii* et *Rickettsiella grylli*, espèces actuellement exclues de l'ordre des *Rickettsiales*. A ce jour, 53 espèces de *Legionella* et 3 sous-espèces réparties en 70 sérogroupes ont été décrites (Fields *et al.*, 2002; Diederer, 2008). Les différents sérogroupes sont définis par les antigènes O des lipopolysaccharides (Ciesielski *et al.*, 1986).

Un certain nombre d'isolats font l'objet d'une classification particulière, essentiellement sur des bases écologiques (voir section I.4. pour l'écologie des *Legionella*). En effet, ces isolats, contrairement aux autres espèces de *Legionella*, sont des parasites obligatoires d'amibes et ne poussent pas, ou très peu, sur milieu synthétique *in vitro* (Adeleke *et al.*, 1996). Ces isolats ont été qualifiés de LLAPs (pour *Legionella*-like Amoebal Pathogens). Cependant, des analyses phylogénétiques basées sur les séquences du gène *rrs*, codant l'ARN ribosomique 16S ou du gène *mip*, codant une protéine appelée Macrophage Infectivity Potentiator impliquée dans le pouvoir pathogène de *Legionella*, ont conduit à une reclassification de certains LLAPs (Adeleke *et al.*, 2001; La Scola *et al.*, 2004). Ainsi, sur les

sept isolats de LLAPs analysés par Adeleke *et al.* (2001), quatre ont été nommés *Legionella drozanskii*, *Legionella fallonii* et *Legionella rowbothamii*, tandis que les trois autres ont été reclassés dans l'espèce *Legionella lytica*. Leur pouvoir pathogène est actuellement inconnu (Adeleke *et al.*, 2001).

I.3.2. Caractéristiques épidémiologiques

Plus d'une vingtaine d'espèces ont été isolées au moins une fois chez des patients en clinique humaine, mais l'espèce *L. pneumophila* est la plus souvent mise en cause lors d'épidémies. Elle est responsable de plus de 90 % des cas de légionellose communautaire en Amérique du Nord, en Europe, en Australie et en Nouvelle-Zélande (Yu *et al.*, 2002; Doleans *et al.*, 2004). Cette espèce comporte 15 sérogroupes, dont le séro groupe 1 est responsable à lui seul de 84,2 % des cas déclarés dans le monde, suivi des sérogroupes 6, 3 et 4 (Fields *et al.*, 2002; Helbig *et al.*, 2002). De plus, une souche particulière de *L. pneumophila* de séro groupe 1, appelée Paris, est extrêmement répandue en Europe et est responsable de plus de 10 % des infections en France. Les autres espèces non-*pneumophila* les plus fréquemment isolées en clinique chez les patients sont : *L. longbeachae* (3,9 %), *L. bozemanii* (2,4 %) et les espèces *L. micdadei*, *L. feeleii*, *L. dumoffii*, *L. wadsworthii* et *L. anisa* qui comptent pour les 2,2 % restants (Yu *et al.*, 2002). Quatorze autres espèces, sensiblement plus rares, sont potentiellement pathogènes pour l'homme, leur implication en pathologie humaine étant fortement associée à une immunodépression importante des patients (Fields *et al.*, 2002; Palusińska-Szys & Cendrowska-Pinkosz, 2009). Les 3 sous-espèces de *L. pneumophila*, subsp. *pneumophila*, *fraseri* et *pascullei* sont également responsables de cas de légionellose (Brenner *et al.*, 1988; Cordevant *et al.*, 2003).

Une particularité est à noter en Australie et en Nouvelle-Zélande où 30,4 % des cas de légionellose communautaire sont dus à l'espèce *L. longbeachae*, même si la majorité des cas

(45,7 %) restent liés à *L. pneumophila* de séro groupe 1 (Yu *et al.*, 2002). De plus et contrairement à *L. pneumophila* qui colonise les environnements aquatiques, *L. longbeachae* se retrouve très fréquemment dans le terreau et se transmet par inhalation de poussières de sols contaminés (Steele *et al.*, 1990a; Cameron *et al.*, 1991; den Boer *et al.*, 2007).

L'étude de la distribution différentielle des souches dans l'environnement et chez les patients a montré que la prévalence clinique de *L. pneumophila* de séro groupe 1 n'était pas liée à sa présence majoritaire dans l'environnement. En effet, une étude menée en France (Doleans *et al.*, 2004) a montré que les isolats *L. pneumophila* de séro groupe 1, responsables de 95,4 % des cas cliniques en France, ne représentaient que 28,2 % des isolats retrouvés dans l'environnement, tandis que les espèces non-*pneumophila*, responsables de très peu de cas cliniques (1,2 %), étaient présentes de façon équivalente dans l'environnement (24,5 % des isolats environnementaux). Ces résultats suggèrent ainsi une virulence accrue de l'espèce *L. pneumophila* de séro groupe 1 plutôt qu'une prévalence dans l'environnement (Doleans *et al.*, 2004).

I.3.3. Caractéristiques bactériologiques et biochimiques

Les bactéries du genre *Legionella* sont des bacilles à Gram négatif, aérobies strictes, non sporulées et dont les cellules mesurent de 0,3 à 0,9 µm de largeur sur 1,5 à 5 µm de longueur. Elles sont non capsulées, à l'exception de l'espèce *L. longbeachae* qui présente une structure de type capsule par observation au microscope électronique et possède des gènes impliqués dans la production de cette structure (Cazalet *et al.*, 2010). Ces bactéries sont organotrophes, utilisant des acides aminés comme source d'énergie et de carbone (Benson & Fields, 1998; Fliermans, 1996), auxotrophes vis-à-vis de la L-cystéine et exigeantes en fer pour leur multiplication (Mintz *et al.*, 1988; Fliermans, 1996). Elles ne sont pas capables de

fermenter le glucose ni de réduire les nitrates. Elles sont uréase-négatives, catalase-positives et gélatinase-positives.

Leur paroi est très particulière par rapport à celle des autres bactéries à Gram négatif : elle est en effet très riche en acides gras ramifiés, habituellement retrouvés chez les bacilles à Gram positif (Moss *et al.*, 1981), et qui peuvent constituer jusqu'à 90 % de l'ensemble des acides gras. Chaque espèce de *Legionella* possède un profil caractéristique en acides gras ce qui permet de les différencier par chromatographie en phase gazeuse (Diogo *et al.*, 1999). Les ubiquinones de la membrane cytoplasmique sont elles aussi particulières par la présence de chaînes latérales isoprénoïdes comprenant plus de 10 unités isoprènes, ce qui est rare dans la nature (Moss *et al.*, 1983).

Les bactéries du genre *Legionella* sont mobiles à l'exception de *L. oakridgensis*, *L. nautarum*, *L. londiniensis* (McDade *et al.*, 1977; Fliermans, 1996) et *L. longbeachae* (Cazalet *et al.*, 2010). Elles possèdent un ou parfois deux flagelles en position polaire ou subpolaire (Ott *et al.*, 1991) et des inclusions lipidiques.

La culture des bactéries du genre *Legionella* est favorisée en présence de 2,5 % de CO₂ et nécessite la présence de L-cystéine et de fer dans le milieu. La croissance est optimale à un pH très légèrement acide de l'ordre de 6,8-6,9 et, pour la majorité des espèces, à une température de 36 +/- 1 °C pendant 3 à 10 jours. Les cultures sont généralement réalisées en milieu BYE (Buffered Yeast Extract) supplémenté en L-cystéine, en tampon ACES et en fer, et additionné d'agar et de charbon (milieu BCYE) pour les cultures en milieu solide (Feeley *et al.*, 1979). La source de fer peut varier et provenir de différentes formes du fer : nitrate de fer, sulfate de fer, chlorure de fer, hématine ou hémine, mais les meilleurs résultats sont obtenus avec du pyrophosphate de fer. Les colonies de *Legionella* après croissance sur milieu gélosé BCYE apparaissent grisâtres, de consistance muqueuse, de taille hétérogène et présentent généralement un aspect en « verre brisé » lorsqu'elles sont observées à la loupe binoculaire.

I.3.4. Caractéristiques génomiques

A l'heure actuelle, les séquences génomiques de sept souches de *Legionella* ont été publiées. Il s'agit de cinq souches de *L. pneumophila* de séro groupe 1 : Philadelphia (Chien *et al.*, 2004), Paris et Lens (Cazalet *et al.*, 2004), Corby (Steinert *et al.*, 2007) et Alcoy (D'Auria *et al.*, 2010) et de deux souches de *L. longbeachae* : D4968 et NSW150 (Kozak *et al.*, 2010; Cazalet *et al.*, 2010).

La souche Philadelphia est dérivée de l'isolat obtenu chez un patient décédé lors de l'épidémie de 1976 à Philadelphie (Fraser *et al.*, 1977). La souche Paris est une souche endémique responsable de 12,7 % des cas de légionellose en France et de 33 % dans la région parisienne (Aurell *et al.*, 2003). La souche Lens a été responsable d'une grande épidémie sporadique de légionellose dans le Nord de la France entre 2003 et 2004. Elle a été isolée en janvier 2004 et son génome séquencé en février 2004. La souche Corby, également très virulente (Steinert *et al.*, 2007), a été isolée dans une autre zone géographique auprès d'un patient atteint de légionellose. La souche Alcoy, isolée à partir d'un patient (Fernández *et al.*, 2002), a été responsable d'une épidémie étendue de légionellose en Espagne suite à la contamination d'une tour aérofrigorante industrielle.

Les génomes des cinq souches de *L. pneumophila* sont de taille comparable (environ 3,5 Mpb), codent environ 3000 gènes et présentent une composition en G+C similaire d'environ 37 à 38 % (Tableau 1). Ces cinq souches possèdent chacune une région chromosomique capable de s'exciser et de se maintenir sous forme de plasmide. Chez la souche Paris, les événements d'excision et d'intégration sont dépendants de la phase de croissance (Doléans-Jordheim *et al.*, 2006) et chez la souche Corby, la forme épisomique pourrait être conjugative (Glöckner *et al.*, 2008). L'analyse des données de séquençage de ces cinq souches montre que 40 % des gènes codent une fonction inconnue et 20 % sont uniques au genre *Legionella*. Par ailleurs, 3,5 % des protéines possèdent des domaines spécifiques de

ou ressemblant à des protéines eucaryotes (Gomez-Valero *et al.*, 2009). Ces protéines sont susceptibles d'être impliquées dans la virulence en mimant les fonctions de l'hôte eucaryote et en perturbant ainsi la machinerie cellulaire, plus particulièrement le trafic vésiculaire, lorsqu'elles sont secrétées par des systèmes de translocation (voir section III.1.3). L'acquisition des gènes codant ces protéines a pu se faire par transfert horizontal (Franco *et al.*, 2009).

Les génomes des deux souches de *L. longbeachae* de séroroupe 1, D4968 et NSW150 (Kozak *et al.*, 2010; Cazalet *et al.*, 2010), ont été comparés à des séquences partielles de trois autres souches de *L. longbeachae* (une de séroroupe 1 et deux de séroroupe 2), ainsi qu'aux génomes complets des souches de *L. pneumophila*. Le chromosome des deux souches de *L. longbeachae* présente une taille plus grande que celle du chromosome de *L. pneumophila*, d'un peu plus de 10 %, ce qui se reflète également au niveau du nombre plus important de gènes prédits (Tableau 1). Cependant, la fraction codante des génomes est identique chez *L. pneumophila* et *L. longbeachae*. La comparaison de la structure des différents génomes et des analyses de synténie révèlent de nombreux réarrangements chromosomiques entre les souches d'espèces différentes mais aussi de même espèce, confirmant la forte plasticité chez cette famille bactérienne (Figure 1). La synténie est significativement différente, 34 % des gènes étant spécifiques de *L. longbeachae* et d'importantes différences en termes de « facteurs de virulence » ayant été mises en évidence. En particulier, bien que le système de sécrétion de type IVb, appelé Dot/Icm et nécessaire à la virulence (voir section III.1.3), soit très conservé chez *L. pneumophila* et *L. longbeachae*, les effecteurs transloqués par ce système sont quant à eux très différents, puisque plus de la moitié de ceux présents chez *L. longbeachae* ne possèdent pas d'équivalent chez *L. pneumophila*. De plus, les souches de *L. longbeachae* présentent la particularité de posséder des gènes impliqués dans les processus de dégradation des cellules de végétaux et d'insectes

(cellulase, xylanase, chitinase). Ces différences suggèrent des stratégies de réplication intracellulaire et d'adaptation à des niches écologiques différentes entre les souches de *L. longbeachae* et *L. pneumophila*. En particulier, les spécificités génomiques de *L. longbeachae* pourraient suggérer son adaptation à une niche écologique différente, en l'occurrence du terreau qui est un milieu riche en végétaux et insectes en décomposition. Cela permettrait également d'expliquer les spécificités épidémiologiques de *L. longbeachae* (voir section I.3.2 ci-dessus).

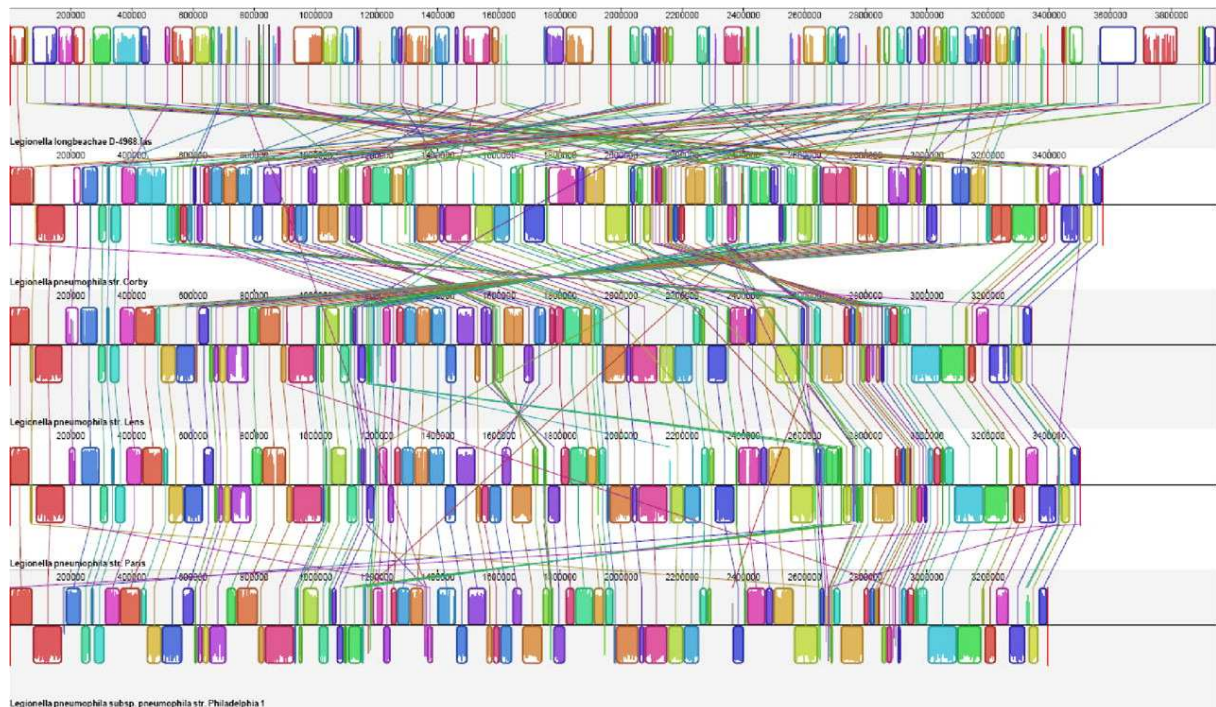


Figure 1: Comparaison de la structure des génomes de *L. longbeachae* D4968 et de quatre souches de *L. pneumophila* (Corby, Lens, Paris et Philadelphia). Les génomes des souches de *L. longbeachae*, *L. pneumophila* Corby, Lens, Paris et Philadelphia sont représentés de manière linéaire et de haut en bas, respectivement. Les boîtes colorées représentent des régions génomiques identiques entre elles et elles sont reliées par des traits de même couleur (Kozak *et al.*, 2010).

Les deux souches de *L. pneumophila* Paris et Lens ainsi que les deux souches de *L. longbeachae* D4968 et NSW150 possèdent chacune un plasmide de 131,9 ; 59,8 ; 49 et 71,8 kb, respectivement (Cazalet *et al.*, 2004, 2010) (Tableau 1). La comparaison des plasmides portés par les trois souches Paris, Lens et NSW150 a révélé 15 gènes en commun (Figure 2), présentant des homologies avec des gènes *tra* codant des fonctions nécessaires au transfert conjugatif. La majeure partie des gènes portés par ces plasmides sont de fonction inconnue.

Espèce	<i>L. pneumophila</i>					<i>L. longbeachae</i>	
	Alcoy	Corby	Philadelphie	Paris	Lens	D4968	NSW 150
Année de séquençage	2010	2007	2004	2004	2004	2010	2010
Référence	(D'Auria <i>et al.</i> , 2010)	(Steinert <i>et al.</i> , 2007)	(Chien <i>et al.</i> , 2004)	(Cazalet <i>et al.</i> , 2004)	(Cazalet <i>et al.</i> , 2004)	(Kozak <i>et al.</i> , 2010)	(Cazalet <i>et al.</i> , 2010)
Numéro d'accèsion	CP001828	NC_009494	NC_002942	NC_006368	NC_006369	ACZG00000000	A-MEXP-1179
Sérotype	1	1	1	1	1	1	1
Taille du chromosome (kb)	3516	3576	3397	3503	3345	4050	4077
% G+C	38,38	38,48	38,27	38,37	38,42	37	37,1
Nombre de protéines codées	2957	3206	2942	2878	2934	3821	3512
Plasmide	0	0	0	1	1	1	1
Taille du plasmide (kb)	-	-	-	131,9	59,8	49	71,8

Tableau 1 : Principales caractéristiques génomiques de cinq souches de *L. pneumophila* et deux souches de *L. longbeachae*. Ces données ont été compilées d'après les publications de (D'Auria *et al.*, 2010; Kozak *et al.*, 2010; Cazalet *et al.*, 2010).

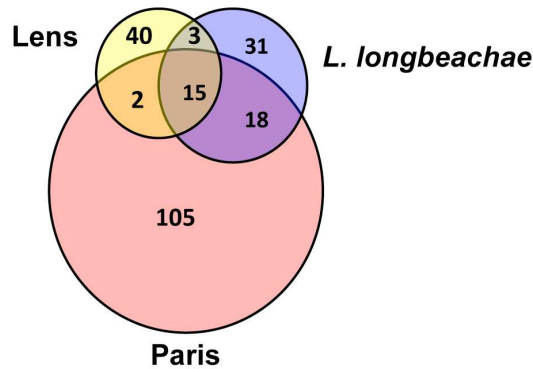


Figure 2 : Gènes spécifiques et communs des plasmides portés par les souches de *L. pneumophila* Paris et Lens et de *L. longbeachae* NSW150 (Cazalet *et al.*, 2010).

I.4. Ecologie

Les bactéries du genre *Legionella* sont ubiquitaires, présentes principalement dans les milieux hydriques et généralement dans les eaux de surface (Fliermans *et al.*, 1981). Le développement technologique lié aux activités humaines a généré des conditions favorables à la colonisation de nouvelles niches écologiques, en l'occurrence tous les réseaux d'eaux domestiques et industriels (climatisations, tours aéroréfrigérantes, spas, fontaines...). Le développement de ces réseaux d'eau a ainsi exposé l'homme à cette bactérie pathogène. Il existe une exception, *L. longbeachae* qui est fréquemment isolée de terreaux (Steele *et al.*, 1990b).

Les bactéries du genre *Legionella* se retrouvent dans des eaux ayant un pH compris entre 4 et 8 (Ohno *et al.*, 2003) et se multiplient à une température variant entre 25 °C et 45 °C (Konishi *et al.*, 2006). Elles peuvent même survivre à des températures de 70 °C (Allegra *et al.*, 2008). *Legionella* est donc capable de s'adapter à tout un panel d'environnements, aux conditions physico-chimiques non stringentes. De plus, elles peuvent se retrouver, soit libres sous forme planctonique, soit sessiles au sein de biofilms, soit à l'intérieur de protozoaires qu'elles infectent et qui sont considérés comme leurs hôtes naturels.

I.4.1. Formation de biofilms

Les bactéries du genre *Legionella* peuvent se retrouver au sein de biofilms (Cargill *et al.*, 1992; Taylor *et al.*, 2009). Le biofilm est un assemblage de microorganismes dans une matrice d'exopolymères qui va former une mince pellicule résistante de quelques micromètres à quelques millimètres d'épaisseur aux interfaces solide-liquide et liquide-air. Il constitue une niche écologique facilitant la survie des microorganismes dans l'environnement, puisque la matrice extracellulaire et la couche externe de cellules vont protéger physiquement la communauté microbienne à l'intérieur du biofilm contre divers agents antimicrobiens comme le chlore, les antibiotiques, les détergents... (Sutherland, 2001). Les biofilms sont souvent à l'origine de problèmes majeurs dans certains secteurs industriels ou hospitaliers, puisqu'ils sont impliqués dans les phénomènes de corrosion et/ou de contamination d'équipements et de réseaux de distribution d'eau potable. Les biofilms peuvent être constitués de nombreuses espèces microbiennes (champignons, bactéries, levures, protozoaires...). La présence naturelle d'un grand nombre d'amibes d'espèces différentes permet également la multiplication des bactéries du genre *Legionella* au sein d'un biofilm (Lau & Ashbolt, 2009). De ce fait, la quantité de cellules de *Legionella* est bien plus importante dans les biofilms que dans les eaux circulantes, ce qui suggère que les analyses bactériologiques sur des échantillons d'eau prélevés sous-évaluent le nombre réel de bactéries pathogènes présentes (Rogers *et al.*, 1994).

Les bactéries du genre *Legionella* ont également la capacité d'interagir avec d'autres bactéries au sein du biofilm. Kimura *et al.* (Kimura *et al.*, 2009) ont montré qu'une petite molécule du quorum sensing chez *Pseudomonas aeruginosa*, la N-(3-oxododecanoyl)-l-homoserine lactone, inhibait la croissance de *Legionella*. Ces résultats suggèrent qu'il existe une communication inter-espèces au sein des biofilms.

Pour adhérer et survivre au sein d'un biofilm, les bactéries du genre *Legionella* doivent s'adapter et se différencier, ce qui implique une modification de l'expression des gènes, par exemple ceux impliqués dans la biosynthèse du flagelle (Watnick & Kolter, 2000). Une étude comparative de profils globaux de transcription, en utilisant des cellules de *Legionella* dans des conditions de biofilms et de cultures liquides, a montré qu'entre 11 % et 15 % des 2932 gènes étudiés avaient une expression significativement différente par rapport à des cellules planctoniques prélevées dans deux conditions distinctes (Hindré *et al.*, 2008). Ces résultats suggèrent donc une modification importante de l'expression génique pour permettre l'adaptation à ce mode de vie. Les gènes exprimés de façon différentielle incluent ceux impliqués dans les mécanismes de résistance aux stress oxydatifs et dans l'acquisition du fer.

I.4.2. Interactions avec les hôtes eucaryotes

Les bactéries du genre *Legionella* sont considérées comme des bactéries intracellulaires facultatives, capables de se multiplier dans certains protozoaires et macrophages d'organismes supérieurs (homme, cochon d'inde, souris). Quatorze espèces d'amibes et deux espèces de protozoaires ciliés sont décrites comme hôtes potentiels de *Legionella* dans l'environnement (Philippe *et al.*, 2006). Ces cellules eucaryotes sont donc des réservoirs naturels de ces bactéries et leur procurent également un moyen de protection. En effet, lors de changements environnementaux et/ou nutritionnels, les amibes peuvent former des kystes ou des vésicules à l'intérieur desquels se retrouvent les cellules bactériennes (Cirillo *et al.*, 1994; Bouyer *et al.*, 2007). De plus, ces hôtes semblent augmenter la virulence des bactéries du genre *Legionella* vis-à-vis des macrophages humains suite à l'expression de certains facteurs de virulence (Fields *et al.*, 2002). Par exemple, la composition en protéines membranaires des cellules de *Legionella* change entre la forme libre et après l'infection de l'amibe. Certaines de ces protéines exprimées après le passage dans les cellules amibiennes

faciliteraient l'adhésion et la phagocytose de la bactérie par les macrophages humains (Cirillo *et al.*, 1999). D'autre part, l'inhalation d'amibes infectées favoriserait la multiplication des bactéries au sein des poumons (Brieland *et al.*, 1996).

Les bactéries du genre *Legionella* infectent les amibes et les macrophages de manière assez similaire (Swanson & Hammer, 2000). Cependant, l'infection des macrophages nécessite des conditions particulières, telles que la formation de microgouttelettes d'eau, afin que les bactéries pénètrent dans les alvéoles pulmonaires. De ce fait, ces bactéries n'ont pas co-évolué avec ce type cellulaire, contrairement à leurs hôtes naturels. Le cycle de vie de *Legionella* se déroule en deux phases distinctes : une phase transmissive et une phase répllicative (Molofsky & Swanson, 2004). Après contact avec son hôte au cours de la phase transmissive, les cellules de *Legionella* sont internalisées par phagocytose conventionnelle ou phagocytose par enroulement (Figure 3) (Horwitz, 1984; Newton *et al.*, 2010). Le cycle d'infection est décrit Figure 4. Après la phagocytose, la bactérie se retrouve à l'intérieur de la cellule hôte dans une vacuole appelée phagosome et synthétise des facteurs de virulence qui empêchent la fusion de ce phagosome avec les lysosomes (Horwitz, 1983). Des vésicules issues du réticulum endoplasmique granuleux, de l'appareil de Golgi et des mitochondries sont ensuite recrutées au niveau de cette vacuole (Newton *et al.*, 2010). A l'intérieur de cette vacuole spécialisée, les cellules bactériennes vont se multiplier activement au cours de la phase répllicative. L'expression des facteurs de virulence bactériens est alors réprimée. En fin de phase répllicative, la diminution des nutriments à l'intérieur de la cellule hôte semble être le signal permettant la transition à la phase transmissive (Brüggemann *et al.*, 2006). Les bactéries vont alors à nouveau acquérir des traits de virulence par expression différentielle de gènes, qui vont leur permettre de détruire la cellule hôte et d'en infecter une nouvelle. Ces traits de virulence incluent la formation de pores dans la membrane des cellules hôte ce qui va entraîner leur lyse et la libération des cellules de *Legionella*, l'acquisition de flagelles et la

résistance à différents stress (Molofsky & Swanson, 2004; Newton *et al.*, 2010). Les cellules de *Legionella* peuvent également moduler l'apoptose chez les macrophages en interférant avec la voie NF- κ B. Ce processus est spécifique des cellules humaines et n'a pas été mis en évidence chez les amibes (Gao & Kwaik, 2000; Gao & Abu Kwaik, 1999; Abu-Zant *et al.*, 2007).

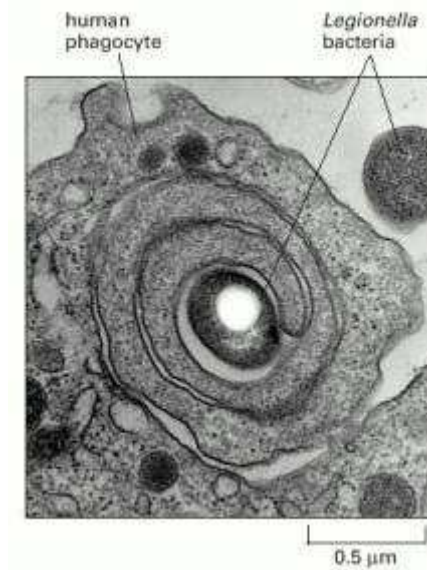


Figure 3 : Phagocytose de *L. pneumophila* par un macrophage humain (Horwitz, 1984). Ici, une phagocytose par enroulement est visible.

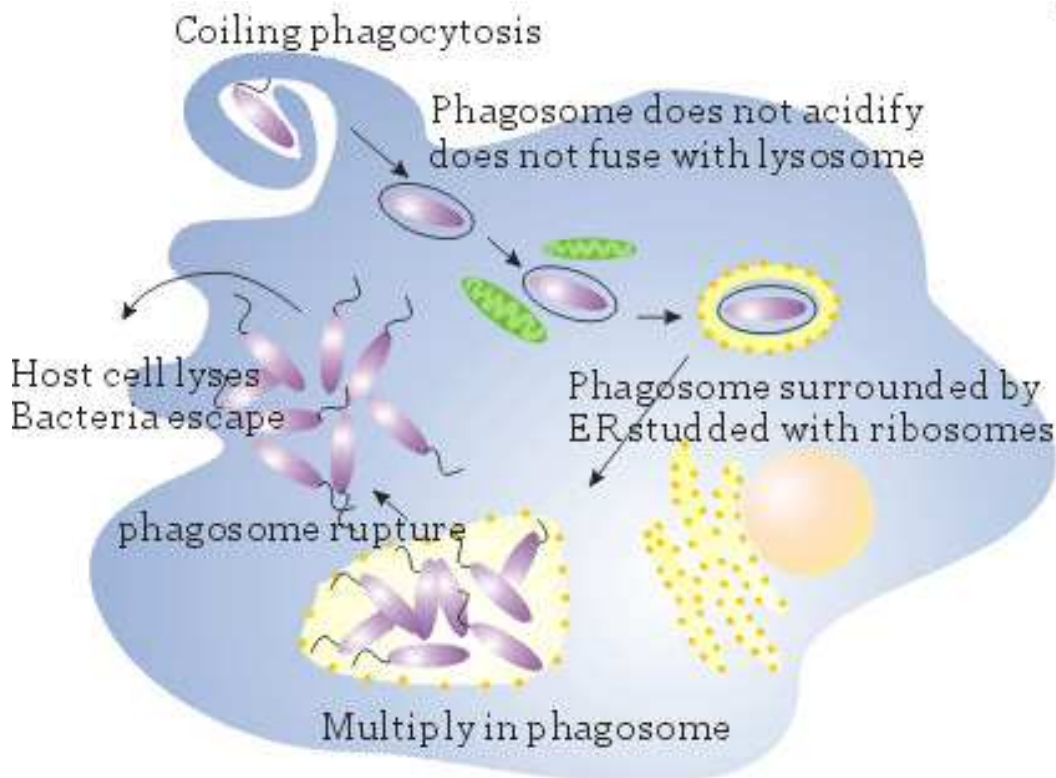


Figure 4 : Cycle infectieux de *Legionella* dans une cellule eucaryote (Swanson & Hammer, 2000).

I.5. L'Etat Viable Non Cultivable (VBNC)

I.5.1. Définition

L'état viable mais non cultivable (VBNC) a été décrit pour la première fois chez *E. coli* et *Vibrio cholerae* (Xu *et al.*, 1982). Depuis, cet état physiologique a été décrit chez plus de 60 espèces bactériennes, pathogènes ou non (Oliver, 2005). Les bactéries, lorsqu'elles présentent un état viable mais non cultivable, se caractérisent par un déficit de croissance et ne sont plus capables de former des colonies sur les milieux de culture solides classiques. L'entrée dans un état VBNC fait suite à des modifications environnementales importantes, souvent un stress nutritionnel, mais peut également être induit par divers facteurs abiotiques comme des variations de températures (trop éloignées de l'optimum de température de la bactérie), la dessiccation, les UV, des changements d'osmolarité, de pH, la concentration en oxygène ou encore certains produits chimiques (Oliver, 2010). Même dans l'état VBNC, les

cellules restent viables, c'est-à-dire qu'elles gardent une certaine activité métabolique (Oliver, 2005). L'état VBNC est réversible : les cellules peuvent donc « ressusciter » dans certaines conditions, c'est-à-dire présenter à nouveau une croissance classique. La Figure 5 représente une réponse typique de l'entrée dans l'état VBNC chez les bactéries. Les cellules bactériennes sont alors généralement de plus petite taille et présentent une modification de la composition membranaire, ainsi qu'une importante diminution des réactions de biosynthèses macromoléculaires et de la respiration. En revanche, le potentiel membranaire, le niveau d'ATP et la synthèse des ARN ribosomiques restent élevés. L'état VBNC diffère de l'état de sporulation rencontré chez les bactéries du type *Bacillus* ou *Clostridium*, qui présentent alors une activité métabolique très fortement diminuée et synthétisent des structures membranaires particulières pour se différencier en endospores. A la différence des VBNC, ces endospores restent cultivables (Wolska *et al.*, 2007).

L'état VBNC peut permettre aux bactéries de persister dans l'environnement. Il a été reporté que des cellules de *P. fluorescens* pouvaient rester dans cet état plus d'un an dans l'eau (Bunker *et al.*, 2004) et que des cellules de *V. fluviialis* pouvaient être revivifiées six ans après leur entrée dans l'état VBNC dans les sédiments marins (Amel *et al.*, 2008). Il semblerait que l'état VBNC soit une forme de résistance aux stress environnementaux. En effet, les formes VBNC de *Mycobacterium smegmatis* présentent une forte résistance à la chaleur (plus de 80 °C) (Anuchin *et al.*, 2009).

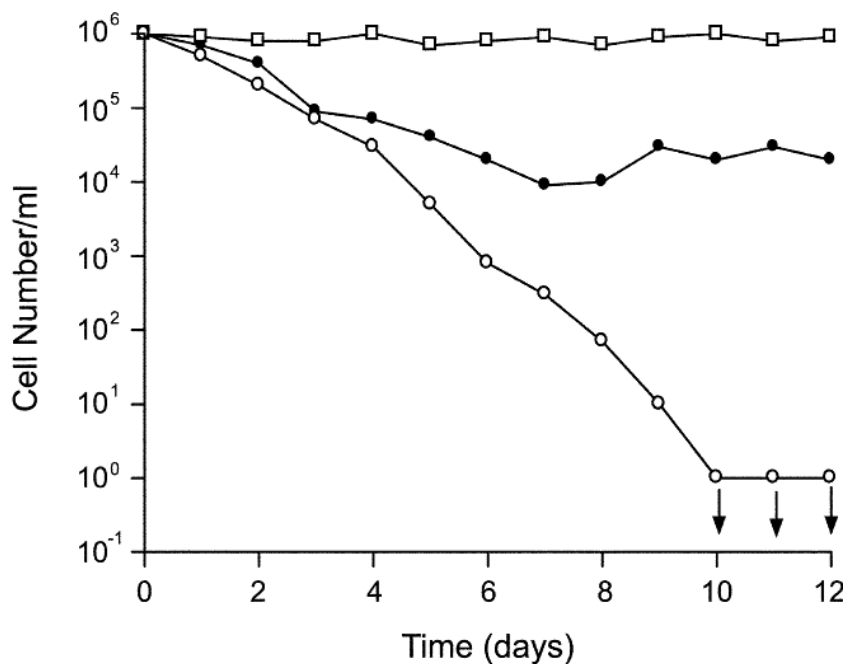


Figure 5 : Courbes caractéristiques de l'entrée dans l'état VBNC chez *Vibrio fulniculus* à 5 °C.

Le nombre de cellules totales (□), estimé par la mesure de la densité optique, de cellules cultivables (○) (comptage sur milieu gélosé) et de cellules viables (●) (mesure de l'activité métabolique) sont montrés (Oliver, 2005). Les flèches indiquent l'absence de détection.

Une des conséquences de l'entrée de bactéries pathogènes dans un état VBNC est son impact sur la résistance aux antibiotiques. Les antibiotiques qui sont très actifs sur la croissance cellulaire, par action sur la synthèse du peptidoglycane ou la synthèse protéique, n'agissent pas ou peu sur les cellules VBNC. Cette résistance s'expliquerait par la faible activité métabolique des cellules VBNC. Il a par exemple été reporté que la vancomycine était efficace sur des cellules d'*Enterococcus faecalis* dans l'état VBNC à des concentrations 500 fois supérieures à la concentration minimale inhibitrice (Lleò *et al.*, 2007). De même, une augmentation de la résistance à l'hygromycine B et la doxycycline a été observée chez des cellules de *M. smegmatis* dans l'état VBNC (Anuchin *et al.*, 2009). D'autre part, des bactéries

uropathogènes d'*E. coli* entrent dans l'état VBNC après traitement antibiotique, mais ne sont pas totalement éliminées, pouvant provoquer une réinfection lors de l'arrêt du traitement et du retour de conditions favorables à la levée de l'état VBNC (Rivers & Steck, 2001).

Plusieurs techniques sont utilisées pour mettre en évidence l'état VBNC. Elles reposent sur des mesures de différents « marqueurs de viabilité » tels que l'intégrité des membranes ou de l'ADN, la synthèse des ARN ribosomiques ou certaines activités enzymatiques (oxydation/réduction) (Alleron *et al.*, 2008; Gião *et al.*, 2009). La revivification des cellules est une autre façon de démontrer l'état VBNC. Parfois, un simple retour à des conditions optimales de température par exemple peut permettre de recouvrer la cultivabilité des cellules (Du *et al.*, 2007). Cette revivification peut se faire également après le passage dans un hôte eucaryote comme les protozoaires *Acanthamoeba castellanii* (Steinert *et al.*, 1997) et *A. polyphaga* (García *et al.*, 2007), un vers marin *Hermodice carunculata* (Sussman *et al.*, 2003), des cellules d'embryon de poulet (Cappelier *et al.*, 1999), de rat (Saha *et al.*, 1991), de souris (Oliver & Bockian, 1995) ou d'homme (Colwell *et al.*, 1996).

I.5.2. Etudes moléculaires de l'état VBNC chez les bactéries

Les mécanismes moléculaires d'induction de l'état VBNC chez les bactéries sont encore peu connus. Des études transcriptionnelles et protéomiques de l'état VBNC induit par différentes conditions ont été réalisées chez les bactéries *E. faecalis*, *V. cholerae*, *V. vulnificus*, *E. coli* O157:H7 et *Lactobacillus* (Smith & Oliver, 2006; Lai *et al.*, 2009). Des différences d'expression de gènes codant des protéines membranaires, telles que les porines (OmpW chez *E. coli*) ou encore des protéines impliquées dans la formation des pili, des flagelles ou le transport de métaux, ont été observées suggérant que la composition de la membrane conditionnerait l'état VBNC et la résurrection des bactéries.

Par ailleurs, aucune étude n'a pu mettre en évidence le rôle de protéines dans l'induction de l'état VBNC. Ceci peut s'expliquer par le fait que les diverses études menées ont été réalisées sur des bactéries différentes et les conditions d'induction de l'état VBNC n'étaient pas comparables d'une étude à une autre.

A l'heure actuelle, une seule protéine est connue comme étant requise pour la sortie de l'état VBNC : la protéine Rpf (resuscitation-promoting factor). Elle a été identifiée pour la première fois chez *Micrococcus luteus* (Mukamolova *et al.*, 1998), mais des protéines homologues ont été retrouvées chez de nombreuses bactéries (Kana & Mizrahi, 2010), dont *Legionella*. Cependant, aucune étude de la protéine Rpf de *Legionella* n'a encore été publiée.

I.5.3. Mise en évidence de l'état VBNC chez *Legionella*

C'est en 1987 que l'état VBNC a été décrit pour la première fois chez des souches de *L. pneumophila* (Hussong *et al.*, 1987). Des échantillons provenant de l'hôpital de Stafford en Angleterre ont été analysés suite à une épidémie de légionellose en 1985. La présence de bactéries du genre *Legionella* dans les échantillons n'avait alors pas pu être mise en évidence par les méthodes classiques de culture sur milieu gélosé, mais grâce à une nouvelle méthode de détection basée sur l'utilisation d'anticorps anti-*Legionella* couplés à une protéine fluorescente (voir les méthodes de détection section II). Une infection de cellules d'embryon de poulet avait ensuite été réalisée avec ces prélèvements, ce qui a permis la revivification et ainsi la mise en culture de *Legionella* sur milieu gélosé (Hussong *et al.*, 1987). Par la suite, il a été montré que le passage dans les hôtes amibiens *A. castellanii* (Steinert *et al.*, 1997) et *A. polyphaga* (García *et al.*, 2007) permettait également le retour à la cultivabilité des cellules de *Legionella*.

I.5.4. Induction de l'état VBNC chez les bactéries du genre *Legionella*

Les carences nutritionnelles

Il a été montré que des cellules de *Legionella* placées dans de l'eau stérile durant plus de quatre mois perdaient leur capacité à former des colonies sur milieu synthétique gélosé tout en maintenant l'intégrité de leur ADN et l'expression des gènes codant l'ARNr 16S (Steinert *et al.*, 1997). Ces cellules bactériennes redeviennent cultivables sur milieu gélosé après une co-culture à 37 °C avec *A. castellanii* pendant 24 heures.

La température et le pH

Les bactéries du genre *Legionella* ont une croissance optimale à une température de 36 °C et un pH de 6,9 et peuvent se multiplier à des températures comprises entre 20 °C et 46 °C et des pH compris entre 5,5 et 9,2 (Wadowsky *et al.*, 1985; Katz & Hammel, 1987; Fields *et al.*, 2002). Les bactéries du genre *Legionella* peuvent présenter un état VBNC en fonction des conditions de température et de pH (Ohno *et al.*, 2003). En effet, ces cellules perdent leur capacité à être mises en culture sur milieu synthétique après incubation à des températures supérieures à 45 °C, tout en maintenant leur intégrité membranaire et une certaine activité métabolique. Elles peuvent également être revivifiées en présence d'amibes. Une étude plus récente a constaté que des cellules de *Legionella* pouvaient entrer dans un état VBNC après un passage de 30 min à des températures de 70 °C (Allegra *et al.*, 2008).

Les traitements physiques et chimiques

Divers traitements physiques et chimiques (chaleur, UV, chlore, ozone, eau de javel, monochloramine...) sont couramment utilisés afin de détruire les bactéries du genre *Legionella* présentes dans les réseaux d'eau. L'efficacité de ces traitements à long terme n'étant pas absolue, plusieurs équipes ont tenté d'expliquer ce qu'il se passait en étudiant les

effets de ces traitements sur la cultivabilité des bactéries (Muraca *et al.*, 1987; Yamamoto *et al.*, 1991). En particulier, les traitements chlorés induisent une perte de la cultivabilité de *Legionella* sur milieu gélosé, mais les cellules restent actives d'un point de vue métabolique, ce qui a été mesuré par la transcription du gène *mip*, suggérant ainsi que ces traitements chimiques induisent bien un état VBNC (Bej *et al.*, 1991). D'autres études plus récentes montrent qu'un traitement à l'hypochlorite de sodium (eau de javel) induit également l'état VBNC dans des populations de *Legionella* (Chang *et al.*, 2007; García *et al.*, 2008). Dans la première étude, l'état VBNC des bactéries a été démontré par des tests d'intégrité membranaire en utilisant un kit de viabilité (Chang *et al.*, 2007), tandis que dans la seconde, il a été montré que les souches traitées pouvaient recouvrir leur cultivabilité après co-culture avec *A. polyphaga* (García *et al.*, 2008).

Récemment, il a été montré que la monochloramine, molécule utilisée pour le traitement des réseaux d'eau aux Etats-Unis, induisait également une perte de la cultivabilité chez *L. pneumophila* (Alleron *et al.*, 2008). Cependant, les cellules présentent une activité estérase, des membranes intègres et sont revivifiables en présence de l'hôte amibien *A. castellanii*.

Enfin, une diminution de la cultivabilité des cellules de *Legionella* au cours du temps a été démontrée (Wadowsky *et al.*, 1985; Heller *et al.*, 1998) dans des conditions de faibles salinités (Wong & Liu, 2008), d'oxygénation particulière du milieu (Kana *et al.*, 2008) ou encore d'expositions aux UV (Ben Said *et al.*, 2010). Cependant, aucune mesure de viabilité des cellules (activité métabolique ou intégrité membranaire) et aucune co-culture avec un hôte eucaryote n'ont été réalisées dans ces études, ce qui suggère seulement que de telles conditions pourraient également induire un état VBNC chez *Legionella*.

Actuellement, aucune donnée sur les mécanismes moléculaires de l'entrée ou sortie de l'état VBNC chez *Legionella* n'a été publiée.

II. Détection et Typage des bactéries du genre *Legionella*

II.1. Détection des souches de *Legionella*

La mise en évidence d'une contamination par *Legionella* est un enjeu majeur pour la santé publique, d'une part pour assurer un traitement approprié aux patients atteints de légionellose et d'autre part pour traiter les installations contaminées et/ou prévenir d'autres contaminations éventuelles de l'environnement. Différentes techniques, de natures microbiologique, moléculaire et biochimique, existent pour détecter les bactéries du genre *Legionella* dans l'environnement et au niveau clinique chez un patient. Elles impliquent la mise en culture et la mise en évidence de marqueurs moléculaires et biochimiques spécifiques des souches de *Legionella*.

II.1.1. La culture

La mise en culture peut être réalisée à partir de tout type de prélèvement soit des voies respiratoires chez les patients soit directement dans l'environnement. Au niveau clinique, le prélèvement donnant un meilleur taux de positivité est le lavage broncho-alvéolaire. Cependant, si l'état du patient ne permet pas de faire ce type de prélèvement, il est possible d'isoler la bactérie à partir d'expectorations ainsi que de biopsies, d'aspirations trachéales ou bronchiques ou du liquide pleural. Les échantillons collectés sont tout d'abord traités à l'acide (pH 2,2) et/ou à température élevée (30 min à 50 °C) de manière à éliminer une partie de la flore microbienne présente (Reinthalter *et al.*, 1993; De Luca *et al.*, 1999). La spécificité de détection dans ces prélèvements est liée à l'utilisation du milieu d'isolement BCYE (Leoni & Legnani, 2001), qui contient divers biocides de type glycine, vancomycine, polymyxine et colistine (GVPC), auxquels les bactéries du genre *Legionella* sont résistantes, ce qui permet d'éliminer la flore microbienne de l'échantillon. La mise en culture demeure une des méthodes de référence du fait de sa spécificité complète, mais elle présente l'inconvénient de

sa lenteur (entre 3 et 10 jours pour obtenir des colonies), d'une sensibilité variable selon les échantillons et l'expertise du laboratoire qui effectue la mise en culture. De plus, elle ne permet pas de détecter les bactéries dans l'état VBNC (voir section I.5). Cette technique reste encore très utilisée : sur 1206 cas de légionellose en France en 2009, une souche de *Legionella* a été isolée par culture dans 220 cas (18,2 %, rapport de l'InVS 2010).

II.1.2. Mise en évidence de marqueurs moléculaires et biochimiques

Afin d'obtenir un diagnostic plus rapide et efficace, de nouvelles méthodes de détection des bactéries du genre *Legionella* ont été développées et sont utilisées en complément des méthodes microbiologiques. Elles reposent sur la détection d'anticorps anti-*Legionella* dans le sérum des patients, la recherche d'antigène soluble dans les urines ou encore la détection d'acides nucléiques spécifiques de *Legionella* à partir de tout type de prélèvements.

Sérologie et immunofluorescence indirecte

La méthode de recherche d'anticorps anti-*Legionella* par immunofluorescence indirecte (IFI ou IFAT : indirect fluorescent antibody test) était couramment utilisée avant 1999, date de la commercialisation des tests urinaires. Ce test repose sur la reconnaissance dans le prélèvement d'anticorps anti-LPS de *Legionella* par des anticorps anti-humain couplés à une protéine fluorescente, la fluorescéine (Figure 6). De façon alternative, des tests enzymatiques de type ELISA sont également utilisés : dans ce cas, l'anticorps secondaire est couplé à une enzyme, la peroxydase qui va catalyser une réaction chimique (*i.e.* dégradation d'un substrat) qui sera quantifiée par colorimétrie.

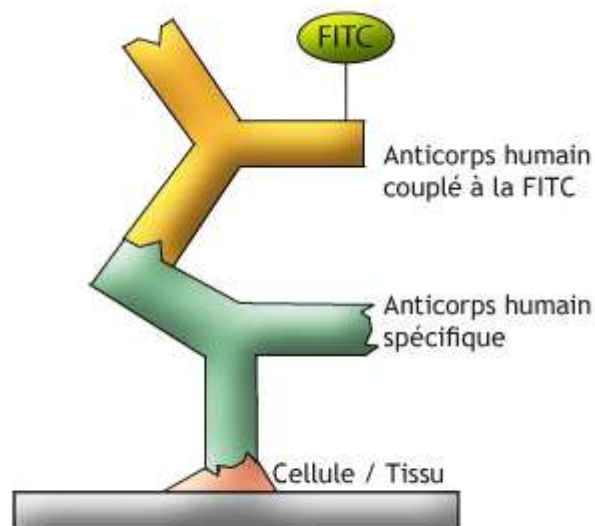


Figure 6 : Principe du test d'immuno-fluorescence indirecte. Le substrat antigénique utilisé dans la détection des bactéries du genre *Legionella* est le LPS. Si l'échantillon est positif, les anticorps spécifiques présents dans l'échantillon se lient aux antigènes fixés à la phase solide. Dans une seconde étape, les anticorps liés sont détectés avec des anticorps anti-humain couplés à la fluorescéine et analysés avec un microscope à fluorescence (d'après Bioadvance <http://www.bio-advance.fr>).

Les méthodes sérologiques tendent à être moins utilisées en France, le pourcentage de cas de légionellose diagnostiqués par ces méthodes étant passé de 58 % en 1997 à 3 % en 2008 (Figure 7). En effet, bien que les tests sérologiques soient de précieux outils épidémiologiques, ils présentent un certain nombre d'inconvénients. Ils ont peu d'impact sur la prise de décision clinique du fait qu'ils deviennent positifs tardivement, en moyenne 2 à 3 semaines après infection. De plus, de nombreux patients anciennement infectés par *L. pneumophila* gardent des titres anticorps résiduels parfois élevés (Plouffe *et al.*, 1995). Par exemple, ces anticorps sont encore détectables 2 ans après l'infection chez 20 % des patients (Kallings & Nordström, 1983). Enfin, des réactions antigéniques croisées se produisent pour les différentes espèces du genre *Legionella*, mais également avec d'autres bactéries,

principalement *Pseudomonas aeruginosa* et *C. burnetii* (agent de la fièvre Q), et plus rarement avec *Pseudomonas pseudomallei*, *Bacteroides fragilis*, *Campylobacter*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*, *Citrobacter freundii*, *Haemophilus influenzae*, *Rickettsia typhi* et *Proteus vulgaris* (Wang *et al.*, 1987; Collins *et al.*, 1984; Boldur *et al.*, 1991).

	1996		1997		1998		1999		2000		2001		2002	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Nombre de cas	80		206		381		440		610		807		1021	
Culture	29	36	60	29	98	26	68	16	134	22	157	20	195	19
Sérologie			119	58	189	50	161	37	235	39	237	29	250	25
Antigène urinaire			53	26	148	39	267	61	396	65	602	74	820	80

	2003		2004		2005		2006		2007		2008		2009	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Nombre de cas	1044		1202		1527		1443		1428		1244		1206	
Culture	173	17	217	18	276	18	220	15	231	16	213	17	220	18
Sérologie	240	23	217	18	163	11	100	7	92	6	40	3	29	2
Antigène urinaire	858	82	1037	86	1412	92	1362	95	1325	95	1187	95	1158	96

* un cas peut être diagnostiqué par plusieurs méthodes
 Source : données de la déclaration obligatoire

Figure 7 : Répartition des méthodes de diagnostic des cas de légionellose en France entre 1996 et 2009 (source InVS).

Mise en évidence d'antigène soluble dans les urines

La détection d'antigène urinaire de *L. pneumophila* de sérotype 1 a été mise au point en 1979 (Tilton, 1979). Cette méthode de détection a été largement commercialisée et utilisée à la fin des années 1990. Actuellement, elle constitue la méthode la plus utilisée pour détecter les cas de légionellose (96 % des cas en 2009, Figure 7). L'antigène recherché dans les urines du patient est localisé au niveau des lipopolysaccharides (LPS) bactériens et est spécifique de l'espèce *pneumophila* (Kohler *et al.*, 1981). Trois méthodes de détection ont été développées avec des sensibilités et spécificités comparables : radio-immunologique, l'anticorps secondaire étant radiomarqué ; immuno-enzymatique, l'anticorps secondaire étant couplé à une enzyme dont l'activité pourra ensuite être détectée ; et immuno-chromatographique, basée sur la migration des anti-LPS marqués à l'or colloïdal (Figure 8). Les tests basés sur la

recherche d'antigène urinaire de *L. pneumophila* de séro groupe 1 ont une grande spécificité, proche de 100 % (Kashuba & Ballow, 1996), mais leur sensibilité varie de 70 % à plus de 90 % (Kashuba & Ballow, 1996). Ces variations de sensibilité sont attribuées à différentes causes : (i) la proportion d'infections par *L. pneumophila* de séro groupe 1 par rapport à celles liées aux autres sérogroupe et espèces du genre *Legionella* (Ruf *et al.*, 1990) ; (ii) la gravité clinique de la maladie, les cas graves présentant une meilleure détection (Yzerman *et al.*, 2002) ; (iii) l'utilisation d'urines avant ou après concentration, la sensibilité des tests augmentant après concentration des urines (Blanco *et al.*, 2008; Guerrero *et al.*, 2004) ; (iv) le temps d'incubation du test pour les méthodes d'immuno-chromatographie, la prolongation à une heure augmentant la sensibilité (Diederer & Peeters, 2006).

Malgré ces variations, les tests urinaires présentent l'avantage d'être faciles à réaliser et de permettre un diagnostic précoce. En effet, ils sont habituellement positifs 1 à 3 jours après le début de la maladie et deviennent négatifs en 4 à 6 semaines. Chez une faible proportion de patients cependant, ils demeurent positifs jusqu'à un an après l'infection (Kohler *et al.*, 1984; Sopena *et al.*, 2002). L'excrétion urinaire des antigènes est en règle générale plus longue chez les patients immunodéprimés, qui sont habituellement fébriles plus longtemps (Sopena *et al.*, 2002). De plus, les tests actuels sont limités à la détection des bactéries du genre *Legionella* de séro groupe 1. L'utilisation d'un nouvel antigène (PAL, peptidoglycan-associated lipoprotein) pour ce type de test pourrait permettre de détecter des bactéries du genre *Legionella* de sérogroupe 3, 4, 5 et 6, voire même d'autres espèces comme *L. micdadei*, *L. jordanis*, *L. oakridgensis*, *L. anisa*, *L. gormanii*, et *L. sainthelensi* (Kim *et al.*, 2003). Il n'existe pas de test urinaire commercialisé pour détecter *L. longbeachae*.

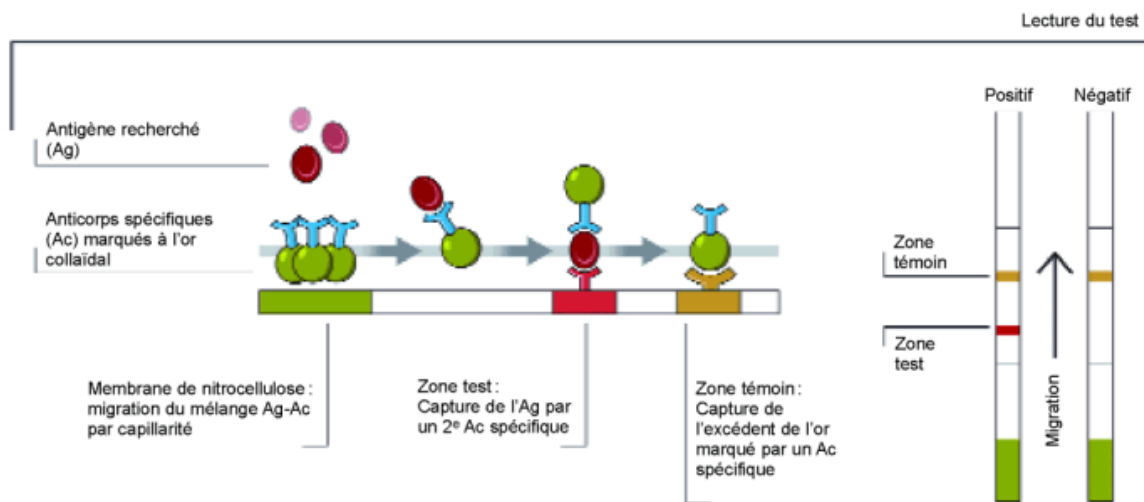


Figure 8 : Principe du test d'immunographie d'après l'université numérique des sciences pharmaceutiques francophone www.unspf.fr.

Détection des acides nucléiques chez *Legionella*

Actuellement, les techniques d'amplification génique par PCR sont employées uniquement pour la détection des bactéries du genre *Legionella* dans l'environnement et non pas comme outils de diagnostic clinique de la légionellose en Europe (Ricketts & Joseph, 2007). Elles présentent l'intérêt de détecter des souches de *Legionella* quelle que soit l'espèce ou le sérotype, sans nécessité d'isolement de la souche. La méthode est rapide, fiable et sensible puisqu'elle permet de détecter des niveaux faibles de contamination (moins de 200 génomes par litre) (Morio *et al.*, 2008). Les inconvénients sont liés à la technique de PCR : la présence possible d'inhibiteurs de PCR qui peut conduire à des résultats faussement négatifs ou le risque d'une contamination de l'échantillon qui peut conduire à de faux positifs. La PCR cible principalement des régions spécifiques des gènes codant l'ARN ribosomique 16S (Stølhaug & Bergh, 2006), 5S (Kessler *et al.*, 1993), leur région intergénique (Herpers *et al.*, 2003) ou le gène *mip* (Stølhaug & Bergh, 2006).

II.2. Méthodes de typage

II.2.1. Généralités

Les méthodes de typage sont essentielles pour comprendre l'épidémiologie des infections puisqu'elles permettent d'identifier les souches responsables de cas de légionellose épidémiques, endémiques ou sporadiques (Visca *et al.*, 1999). Ces techniques doivent permettre : (i) l'identification de la source de l'infection, (ii) de distinguer les isolats de *Legionella* entre eux, (iii) de distinguer isolats cliniques et environnementaux.

Plusieurs méthodes de typage des bactéries du genre *Legionella* ont été développées : MAb (Monoclonal Antibodies), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), rep-PCR (repetitive element PCR), SNP (Single Nucleotide Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis), SBT (Sequence-Based Typing), MLEE (Multi-Locus Enzyme Electrophoresis), ribotypage... A l'heure actuelle, quatre de ces méthodes sont couramment employées : une méthode phénotypique basée sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux MAb et trois méthodes moléculaires dont le principe repose sur la variabilité nucléotidique des isolats : l'AFLP, le PFGE et le SBT (Fields *et al.*, 2002; Hilbi *et al.*, 2010).

Ces différentes méthodes épidémiologiques sont évaluées selon différents critères (Tenover *et al.*, 1997) : (i) la typabilité, c'est-à-dire la capacité d'assigner un type à un isolat ; (ii) la reproductibilité ; (iii) la stabilité, c'est-à-dire la capacité d'établir des liens clonaux entre les souches dérivant d'un ancêtre commun ; (iv) le pouvoir discriminant, c'est-à-dire la probabilité que deux isolats, non reliés épidémiologiquement et choisis au hasard, soient assimilés à deux types différents ; et enfin (v) la rapidité, l'accessibilité, le coût d'utilisation, la facilité d'interprétation et le partage des données entre laboratoires.

Malgré la diversité actuelle des techniques de typage, une limite importante existe : en effet, elles ne permettent pas de discriminer entre eux les isolats de la souche *L. pneumophila*

Paris, qui est très répandue en Europe et responsable de plus de 10% des infections en France en 2009. De ce fait, de nouvelles méthodes de typage sont encore à développer et ceci a constitué l'objet d'étude d'une partie de ma thèse (voir chapitre 4).

II.2.2. MAb (Monoclonal Antibodies)

Cette technique est utilisée en routine dans les laboratoires cliniques pour l'identification de l'espèce et du sérotype (Helbig *et al.*, 1997). Les anticorps monoclonaux (MAb) utilisés ciblent des antigènes de surface, c'est-à-dire les LPS de la membrane externe des bactéries. Un total de 98 anticorps monoclonaux dirigés contre les LPS de *L. pneumophila* a été obtenu en immunisant des souris avec des souches de référence de *L. pneumophila*. Ces anticorps constituent le panel de Dresden. Un test ELISA est le plus souvent réalisé en utilisant un des MAb comme anticorps primaire (Helbig *et al.*, 1997). Cette technique permet de grouper l'espèce *L. pneumophila* en 15 sérotypes numérotés de 1 à 14 et un groupe appelé sérotype Lansing 3. Elle permet aussi en utilisant 8 MAb différents de subdiviser les isolats de *L. pneumophila* de sérotype 1 en 9 sous-groupes : Knoxville, Philadelphia, Benidorm, France/Allentown, Olda, Oxford, Bellingham, Heysham et Camperdown (Figure 9) (Helbig *et al.*, 2002). Un épitope reconnu par l'anticorps MAb 3/1 est lié à une virulence accrue pour le sérotype 1 : en effet, 85,1 % des légionelles de sérotype 1 isolées chez des patients sont reconnues par ce MAb.

Des soucis de reproductibilité interlaboratoire pour la subdivision en sous-groupes ont été reportés par cette technique. De plus, il n'existe actuellement aucun kit permettant de réaliser un test de sérotypage rapidement.

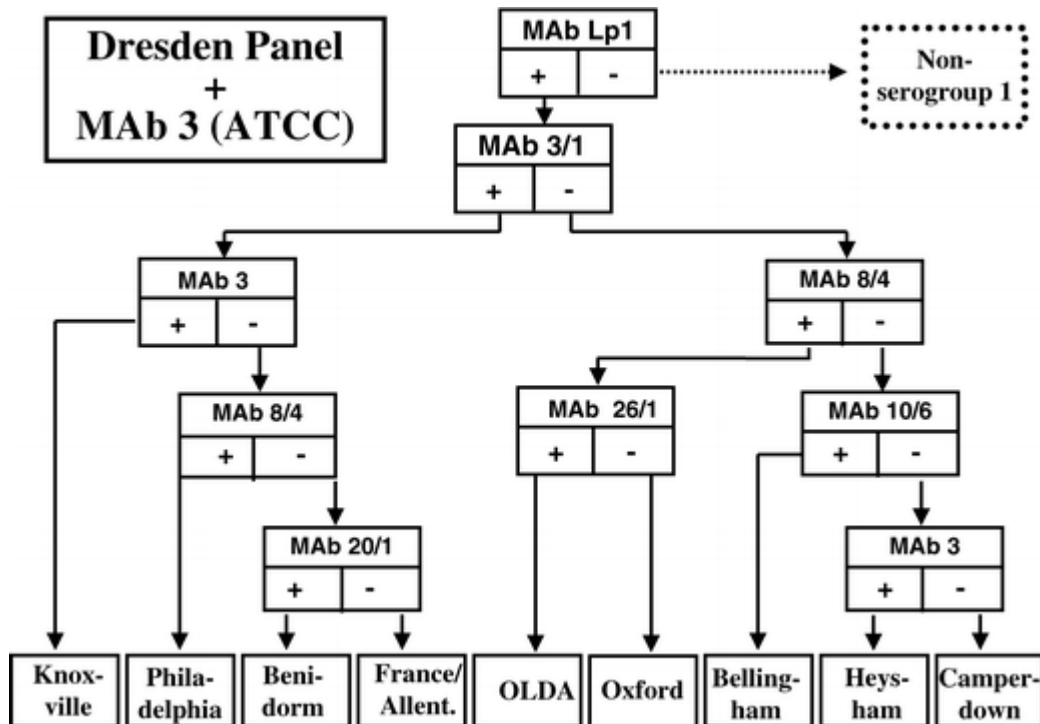


Figure 9 : Organigramme pour la subdivision en sous-groupes monoclonaux de *L. pneumophila* sérogruppe 1, en utilisant le panel de Dresden et MAb3. Les sigles + et - indiquent une réaction positive et négative, respectivement, à l'anticorps monoclonal (d'après (Helbig *et al.*, 2002)).

II.2.3. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

La technique AFLP consiste à extraire l'ADN bactérien, le digérer par des enzymes de restriction, puis ligaturer les fragments obtenus à des adaptateurs de séquence connue. Les fragments sont alors amplifiés par PCR à l'aide d'amorces complémentaires aux adaptateurs et les produits obtenus sont ensuite séparés par électrophorèse. L'enzyme de restriction doit être adaptée au pourcentage en G+C et à la taille du génome de l'organisme (Valsangiacomo *et al.*, 1995). Cette technique présente les avantages d'être simple d'utilisation, rapide (entre 24 et 48 heures) et de posséder un bon pouvoir discriminant (0,89) au sein du genre *Legionella* (Fry *et al.*, 1999). Il s'agit de la première méthode de typage génomique qui a été

standardisée et utilisée au niveau international chez *L. pneumophila* (Fry *et al.*, 2002). L'utilisation de cette technique tend cependant à diminuer par rapport à d'autres.

II.2.4. L'électrophorèse en champs pulsés (PFGE)

Cette méthode de typage est utilisée chez de nombreuses espèces bactériennes, comme *E. coli* 0157:H7, *Salmonella*, *Shigella*, *Streptococcus aureus* et *Bacillus tuberculosis* (Lawrence *et al.*, 1999; Singh *et al.*, 2006). Dans le cas des bactéries du genre *Legionella*, elle est essentiellement utilisée pour le typage des isolats de l'espèce *L. pneumophila* et de sérogroupes 1, bien que quelques travaux aient été réalisés sur des isolats d'une part des sérogroupes 3, 4, 6 et 10 (Lück *et al.*, 1994, 1995; Visca *et al.*, 1999; Ott *et al.*, 1992) et d'autre part des espèces *L. bozemanii*, *L. micdadei*, *L. longbeachae* (Lück *et al.*, 1995) et *L. anisa* (Akermi *et al.*, 2006).

Cette méthode consiste à extraire l'ADN génomique, puis de le digérer par des enzymes de restriction choisies pour générer 10 à 30 fragments de restriction de 10 à 800 kb chacun. L'enzyme de restriction la plus largement utilisée pour les isolats de *Legionella* est *Sfi*I (Pruckler *et al.*, 1995; Jonas *et al.*, 2000). La séparation des fragments d'ADN obtenus est réalisée sur un gel d'agarose grâce à deux champs électriques qui alternent durant des intervalles de temps courts, et augmentent au fur et à mesure. L'angle formé par ces deux champs électriques varie suivant la résolution voulue. Les fragments séparés sont révélés par coloration au bromure d'éthidium et les profils obtenus sont classés en pulsotypes, caractéristiques des différentes souches analysées. Un guide consensus pour l'interprétation des pulsotypes est disponible (Tenover *et al.*, 1995).

Il s'agit de la technique de typage présentant le meilleur pouvoir discriminant, supérieur à 0,98 au sein du genre *Legionella* (Riffard *et al.*, 1998; Fry *et al.*, 1999). Cependant, cette méthode a l'inconvénient d'être coûteuse en temps et en matériel (Tenover

et al., 1997). Cette méthode a permis d'établir le profil de la souche *L. pneumophila* séro groupe 1 Paris. Cependant, elle ne permet pas de discrimination entre les différents isolats de type Paris, bien que ceux-ci puissent être isolés en Europe, Amérique du Nord, Australie, Japon et Sénégal (Cazalet *et al.*, 2008; Aurell *et al.*, 2003).

II.2.5. Sequence-Based Typing (SBT)

La technique SBT (Gaia *et al.*, 2005) a été développée par le groupe européen EWGLI (European Working Group for Legionella Infections). Elle consiste à amplifier par PCR, puis à séquencer, des portions de sept gènes impliqués dans le métabolisme de base, la régulation génique et la virulence : *asd*, codant l'aspartate-β-semi-aldéhyde déshydrogénase ; *flaA*, codant une des sous-unités du flagelle ; *pilE*, codant la piline de type IV ; *mip*, codant une protéine appelée « macrophage infectivity potentiator » ; *mompS*, codant une protéine membranaire ; *proA*, codant une métalloprotéase à zinc ; et *neuA*, codant la N-acylneuraminate cytidyl transférase.

L'ensemble de ces séquences est comparé pour les différents isolats, ce qui permet de les classer en différents groupes alléliques ou ST (Sequence Type). Un numéro d'allèle est attribué à chaque portion de gènes, ce qui permet d'assigner un profil allélique, constitué par la succession de sept chiffres, à chaque isolat. Un numéro ST est alors attribué, qui est caractéristique de l'isolat. Ces séquences sont répertoriées dans une banque de données accessible sur le site du groupe EWGLI (www.ewgli.org). Cette technique présente les avantages d'être précise, reproductible et de générer des résultats facilement transférables entre différents laboratoires. Son pouvoir discriminant est de 0,963 et devient similaire à celui du PFGE (0,98) en l'associant à la méthode du sérotypage avec des anticorps monoclonaux (Ratzow *et al.*, 2007).

III. Facteurs de virulence chez les bactéries du genre

Legionella

Les facteurs de virulence sont définis comme tous les éléments d'une bactérie participant à leur capacité à infecter et à provoquer une maladie ou la mort de leur hôte. Ces facteurs sont donc très divers de façon générale, mais sont également très différents d'une espèce bactérienne à une autre. Dans cette partie bibliographique, je me focaliserai ainsi sur le cas des bactéries du genre *Legionella*. En effet, même si ces bactéries présentent certains facteurs de virulence typiques des bactéries pathogènes comme le lipopolysaccharide (LPS), les flagelles, les pili, des protéines de la membrane externe ou un système de sécrétion de type II, des spécificités existent comme la présence d'un système de sécrétion de type IV avec environ 200 protéines effectrices. Les bactéries du genre *Legionella* ont ainsi développé de nombreux facteurs de virulence leur permettant d'infecter et de se multiplier dans leurs hôtes naturels que sont les protozoaires, mais aussi dans les macrophages alvéolaires humains (Newton *et al.*, 2010). Le cycle cellulaire de *Legionella* au cours d'une infection se caractérise par deux phases distinctes (voir section I.4.2 et Figure 4) : la phase répllicative au cours de laquelle les cellules bactériennes se multiplient dans la vacuole intracellulaire et la phase transmissive au cours de laquelle les cellules bactériennes sortent de la cellule infectée pour éventuellement infecter d'autres cellules hôtes. Un parallèle a été suggéré entre les phases répllicative et transmissive de l'infection *in vivo* et les phases exponentielle et stationnaire lors de cultures *in vitro* de *Legionella* (Molofsky & Swanson, 2004). Ce parallèle a été proposé essentiellement sur la base d'une régulation différentielle des gènes au cours des deux types de phases *in vivo* et *in vitro*, avec notamment différents facteurs de virulence exprimés dans chaque phase. L'infection est donc un processus complexe qui requiert une régulation fine de l'expression des gènes entre ces deux phases successives et donc la participation de

régulateurs globaux afin de coordonner l'expression des facteurs de virulence à celle des gènes impliqués dans divers processus physiologiques, comme les réponses aux stress et l'adaptation au nouvel environnement constitué par l'hôte eucaryote. Chez *Legionella*, plusieurs régulateurs globaux ont été identifiés et l'implication de certains d'entre eux dans la virulence a pu être démontrée. Il s'agit notamment des protéines RpoS et CsrA, de la molécule signal (p)ppGpp, de petits ARNs non codants, et de systèmes à deux composantes. Une présentation des principaux facteurs de virulence chez *Legionella* et de leur rôle respectif est exposée ci-dessous et ce, en fonction de leur implication dans la phase répllicative ou transmissive. Enfin, les régulateurs de ces deux phases de l'infection seront également présentés.

III.1. Les facteurs impliqués dans la phase répllicative

Il est important de noter ici que certains des facteurs de virulence décrits ci-dessous peuvent également être impliqués dans la phase transmissive, en plus de la phase répllicative.

III.1.1. Facteurs impliqués dans l'acquisition du fer et d'acides aminés

Les bactéries pathogènes nécessitent du fer pour se multiplier dans leurs hôtes (Sutak *et al.*, 2008). Chez *Legionella*, une altération de l'expression des gènes impliqués dans l'acquisition du fer entraîne une diminution ou une perte totale de sa capacité à se multiplier dans les cellules hôtes. Deux sidérophores sont impliqués dans la virulence : un sidérophore de type aérobactine dont la synthèse dépend du gène *frgA* (Fur-regulated gene A) qui code une protéine homologue aux aérobactines synthétases LucA et LucC d'*E. coli* (Hickey & Cianciotto, 1997) et la légioabactine qui est un sidérophore spécifique des bactéries du genre *Legionella*. En effet, la légioabactine présente une structure différente des sidérophores connus par ailleurs chez d'autres bactéries (Liles *et al.*, 2000; Allard *et al.*, 2009). Les gènes *lbtAB*

codent respectivement la synthétase et la protéine d'export de la légiobactine (Allard *et al.*, 2006). Un mutant *lbtA* est affecté dans sa capacité à infecter des souris.

Un certain nombre d'autres facteurs sont impliqués dans l'assimilation du fer, comme les protéines IraAB et FeoB qui sont des transporteurs membranaires également nécessaires à la multiplication intracellulaire (Viswanathan *et al.*, 2000; Robey & Cianciotto, 2002). La protéine FeoB est notamment impliquée dans le transport du fer à travers la membrane plasmique (Cianciotto, 2007). Le facteur CcmC de maturation du cytochrome c, codé par le gène *ccmC*, est nécessaire à la formation du cytochrome C qui permet l'assimilation du fer (Viswanathan *et al.*, 2002). Les protéines FeoB, CcmC et IraA sont nécessaires à la multiplication intracellulaire de *Legionella* dans différents hôtes eucaryotes.

Le fer n'est pas le seul élément nécessaire aux bactéries *Legionella* pour se multiplier dans leur hôte. En effet, elles doivent acquérir des nutriments de leur hôte, notamment des acides aminés. Une famille de transporteurs d'acides aminés, appelés Pht (Phagosomal transporter), est nécessaire pour la réplication de *Legionella* dans ses hôtes (Sauer *et al.*, 2005). Ces transporteurs font partie de la famille MFS (Major Facilitator Superfamily). Une des protéines Pht a été caractérisée, la protéine PhtA. Il s'agit d'un transporteur de la thréonine, un acide aminé essentiel pour *L. pneumophila* durant la phase répliative (Sauer *et al.*, 2005). Des mutants du gène *phtA* sont incapables de se répliquer dans des macrophages. Une dizaine de protéines Pht ont été identifiées dans les génomes disponibles de toutes les souches de *Legionella* (Chen *et al.*, 2008).

III.1.2. Protéines de stress

Lors de la réplication intracellulaire, les cellules de *Legionella* doivent faire face à un certain nombre de stress pour survivre, notamment le stress oxydatif. Elles possèdent ainsi un arsenal leur permettant de faire face à ces stress. A l'heure actuelle, quatre protéines de stress impliquées dans la virulence chez *Legionella* ont été caractérisées : GspA, KatAB, SodB et SodC.

La protéine GspA (Global stress protein) est une protéine de 19kDa, homologue à la protéine GroEL (Abu Kwaik *et al.*, 1997). Cette protéine est exprimée durant la multiplication intracellulaire dans les macrophages et les amibes. *In vitro*, elle est également exprimée suite à quatre stress : choc thermique, stress oxydatif, choc acide et choc osmotique et elle augmente la résistance des bactéries à ces stress.

Le complexe protéique KatAB, constitué des sous-unités KatA et KatB, est une catalase-péroxydase périplasmique exprimée avant l'entrée dans la phase post-exponentielle (Bandyopadhyay & Steinman, 1998; Bandyopadhyay *et al.*, 2003). Ce complexe est requis pour la multiplication intracellulaire. Il serait nécessaire pour maintenir un faible taux de composés oxygénés comme le peroxyde d'hydrogène, permettant ainsi la multiplication des bactéries du genre *Legionella* dans le phagosome (Bandyopadhyay *et al.*, 2003).

Les protéines SodB et SodC sont des superoxide dismutases, la première dépendante du fer et cytoplasmique et la seconde dépendante de cuivre et de zinc et périplasmique. Elles favorisent la résistance des cellules bactériennes aux stress oxydatifs lors de l'invasion des cellules eucaryotes (Sadosky *et al.*, 1994; St John & Steinman, 1996). L'expression de ces protéines ne varie pas au cours de la croissance et n'est pas induite par différents stress (Sadosky *et al.*, 1994). Le gène *sodB* est essentiel car il permettrait de réduire les composés oxydatifs produits à l'intérieur du cytoplasme, ce que ne peut pas faire ni le complexe KatAB ni la protéine SodC.

III.1.3. Systèmes de sécrétion

Chez *L. pneumophila*, quatre systèmes de sécrétion ont été décrits, de types I, II, IVa et IVb, et un système de sécrétion de type V a été mis en évidence spécifiquement chez la souche Paris (Cazalet *et al.*, 2004). Les données génomiques concernant l'espèce *L. longbeachae* montrent l'existence de trois systèmes de sécrétion, de types I, II et IVb (Cazalet *et al.*, 2010). Seuls les systèmes de sécrétion de types II, IVa et IVb sont impliqués dans la virulence et seront donc décrits ici.

Le système de sécrétion de type II

Le système de sécrétion de type II, appelé Lsp pour « *Legionella* secretion pathway », est nécessaire pour une virulence complète de *Legionella*, mais aussi pour sa persistance dans l'environnement (Söderberg *et al.*, 2008). Il est constitué de protéines de sécrétion conservées chez les bactéries Gram-négatives, permettant l'export de toxines, protéases et d'autres types de protéines (Figure 10). Chez *Legionella*, le système Lsp permet le transport de plus d'une vingtaine de protéines, majoritairement des enzymes qui vont interférer avec la machinerie de l'hôte, comme des protéases, des phosphatases, des lipases (Cianciotto, 2009). La sécrétion est réalisée en deux étapes. Les substrats sont tout d'abord transloqués à travers la membrane plasmique dans le périplasme par le système Sec ou Tat, grâce à une séquence signal localisée dans leur partie N-terminale (Cianciotto, 2005). Dans le périplasme, cette séquence signal est éliminée, puis les substrats sont transportés par le système de sécrétion de type II à travers la membrane externe des bactéries vers le milieu extérieur (Lammertyn & Anné, 2004).

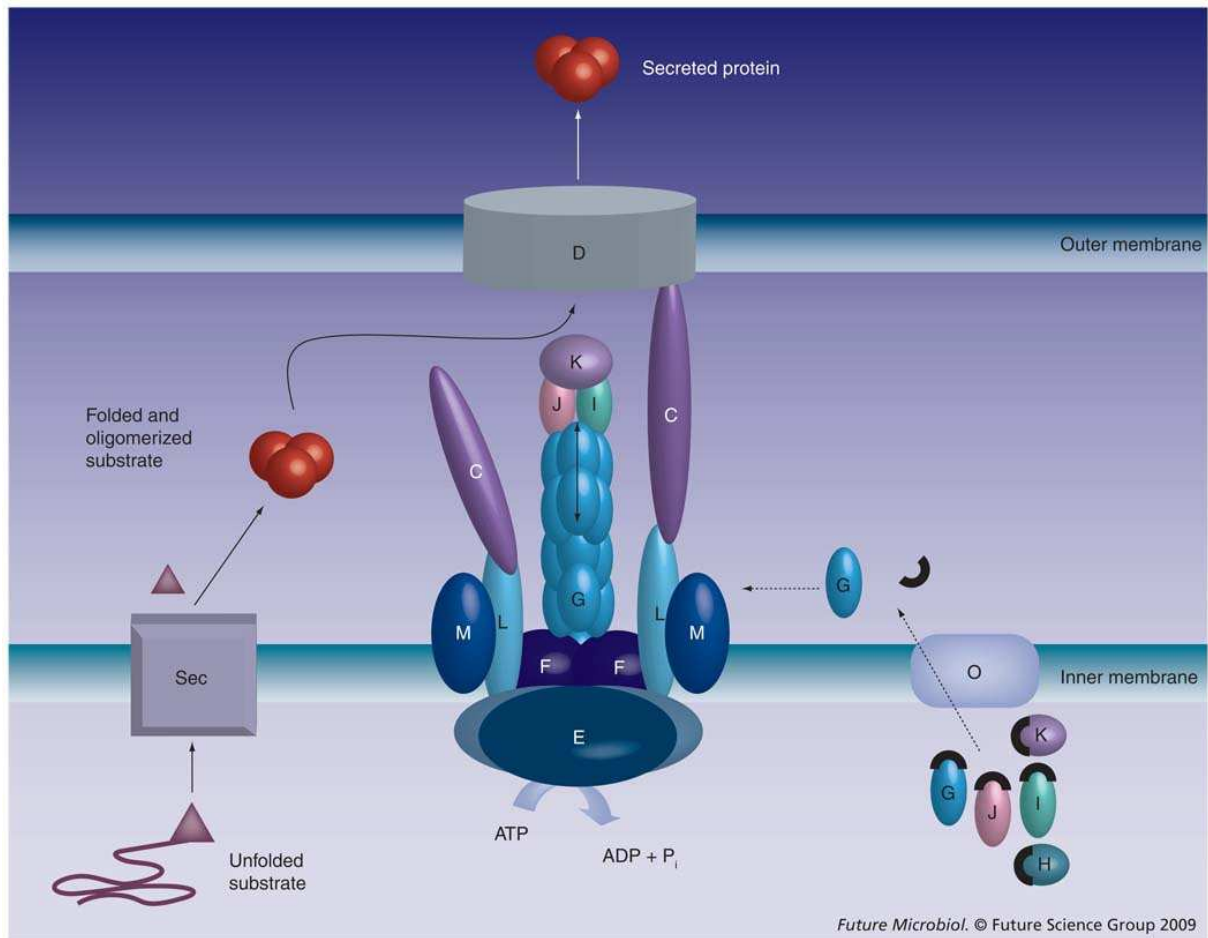


Figure 10 : Modèle de système de sécrétion de type II. Les substrats sont transloqués à travers la membrane interne (Inner membrane) via le système Sec (le système Tat n'est pas représenté). Ensuite, un pilus extensible constitué des protéines G (pseudopiline majeure), J, K et I (pseudopilines mineures) vont pousser les substrats à travers la sécrétine dodécamérique D et permettre leur passage à travers la membrane externe (Outer membrane). La prépiline peptidase O permet l'incorporation des pseudopilines au pilus après clivage et methylation. C–M: constituants de l'appareil de sécrétion de type II ; H: pseudopiline mineure. D'après (Cianciotto, 2009).

Le système Lsp est codé par cinq loci génétiques répartis sur le chromosome, dont *pilBCD* impliqué dans la synthèse des pili de type IV ; *lspFGHIJK* qui code des pseudopilines, constituants du pseudopilus (Rossier & Cianciotto, 2001) ; *lspDE* codant la sécrétine de la

membrane externe et l'ATPase ; et *lspC* et *lspLM* qui sont probablement impliqués dans la sécrétion (Rossier *et al.*, 2004). L'étude de mutants de ces gènes a révélé l'implication de ce système de sécrétion de type II dans la virulence de *Legionella* : une mutation de *pilD* qui code une pseudopiline peptidase empêche la bactérie d'infecter les cellules hôtes quelles qu'elles soient, tandis qu'une mutation de *lspGH* affecte la multiplication intracellulaire dans les amibes (Hales & Shuman, 1999a; Aragon *et al.*, 2002). Ces mutants sont également affectés dans leur survie dans l'environnement, ainsi qu'à des températures basses. De plus, ce système est impliqué dans l'adhésion des bactéries aux surfaces, la formation de biofilm, mais aussi la mobilité via la sécrétion potentielle d'un surfactant de surface (Stewart *et al.*, 2009).

Les systèmes de sécrétion de type IV

Chez les bactéries du genre *Legionella*, il existe deux systèmes de sécrétion de type IV : un système de type IVa, appelé Lvh pour « *Legionella vir* homolog », et un système de type IVb, appelé Dot/Icm (Defective in Organelle Trafficking/IntraCellular Multiplication). Ces deux systèmes permettent également le transfert conjugatif de gènes.

Un large nombre de mutants présentant un défaut de multiplication intracellulaire a été mis en évidence et ils furent nommés mutant *dot* (Berger & Isberg, 1993) ou *icm* (Marra *et al.*, 1992). Ces gènes *dot* ou *icm* ont par la suite été identifiés comme codant pour un système de sécrétion de type IVb par deux équipes indépendantes, qui lui ont ainsi donné chacun un nom différent : Dot (Segal *et al.*, 1998) et Icm (Vogel *et al.*, 1998). Il est depuis appelé Dot/Icm (Figures 11 et 12). Ce système de sécrétion est nécessaire pour la multiplication intracellulaire de *Legionella*, mais aussi pour l'entrée des bactéries, l'inhibition de l'apoptose et la sortie des cellules bactériennes de la cellule hôte. Les constituants de Dot/Icm formeraient une structure multiprotéique de type translocon traversant la membrane

plasmique et la membrane externe (Vincent *et al.*, 2006) et entraînant l'insertion d'un pore de translocation dans la membrane plasmique de la cellule hôte (Isberg *et al.*, 2009). Environ 200 protéines dites effectrices ou effecteurs sont transloquées dans la cellule hôte par le système Dot/Icm, ce qui représente près de 10% du protéome de *L. pneumophila* (Isberg *et al.*, 2009; Burstein *et al.*, 2009). La séquence signal des effecteurs serait à leur extrémité C-terminale (Cambronne & Roy, 2007). La fonction de la majorité de ces effecteurs est inconnue et l'inactivation des gènes d'effecteurs est en général sans effet, ce qui suggère une forte redondance fonctionnelle entre ces effecteurs. Cependant, un certain nombre de processus cellulaires de l'hôte sont connus pour être affectés par ces effecteurs, notamment le trafic vésiculaire intracellulaire (Dorer *et al.*, 2006; de Felipe *et al.*, 2008; Heidtman *et al.*, 2009), la régulation des GTPases (Kagan *et al.*, 2004), la traduction et les réponses au stress (Shen *et al.*, 2009), l'apoptose (Molmeret *et al.*, 2004; Laguna *et al.*, 2006), la phagocytose, la maturation du phagosome, l'inhibition de la fusion phagosome/lysosome, la formation de pores, la sortie de la cellule hôte (Isberg *et al.*, 2009) et les voies d'ubiquitination (Kubori *et al.*, 2008). Par ailleurs, un certain nombre d'effecteurs possèdent des motifs protéiques trouvés uniquement chez des protéines eucaryotes (Nagai *et al.*, 2002). Les protéines effectrices modulent ainsi la réponse des hôtes eucaryotes, rendant possible la multiplication intracellulaire de *Legionella* (Segal *et al.*, 2005).

Les constituants du système Dot/Icm sont codés par un groupe de 26 gènes situés sur deux régions distinctes du chromosome (Figure 12) (Segal *et al.*, 1998; Matthews & Roy, 2000; Vincent *et al.*, 2006). Une délétion de certains de ces gènes affecte la virulence des bactéries pour les macrophages et les amibes (Franco *et al.*, 2009). Plus de 65% des protéines codées par ces gènes présentent des homologies avec des systèmes bactériens de transfert conjugatif d'ADN et le système Dot/Icm est également capable de mobiliser certains plasmides (Vogel *et al.*, 1998). Cette capacité de conjugaison via le système de sécrétion

Dot/Icm peut permettre aux bactéries du genre *Legionella* d'acquérir des traits de virulence (Vogel *et al.*, 1998). Par ailleurs, il a également été démontré que les gènes *dot/icm* pouvaient être transférés horizontalement entre souches de *Legionella* de sérogroupes différents, permettant ainsi à une souche avirulente d'acquérir un phénotype virulent (Miyamoto *et al.*, 2003). Ce transfert de gènes pourrait également se produire à l'intérieur de biofilms. Certains auteurs émettent l'hypothèse que l'acquisition de gènes d'effecteurs possédant des motifs protéiques de nature eucaryote aurait pu se produire lors d'infections par des événements de transferts horizontaux (Franco *et al.*, 2009; Lurie-Weinberger *et al.*, 2010).

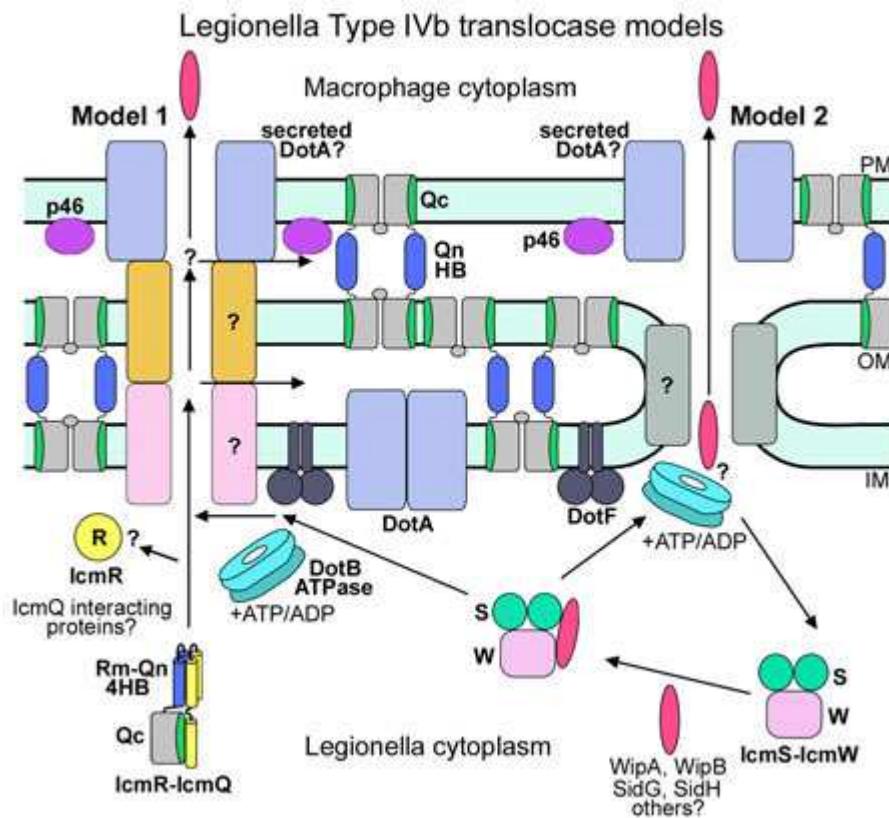


Figure 11 : Modèles du système de sécrétion de type IVb chez *Legionella*. Le complexe IcmS-IcmW interagit avec les effecteurs sécrétés. Le canal par lequel les effecteurs transigent n'a pas été identifié. Le premier modèle suppose un canal formé par des protéines transmembranaires de la membrane plasmique et de la membrane externe, tandis que dans le second modèle le canal de translocation serait constitué d'une seule protéine. Selon Akey <http://www.bumc.bu.edu/phys-biophys/faculty/akey/akey->

laboratory/projects/type-ivb-protein-secretion/. IM : membrane plasmique de la bactérie ; OM : membrane externe de la bactérie ; PM : membrane plasmique de la cellule hôte.

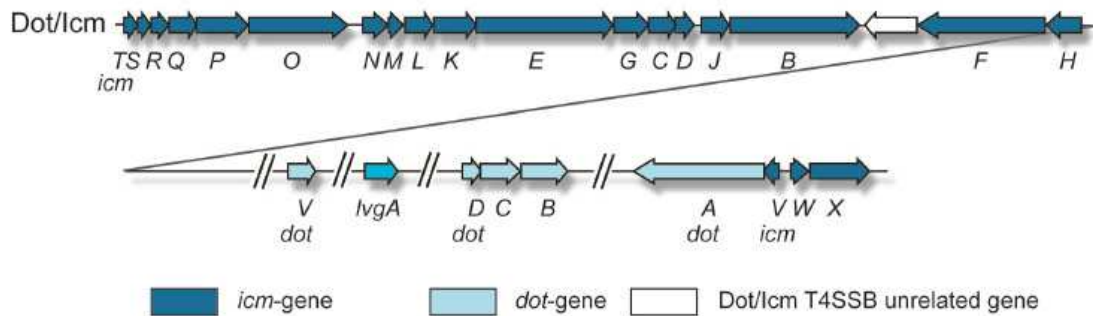


Figure 12 : Organisation des gènes codant le système de sécrétion de type IVb Dot/Icm chez *Legionella*, selon (Schroeder *et al.*, 2010).

Le système de sécrétion de type IVa, appelé Lvh, semble fonctionner en parallèle du système Dot/Icm car il complète certains déficits de mutants Dot/Icm au niveau de l'invasion de la cellule hôte et de la répllication intracellulaire (Bandyopadhyay *et al.*, 2007). Les substrats transloqués par ce système ne sont pour le moment pas identifiés. Le système Lvh est codé par 11 gènes portés par un élément mobile, qui peut exister sous deux formes dans la cellule : intégré dans le chromosome au niveau d'un gène codant un ARNt ou libre sous forme plasmidique. La présence de l'une ou l'autre de ces formes dépend de la phase de croissance (Doléans-Jordheim *et al.*, 2006). Ce système est analogue au système de sécrétion Vir de la bactérie phytopathogène *Agrobacterium tumefaciens*, qui permet la translocation d'ADN bactérien dans les cellules végétales (Figure 13). Le système Lvh n'a pas de rôle essentiel dans la virulence de *Legionella*, mais favorise sa multiplication intracellulaire dans les hôtes eucaryotes à 30 °C (Ridenour *et al.*, 2003).

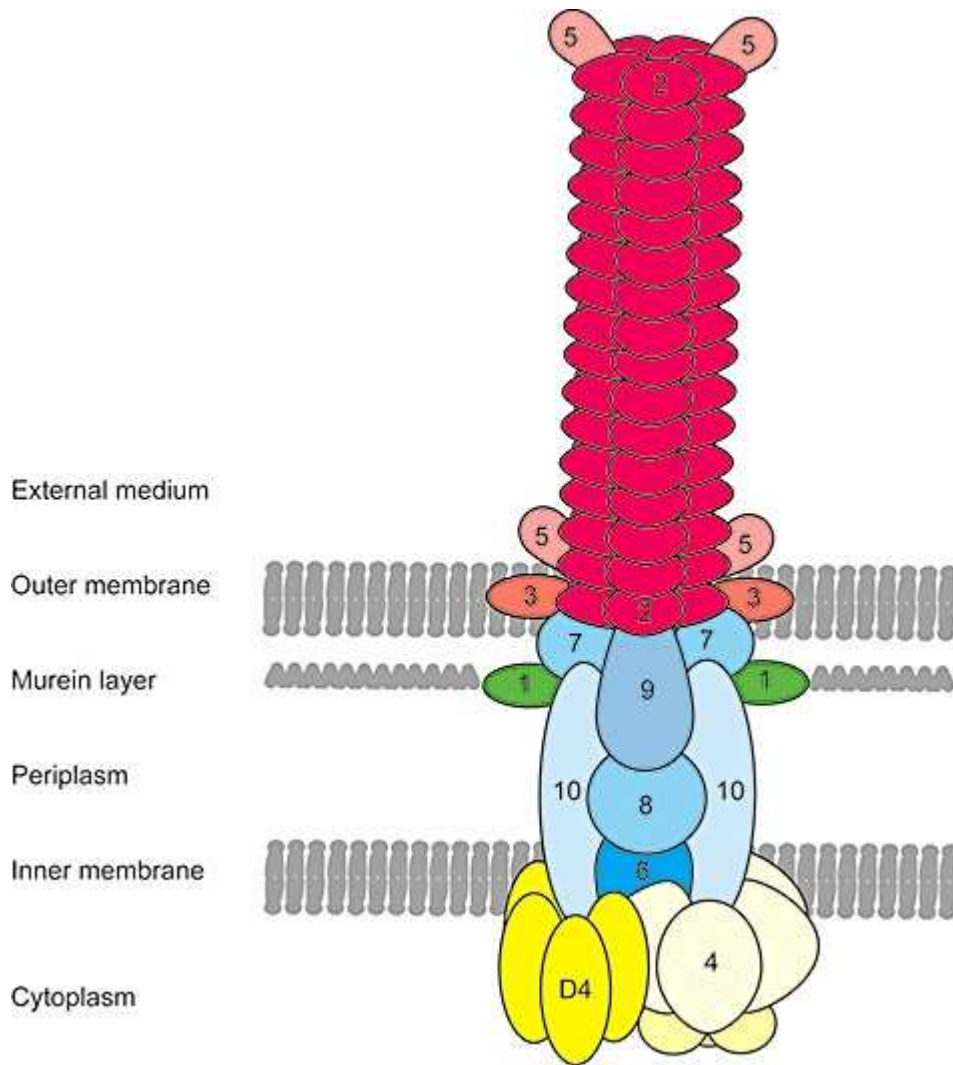


Figure 13 : Modèle de l'appareil de sécrétion de type IVa d'*A. tumefaciens*. L'appareil de sécrétion d'*A. tumefaciens* est composé de 11 protéines VirB1 à VirB11 et d'une protéine VirD4. La nucléoside triphosphate est représentée en jaune, elle donne l'énergie nécessaire au transfert ; en bleu, les composants du canal transmembranaire ; en rouge, les composants du pilus ; en vert, la transglycosylase lytique responsable de la dégradation locale de la couche de muréine au site d'assemblage, d'après (Juhas *et al.*, 2008).

III.1.4. La protéine Mip

La protéine Mip (macrophage infectivity potentiator) est une protéine homodimérique de surface de 24kDa codée par le gène *mip*. Cette protéine possède une activité peptidyl-prolyl *cis/trans* isomérase, qui est nécessaire pour les étapes d'invasion et d'établissement intracellulaire dans les cellules hôtes, mais pas pour la multiplication bactérienne intracellulaire, ni pour l'invasion d'amibes comme *A. castellanii* (Cianciotto, 2001; Wieland *et al.*, 2002; Köhler *et al.*, 2003). Les mécanismes exacts de son implication dans la virulence ne sont cependant pas clairement établis.

III.1.5. Facteurs impliqués dans l'infection des macrophages

Quatre régions chromosomiques sont requises pour infecter les macrophages, même si elles restent encore mal caractérisées : *pmi* (protozoa and macrophage infectivity), *mil* (macrophage infectivity locus), *eml* (early stage macrophage-induced locus) et *enh* (enhanced entry). Tous ces loci codent des facteurs intervenant dans la virulence (entrée dans les cellules eucaryotes, modification de la voie endosomale, formation de pores...) (Abu Kwaik & Pederson, 1996; Gao *et al.*, 1998; Harb & Abu Kwaik, 2000; Cirillo *et al.*, 2000). Seul le gène *rtxA* appartenant au locus *enh1* a été caractérisé. Il est impliqué dans l'adhérence, la cytotoxicité, la formation de pores et l'entrée de *L. pneumophila* dans la cellule hôte (Cirillo *et al.*, 2001).

III.2. Les facteurs impliqués dans la phase transmissive

III.2.1. Facteurs impliqués dans l'adhésion

Plusieurs structures de surface sont impliquées dans l'adhésion des bactéries du genre *Legionella* aux cellules eucaryotes.

Le lipopolysaccharide (LPS) est un facteur de virulence de *Legionella* situé à la surface bactérienne. Le sérotype d'une souche est ainsi identifié par la reconnaissance des épitopes associés au LPS par un anticorps monoclonal (MAb). Les données de typage reposant sur la reconnaissance antigénique du LPS ont mis en évidence que les souches *L. pneumophila* sérotype 1 sont plus souvent retrouvées associées à des cas de légionellose (Helbig *et al.*, 1995). Le LPS induit chez l'hôte eucaryote supérieur les voies classique *et* alternative du complément (Mintz *et al.*, 1992). Il permet l'adhésion des cellules de *Legionella* à la muqueuse respiratoire. Comme chez de nombreuses bactéries, *L. pneumophila* de sérotype 1 présente un phénomène de variation de phase qui permet une expression différentielle ainsi qu'une variabilité au niveau des épitopes du LPS, ce qui entraîne une modulation de la virulence en déjouant le système immunitaire. Dans un cas particulièrement bien étudié, le changement de phase est dû à la mobilité d'un élément génétique de 30kb d'origine phagique, qui se trouve sur le chromosome dans les souches virulentes (Lüneberg *et al.*, 1998). L'excision de cet élément provoque une altération du LPS, ce qui entraîne une diminution de la virulence à l'encontre des macrophages de lignées humaines HL60 et des cellules amibiennes *A. castellanii*.

Le LPS de certaines souches de *L. pneumophila* de sérotype 1 présente une hydrophobicité importante, due à une O-acétyltransférase codée par le gène *lag-1* et entraînant la formation de résidus O-acétylés sur le polysaccharide O du LPS (Zou *et al.*, 1999; Kooistra *et al.*, 2001). Cette hydrophobicité pourrait expliquer en partie une meilleure survie dans les aérosols et pourrait jouer un rôle dans la virulence (Dennis & Lee, 1988). La forte prévalence

du gène *lag-1* parmi les isolats cliniques suggère son importance dans la virulence (Kozak *et al.*, 2009).

Un deuxième facteur important pour l'adhésion est la protéine MOMP (Major Outer Membrane Protein) codée par le gène *ompS*. C'est une protéine constituée de deux sous-unités de 28 et 31kDa, respectivement (Hoffman *et al.*, 1992). Cette protéine est impliquée dans la virulence en permettant l'adhésion aux macrophages au niveau des récepteurs CR1 et CR3 via la liaison des éléments C3 et C3i du complément (Bellinger-Kawahara & Horwitz, 1990; Krinos *et al.*, 1999).

La protéine de choc thermique Hsp60 codée par le gène *htpB* est également impliquée dans l'adhésion aux cellules de mammifères HeLa, le récepteur eucaryote n'étant pas connu (Garduño *et al.*, 1998).

Les bactéries du genre *Legionella* peuvent également exprimer à leur surface des pili de type IV ou CAP (Competence and adherence-associated pili), ces pili étant associés à la compétence et l'adhésion. Ils peuvent lier le complément et être reconnus comme ligands par les lectines des protozoaires. Ils sont impliqués dans l'adhésion et la virulence des bactéries du genre *Legionella* vis-à-vis des macrophages et des amibes (Stone & Abu Kwaik, 1998).

III.2.2. Le flagelle

La synthèse du flagelle, et donc l'expression des gènes de biosynthèse correspondants, intervient à un moment précis du cycle cellulaire de *L. pneumophila*, lors de la transition entre les phases répllicative et transmissive au cours d'infections *in vivo* et de l'entrée des cellules en phase stationnaire *in vitro*. En effet, le flagelle n'est pas requis pour la multiplication intracellulaire mais pour la capacité de dissémination et d'invasion des cellules hôtes (Merriam *et al.*, 1997; Dietrich *et al.*, 2001; Heuner & Steinert, 2003). De même, il n'est pas nécessaire lorsque les cellules se divisent en phase exponentielle *in vitro*. Les bactéries du

genre *Legionella* deviennent donc mobiles durant les étapes tardives de l'infection *in vivo* et au moment de l'entrée des cellules en phase stationnaire *in vitro* (Swanson & Hammer, 2000). Des mutants de *L. pneumophila* dépourvus de flagelle présentent une diminution de la capacité infectieuse vis-à-vis de macrophages et de cellules amibiennes. En revanche, le taux de réplication intracellulaire n'est pas affecté (Dietrich *et al.*, 2001). Le système flagellaire de *Legionella* est donc lié au phénotype de virulence. La mobilité pourrait également être importante dans l'environnement afin de trouver un nouvel hôte à infecter ou pour la colonisation de nouveaux habitats (Heuner & Steinert, 2003).

Le flagelle est une structure complexe, dont la synthèse et sa régulation font intervenir 43 gènes (Figure 14). Ces gènes sont régulés selon une cascade de régulation et sont ainsi regroupés en 4 classes suivant leur ordre d'expression, des plus précoces aux plus tardifs (Heuner & Steinert, 2003; Albert-Weissenberger *et al.*, 2010) :

- classe I : *fleQ* qui code un activateur transcriptionnel qui va, en combinaison avec le facteur sigma alternatif RpoN (σ^{54}), activer les gènes de classe II (Jacobi *et al.*, 2004; Albert-Weissenberger *et al.*, 2010),

- classe II : *fleN, fleR, fleS, flgA, flgB, flgC, flgD, flgE, flgF, flgG, flgH, flgI, flgJ, flgK, flgL, flhA, flhB, flhF, fliE, fliF, fliG, fliH, fliI, fliJ, fliK', fliM, fliN, fliQ, fliR* ; la plupart codant les protéines participant à la synthèse du corps basal et du crochet du flagelle, *fleN* codant l'anti-activateur de FleQ et *fleRS* un régulateur à deux composantes induisant l'expression des gènes de classe III,

- classe III : *flgM, flgN, flhB', fliA, motA, motA2, motB, motB2* ; *fliA* codant le facteur alternatif σ^{28} qui va ensuite activer la transcription des gènes de classe IV (Heuner *et al.* 2002),

- classe IV : *flaA, flaG, fliD, fliS, motY* ; *flaA* codant la flagelline qui est connue pour induire la cytotoxicité et la mort des macrophages (Molofsky *et al.*, 2005).

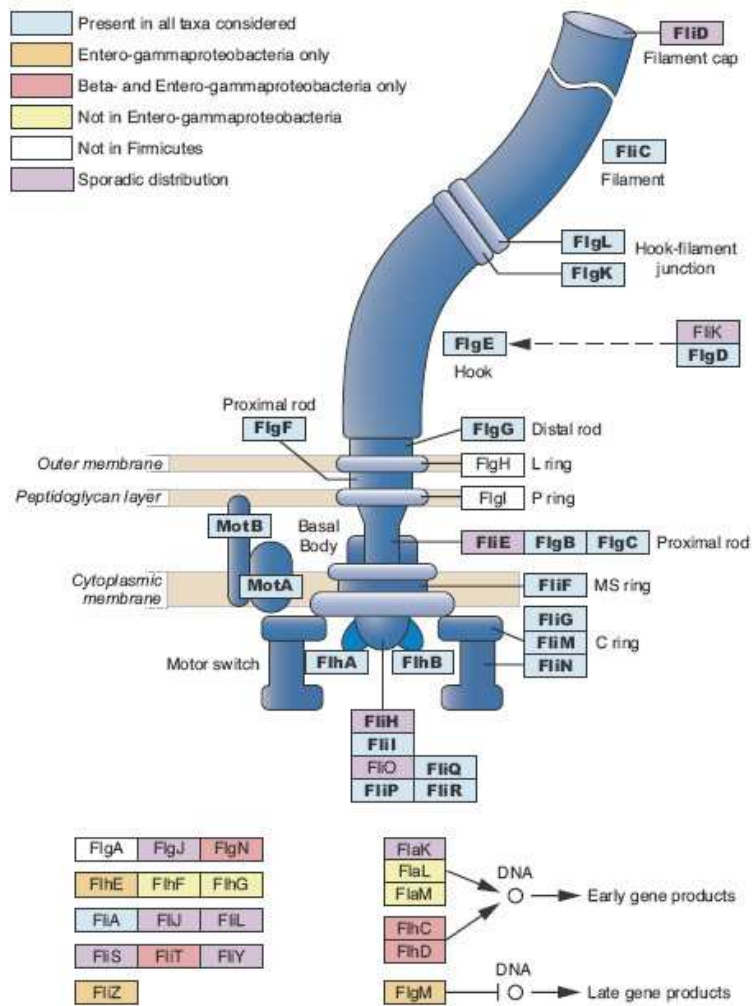


Figure 14 : Structure protéique théorique du flagelle bactérien, selon la base de données KEGG

www.genome.jp/kegg/pathway/eco/eco02040.html

III.2.3. Les cytotoxines

Il existe chez *L. pneumophila* deux toxines ayant une activité hémolytique : la légiolysine, une protéine de 39kDa codée par le gène *lly*, et la métalloprotéase à zinc Msp, codée par *proA* et qui présente plusieurs activités protéolytiques, hémolytiques et cytotoxiques. La protéine Msp est sécrétée par le système de sécrétion de type II Lsp (voir section III.1.3). Ces toxines sont impliquées dans la lyse des cellules, mais elles ne sont pas strictement nécessaires, car des mutants pour chacun de ces gènes sont toujours capables de

croître et de lyser les cellules (Quinn & Tompkins, 1989; Wintermeyer *et al.*, 1994). La protéase Msp est en revanche capable de diminuer le stress oxydatif au cours de l'infection (Sahney *et al.*, 2001).

III.3. Régulation du cycle biphasique de *Legionella*

Les caractéristiques majeures des bactéries du genre *Legionella* sont d'une part un cycle de croissance biphasique aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* et d'autre part une capacité à se multiplier et à survivre dans des hôtes eucaryotes extrêmement diversifiés et dans des environnements tout aussi divers. L'adaptation des bactéries du genre *Legionella* à toutes ces conditions implique une régulation fine de l'expression des gènes, dont ceux nécessaires à la virulence. La comparaison des profils globaux de transcription chez *L. pneumophila* d'une part entre les phases répllicative et transmissive et d'autre part au cours des différentes phases de cultures *in vitro* a démontré une expression différentielle des gènes, spécifique de chaque phase du cycle cellulaire (Brüggemann *et al.*, 2006). En particulier, la phase répllicative se caractérise par la transcription préférentielle de gènes impliqués dans l'utilisation de sources de carbone et le métabolisme des acides aminés, alors que la phase transmissive s'accompagne d'une augmentation de la transcription de gènes d'effecteurs du système Dot/Icm, de gènes de biosynthèse du flagelle et de gènes modulant la quantité de molécules signal.

Le processus infectieux de *Legionella* et en particulier la transition entre phases répllicative et transmissive sont sous le contrôle de différents systèmes de régulation globale de l'expression des gènes (Steinert *et al.*, 2007). Trois systèmes à deux composantes sont impliqués dans la régulation de la virulence chez *Legionella* (Figure 15) : CpxAR, PmrAB et LetAS. Les deux premiers régulent directement, en activant lors de la phase transmissive, l'expression de gènes codant des composants et des effecteurs du système Dot/Icm (Gal-Mor

& Segal, 2003; Zusman *et al.*, 2007; Altman & Segal, 2008; Al-Khodor *et al.*, 2009). Le troisième, LetAS, constitue l'un des plus importants points de contrôle de la transition entre phases répllicative et transmissive (Gal-Mor & Segal, 2003; Al-Khodor *et al.*, 2009; Lynch *et al.*, 2003), en contrôlant notamment un régulateur clé de la phase répllicative, CsrA (Figure 15). La protéine CsrA est un répresseur post-transcriptionnel de l'expression des gènes impliqués dans la phase transmissive (Molofsky & Swanson, 2003). Elle est impliquée dans la croissance, la virulence, la formation de biofilm et l'entrée en phase stationnaire (Forsbach-Birk *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005). Ainsi, la transition de la phase répllicative vers la phase transmissive doit s'accompagner de la levée de la répression exercée par CsrA. C'est à ce niveau qu'intervient le système à deux composantes LetAS qui va induire, en réponse à des signaux peu connus, l'expression de deux gènes *rsmY* et *rsmZ* (Figure 15), codant deux petits ARNs non-codants. Ceux-ci vont alors séquestrer CsrA et permettre la transition entre phases répllicative et transmissive (Rasis & Segal, 2009; Sahr *et al.*, 2009).

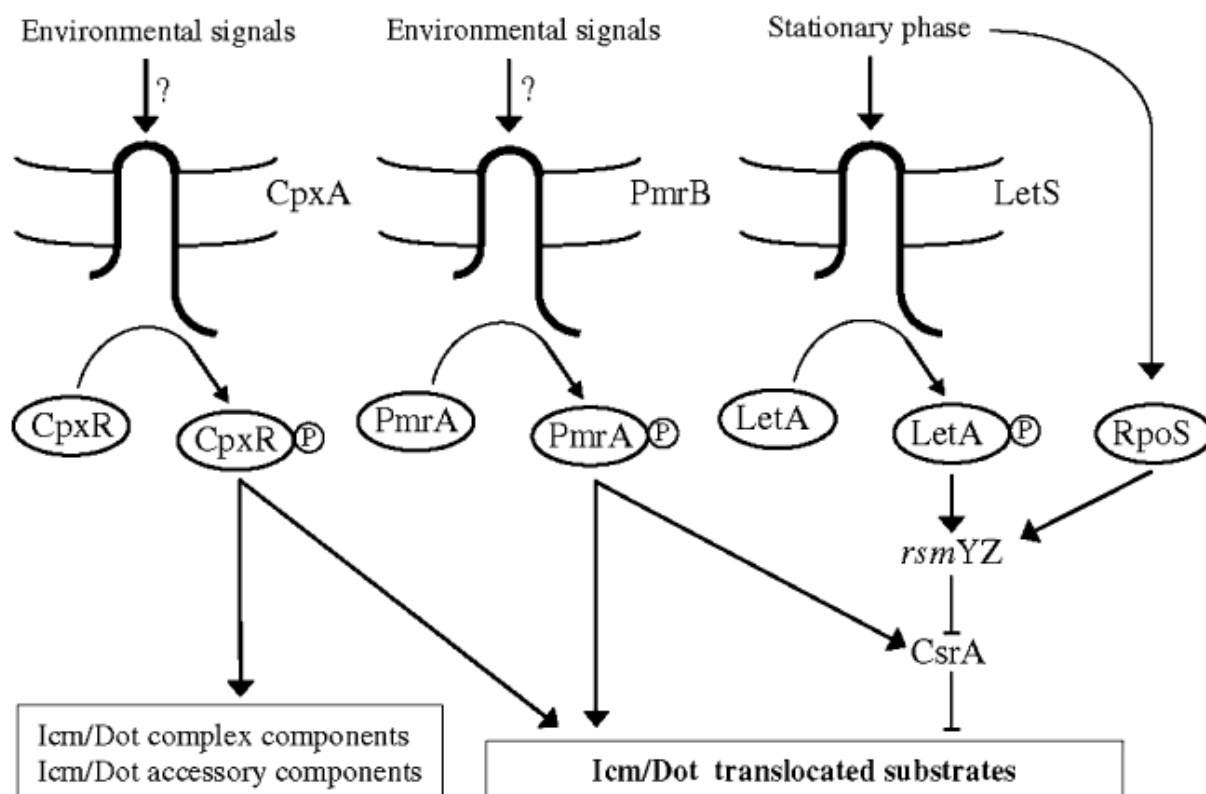


Figure 15 : Modèle de régulation du système Dot/Icm de *L. pneumophila* via les systèmes à deux composantes CpxAR, PmrAB et LetAS (Rasis & Segal, 2009).

La virulence chez *Legionella* est également régulée par le facteur sigma alternatif RpoS ou σ^{38} (Hales & Shuman, 1999b). Un mutant du gène *rpoS* est en effet incapable de se répliquer chez *A. castellanii* (Hales & Shuman, 1999b). Le gène *rpoS* est exprimé à l'entrée en phase stationnaire et dans différentes conditions de stress et la protéine RpoS favorise la transcription de gènes impliqués dans la survie dans ces conditions. Elle contrôle également la transcription de nombreux gènes impliqués dans la virulence (Hovel-Miner *et al.*, 2009) : *fliA* (voir section précédente) qui code lui-même le facteur sigma alternatif σ^{28} impliqué dans la mobilité, la cytotoxicité, l'échappement lysosomal et la formation de biofilms ; de nombreux gènes impliqués dans la multiplication intracellulaire ; des gènes d'effecteurs ; les gènes *cpxR* et *pmrA* codant les systèmes à deux composantes CpxAR et PmrAB (Figure 15) ; *rsmY* et *rsmZ* (Figure 16). Ainsi, RpoS régulerait la transition vers la phase transmissive de façon concertée à différents niveaux. En effet, en permettant la transcription de *rsmY* et *rsmZ*, RpoS

favorise la levée de répression des gènes par CsrA et donc la transition vers la phase transmissive (Figure 16). Il est important de noter que la surexpression de LetS permet de restaurer la transcription de *rsmY* et *rsmZ* dans un mutant du gène *rpoS*, ce qui suggérerait que *letAS* pourraient être régulés par RpoS, qui serait alors au-dessus de la hiérarchie de régulation (Figure 16) (Hovel-Miner *et al.*, 2009). D'autre part, en activant *cpxR* et *pmrA*, RpoS permet également l'expression des facteurs contrôlés par ces deux systèmes à deux composantes. Enfin, RpoS active également directement la transcription de gènes nécessaires à la phase transmissive dont *fliA* qui est nécessaire à la synthèse du flagelle (voir section précédente). Ainsi, trois facteurs sigma alternatifs participent à la régulation du flagelle et donc de la virulence chez *Legionella* (Albert-Weissenberger *et al.*, 2010) : σ^{38} ou RpoS (Hovel-Miner *et al.*, 2009), σ^{28} ou FliA (Heuner *et al.*, 2002) et σ^{54} ou RpoN (Jacobi *et al.*, 2004).

Malgré les nombreuses connaissances au niveau de la régulation de la virulence, les signaux responsables de ces régulations sont peu connus. Cependant, l'étude de la régulation de la transition entre phases exponentielle et stationnaire chez *L. pneumophila* a permis de montrer le rôle du réseau de régulation appelé la réponse stringente (Hammer & Swanson, 1999), qui permet aux bactéries de s'adapter aux carences nutritionnelles (Potrykus & Cashel, 2008). Ce système repose sur une alarmone, le ppGpp ou guanosine 5'-diphosphate-3'-diphosphate, dont le métabolisme est contrôlé par les protéines RelA et SpoT, codées par les gènes *relA* et *spoT*. Cette alarmone possède la propriété de totalement reprogrammer la transcription globale des gènes dans les cellules bactériennes en fonction des conditions nutritionnelles. Dans des conditions de carences, l'augmentation de concentration de ppGpp entraîne une inhibition de la transcription des gènes d'ARNr et de protéines ribosomiques et l'activation des gènes nécessaires à la survie comme ceux impliqués dans la biosynthèse des acides aminés (Mechold *et al.*, 1996). En présence de nutriments, ppGpp est dégradée. La réponse stringente est également connue pour réguler les propriétés de virulence de

nombreuses espèces bactériennes (Dalebroux *et al.*, 2010). Chez *L. pneumophila*, ppGpp joue un rôle essentiel dans le cycle infectieux (Dalebroux *et al.*, 2009). En effet, la synthèse de ppGpp est indispensable pour la transition entre phases répllicative et transmissive et sa dégradation permet ensuite la reprise de la réplication cellulaire. Ce rôle central de ppGpp dans la virulence de *L. pneumophila* est lié à son implication, directe ou indirecte, dans la régulation des régulateurs globaux décrits précédemment et qui contrôlent la transition entre phases répllicative et transmissive : RpoS, CsrA et LetAS (Figure 16) (Zusman *et al.*, 2002). Ainsi, ppGpp est au sommet de la hiérarchie de régulation et la transition entre les deux phases du cycle infectieux semble donc répondre à des changements nutritionnels de l'environnement de *Legionella* (sources de carbone, acides aminés, acides gras...).

Enfin, un dernier niveau de régulation a été mis en évidence récemment, impliquant l'intervention d'un système de quorum sensing (Spirig *et al.*, 2008). Trois gènes sont impliqués : *lqsA* et *lqsRS* codant respectivement la synthétase de l'autoinducteur et un système à deux composantes LqsRS. L'autoinducteur auquel les cellules de *Legionella* vont répondre est la 3-hydroxypentadecan-4-one.

La virulence chez *Legionella* est donc régulée par un réseau global complexe faisant intervenir différents types de régulateurs : petites molécules, facteurs sigma alternatifs, systèmes à deux composantes, facteurs transcriptionnels et post-transcriptionnels et petits ARNs non-codants (Figure 16). Chez de nombreuses autres bactéries pathogènes, un autre réseau global de régulation est connu pour être impliqué dans la régulation de la virulence. En outre, ce réseau global est également connu pour répondre, entre autres, aux fluctuations nutritionnelles de l'environnement. Il s'agit de la topologie de l'ADN (Dorman & Corcoran, 2009).

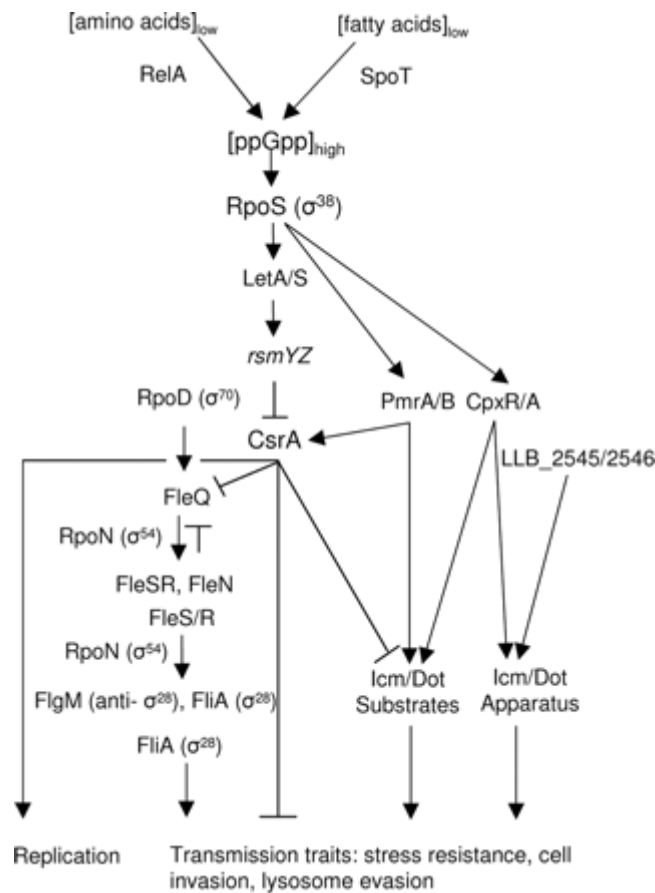


Figure 16 : Modèle de régulation de la virulence chez *L. longbeachae* D-4968 par analogie avec *L. pneumophila* (Kozak *et al.*, 2010).

IV. Topologie de l'ADN bactérien

Une des principales caractéristiques des bactéries est leur capacité à coloniser toutes les niches écologiques, c'est-à-dire à s'adapter non seulement à des environnements extrêmement variés mais également à des fluctuations importantes des conditions externes. Ceci est tout particulièrement le cas des bactéries pathogènes, dont *Legionella* qui est capable de survivre dans des environnements variés, libre ou sous forme de biofilms, et de se multiplier dans des hôtes eucaryotes très divers. L'adaptation à toutes ces situations requiert un contrôle rapide et précis de l'expression génique pour induire des réponses phénotypiques appropriées. Ces modifications phénotypiques sont associées à un remaniement total de l'expression du génome (Peter *et al.*, 2004).

De nombreuses fluctuations des conditions externes, liées aux modifications de différents paramètres de l'environnement, sont connues pour affecter de façon transitoire le niveau de superhélicité de l'ADN : la richesse en nutriments (Balke & Gralla, 1987; Reyes-Domínguez *et al.*, 2003), la concentration en oxygène (Ni Bhriain *et al.*, 1989), la température (Goldstein & Drlica, 1984), le pH (Karem & Foster, 1993), le stress oxydatif (Weinstein-Fischer *et al.*, 2000), et le stress osmotique (Higgins *et al.*, 1988). En retour, ces changements transitoires de superhélicité conduisent à des modifications des taux de transcription au niveau du génome entier (Jovanovich & Lebowitz, 1987; Pruss & Drlica, 1989; Gmuender *et al.*, 2001), ce qui entraîne une modification rapide de l'expression de nombreux gènes et par conséquent l'adaptation phénotypique des bactéries aux fluctuations de l'environnement (Dorman, 2006). La topologie de l'ADN bactérien permet ainsi d'harmoniser les réseaux de régulation de gènes aux conditions de l'environnement. De plus, un niveau adéquat de la superhélicité de l'ADN est requis pour tous les processus cellulaires vitaux : la réplication, la réparation de l'ADN, la ségrégation des chromosomes, la transcription, la recombinaison et la transposition.

Le contrôle du niveau de topologie de l'ADN est réalisé par l'action combinée de deux catégories de protéines : les topoisomérases (Champoux, 2001; Rui & Tse-Dinh, 2003) et les protéines de type histone (Dorman & Deighan, 2003). Ci-dessous, ces deux types de protéines sont décrits, ainsi que l'impact des modifications de superhélicité de l'ADN sur l'expression des gènes, en particulier sur les gènes de virulence chez les bactéries pathogènes.

IV.1. Les protéines contrôlant la topologie de l'ADN

IV.1.1. Les topoisomérases

Les topoisomérases sont des enzymes conservées chez tous les organismes vivants (Champoux, 2001). Il existe deux types de topoisomérase, I (subdivisés en IA et IB en fonction de la réaction catalysée) et II, selon qu'elles coupent un ou deux brins d'ADN lors des réactions enzymatiques. Après coupures grâce à un résidu tyrosine catalytique, les topoisomérases catalysent des transferts de brins d'ADN dont le résultat sera une modification du degré de superenroulement de l'ADN (Figure 17).

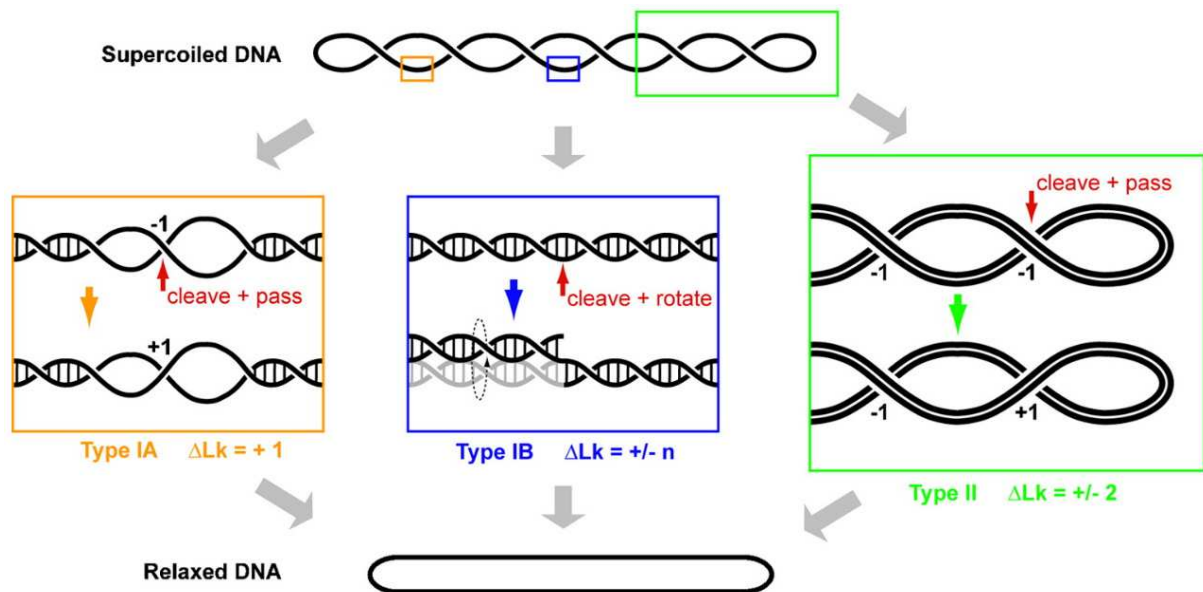


Figure 17 : Activité des différentes topoisomérases (Corbett & Berger, 2004). Les topoisomérases de type IA (en orange) transfèrent un brin d'ADN à travers le second brin de l'hélice, modifiant le superenroulement (Lk) par étapes de 1. Les topoisomérases de type IB (en bleu) effectuent une rotation du brin d'ADN clivé autour du brin non clivé, modifiant Lk de plusieurs unités, positivement ou négativement. Les topoisomérases de type II (en vert) transfèrent une hélice à travers une autre hélice, changeant Lk par étapes de 2.

Les topoisomérases de type IA forment une liaison avec l'extrémité 5' phosphate de l'ADN, transfèrent l'autre brin et referment la coupure (Figure 17), ce qui conduit à un relâchement des supertours négatifs par incréments de 1 (Brown & Cozzarelli, 1981). Les topoisomérases de type IB forment une liaison avec une extrémité 3' phosphate de l'ADN. Elles permettent au brin coupé d'effectuer une ou plusieurs rotations autour du brin non clivé, ce qui permet des modifications topologiques plus importantes (Figure 17). Elles permettent de relâcher les supertours positifs et négatifs.

Les topoisomérases de type II clivent les deux brins de la double hélice d'ADN et transfèrent une double hélice d'ADN à travers la coupure (Figure 17) (Levine *et al.*, 1998). Elles possèdent des activités diverses de relâchement, de caténation/décaténation, et d'introduction ou de suppression de nœuds. Parmi toutes les topoisomérases, la gyrase (qui est de type II) est la seule capable d'introduire des supertours négatifs dans l'ADN. Cette activité nécessite l'hydrolyse d'ATP. Les topoisomérases de type II sont les cibles de deux familles d'antibiotiques : les coumarines et les quinolones (Gellert *et al.*, 1976; Drlica & Zhao, 1997; Drlica *et al.*, 2009). Les coumarines entrent en compétition avec l'ATP. Les quinolones se fixent sur l'enzyme complexée à l'ADN et l'immobilisent sur l'ADN après coupure. Ceci entraîne la fragmentation de l'ADN, aboutissant à la mort cellulaire. Les quinolones sont des antibiotiques préférentiellement utilisés en thérapie contre la légionellose (Griffin *et al.*, 2010).

Chez *L. pneumophila*, l'analyse des génomes révèle la présence de gènes codant trois topoisomérases différentes : la topoisomérase I (TopoI), codée par le gène *topA* et de type IA ; la gyrase, codée par les gènes *gyrA* et *gyrB* et de type II ; et la topoisomérase IV (TopoIV), codée par les gènes *parC* et *parE* et de type II (Cazalet *et al.*, 2004). Il n'existe pas de topoisomérase III chez cette bactérie.

Chez les bactéries, le contrôle du niveau de superhélicité de l'ADN pour le maintenir à un niveau physiologique adéquat est réalisé par les activités opposées d'une part de la TopoI et de la TopoIV qui relâchent la superhélicité de l'ADN et d'autre part de la gyrase qui introduit des supertours négatifs dans l'ADN. Ainsi, la TopoI et la TopoIV évitent d'avoir un niveau de superhélicité de l'ADN trop élevé, alors que la gyrase évite un degré trop faible (Zechiedrich *et al.*, 2000). Par ailleurs, ces trois topoisomérases présentent également d'autres fonctions. La TopoI joue également un rôle majeur au niveau de la transcription globale du chromosome (Massé & Drolet, 1999). En effet, la TopoI est capable d'interagir directement avec l'ARN polymérase (Cheng *et al.*, 2003), pour éliminer les supertours négatifs qui s'accumulent en aval du complexe ADN-ARN polymérase (Liu & Wang, 1987). En effet, la progression de l'ARN polymérase entraîne une rotation de l'ADN ce qui conduit à des supertours négatifs en aval du complexe de transcription. Une accumulation trop importante de ces supertours négatifs pourrait entraîner l'ouverture de la double hélice d'ADN et pourrait favoriser l'hybridation de l'ARNm nouvellement synthétisé avec le brin d'ADN matrice, conduisant de ce fait à l'absence de traduction de l'ARNm (Drolet *et al.*, 2003). La TopoI, en éliminant ces supertours négatifs trop importants, est donc essentielle au couplage transcription-traduction dans les cellules bactériennes.

La gyrase est essentielle à l'initiation de la réplication de l'ADN et de la transcription car, en augmentant la superhélicité négative, elle permet d'abaisser la quantité d'énergie nécessaire à l'ouverture de la double hélice (Espeli & Marians, 2004). La TopoIV est quant à elle responsable de la décaténation de l'ADN, au cours de la réplication (Hiasa & Marians, 1996), mais aussi lors des processus de recombinaison spécifique de site (Zechiedrich *et al.*, 1997).

IV.1.2. Les protéines de type histone (PTH)

Les protéines de type histone (PTH), aussi appelées NAP (pour Nuclear Associated Protein ou Protéines Associées au Nucléotide), sont impliquées dans trois fonctions essentielles dans les cellules bactériennes : elles constituent des régulateurs globaux de la transcription en contrôlant, directement ou non, la transcription de centaines de gènes (Dorman & Deighan, 2003) ; elles interviennent dans le contrôle de l'état de superenroulement du chromosome, soit directement par fixation sur l'ADN (Luijsterburg *et al.*, 2006), soit indirectement par régulation des gènes codant les topoisomérases (Schneider *et al.*, 1999; Weinstein-Fischer *et al.*, 2000; Keane & Dorman, 2003) ; elles structurent le chromosome de façon globale en micro- et macro-domaines (Valens *et al.*, 2004; Hardy & Cozzarelli, 2005). Chez *E. coli* et la majorité des bactéries, il y a 5 PTH majeures : Dps, Fis, H-NS, HU et IHF. Les différents rôles des PTH sont liés à leurs propriétés de liaison à l'ADN. En particulier, certaines peuvent courber l'ADN comme IHF, HU ou Fis, alors que d'autres établissent des ponts entre molécules d'ADN différentes ou entre domaines distants de l'ADN comme H-NS ou Dps. Par rapport à *E. coli*, deux différences majeures existent chez *L. pneumophila* : d'une part, la protéine H-NS est absente et ne semble pas être remplacée par une autre protéine et d'autre part, trois gènes codant des protéines homologues de Fis sont présents. Pour les trois PTH Dps, HU et IHF, la situation est similaire à ce qui existe chez *E. coli* notamment.

Les PTH sont exprimées de manière différentielle au cours du cycle cellulaire et en fonction des conditions de l'environnement (Dillon & Dorman, 2010). De par leur rôle dans le contrôle de la superhélicité de l'ADN et sur la transcription globale du chromosome, les PTH vont entraîner une dynamique importante du nucléotide bactérien et de l'expression globale des gènes. Elles peuvent donc constituer un niveau de contrôle supplémentaire entre les fluctuations de l'environnement et les réponses phénotypiques bactériennes appropriées, via

une modification de l'expression des gènes. A l'heure actuelle, peu d'études existent quant aux rôles et fonctions des PTH chez *Legionella* et en particulier sur ses propriétés de virulence. Seules trois études ont été publiées récemment (Park *et al.*, 2006; Morash *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2009). Elles font état d'un lien potentiel entre PTH et virulence, bien que les conclusions de ces études soient incomplètes. Ci-dessous, les PTH identifiées chez *L. pneumophila* sont décrites quant à leurs propriétés et fonctions, déterminées à partir d'études effectuées chez d'autres bactéries, notamment *E. coli*.

HU

HU est une protéine de 19kDa qui a été initialement isolée chez *E. coli* comme étant capable de former des structures de type nucléosome (Rouvière-Yaniv & Gros, 1975). Chez la plupart des bactéries, HU existe sous forme d'homodimères, alors qu'elle peut se présenter sous forme d'hétérodimères et d'homodimères chez *E. coli* (Ramstein *et al.*, 2003). Les deux sous-unités de l'hétérodimère sont codées par les gènes *hupA* et *hupB*. Chez *L. pneumophila*, la protéine HU est codée par un seul gène *hubB*.

Aucune séquence spécifique de reconnaissance de l'ADN n'a pu être mise en évidence, bien que HU se fixe préférentiellement sur de l'ADN superenroulé négativement (Shindo *et al.*, 1992; Endo *et al.*, 2002). De plus, la fixation de HU se fait préférentiellement au niveau de structures spécifiques d'ADN, comme des jonctions en croix ou des coupures simple brin, ce type de liaison à l'ADN suggérant un rôle dans les processus de recombinaison (Rowland *et al.*, 2006). La fixation de HU sur l'ADN induit une courbure d'environ 160°, ce qui provoque la compaction de molécules d'ADN *in vitro* (Figure 18). Les données *in vivo* suggèrent que HU compacte l'ADN. En effet, dans des souches dépourvues de la protéine HU fonctionnelle, il y a compensation de la mutation par sélection de mutations dans le gène *gyrB* qui favorisent le superenroulement (Malik *et al.*, 1996). Cependant, à fortes concentrations, il semblerait à l'inverse que HU donne un aspect circulaire relâché à l'ADN

(Dame & Goosen, 2002). Elle aurait alors un effet sur le pas de l'hélice d'ADN, qui serait constitué de 10,9 pb par tour d'hélice au lieu de 10,5 pb. Cette modification serait réalisée via la contrainte d'un nombre de supertours négatifs supplémentaires (Dame & Goosen, 2002) et une rigidification de la double hélice. A concentrations plus faibles, HU a un effet de courbure sur l'ADN et l'aspect circulaire est alors moins rigide (van Noort *et al.*, 2004).

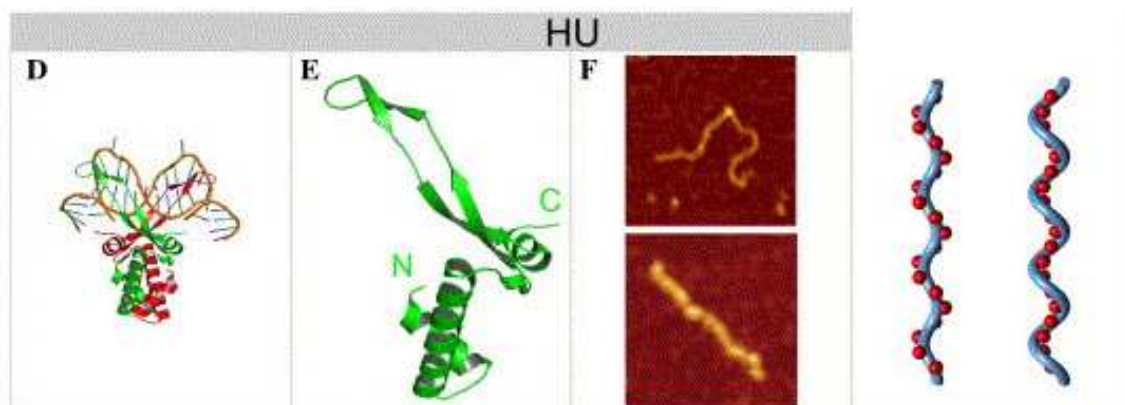


Figure 18 : Effet de la protéine HU sur l'ADN (Luijsterburg *et al.*, 2006). D. Structure de la protéine HU fixée sur l'ADN. E. Structure cristallographique d'un monomère de la protéine HU. F. Image par microscopie à force atomique d'un plasmide en présence de protéine HU. A droite, modèle de liaison de la protéine à l'ADN.

En plus de son rôle structural et de par sa nature à se fixer à l'ADN, HU peut influencer la régulation au niveau des promoteurs et donc l'expression des gènes. Chez des mutants HU, un profond changement du profil global de transcription a été détecté, ainsi que des modifications morphologiques des cellules mutantes (Kar *et al.*, 2005). Ces profondes modifications pourraient s'expliquer en partie par le fait que la protéine HU est requise pour la traduction de RpoS (Balandina *et al.*, 2001). Par ailleurs, il a été montré que HU permettait l'interaction entre dimères du répresseur GalR pour conduire à la répression des gènes *gal* (Kar & Adhya, 2001). L'expression de HU est quant à elle régulée en fonction des phases de

la croissance bactérienne. En effet, HU est très abondante dans les cellules en phase exponentielle avec 30 000 à 55 000 molécules (Ali Azam *et al.*, 1999), alors que le nombre de molécules diminue à moins de 20 000 par cellule lors du passage en phase stationnaire.

Le rôle de la protéine HU chez *L. pneumophila* n'a pas pu être élucidé. En effet, il semblerait qu'un mutant HU ne puisse pas être obtenu (Morash *et al.*, 2009), ce qui suggèrerait un rôle essentiel chez *L. pneumophila*.

Dps (DNA-binding Protection from Starved cells)

La protéine Dps existe sous forme dodécamérique, les 12 monomères étant structurés en 4 feuillets constituant une sphère creuse (Frenkiel-Krispin *et al.*, 2004). Elle ne reconnaît pas de séquence spécifique de fixation à l'ADN. Son étude cristallographique suggère que la présence de résidus lysines, chargés positivement, permettrait l'interaction du complexe avec l'ADN (Grant *et al.*, 1998). L'observation de l'effet de Dps sur le chromosome bactérien montre la présence de cristaux formés d'une alternance de couches d'ADN et de protéines Dps, la liaison à l'ADN induisant des interactions entre les dodécamères de Dps (Wolf *et al.*, 1999; Frenkiel-Krispin *et al.*, 2004). La formation de ces structures fortement organisées permettrait une forte compaction de l'ADN (Figure 19).

Ces complexes ADN-Dps protégeraient également physiquement l'ADN de différents stress : radiations UV, stress thermiques et oxydatifs, carences nutritionnelles prolongées en phase stationnaire (Frenkiel-Krispin *et al.*, 2001, 2004). Ainsi, la protéine Dps est également impliquée dans la réponse à différents stress, dont le stress oxydatif. En effet, elle fait partie du régulon OxyR chez *E. coli*, qui est induit lors de stress oxydatifs et permet aux cellules d'y survivre (Altuvia *et al.*, 1994). Les stress oxydatifs conduisent à la formation de radicaux libres, fortement toxiques pour la bactérie. Ces radicaux libres entraînent l'oxydation de protéines, mais aussi des cassures simple ou double brin de l'ADN par oxydation de

nucléotides. La production de ces radicaux libres se réalise via les réactions de Fenton, qui nécessitent la présence d'ions Fe^{2+} dans le milieu. En plus d'offrir une protection physique de l'ADN, la protéine Dps confère une protection chimique en séquestrant les ions Fe^{2+} et en les oxydant en ions Fe^{3+} , protégeant ainsi l'ADN et les protéines bactériennes (Zhao *et al.*, 2002). La protéine Dps fait en effet partie des bactérioferritines. De plus, Dps pourrait réguler indirectement l'expression d'un grand nombre de gènes. En effet, les profils protéomiques chez *E. coli* sont fortement modifiés en phase stationnaire dans un mutant dépourvu de Dps (Almirón *et al.*, 1992). Le gène *dps* est régulé en fonction des conditions de l'environnement et est fortement induit au cours de différents stress, comme l'entrée en phase stationnaire ou un stress oxydatif. Chez *E. coli*, plus de 200 000 molécules de Dps ont été détectées en phase stationnaire, alors que seules 6000 molécules sont présentes en phase exponentielle (Ali Azam *et al.*, 1999).

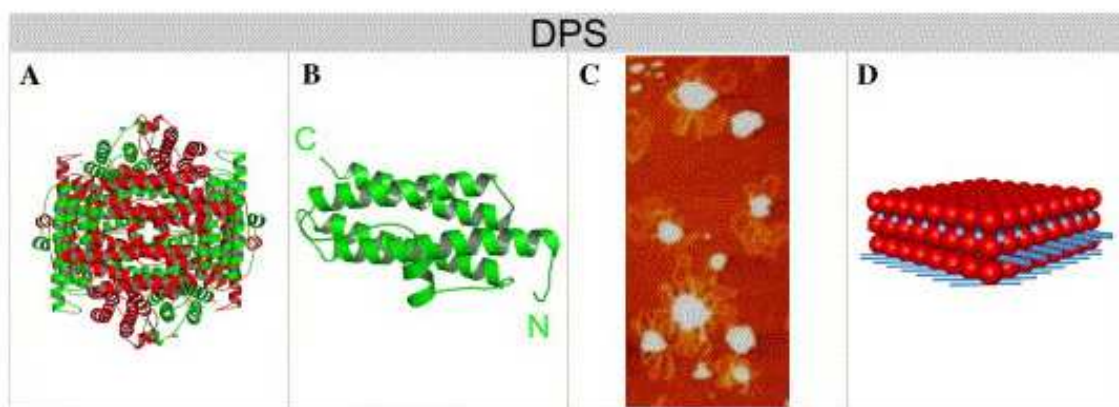


Figure 19 : Effet de la protéine Dps sur l'ADN (Luijsterburg *et al.*, 2006). A. Structure de la protéine Dps fixée sur l'ADN. B. Structure cristallographique d'un monomère de Dps. C. Image par microscopie à force atomique d'ADN en présence de Dps. D. Modèle de liaison de la protéine à l'ADN.

Chez *L. pneumophila* souche Paris, la protéine Dps est codée par le gène *lpp0744*. Son expression est induite lors d'un stress oxydatif (Park *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2009), mais aucune donnée n'existe quant à son implication dans les phénotypes de virulence et d'interactions avec les cellules hôtes.

IHF (Integration Host Factor)

La protéine IHF (Integration Host Factor) est un complexe hétérodimérique constitué de deux sous-unités α et β , codées par les gènes *himA* et *himB*. La séquence de *himAB* et la structure de IHF ressemblent à celles de HU, suggérant une origine commune (Drlica & Rouviere-Yaniv, 1987). La protéine IHF présente une forte spécificité de fixation à l'ADN, la séquence consensus ayant été définie à partir de la comparaison de plusieurs sites de liaison (Craig & Nash, 1984; Goodman *et al.*, 1999). Elle se fixe sur une séquence de 30 pb, dont 13 sont conservées, et induit une courbure de l'ADN allant jusqu'à 180° (Figure 20) (Lorenz *et al.*, 1999). Sur le chromosome d'*E. coli*, environ 1000 sites de fixation à haute affinité pour IHF ont été détectés (Ussery *et al.*, 2001), alors qu'entre 12 000 et 55 000 molécules d'IHF sont présentes dans la cellule (voir ci-dessous). Ainsi, IHF pourrait également se fixer à l'ADN par des interactions non spécifiques, car la majorité d'IHF *in vivo* est liée à l'ADN (Yang & Nash, 1995). La fixation d'IHF à l'ADN *in vitro* conduit à une réduction de 30% de la longueur de l'ADN, suite à son activité de courbure. La conséquence de la fixation d'IHF est donc une compaction de l'ADN (Ali *et al.*, 2001).

En plus de son rôle structurant de l'ADN, IHF est impliquée dans la régulation de la transcription globale des gènes chez les bactéries (Goosen & van de Putte, 1995), l'initiation de la réplication de l'ADN (Ryan *et al.*, 2002), la recombinaison spécifique de site (Dorman & Higgins, 1987) et la transposition (Sewitz *et al.*, 2003). En particulier, l'activité de fixation d'IHF à l'ADN peut soit inhiber l'ouverture de la boucle de transcription au niveau de

promoteurs (Huo *et al.*, 2009), soit au contraire la favoriser (Sheridan *et al.*, 1998). L'absence d'IHF entraîne des changements dans la transcription de plus de 100 gènes chez *E. coli* (Arfin *et al.*, 2000) et de plusieurs centaines de gènes chez *S. typhimurium* (Mangan *et al.*, 2006). Dans ce dernier cas, les gènes affectés sont impliqués dans la virulence et l'entrée en phase stationnaire.

Comme HU et Dps, l'expression d'IHF est régulée au cours du cycle cellulaire bactérien, avec 12 000 molécules présentes chez *E. coli* en phase exponentielle et 55 000 en début de phase stationnaire (Ali Azam *et al.*, 1999).

Chez *Legionella*, IHF présente la même structure hétérodimérique que chez *E. coli* et est impliquée dans les phénotypes de virulence (Morash *et al.*, 2009), sans que son impact sur l'expression globale des gènes et donc la régulation des gènes de virulence soit connu avec précision.

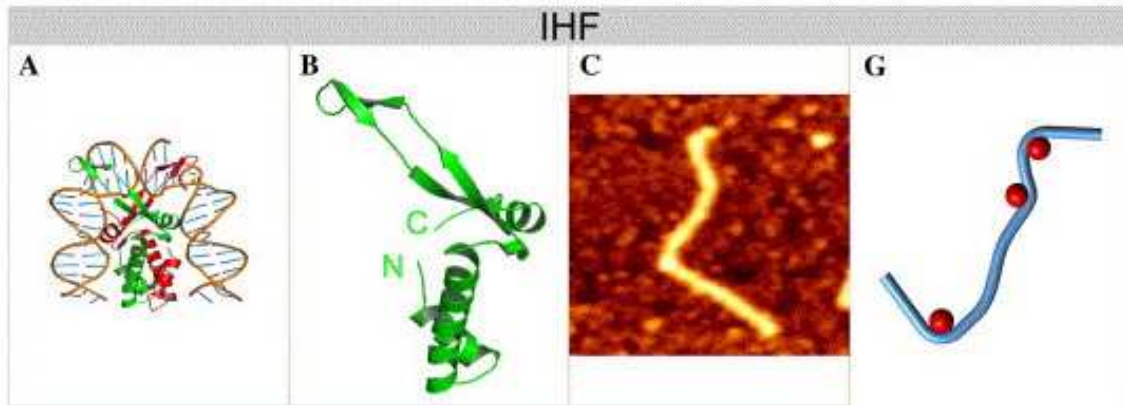


Figure 20 : Effet de la protéine IHF sur l'ADN (Luijsterburg *et al.*, 2006). A. Structure de la protéine IHF fixée sur l'ADN. B. Structure cristallographique d'un monomère de IHF. C. Image par microscopie à force atomique d'un ADN en présence de IHF. G. Modèle de liaison de la protéine à l'ADN.

Fis (Factor for Inversion Stimulation)

Il s'agit d'une petite protéine homodimérique de 98 acides aminés, codée par le gène *fis*. Sa structure cristallographique a été établie (Kostrewa *et al.*, 1991). La fixation de Fis à l'ADN provoque une courbure de 50 à 90°, accompagnée d'une extrusion de boucles d'ADN (Schneider *et al.*, 2001). Des sites de fixation sur l'ADN à haute affinité pour Fis ont été mis en évidence et une séquence consensus de fixation a été établie, comprenant deux sites de 7 pb espacés de 11 pb (Hengen *et al.*, 1997). Comme pour IHF, le nombre de sites de fixation répertoriés sur le chromosome d'*E. coli* est bien inférieur au nombre de molécules de Fis présentes dans la cellule (Ussery *et al.*, 2001). Ainsi, Fis est également capable de se lier à l'ADN de manière non spécifique, ce qui lui permet d'être impliquée dans la structuration globale ou locale du chromosome. Ces deux rôles impliquent la capacité de Fis de courber l'ADN et de former des branches et des boucles (Figure 21). Au niveau global, en se fixant de manière aspécifique, Fis forme des barrières qui contribuent à maintenir des domaines topologiques et son absence engendre un relâchement global de l'ADN chromosomique (Hardy & Cozzarelli, 2005). Ces domaines topologiques sont importants pour le maintien de l'intégrité du chromosome et l'expression coordonnée des gènes. Au niveau local, en se fixant sur ses sites spécifiques à haute affinité qui se situent souvent dans les régions promotrices de gènes, Fis permettrait de faciliter l'ouverture de la double hélice d'ADN et donc la transcription des gènes, en augmentant localement la superhélicité de l'ADN. En plus de ces effets directs sur le niveau de superhélicité de l'ADN, Fis engendre un effet indirect en régulant la transcription des gènes *gyrAB* et *topA* codant la gyrase et la TopoI (Schneider *et al.*, 1999; Weinstein-Fischer *et al.*, 2000).

En plus de son rôle dans le contrôle du niveau de superhélicité de l'ADN, Fis est impliquée dans de nombreux processus cellulaires. Il s'agit également d'un régulateur global de l'expression des gènes, puisque Fis régule la transcription de très nombreux gènes (Kelly *et*

al., 2004; Bradley *et al.*, 2007), comme les gènes d'ARN ribosomiques (Ross *et al.*, 1990), le gène *rpoS* (Hirsch & Elliott, 2005), *gyrAB* et *topA*, des gènes impliqués dans le catabolisme des sources de carbone (González-Gil *et al.*, 1996) et des gènes de virulence chez différentes bactéries pathogènes (Lautier & Nasser, 2007; Dorman & Corcoran, 2009). La protéine Fis est également impliquée dans l'initiation de la réplication du chromosome (Filutowicz *et al.*, 1992) et la recombinaison spécifique de site (Johnson *et al.*, 1986).

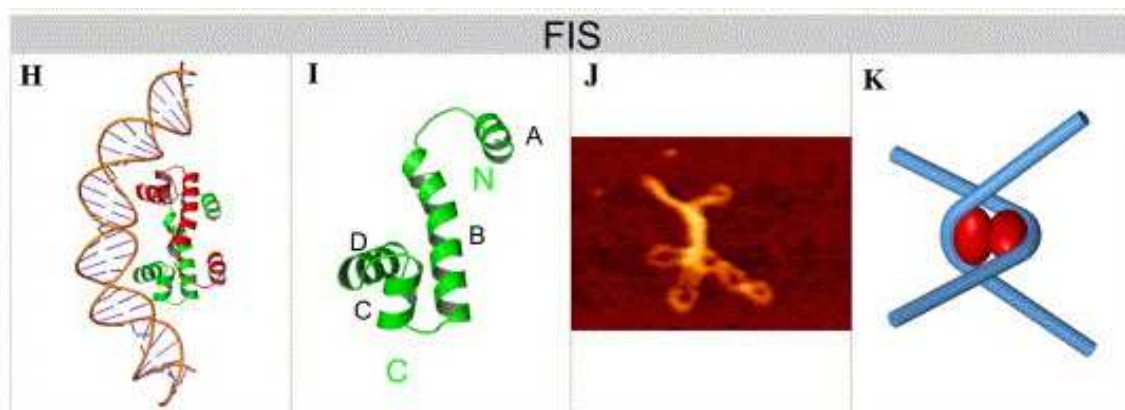


Figure 21 : Effet de la protéine Fis sur l'ADN (Luijsterburg *et al.*, 2006). H. Structure de la protéine Fis fixée sur l'ADN. I. Structure cristallographique d'un monomère de Fis. J. Image par microscopie à force atomique d'un plasmide en présence de Fis. K. Modèle de liaison de la protéine à l'ADN.

Comme les autres PTH, l'expression de Fis est régulée au cours du cycle cellulaire, avec cependant un profil d'expression très spécifique. En effet, Fis est très fortement exprimée en phase exponentielle avec plus de 50 000 molécules par cellule (Ali Azam *et al.*, 1999), alors qu'elle n'est quasiment plus détectée en phase stationnaire. D'autre part, alors que Fis contrôle le niveau de superhélicité de l'ADN, en retour l'expression du gène *fis* est contrôlée par le degré de superhélicité de l'ADN, *fis* étant réprimé par un relâchement de

l'ADN (Schneider *et al.*, 2000). Cette double régulation permet un contrôle homéostatique de la superhélicité de l'ADN.

Chez *Legionella*, trois gènes codant des protéines homologues de Fis sont présents (Cazalet *et al.*, 2004), leur rôle respectif étant pour l'instant totalement inconnu.

IV.2. Impact de la superhélicité de l'ADN sur l'expression génique

La superhélicité de l'ADN influe fortement sur les conditions physiologiques des cellules bactériennes et notamment sur leur taux de croissance, car elle régule la transcription des opérons d'ARN ribosomiques (Muskhelishvili & Travers, 2003). Elle intervient également dans la réponse à quasiment tous les stress possibles, de par notamment un fort impact sur la transcription globale du chromosome, 7 % des gènes ayant leur transcription modifiée par l'inhibition de la gyrase chez *E coli* (Peter *et al.*, 2004). Le lien entre modifications de la topologie de l'ADN et de l'expression globale des gènes existe chez la plupart des microorganismes (Dorman, 1991; Gmuender *et al.*, 2001; Fournier & Klier, 2004; Kelly *et al.*, 2004; Eriksson *et al.*, 2005; Ye *et al.*, 2007; Ferrándiz *et al.*, 2010). D'autre part, chacune des histones est impliquée dans la régulation globale de l'expression des gènes (Almirón *et al.*, 1992; Kelly *et al.*, 2004; Kar *et al.*, 2005; Mangan *et al.*, 2006).

Le type de gènes affectés par le degré de superhélicité de l'ADN est extrêmement diversifié et permet aux bactéries de s'adapter à tout un panel de conditions de l'environnement et de stress : les stress nutritionnels par le contrôle de la transcription des opérons d'ARN ribosomiques (Ross *et al.*, 1990) et de gènes impliqués dans le métabolisme (González-Gil *et al.*, 1996) ; le stress oxydatif par le contrôle des gènes nécessaires à la survie (Weinstein-Fischer *et al.*, 2000) ; le stress osmotique par le contrôle du gène *proU* (Higgins *et al.*, 1988) et une combinaison de stress par le contrôle de la transcription par le facteur sigma RpoS (Bordes *et al.*, 2003).

Cette relation entre niveau de superhélicité de l'ADN et expression globale des gènes est également détectée *in vivo* puisque la topologie de l'ADN est impliquée dans la virulence chez de nombreuses bactéries (Dorman & Corcoran, 2009). En effet, les bactéries pathogènes au cours de leur cycle doivent faire face à de nombreuses fluctuations de leur environnement par interactions avec différents compartiments soit de l'environnement soit de leurs hôtes. Par exemple, la transcription de l'opéron de virulence *fim* codant des fibrilles de type 1 chez *E. coli* est soumise à un phénomène de variation de phase dont la fréquence dépend de la TopoI et de la gyrase (Dove & Dorman, 1994). Chez *S. enterica*, la transcription des gènes nécessaires à l'expression de deux systèmes de sécrétion de type III, importants pour l'invasion des cellules de l'hôte, est contrôlée par le niveau de superhélicité de l'ADN (Galán & Curtiss, 1990; O Cróinín *et al.*, 2006), notamment par l'intervention des PTH Fis, HU et H-NS (Schechter *et al.*, 2003; O Cróinín *et al.*, 2006; Vivero *et al.*, 2008). La structure topologique de l'ADN peut également contrôler la production de toxines chez des bactéries pathogènes, comme *Bacillus anthracis* (Hadjifrangiskou & Koehler, 2008), la synthèse du flagelle comme chez *H. pylori* (Ye *et al.*, 2007), la synthèse de protéines de virulence associées à la synthèse de la paroi (Fournier & Klier, 2004), et la résistance aux antibiotiques (Aleixandre & Blanco, 1987; Nishino & Yamaguchi, 2004).

La superhélicité de l'ADN permet un contrôle fin de l'expression génique suite à des variations environnementales chez les bactéries. De plus, les résultats acquis sur la régulation des gènes de virulence suggèrent que la transition entre les deux phases du cycle infectieux de *L. pneumophila* semble répondre à des changements nutritionnels de l'environnement de cette bactérie (voir section III.3). Ainsi, le degré de superhélicité de l'ADN et les protéines PTH pourraient être impliqués dans l'adaptation de *L. pneumophila* aux nouvelles conditions que peut rencontrer cette bactérie, et donc dans le contrôle de traits phénotypiques tels que la résistance à divers stress et la virulence.

V. Objectifs

L'objectif de ma thèse a consisté d'une part à étudier l'impact de la plasticité fonctionnelle du génome de *L. pneumophila* sur les propriétés de virulence et de sensibilité à différents stress et d'autre part à évaluer l'utilisation de la plasticité structurale du génome pour des analyses épidémiologiques, en particulier pour identifier la source de l'infection et discriminer entre eux des isolats de l'espèce la plus répandue au niveau clinique en Europe.

Dans la première partie de cette thèse, nous avons caractérisé le rôle des protéines de type histone chez *L. pneumophila* notamment dans la régulation de la virulence et de la sensibilité à différents stress. En effet, avant les travaux de ma thèse, les protéines de type histone étaient peu étudiées chez ces bactéries. Des mutants des gènes codant les protéines Dps et IHF ont été obtenus et analysés, les résultats figurant dans les chapitres 2 et 3, respectivement. Nos résultats montrent que ces deux protéines sont nécessaires pour une multiplication optimale de *L. pneumophila* dans les macrophages humains. En revanche, elles ne semblent pas requises lors d'infection d'amibes. Nous avons également pu montrer que la protéine Dps était impliquée dans la diminution de la sensibilité aux carences nutritionnelles et au stress oxydatif *in vitro* et que la protéine IHF est impliquée dans la survie et la cultivabilité des cellules après un stress nutritionnel, les expériences suggérant que IHF pourrait être impliquée dans le contrôle du moment d'entrée dans l'état VBNC chez *L. pneumophila*. La détermination des profils globaux de transcription a par ailleurs permis de montrer que la protéine IHF contrôlait l'expression de nombreux gènes, dont certains codant des régulateurs impliqués dans la virulence, comme *rpoS*, *csrA* et *rsmZ*.

Dans la dernière partie de ma thèse, correspondant au chapitre 4, nous avons utilisé les éléments génétiques mobiles IS comme marqueurs génomiques de *L. pneumophila* afin de répondre à une question épidémiologique majeure. Lors d'une épidémie, il est en effet nécessaire d'identifier avec précision la bactérie à l'origine de l'infection et de trouver le

foyer infectieux le plus rapidement possible, afin de le traiter et d'éviter la propagation de l'infection. A l'heure actuelle cependant, les méthodes de typages sont peu efficaces pour différencier entre eux les isolats de *L. pneumophila* de type Paris, qui constitue une des souches prédominantes lors d'épidémies en Europe. Nous avons déterminé la signature génomique de 86 souches de *L. pneumophila* en utilisant les éléments IS comme marqueurs et utilisé la variabilité observée comme nouvelle méthode de typage. Cette étude a mis en évidence une séquence d'insertion, *ISLpn11*, présentant un fort pouvoir discriminant pour les isolats *L. pneumophila* de type Paris entre eux. Les données phylogénétiques de cette étude confirment également une expansion clonale de la souche *L. pneumophila* Paris.

Chapitre 2 : Rôles de la protéine Dps chez *L. pneumophila*

Les bactéries pathogènes, comme tous les organismes vivants, oxydent le fer grâce à certaines enzymes et peuvent également le séquestrer via des protéines de la famille des ferritines, ce qui évite la production de radicaux libres (Andrews *et al.*, 2003). En effet, le fer peut sous la forme Fe^{2+} catalyser des réactions de Fenton aboutissant à l'apparition de radicaux oxygénés hautement réactifs et dangereux pour les cellules (Luo *et al.*, 1994; Cabiscol *et al.*, 2000; Neyens & Baeyens, 2003)

La protéine Dps est une petite protéine ubiquitaire de type ferritine capable de limiter la formation de radicaux oxygénés en chélatant le fer (Martinez & Kolter, 1997). Cette protéine est également capable de se fixer sur l'ADN de manière non spécifique, ce qui peut également influencer l'expression globale des gènes. Il a ainsi été montré que Dps était impliquée dans la résistance à de nombreux stress, dont le stress oxydatif, d'une part en protégeant physiquement l'ADN par formation de véritables cristaux ADN-Dps et d'autre part en limitant les réactions de Fenton (Yamamoto *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2002; Su *et al.*, 2005). Les bactéries pathogènes intracellulaires devant faire face à des stress oxydatifs importants au cours de l'infection, Dps pourrait être impliquée dans les processus infectieux. Malgré de nombreuses études sur les protéines Dps bactériennes, très peu se sont intéressées à son implication éventuelle dans la virulence bactérienne. Elle est cependant impliquée dans la survie et la multiplication dans les macrophages de *S. enterica* serovar Typhimurium (Halsey *et al.*, 2004) et *Listeria monocytogenes* (Olsen *et al.*, 2005) et dans la virulence chez *H. pylori* (Haikarainen & Papageorgiou, 2010). D'autre part, l'expression de Dps est induite lors de carences en fer chez *L. pneumophila* souche Philadelphia (Yu *et al.*, 2009) et lors de la phagocytose chez l'endosymbiote *Candidatus Legionella jeonii* (Park *et al.*, 2006). Cependant, aucune donnée sur l'implication de cette protéine sur les propriétés de virulence chez *L. pneumophila* n'a été publiée.

Nous avons donc entrepris une étude du rôle du gène *dps* chez la souche Paris de *L. pneumophila* et trois types d'expériences ont été réalisés : l'analyse de la transcription du gène dans des conditions *in vitro*, de son implication *in vitro* dans la résistance à différents stress et *in vivo* dans les interactions entre *Legionella* et deux types d'hôtes eucaryotes (cellules humaines et amibiennes). Ces interactions ont été étudiées aux niveaux de la réplication intracellulaire, de la cytotoxicité et de l'activité hémolytique de *Legionella*. Les résultats obtenus font l'objet d'un manuscrit que nous avons soumis à la revue *FEMS Microbiology Letters* le 26 mai 2010 et qui est en cours de révision pour tenir compte des réponses des rapporteurs.

Dans un premier temps, nous avons suivi la transcription du gène *dps in vitro* par des expériences de PCR semi-quantitative après extraction des ARN de cellules de *L. pneumophila* prélevées au cours des différentes phases du cycle cellulaire bactérien lors de cultures en milieu liquide. Nous avons pu démontrer l'induction de la transcription du gène durant l'entrée en phase stationnaire. L'influence de la protéine Dps sur les propriétés phénotypiques de *L. pneumophila in vitro* et *in vivo* a ensuite été étudiée par la construction d'un mutant délété du gène *dps* et sa comparaison à la souche de référence. Cette construction a été réalisée par recombinaison homologue dans le chromosome résultant dans le remplacement du gène *dps* par un gène de résistance à un antibiotique.

L'étude phénotypique comparative *in vitro* de la souche mutante dont le gène *dps* a été délété montre que *dps* est requis pour une réponse optimale à un stress oxydatif au peroxyde d'hydrogène et à une carence nutritionnelle prolongée. En effet, la souche mutante présente d'une part un halo d'inhibition de croissance en présence de peroxyde d'hydrogène de diamètre plus grand que la souche de référence et d'autre part une survie plus faible en phase stationnaire prolongée.

In vivo, la capacité de la souche mutante à infecter et à se multiplier dans des hôtes eucaryotes a été analysée en utilisant une lignée cellulaire de macrophages U937, des macrophages dérivés de sang humain et des amibes. La protéine Dps est requise pour la multiplication intracellulaire dans les deux types de macrophages, mais elle ne semble pas indispensable pour la multiplication dans les cellules amibiennes. Elle est également impliquée dans la cytotoxicité cellulaire et dans l'hémolyse.

La complémentation des différents phénotypes a été entreprise en clonant le gène *dps* avec son propre promoteur sur un plasmide réplcatif chez *Legionella* (Chen *et al.*, 2006). La transformation du mutant délété de *dps* par ce plasmide a permis de compléter les phénotypes *in vitro*, en diminuant la sensibilité au peroxyde d'hydrogène et au stress nutritionnel. En revanche, la complémentation des déficits de multiplication et de cytotoxicité *in vivo* du mutant n'ont pas abouti, et nous avons pu montrer que ceci était vraisemblablement lié à un coût important du plasmide sur la croissance bactérienne.

Le manuscrit n'a pour l'instant pas été accepté pour publication et les commentaires des rapporteurs se trouvent ci-dessous, faisant suite au manuscrit. Leurs commentaires sont cependant positifs et l'éditeur de notre manuscrit nous permet de le resoumettre après réponses aux commentaires des rapporteurs. Notre stratégie en vue d'y répondre est donnée ci-après.

The *Legionella pneumophila* Dps-homolog Dps_{lpp} is required both *in vitro* under stress conditions and *in vivo* in eukaryotic host cells.

Mike Vergnes^{1,2}, Maëlle Molmeret^{3,4}, Max Maurin^{1,2,5}, Dominique Schneider^{1,2} and Elisabeth Kay^{1,2*}

¹Laboratoire Adaptation et Pathogénie des Microorganismes, Université Joseph Fourier Grenoble 1, BP 170, F-38042 Grenoble cedex 9, France; ²CNRS UMR5163; ³Faculté de Médecine Laennec, Laboratoire de Bactériologie, Université Lyon 1; ⁴INSERM U851, 7 rue Guillaume Paradin, F-69372 Lyon cedex 08; and ⁵CHU Grenoble, Université Joseph Fourier, BP 217, 38043 Grenoble, France.

*Corresponding author. Laboratoire Adaptation et Pathogénie des Microorganismes, CNRS UMR5163, Université Joseph Fourier, Institut Jean Roget, Campus Santé, Domaine de la Merci, BP170, 38042 Grenoble Cedex 9, France. Phone: +33 (0)4 76 63 74 95; fax: +33 (0)4 76 63 74 97. E-mail: elisabeth.kay@ujf-grenoble.fr

Keywords: *Legionella pneumophila*, *dps*, starvation survival, oxidative stress, intracellular multiplication, cytotoxicity.

Running title: phenotypic traits of *L. pneumophila* Dps-homolog.

Abstract

Legionella pneumophila can multiply in a wide range of eukaryotic hosts, including protozoa (amoebae, ciliates) and human macrophages. This bacterium can overcome the attack of the oxidising molecules produced by host cells during infection. Using a genetically-constructed mutant strain, we investigated the role of the *dps*-homolog gene of *L. pneumophila* strain Paris in the *in vitro* sensitivity to oxidative and nutritional stresses and in intracellular multiplication and cytotoxic potential in both amoebae and human macrophages. We demonstrated that, as for other bacteria, *dps* is transcribed during stationary phase in *L. pneumophila* and is required for optimal *in vitro* response to oxidative and nutritional stresses. In addition, the Dps protein is involved *in vivo* in intracellular multiplication and cytotoxicity, although the effects are different in amoebal and human macrophage host cells, and in hemolytic activity. Our findings demonstrate that *dps* is required in *L. pneumophila* in stressful environments, both in axenic conditions and in host cell systems.

Introduction

Legionella pneumophila, the agent of legionellosis, is a Gram-negative intracellular pathogen that replicates within protozoa (*Acanthamoeba*, *Hartmanella*, *Naegleria*) and ciliates (*Tetrahymena*). It can also replicate inside human alveolar macrophages potentially leading to a severe pneumonia called Legionnaires' disease (Rowbotham, 1980; Horwitz, 1983; Fields, 1996). Human infections occur through inhalation of contaminated aerosols generated from natural or man-made aquatic environments (Winn, 1988; Swanson & Hammer, 2000). To subvert the macrophage defence mechanisms, *L. pneumophila* inhibits the immediate phagosome-lysosome fusion and instead, replicates within a specialized vacuole surrounded by endoplasmic reticulum and mitochondria (Horwitz & Maxfield, 1984). In addition, intracellular bacteria have to face severe oxidative stress due to reactive oxygen species

(ROS) generated by respiratory burst during phagocytosis. Superoxide (O_2^-), hydroxyl radicals (OH^\bullet) and hydrogen peroxide (H_2O_2) are potent oxidizing agents that damage proteins, membrane lipids and DNA (Luo *et al.*, 1994; Martinez & Kolter, 1997; Cabiscol *et al.*, 2000). Reaction of H_2O_2 with ferrous iron can result in the production of OH^\bullet . To minimize ROS-induced damage, bacteria possess scavenging enzymes and ferritins or ferritin-like proteins that oxidize and sequester iron (Andrews *et al.*, 2003). Dps (DNA-binding protein from starved cells) is a ubiquitous bacterial ferritin-like protein that protects cells against oxidative stress by removing Fe(II) and thus limiting the formation of hydroxyl radicals (Yamamoto *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2002; Su *et al.*, 2005). Dps represents the most abundant protein during stationary phase and is crucial for long-term survival (Nair & Finkel, 2004; Olsen *et al.*, 2005). In addition, Dps can form co-crystals with DNA providing physical protection to nucleic acids (Frenkiel-Krispin *et al.*, 2001). Few studies have evaluated the role of Dps in the virulence of pathogenic bacteria. Dps is involved in survival and multiplication within macrophages of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Halsey *et al.*, 2004) and *Listeria monocytogenes* (Olsen *et al.*, 2005), and in virulence of *Helicobacter pylori* (Haikarainen & Papageorgiou, 2010). The expression of *dps_x* in the obligate endosymbiont “*Candidatus Legionella jeonii*” is induced in response to phagocytic activities of host cells (Park *et al.*, 2006). A *dps* gene-homolog has recently been discovered in *L. pneumophila* that participates in multiple stress resistance with an induced expression under iron-limited conditions (Yu *et al.*, 2009). However, the role of Dps in the virulence of *Legionella* species has not been assessed. Here, we measured the expression of *dps* in a natural strain of *L. pneumophila* during *in vitro* growth. We compared this strain and a *dps*-derived mutant for their *in vitro* sensitivity to oxidative and nutritional stresses, their intracellular replication and cytotoxicity in amoebal and human host cells and their hemolytic activity on mammalian

cells. During complementation experiments, we observed unexpected differences for *in vitro* and *in vivo* phenotypes.

Materials and methods

Cell cultures

L. pneumophila serogroup 1 strain Paris (CIP 107629T) served as reference strain. Bacteria were grown at 37°C in N-(2-acetamido)-2-aminoethanesulfonic acid (ACES)-buffered (pH 6.9) yeast extract broth (BYE) or on ACES-buffered charcoal yeast extract (BCYE) agar plates. All BYE cultures were inoculated from 3-day-old cells plated on BCYE. When needed, kanamycin (15 µg mL⁻¹) and chloramphenicol (10 µg mL⁻¹) were added. The *Acanthamoeba polyphaga* amoebal cells were grown and maintained at 30°C in Peptone Yeast extract Glucose (PYG) medium in 75-cm² tissue culture flasks (Moffat & Tompkins, 1992). Prior infection, amoebal cells were washed twice, resuspended in PYG without glucose (PY) and seeded in a 96-well plate at ~1x10⁵ cells per well. The U937 human monocyte cell line was maintained at 37°C in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) and 2 mM L-glutamine in a humidified atmosphere with 5% CO₂. Human monocyte-derived macrophages (hMDMs) were prepared from fresh peripheral blood monocytes obtained from healthy donors (Etablissement Français du Sang, Lyon, France) and isolated by Ficoll density gradient. Peripheral blood mononuclear cells were seeded in ultra-low attachment 6-well plate (Corning) at 1x10⁶ cells per well in RPMI 1640 with 10% FCS and 2 mM L-glutamine, and incubated at 37°C with 5% CO₂ for 3 days to allow adherence. Cells were then scraped, washed three times in PBS and hMDMs were counted using a hemacytometer before seeding in a 96-well plate at ~1x10⁵ cells per well. Prior infection, U937 cells (1x10⁵ per well) were differentiated into macrophages with 50 ng mL⁻¹ phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) for 48 hours (Abu Kwaik *et al.*, 1993) and then washed three times in RPMI 1640.

Mutant and complementation-plasmid constructions

The *dps* mutant was constructed by replacing the chromosomal gene by a kanamycin resistance cassette. Briefly, the two flanking regions of *dps* (*lpp0744*) were PCR-amplified from *L. pneumophila* Paris chromosomal DNA with primers PLP16 (5'-CTGATTACGATAGAGAAAAATTACAAG-3') and PLP38 (5'-GCTTTTAAATTAGTCGACTCATTATTCTTTCCTTG-3') for the upstream region, and PLP18 (5'-CAGCCTCCAAGGGTTCGACAATAAAGTATTC-3') and PLP19 (5'-GATTACTGGATATGTACAAATAATAAG3'-) for the downstream region. (Underlined are *Sal*I restriction sites). The 722-bp upstream and 719-bp downstream fragments were each cloned into pCRII-TOPO (Invitrogen), isolated after cleavage with *Sac*I/*Sal*I and *Sal*I/*Pst*I, respectively, and ligated together into pBluescript KS digested by *Sac*I/*Pst*I. A 1kb kanamycin resistance cassette (*kan*) was then inserted into the *Sal*I site. The resulting plasmid was introduced into *L. pneumophila* Paris by natural transformation as described (Almahmoud *et al.*, 2009). Recombination events, resulting in the replacement of *dps* with *kan*, were selected onto BCYE agar plates containing 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ kanamycin. After 4 to 5 days at 37°C, colonies were isolated, streaked on kanamycin-containing BCYE and checked for the mutant allele by PCR using primers PLP165 (5'-CCACTTCTGATTACGATAG-3') and PLP166 (5'-GCTTCCAAGATTACTGG-3'). A representative $\Delta\textit{dps}::\textit{kan}$ mutant strain, called LPP51, was stored at -80°C. For complementation assays, the *dps* gene with its own regulatory region was PCR-amplified with primers PLP117 (5'-GTTGAGCTCGGTGGCGTTGCCTTG-3') and PLP118 (5'-AAACTGCAGCAAACAGTCCACAC-3'). (Underlined are *Sac*I and *Pst*I restriction sites, respectively). The resulting fragment was digested by *Sac*I/*Pst*I and cloned into pBG307 (Chen *et al.*, 2006) cleaved by *Sac*I/*Pst*I, thereby replacing *pmip-gfp* in pBG307. The *dps* sequence was checked in the resulting plasmid pLPPA124 which was then introduced

into *L. pneumophila* by electrotransformation. The plasmid pLPPA99, corresponding to pBG307 without *pmip-gfp* and *dps* was used as control.

RNA isolation, cDNA preparation and real-time qPCR

Cultures of *L. pneumophila* were inoculated at $OD_{600} = 0.05$ in 50 mL BYE and grown at 37°C with agitation. Cells (1×10^9) were collected after 12, 16, 20 and 26 hours and centrifuged 2 min at 11,000 rpm. Total RNA was isolated using an RNeasy Mini Kit (Qiagen) and treated with DNase (Roche). cDNA was prepared using AMV Reverse Transcriptase (Promega) for 1 h at 42°C. Real-time qPCR experiments were performed in a 25- μ L reaction volume containing 1 μ g cDNA, 12.5 μ L SYBR Green Master Mix (Roche) and 300 nM specific primers using a Real Time PCR lightcycler 1.5 (Roche). Experiments were repeated twice, generating similar results. The threshold cycle (C_T), *i.e.* the number of cycles needed for the amplification curve to rise above background noise, was measured and normalized using the 16S rRNA gene. The relative change in gene expression was recorded by calculating $2^{-\Delta\Delta CT}$, where $\Delta\Delta CT = (C_{T, dps} - C_{T, 16S})_{t=x} - (C_{T, dps} - C_{T, 16S})_{t=12h}$ (Livak & Schmittgen, 2001). The specific primers are: 16S1: 5'-AGGGTTGATAGGTTAAGAGC-3' and 16S2: 5'-CCAACAGCTAGTTGACATCG-3'; Dps_F: 5'-CATTGGCATGTTACTGGA- 3' and Dps_R: 5'-TCAGCAAAGGTAGCAGGA-3'.

Prolonged stationary phase cultures

Cultures of *L. pneumophila* were inoculated at $OD_{600} = 0.05$ in 2 mL BYE and incubated at 37°C with agitation. At regular intervals during four days, OD_{600} was measured and viable cell counts were determined by plating serial dilutions on BCYE plates. The same serial dilutions were used to infect *A. polyphaga*. Briefly, in a 96-well plate, 1×10^5 amoebal cells per well (200 μ L final volume) were infected with 20 μ L of each dilution and incubated 5 days at 37°C. Cells were lysed with 0.05% Triton X-100 and 5 μ L were spread on BCYE. *Legionella*

colonies were scored after 4 days at 37°C. Three independent experiments, each in triplicate, were performed.

Stress assays

For oxidative stress assays, *L. pneumophila* strains were grown in 2 mL BYE with agitation at 37°C. Cells (10^8) were collected both at $OD_{600} = 1.5 - 1.7$ (exponential phase) and ~4 hours after cessation of growth ($OD_{600} = 4.1 - 4.3$, stationary phase), mixed with 5 mL 0.8% soft agar (at 50°C) and used to overlay BCYE agar plates. Whatmann paper disks (5 mm diameter), soaked with 5 μ L of either 5 mM hydrogen peroxide or water, were deposited onto the bacterial overlay. Diameters of growth inhibition zones were measured after 2 days at 37°C.

For other stress assays, *L. pneumophila* strains were grown as above until they reached stationary phase ($OD_{600} = 4.1 - 4.3$). Cells (0.6 mL) were collected, centrifuged at 11,000 rpm and resuspended in either sterile water or different solutions containing the following toxic compounds: 100 mM $FeSO_4$, 50 mM $CuSO_4$, 100 mM potassium hydroxide pH=11, 100 mM citric acid pH=3, 100 μ g mL^{-1} ethidium bromide, 0.002% SDS. After 15, 30, 45 and 60 min, cells were centrifuged, resuspended in water and serial dilutions were plated on BCYE. Viable cell counts were calculated as the ratio of the number of growing colonies after 3 days at 37°C compared to the control condition. The same cell fractions were also exposed for 1, 2, 3 and 5 min to UV light (200 $J m^{-2}$) and for 5, 10, 15 and 20 min to 50°C.

Intracellular multiplication of *L. pneumophila* strains in eukaryotic cells

L. pneumophila strains were grown for 24 h (post-exponential phase) at 37°C in BYE and resuspended in either serum-free RPMI for macrophage infection or PY for amoeba infection. For each bacterial strain, triplicate infections each with three repetitions, were performed at an MOI of 10 using 1×10^6 bacterial cells. Plates were centrifuged 10 min at 1500 rpm and incubated 1h at 37°C. Cells were then washed three times to remove extracellular bacteria

(T0) and infection was allowed to continue at 37°C in RPMI or PY. After 12, 24 and 48 h, monolayers were lysed either hypotonically for macrophages or with 0.05% Triton X-100 for amoeba, diluted and plated on BCYE for scoring bacterial colonies as a measure of intracellular replication.

Cytotoxicity to U937 and *A. polyphaga* cells

Cell monolayers were infected by each *L. pneumophila* strain at an MOI of 10, centrifuged 10 min at 1500 rpm followed by one hour incubation at 37°C, washed three times in either RPMI or PY and incubated 48 hours at 37°C. Cells were then washed three times in either RPMI or PY and 100 µL of medium containing 10% (v/v) Alamar blue (Invitrogen) were added per well. After 4h at 37°C to allow the viable eukaryotic cells to convert Alamar blue into its reduced form, OD₅₆₅ was measured and corrected for background by the OD₆₀₀. The percentage P of viable eukaryotic cells was calculated from triplicate supernatants as $P = \frac{(OD_{565}-OD_{600})_{infected}}{(OD_{565}-OD_{600})_{uninfected}} \times 100$. Cytotoxicity was therefore calculated as 100-P.

Hemolysis assay

Sheep red blood cells (sRBC) were washed in PBS and resuspended at 5×10^7 cells mL⁻¹. Bacteria from 3 days-old plates were resuspended in PBS and adjusted to 10^{10} cells mL⁻¹. Bacterial cells (50 µL) were mixed with 200 µL of sRBC, corresponding to an MOI of 50. Samples were centrifuged at 1700 rpm for 5 min and incubated 1h at 37°C. The mixtures were then resuspended by vortexing and centrifuged at 1700 rpm for 5 min. The OD_{415nm} of all supernatants was determined in a microplate reader (Tecan) to quantify the release of haemoglobin. Three independent experiments were performed, each in triplicate.

Results and discussion

dps is maximally expressed during stationary phase

We identified *lpp0744* as the potential *dps* gene homolog in the *L. pneumophila* Paris genome (Cazalet *et al.*, 2004) since its product, called here Dps_{lpp}, showed 99% and 68% identity with the Dps-homologs of *L. pneumophila* Philadelphia (Yu *et al.*, 2009) and “*Candidatus Legionella jeonii*” (Park *et al.*, 2006), respectively.

We measured the Dps_{lpp} mRNA relative levels over 26 hours of growth in BYE by real-time qPCR (Fig. 1). A 7.3-fold induction was observed at the end of exponential growth, indicating that *dps* expression responded to nutrient starvation as in other bacteria (Nair & Finkel, 2004; Olsen *et al.*, 2005).

Dps_{lpp} decreases sensitivity to oxidative stress during stationary phase

A Δ *dps::kan* mutant LPP51 was constructed by allelic exchange in the chromosome of *L. pneumophila* Paris. Upstream and downstream adjacent regions including the putative transcriptional terminator were kept intact. Both LPP51 and reference Paris strains were compared in different stress conditions during exponential and stationary phases, including oxidative stress, UV light, heat shock, presence of toxic compounds (iron, copper, ethidium bromide, SDS) and pH stress. We detected differences between both strains only for oxidative stress (Fig. 2a). As described for *Escherichia coli*, *L. pneumophila* Paris developed decreased sensitivity to oxidative stress during stationary phase. While the loss of Dps_{lpp} had no effect in exponential phase, it increased sensitivity to 5 mM H₂O₂ in stationary phase. We further confirmed the direct involvement of Dps_{lpp} by overexpressing *dps* under its own promoter. While the empty plasmid vector pLPPA99 had no effect, the pLPPA124 plasmid carrying *dps* complemented the sensitivity of LPP51 in stationary phase. Complementation also occurred in exponential phase for both LPP51 and reference strains although, for unknown reasons, it

was less efficient in the mutant. It should be emphasized that complementation involved overexpression of Dps prior to exposure to H₂O₂ which has been reported to confer decreased sensitivity in exponential phase (Martinez & Kolter, 1997). Efficient complementation confirmed the overexpression of *dps* carried by pLPPA124. These experiments confirmed that Dps_{lpp} conferred decreased sensitivity to oxidative stress during stationary phase in *L. pneumophila* (Yu *et al.*, 2009), but was not involved in the other stresses tested, by contrast to the situation in *E. coli* (Nair & Finkel, 2004).

Dps_{lpp} is required for long-term starvation

The three strains Paris, LPP51 and LPP51 + pLPPA124 were grown in BYE for four days and we determined both their growth rate by measuring the OD₆₀₀ and their ability to form colonies after plating serial dilutions on BCYE plates. All media were supplemented with chloramphenicol for the third strain. All growth curves were comparable (Fig. 2b). Viable counts of both reference and mutant strains reached $\sim 1 \times 10^{10}$ CFU mL⁻¹ upon entry into stationary phase and dramatically dropped to 5×10^3 CFU mL⁻¹ after four days. However, LPP51 decreased much faster with $\sim 1 \times 10^4$ CFU mL⁻¹ after two days whereas we observed no decrease for the Paris strain at that time.

Previous studies have shown that after prolonged periods of low nutrient availability *Legionella* species can enter a viable noncultivable (VBNC) state from which it can recover and regain pathogenic potential after passage in amoeba (Steinert *et al.*, 1997; Dusserre *et al.*, 2008; Garcia *et al.*, 2008). We determined if the decreased ability of LPP51 to form colonies was related to loss of cultivability. We infected *A. polyphaga* with serial dilutions of the BYE cultures obtained after four days of incubation. After 5 days of infection, amoebal cells were lysed and plated on BCYE to score the colonies formed by *L. pneumophila* cells. No increase in CFU counts was detected after passage in amoeba (data not shown), suggesting that the

decrease in CFU counts of LPP51 may be related to increased cell death during starvation rather than entry into a VBNC state.

Dps_{lpp} affects intracellular multiplication of *L. pneumophila* in macrophages but not in amoeba and cytotoxicity in both cell types

We infected human macrophages (prepared from fresh peripheral blood monocytes-hMDMs and the monocytic cell line U937) and *A. polyphaga* amoebal cells with each of the Paris and LPP51 strains grown for 24h in BYE and monitored intracellular growth by enumeration of CFUs over 2 days (Fig. 3). At all timepoints (2, 24 and 48h post-infection), the intracellular replication of LPP51 was significantly lower compared to the Paris *dps*⁺ strain in both macrophage cell lines, with 1000- and 10-fold reductions in CFU mL⁻¹ after 24h in hMDMs and U937 cells, respectively (Fig. 3a and b). Incubation of both *L. pneumophila* strains in cell-free RPMI did not allow bacterial multiplication nor did it alter viability or recovery (data not shown), confirming differences in intracellular multiplication. In contrast with macrophages, no difference was observed with *A. polyphaga* (Fig. 3c). As expected, the *dotB* mutant was unable to multiply in all hosts. We next determined the cytotoxicity of *L. pneumophila* Paris and LPP51 to *A. polyphaga* and U937 macrophages by quantifying the amount of killed host cells using Alamar blue staining (Fig. 4). The cytotoxicity of LPP51 to *A. polyphaga* and U937 macrophages was significantly reduced by ~50 and ~70%, respectively, compared to the reference strain ($p < 0.05$). Therefore, these results showed that Dps_{lpp}, while involved in cytotoxicity to both human macrophages and amoebal cells, is required for intracellular multiplication only in macrophages, especially in hMDMs.

Dps_{lpp} affects hemolysis

Hemolysis of sRBC was measured by infection with the three strains Paris, LPP51 and the *dotB* mutant. LPP51 revealed a two-fold reduction in hemolysis compared to the reference strain (Fig. 5), while hemolysis was abolished in the *dotB* mutant (Kirby *et al.*, 1998). The phenotypic difference of LPP51 between effective intracellular multiplication and decreased cytotoxicity to the amoebal cells may therefore reflect a deficiency of the mutant to exit amoeba after replication, as described for the *rib* mutants of *L. pneumophila* (Gao & Abu Kwaik, 2000), although their differential phenotypic behavior was also apparent in macrophages (Alli *et al.*, 2000). Also, factors produced by *L. pneumophila*, such as lipolytic enzymes contribute to hemolysis and/or cytotoxicity without affecting intracellular multiplication in host cells (Flieger *et al.*, 2004). Thus, bacterial ability to replicate and cytotoxicity to host cells, although correlated, should be carefully investigated as different factors can be involved in host cell lysis such as degradative enzymes, pore-forming cytolysin or mechanical pressure of the bacterial load inside cells (Gao & Abu Kwaik, 2000; Alli *et al.*, 2000; Flieger *et al.*, 2004). Our data suggest that genetic determinants specifically involved in the destruction of eukaryotic cells may exist in *L. pneumophila* and that Dps_{lpp} may be involved in their regulation.

***In vivo* complementation experiments**

The cytotoxicity level to host cells was not restored after complementation of *dps* in LPP51 (Fig. 4). Although our *in vitro* complementation assays suggested that *dps* was successfully expressed from its plasmid location (Fig. 2), it may not be the case anymore in host cells especially since *dps* is expressed from its own promoter. To gain further insights into this lack of complementation, we introduced both plasmids pLPPA99 and pLPPA124 (without and with *dps*, respectively) in the reference strain and performed the cytotoxicity assays to U937

with and without chloramphenicol (Fig. 4). While the introduction of each plasmid into *L. pneumophila* Paris did not change its cytotoxicity to the macrophages for the assay without chloramphenicol, addition of the antibiotic during infection dramatically decreased cytotoxicity by ~5 fold. This was true even for the pLPPA99 empty vector. Therefore, plasmid maintenance may impose a cost to *L. pneumophila* during the infection process, thereby affecting its virulence traits. This may also explain the lack of complementation of cytotoxicity with the LPP51 mutant. We also showed that *in vitro* growth of *L. pneumophila* Paris carrying pLPPA99 in BYE with or without chloramphenicol was slowed down (data not shown), confirming the plasmid cost. Previous studies reported a chloramphenicol concentration 3- to 5-fold higher in human monocytes (Hand *et al.*, 1984; Lee Hand & King-Thompson, 1989) that might further select for the maintenance and therefore the cost of the plasmids. By increasing the chloramphenicol concentration by 3 and 5 fold in BYE cultures, we detected further decreased growth of both Paris and LPP51 strains (data not shown). Difficulties with full phenotypic complementation were already observed linked to the presence of antibiotic resistance genes (Abromaitis *et al.*, 2005; Morash *et al.*, 2009). Despite the lack of *in vivo* complementation, we are however confident that the phenotypic differences specific to LPP51 are associated to the loss of *dps* rather than to polar effects on the downstream transcribed gene on the *L. pneumophila* chromosome for two reasons: more than 200 bp separate the two genes making co-transcription unlikely and transcriptional analyses revealed no effect of the *dps* deletion on transcription of this downstream gene (data not shown).

In this study, we report that Dps_{lpp} , the *Dps* homolog from *L. pneumophila* strain Paris, is expressed upon entry into stationary phase and is involved in *in vitro* and *in vivo* phenotypes: sensitivity to oxidative and nutritional stresses, intracellular replication in macrophages,

cytotoxicity to amoeba and macrophages and hemolysis. We also provide evidence that complementation studies should take into account the cost of the complementing plasmid associated with expression of antibiotic resistance.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the French Centre National de la Recherche Scientifique and “Bonus Qualité Recherche” of University Joseph Fourier (to DS). The authors thank YJ Lu for the kind gift of pBG307 and C Ginévra for the *L. pneumophila dotB* mutant. MV thanks the French Ministry of Education and Research for a PhD fellowship and the University Joseph Fourier for an ATER funding.

References

- Abromaitis S, Faucher S, Béland M, Curtiss R 3rd & Daigle F (2005) The presence of the *tet* gene from cloning vectors impairs *Salmonella* survival in macrophages. *FEMS Microbiol Lett* **242**: 305-312.
- Abu Kwaik Y, Eisenstein BI & Engleberg NC (1993) Phenotypic modulation by *Legionella pneumophila* upon infection of macrophages. *Infect Immun* **61**: 1320–1329.
- Alli OAT, Gao L-Y, Pedersen LL, Zink S, Radulic M, Doric M & Abu Kwaik Y (2000) Temporal pore formation-mediated egress from macrophages and alveolar epithelial cells by *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* **68**: 6431-6440.
- Almahmoud I, Kay E, Schneider D & Maurin M (2009) Mutational paths towards increased fluoroquinolone resistance in *Legionella pneumophila*. *J Antimicrob Chemother* **64**: 284–293.

- Andrews SC, Robinson AK & Rodríguez-Quiñones F (2003) Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* **27**: 215–237.
- Cabiscol E, Tamarit J & Ros J (2000) Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int Microbiol* **3**: 3–8.
- Cazalet C, Rusniok C, Brüggemann H, Zidane N, Magnier A, Ma L, Tichit M, Jarraud S, Bouchier C, Vandenesch F, Kunst F, Etienne J, Glaser P & Buchrieser C (2004) Evidence in the *Legionella pneumophila* genome for exploitation of host cell functions and high genome plasticity. *Nat Genet* **36**: 1165-1173.
- Chen DQ, Zheng XC & Lu YJ (2006) Identification and characterization of novel ColE1-type, high-copy number plasmid mutants in *Legionella pneumophila*. *Plasmid* **56**: 167–178.
- Dusserre E, Ginevra C, Hallier-Soulier S, Vandenesch F, Festoc G, Etienne J, Jarraud S & Molmeret M (2008) A PCR-based method for monitoring *Legionella pneumophila* in water samples detects viable but noncultivable *legionellae* that can recover their cultivability. *Appl Environ Microbiol* **74**: 4817–4824.
- Fields BS (1996) The molecular ecology of *legionellae*. *Trends Microbiol* **4**: 286–290.
- Flieger A, Rydzewski K, Banerji S, Broich M & Heuner K (2004) Cloning and characterization of the gene encoding the major cell-associated phospholipase A of *Legionella pneumophila*, *plaB*, exhibiting hemolytic activity. *Infect Immun* **72**: 2648–2658.
- Frenkiel-Krispin D, Levin-Zaidman S, Shimoni E, Wolf SG, Wachtel EJ, Arad T, Finkel SE, Kolter R & Minsky A (2001) Regulated phase transitions of bacterial chromatin: a non enzymatic pathway for generic DNA protection. *EMBO J* **20**: 1184–1191.
- Gao L-Y & Abu Kwaik Y (2000) The mechanism of killing and exiting the protozoan host *Acanthamoeba polyphaga* by *Legionella pneumophila*. *Environ Microbiol* **2**: 79-90.
- García MT, Baladrón B, Gil V, Tarancon ML, Vilasau A, Ibañez A, Elola C & Pelaz C (2008)

- Persistence of chlorine-sensitive *Legionella pneumophila* in hyperchlorinated installations. *J Appl Microbiol* **105**: 837–847.
- Haikarainen T & Papageorgiou AC (2010) Dps-like proteins: structural and functional insights into a versatile protein family. *Cell Mol Life Sci* **67**: 341–351.
- Halsey TA, Vazquez-Torres A, Gravdahl DJ, Fang FC & Libby SJ (2004) The ferritin-like Dps protein is required for *Salmonella enterica* serovar Typhimurium oxidative stress resistance and virulence. *Infect Immun* **72**: 1155–1158.
- Hand WL, Corwin RW, Steinberg TH & Grossman GD (1984) Uptake of antibiotics by human alveolar macrophages. *Am Rev Respir Dis* **129**: 933–937.
- Horwitz MA (1983) The Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes. *J Exp Med* **158**: 2108–2126.
- Horwitz MA & Maxfield FR (1984) *Legionella pneumophila* inhibits acidification of its phagosome in human monocytes. *J Cell Biol* **99**: 1936–1943.
- Kirby JE, Vogel JP, Andrews HL & Isberg RR (1998) Evidence for pore-forming ability by *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol* **27**: 323–336.
- Lee Hand W & King-Thompson NL (1989) The entry of antibiotics into human monocytes. *J Antimicrob Chemother* **23**: 681–689.
- Livak KJ & Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**: 402–408.
- Luo Y, Henle ES, Chatopadhyaya R, Jin R & Linn S (1994) Detecting DNA damage caused by iron and hydrogen peroxide. *Methods Enzymol* **234**: 51–59.
- Martinez A & Kolter R (1997) Protection of DNA during oxidative stress by the nonspecific DNA-binding protein Dps. *J Bacteriol* **179**: 5188–5194.
- Moffat JF & Tompkins LS (1992) A quantitative model of intracellular growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii*. *Infect Immun* **60**: 296–301.

- Morash MG, Brassinga AK, Warthan M, Gourabathini P, Garduño RA, Goodman SD & Hoffman PS (2009) Reciprocal expression of integration host factor and HU in the developmental cycle and infectivity of *Legionella pneumophila*. *Appl Environ Microbiol* **75**: 1826–1837.
- Nair S & Finkel SE (2004) Dps protects cells against multiple stresses during stationary phase. *J Bacteriol* **186**: 4192–4198.
- Olsen KN, Larsen MH, Gahan CG, Kallipolitis B, Wolf XA, Rea R, Hill C & Ingmer H (2005) The Dps-like protein Fri of *Listeria monocytogenes* promotes stress tolerance and intracellular multiplication in macrophage-like cells. *Microbiology* **151**: 925–933.
- Park M, Yun ST, Hwang SY, Chun CI & Ahn TI (2006) The *dps* gene of symbiotic "*Candidatus* *Legionella jeonii*" in *Amoeba proteus* responds to hydrogen peroxide and phagocytosis. *J Bacteriol* **188**: 7572–7580.
- Rowbotham TJ (1980) Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J Clin Pathol* **33**: 1179–1183.
- Sexton JA, Yeo HJ & Vogel JP (2005) Genetic analysis of the *Legionella pneumophila* DotB ATPase reveals a role in type IV secretion system protein export. *Mol Microbiol* **57**: 70-84.
- Steinert M, Emödy L, Amann R & Hacker J (1997) Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. *Appl Environ Microbiol* **63**: 2047-2053.
- Su M, Cavallo S, Stefanini S, Chiancone E & Chasteen ND (2005) The so-called *Listeria innocua* ferritin is a Dps protein. Iron incorporation, detoxification, and DNA protection properties. *Biochemistry* **44**: 5572–5578.
- Swanson MS & Hammer BK (2000) *Legionella pneumophila* pathogenesis: a fateful journey from amoebae to macrophages. *Annu Rev Microbiol* **54**: 567–613.

- Winn WC Jr (1988) Legionnaires disease: historical perspective. *Clin Microbiol Rev* **1**: 60–81.
- Yamamoto Y, Poole LB, Hantgan RR & Kamio Y (2002) An iron-binding protein, Dpr, from *Streptococcus mutans* prevents iron-dependent hydroxyl radical formation *in vitro*. *J Bacteriol* **184**: 2931–2939.
- Yu MJ, Ren J, Zeng YL, Zhou SN & Lu YJ (2009) The *Legionella pneumophila* Dps homolog is regulated by iron and involved in multiple stress tolerance. *J Basic Microbiol* **49**: 79–86.
- Zhao G, Ceci P, Ilari A, Giangiacomo L, Laue TM, Chiancone E & Chasteen ND (2002) Iron and hydrogen peroxide detoxification properties of DNA-binding protein from starved cells. A ferritin-like DNA-binding protein of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **277**: 27689–27696.

Figure Legends

Fig. 1. Relative expression levels of *dps* during *in vitro* growth. The growth curve of *L. pneumophila* Paris strain during 26 h at 37°C in liquid BYE medium is shown with solid line and squares. Relative expression of *dps* was evaluated after 12, 16, 20 and 26 h by real-time qPCR as detailed in Materials and methods. The fold-changes in expression compared to the 12h timepoint, artificially set to 1, are shown by histograms. Values and error bars represent means and standard deviations for duplicate experiments.

Fig. 2. Involvement of Dps_{lpp} in stress responses. (a) Sensitivity to oxidative stress. Cells from both *dps*⁺ (Paris) and *dps*⁻ (LPP51) *L. pneumophila* strains were collected in exponential or stationary phase and plated on BCYE medium with a disk of Whatmann paper soaked with 5mM H₂O₂. The diameter of the inhibition zone is given in mm, as a measure of sensitivity with the mean and standard deviations for triplicate experiments. Complementation

experiments were performed in the same conditions with each strain carrying either the pLLPA124 plasmid with functional *dps* or the empty pLPPA99 plasmid vector. (b) Sensitivity to nutritional stress. The three *L. pneumophila* strains Paris (diamonds), LPP51 (triangles) and LPP51 + pLPPA124 (circles) were grown for four days in liquid BYE medium. At regular intervals during growth, OD₆₀₀ (hatched lines) and CFU mL⁻¹ (solid lines) were determined for three independent experiments each in triplicate. One representative experiment is shown.

Fig. 3. Intracellular multiplication of *L. pneumophila* in hMDMs (a), U937 (b) and *A. polyphaga* amoebal cells (c). During infection by the Paris (diamonds) and LPP51 (circles) strains, multiplication was quantified by determination of the CFU mL⁻¹ on BCYE plates after lysis of the host cells. An avirulent *dotB* strain (squares, Sexton *et al.*, 2005) is used as negative control. Three independent experiments were performed each in triplicate. Values and error bars represent means and standard deviations for triplicates of one representative experiment.

Fig. 4. Cytotoxicity of *L. pneumophila* Paris and LPP51 to *A. polyphaga* cells (a) and U937 human monocyte-derived macrophages (b). Cells were infected at an MOI of 10 for 1 h with *L. pneumophila* strains Paris and LPP51 and with a *dotB* mutant as a negative control. After 48 h of infection, macrophage viability was assessed by quantifying the reduction of the Alamar blue dye compared to non-infected cell monolayers. The percentage of killed macrophages was deduced. Complementation experiments were performed with each *L. pneumophila* strain Paris and LPP51 bearing either pLPPA99 or pLPPA124. During the infection assays, chloramphenicol was either added to maintain the plasmid or omitted. Two independent experiments were performed in triplicate with error bars representing standard deviations.

Fig. 5. Hemolysis of sRBC by *L. pneumophila*. Infection of sRBC was performed with the three *L. pneumophila* strains Paris, LPP51 and *dotB* mutant as a negative control at an MOI of 50 for 1 hour at 37°C. Haemoglobin release was assessed by spectrophotometric measurements of supernatants at 415nm. Three independent experiments were performed, each in triplicate. Values and error bars represent means and standard deviations for triplicates 3 of one representative experiment.

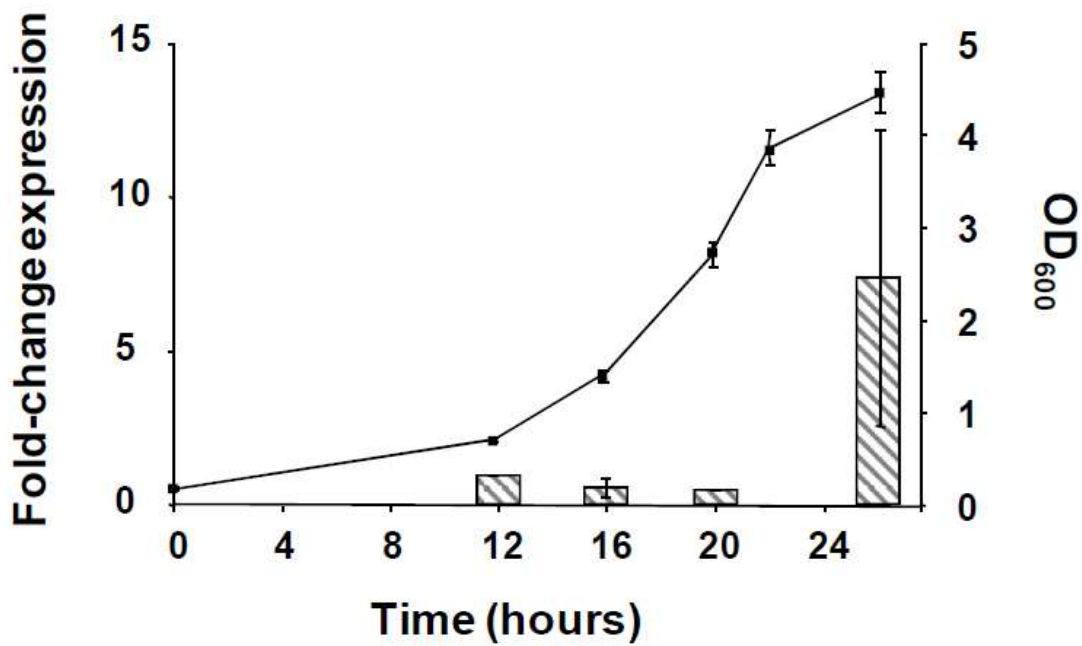


Figure 1

(a)

Strain	H ₂ O ₂ sensitivity (diameter of inhibition zone, mm)	
	Exponential	Stationary
Paris (<i>dps</i> ⁺)	13.75 ± 0.35	0
Paris + pLPPA99	14.25 ± 0.35	0
Paris + pLPPA124	0	0
LPP51 (<i>dps</i> ⁻)	15.2 ± 0.21	14.75 ± 0.35
LPP51 + pLPPA99	15.25 ± 0.35	14.5 ± 0.35
LPP51 + pLPPA124	5.75 ± 0.2	0

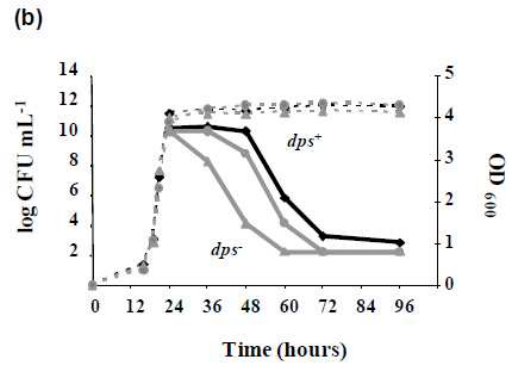


Figure 2

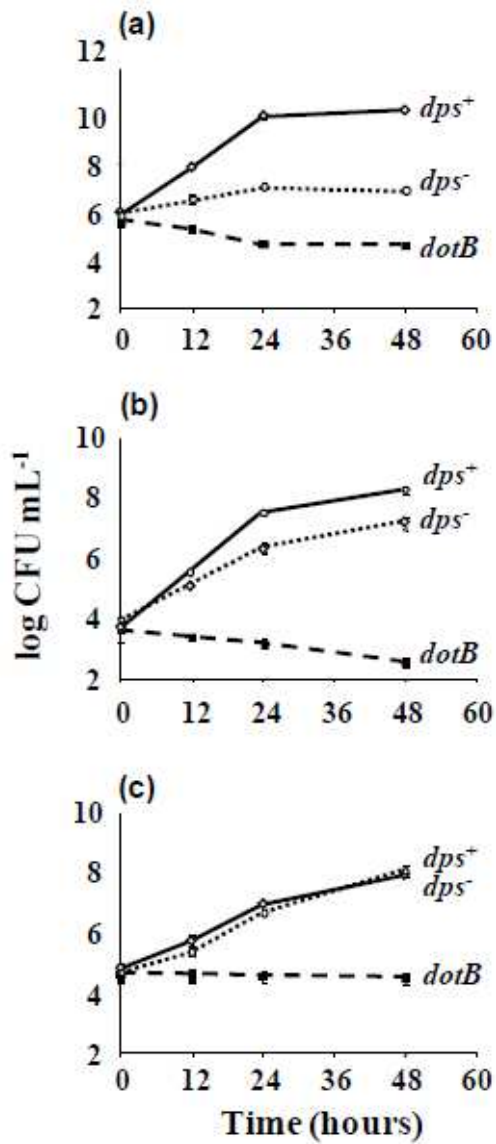


Figure 3

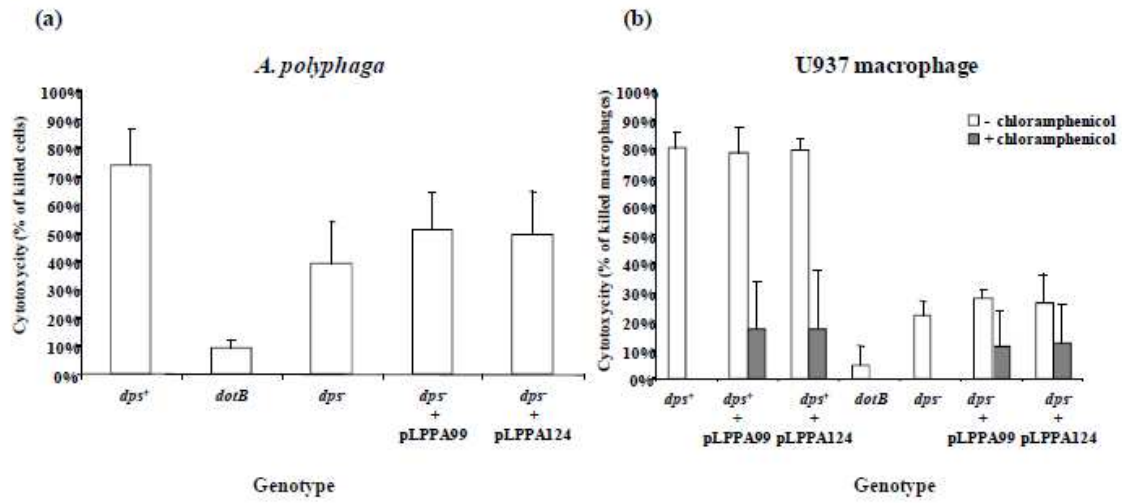


Figure 4

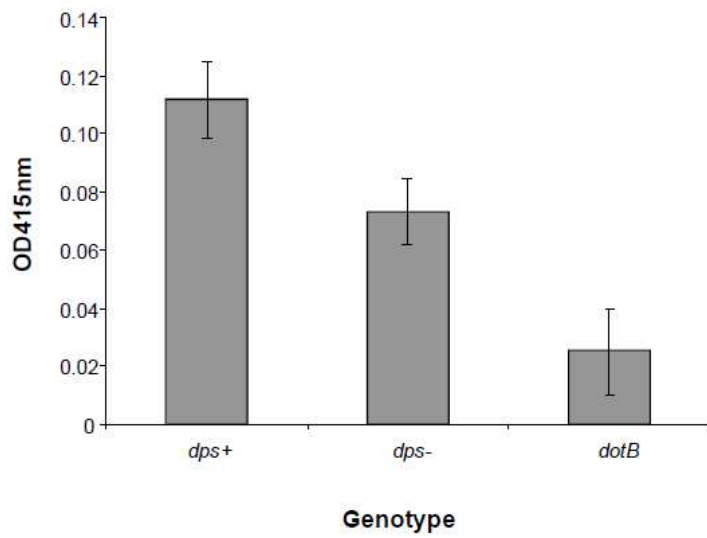


Figure 5

Réponse de l'éditeur de *FEMS Microbiology Letters*

Manuscript ID: FEMSLE-10-05-0523

Title: The Legionella pneumophila Dps-homolog Dpslpp is required both in vitro under stress conditions and in vivo in eukaryotic host cells

Authors: Vergnes, Mike; Molmeret, Maelle; Maurin, Max; Schneider, Dominique; Kay, Elisabeth

Submitted to: FEMS Microbiology Letters

Submitted date: 26-May-2010

08-Jul-2010

Dear Dr. Kay,

I regret to inform you that, based on points raised by the referee(s), I am unable to accept the current version of your paper for publication. The comments of the referee(s) are at the foot of this email. You may access your "attached" review files from your author center. Select "Manuscripts with Decisions", then "view the decision letter" in the status column.

Although your manuscript cannot be accepted at this time, I believe that the topic of your research is of interest to the journal. You are therefore encouraged to consider a new submission incorporating all of the suggestions of the referees, including as necessary additional data or analysis.

Any such submission would be considered a completely new manuscript, with a new receipt date, and subject to the full peer review process, not necessarily involving the same referees. When uploading the new manuscript, please answer 'Yes' to the question 'Has this manuscript been submitted previously to this journal?'.

Please include a detailed cover letter indicating how the manuscript has been changed in response to the referees' criticisms and upload this document as a manuscript file with the file designation "Additional File for Review but NOT for Publication". The resubmitted manuscript will then be sent for peer review.

Thank you for submitting your manuscript to FEMS Microbiology Letters.

Sincerely,

Dr. David Clarke

Editor FEMS Microbiology Letters

Commentaires des rapporteurs:

Reviewer: 1

Comments to the Author

The article « The *Legionella pneumophila* Dps-homolog Dpslpp is required both in vitro under stress conditions and in vivo in eukaryotic host cells » by Vergnes and colleagues describes the phenotype of a Dps deletion mutant of *L. pneumophila*. The authors report that a dps mutant is more sensitive to oxidative and nutritional stress and is attenuated for intracellular growth and its cytotoxic potential for human macrophages and amoeba.

The work described here is well done and interesting as it reports on the possible function of dps, a gene not investigated yet in *L. pneumophila*. It is well written and shows the implication of the encoded protein in stress response and intracellular growth.

My only concern is the complementation.

- There is no complementation shown for the intracellular growth in hMDMs, U937 and *A. polyphaga* infection assays (Figure 3)
- The complementation of the cytotoxicity of the mutant is a little confusing; I can well understand that the plasmid and the growth under antibiotic presence retards the growth, however I don't understand why the strain carrying the empty plasmid and growing with chloramphenicol cannot be complemented for the cytotoxicity phenotype?? The wt carrying the empty plasmid and the complemented one are both having the same plasmid and are growing with the same antibiotic, thus the cost of the plasmid and antibiotic should be the same?

Reviewer: 2

Comments to the Author

The paper by Vergnes *et al.* documents an analysis of the dps gene of *Legionella pneumophila*, an amoebae-resistant opportunistic human pathogen. Dps (DNA-binding protein from starved cells) is a ferritin-like iron-binding protein implicated in the protection against oxidative stress. The authors report that in *L. pneumophila* strain Paris the dps gene is expressed in stationary growth phase, a mutant strain lacking dps is more sensitive towards oxidative stress, and the defect is complemented by supplying the gene on a plasmid. Moreover, *L. pneumophila* lacking dps shows a growth defect in primary macrophages and macrophage-like cells, but not in *Acanthamoeba polyphaga*; yet, the mutant strain exhibits reduced long-term cytotoxicity against macrophages as well as amoebae. Finally, the dps mutant strain is impaired for hemolysis of erythrocytes.

The study contributes to our knowledge about the genetic background of stress resistance of *L. pneumophila*. However, a number of points should be addressed to render the work more compelling and complete.

Major points:

1) It is somewhat odd that the lack of dps causes a replication phenotype in macrophages but not in amoebae, while in absence of dps long-term cytotoxicity was impaired in macrophages as well as in amoebae. This observation should be documented in more detail, as already proposed by the authors (p.13, l.6).

Cytotoxicity should be determined at early time points (30-60 min post infection; “immediate cytotoxicity”) and not only at 48 h post infection, where replication-dependent cytotoxicity probably accounts for most of the toxic effect.

2) The increased sensitivity towards oxidative stress of the dps mutant strain was complemented by supplying the gene on a plasmid. In contrast, none of the cellular phenotypes was even partially complemented, and the

authors speculate about the possible costs for the bacteria carrying the complementation plasmid during the infection. To further address this question, complementation should be assayed in short-term cellular assays, such as “immediate cytotoxicity” and hemolysis (Fig. 5).

3) To lyse infected amoebae, 0.05% “Triton W-100” was used. Should this read Triton X-100? In any case, it should be tested and documented, whether at the concentration used the detergent affects the viability of *L. pneumophila*.

Minor points:

1) Fig. 2a should be shown as a separate Table.

2) Fig. 2b was done in triplicate; the error bars should be shown.

3) Fig. 3: Is the dotB mutant strain used as a negative control a derivative of *L. pneumophila* strain Philadelphia or strain Paris?

4) p.11, l.4: More precisely, the *dps* gene is required for “long-term persistence” (rather than “long-term starvation”). Similarly (p.14, l.20; p.19, l.23): “persistence”, rather than “nutritional stresses”.

5) p.12, l.4: “At all timepoints (12, 24, and 48 h.....)”

6) p.12, l.22: Hemolysis is reduced approximately 33% (rather than “two-fold”)

7) p.19, l.13: “...12 h timepoint, arbitrarily set to 1, ...”

Expériences et réponses prévues :

La plupart des remarques des rapporteurs peuvent être prises en compte au niveau de changements de texte. Cependant, une expérience supplémentaire est demandée (rapporteur 2, points majeurs 2 et 3). Afin de répondre à cette requête, des mesures de cytotoxicité sur des lignées de macrophages et des cellules amibiennes sont réalisées pendant des temps d'infection plus courts, à 30 et 60 min post-infection. (Les mesures réalisées auparavant avaient été faites après 48h d'infection). Ces expériences seront réalisées en utilisant la souche de référence *L. pneumophila* Paris, le mutant délété du gène *dps*, le mutant complémenté par un vecteur portant le gène *dps* sous son propre promoteur et, afin d'apporter encore des informations supplémentaires concernant les expériences de complémentation, le mutant complémenté avec un autre vecteur portant le gène *dps* cette fois sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'IPTG.

Les résultats de ces expériences devraient permettre d'apporter les réponses nécessaires aux remarques majeures des rapporteurs, les autres commentaires pouvant être pris en compte par des changements au niveau du texte du manuscrit.

Chapitre 3 : Rôles de la protéine IHF chez *L. pneumophila*

Les protéines de type histone influencent l'expression globale des gènes chez les organismes bactériens (Jeong *et al.*, 2010; Dillon & Dorman, 2010). La protéine IHF est une des protéines de type histone majeures chez les bactéries. Il s'agit d'une protéine hétérodimérique formée de deux sous-unités α et β , codée par les gènes *himA* et *himD*, respectivement. Elle se lie à l'ADN de manière spécifique sur une séquence consensus de 13 pb (Goodman *et al.*, 1999) et régule l'expression de plusieurs centaines de gènes chez les bactéries (Arfin *et al.*, 2000; Mangan *et al.*, 2006). En particulier, IHF contrôle des gènes de virulence chez différentes bactéries pathogènes, comme *Brucella abortus*, *Vibrio cholerae* et *Salmonella enterica* (Sieira *et al.*, 2004; Stonehouse *et al.*, 2008; Fass & Groisman, 2009).

Une étude récente, publiée au cours de ma thèse, a montré que la protéine IHF de *L. pneumophila* était impliquée dans les phénotypes de virulence (Morash *et al.*, 2009). Cependant, les mécanismes sous-jacents sont totalement inconnus.

Nous avons entrepris une étude du rôle de la protéine IHF sur les processus adaptatifs chez *L. pneumophila* Paris, en particulier sur la sensibilité aux stress nutritionnels et la virulence. Nous avons également recherché les mécanismes mis en jeu. Deux axes ont été poursuivis : l'analyse de la transcription des gènes *himA* et *himD* au cours de la croissance *in vitro* de *L. pneumophila* et la construction, puis l'analyse, de trois souches mutantes pour lesquelles chacun des deux gènes *himA* et *himD*, ainsi que les deux simultanément, ont été délétés. L'influence de la protéine IHF a ainsi pu être analysée en comparant les souches de référence et mutantes, d'une part au niveau cellulaire quant à leur sensibilité aux stress nutritionnels *in vitro* et à leurs propriétés de virulence *in vivo* vis-à-vis de deux types d'hôtes eucaryotes (des cellules de macrophages humaines et des cellules amibiennes), et d'autre part sur l'expression globale des gènes par la détermination des profils globaux de transcription. Enfin, nous avons démontré la fixation de la protéine IHF sur la région promotrice de quelques gènes identifiés comme étant régulés par IHF.

Tout d'abord, nous avons analysé la transcription des gènes *himA* et *himD* au cours de la croissance bactérienne en milieu liquide par des expériences de PCR semi-quantitative. Nous avons ainsi démontré que la transcription de ces deux gènes était accrue lors de l'entrée en phase stationnaire. Afin d'étudier l'effet de la protéine IHF chez *L. pneumophila*, nous avons ensuite construit trois mutants par recombinaison homologue dans le chromosome, chacun des gènes *himA* et *himD* étant remplacé par un gène de résistance à un antibiotique : un mutant délété du gène *himA*, un mutant délété du gène *himD* et un mutant délété des deux gènes simultanément. L'analyse de ces mutants a alors révélé un certain nombre de déficits *in vitro* et *in vivo* par rapport à la souche de référence *L. pneumophila* Paris, les trois mutants se comportant de manière similaire entre eux, ce qui suggère que la protéine IHF est fonctionnelle sous forme hétérodimérique chez *L. pneumophila*.

Après 24 heures de cultures *in vitro* en milieu liquide, c'est-à-dire au moment de l'entrée en phase stationnaire, les mutants présentent une forte baisse de leur capacité à former des colonies sur milieu gélosé. De plus, cette baisse de cultivabilité peut être partiellement restaurée, lorsque les bactéries sont incubées en présence d'amibes. Ces deux propriétés physiologiques sont considérées comme des caractéristiques de l'entrée dans l'état VBNC chez les bactéries du genre *Legionella* (Steinert *et al.*, 1997; García *et al.*, 2007). Nos résultats pourraient ainsi suggérer que IHF serait impliquée dans le contrôle du moment d'entrée dans un état viable mais non cultivable (VBNC). Pour l'instant, les bases génétiques de l'état VBNC sont inconnues.

Des expériences d'infections d'hôtes eucaryotes (macrophages et amibes) *in vivo* nous ont par ailleurs permis de montrer que les mutants IHF présentaient un défaut de multiplication à l'intérieur des macrophages humains (macrophages isolés de sang ou de la lignée U937), mais étaient toujours capables d'infecter les amibes *A. polyphaga*, à un niveau identique à celui de la souche de référence. Malgré cette répllication intracellulaire déficiente

des mutants dans les cellules humaines, aucune différence n'a cependant été observée par rapport à la souche de référence quant aux propriétés de cytotoxicité immédiate et d'hémolyse des mutants. Ces résultats suggèrent ainsi que le système de sécrétion Dot/Icm des mutants est toujours fonctionnel et que la baisse de multiplication intracellulaire dans les cellules humaines est liée à d'autres déterminants de virulence.

La détermination des profils de transcription globale des gènes a été réalisée pour la souche sauvage et le double mutant. Nous avons observé une modification statistique de l'expression de 161 gènes en phase exponentielle et de 27 gènes en phase stationnaire dans le mutant déficient pour IHF. En augmentant la stringence aux gènes dont la transcription est modifiée d'au moins un facteur 2, nous avons observé 33 gènes (27 réprimés et 6 surexprimés) en phase exponentielle et 23 gènes (14 réprimés et 6 surexprimés) en phase stationnaire exprimés de façon différentielle dans le mutant. L'analyse plus détaillée de ces données suggère que la protéine IHF régule l'expression de trois gènes codant des régulateurs globaux majeurs chez *L. pneumophila* : *rpoS*, *csrA* et *rsmZ*. La protéine IHF active l'expression de *rpoS* et *rsmZ*, qui codent le facteur sigma alternatif RpoS et un petit ARN non codant RsmZ, respectivement, tous deux des activateurs de facteurs de virulence (Bachman & Swanson, 2004; Rasis & Segal, 2009; Sahr *et al.*, 2009), et inhibe l'expression de *csrA*, qui code un répresseur des facteurs de virulence et permet la réplique intracellulaire des cellules bactériennes à l'intérieur des cellules de l'hôte (Molofsky & Swanson, 2003). Ces données suggèrent donc que la protéine IHF est importante dans le contrôle du cycle biphasique de *L. pneumophila* lors de l'infection des cellules hôtes, en particulier pour le passage des cellules de *L. pneumophila* de la phase réplique à la phase transmissive virulente. De plus, IHF régule l'expression de gènes impliqués dans la synthèse du système flagellaire. Ce contrôle du cycle infectieux s'exerce par la régulation de la transcription de gènes codant des régulateurs globaux. La protéine IHF fait donc partie du réseau de régulation

contrôlant les phénotypes de virulence chez *L. pneumophila*. Pour confirmer ces résultats, nous avons étudié de façon plus détaillée cinq gènes cibles d'IHF identifiés dans les profils globaux de transcription : *csrA*, *rpoS*, *rsmZ*, *flgA* et *flgB*, ces deux derniers étant impliqués dans la biosynthèse du flagelle.

Dans un premier temps, nous avons confirmé la régulation transcriptionnelle des gènes *csrA*, *rpoS*, *flgA* et *flgB* par IHF par des expériences de RT-PCR. Par ailleurs, nous avons identifié, par des analyses *in silico* par comparaison avec le site consensus de fixation d'IHF (Goodman *et al.*, 1999), un site potentiel de fixation d'IHF dans la région promotrice des gènes *rpoS*, *csrA* et *flgA*, deux sites de fixation dans la région promotrice de *flgB* et huit sites dans la région promotrice de *rsmZ*. De plus, des expériences de retard sur gel nous ont permis de confirmer que la protéine IHF se fixait bien dans la région promotrice de chacun des gènes *rpoS*, *csrA*, *flgA* et *flgB*, sur un seul site pour les trois premiers et sur deux sites pour *flgB*. Ces données suggèrent une régulation directe de la transcription de ces quatre, voire cinq, gènes par la protéine IHF par fixation dans la région promotrice.

L'étude de la protéine IHF de *L. pneumophila* Paris montre ainsi qu'il s'agit d'un régulateur global de l'expression génique, impliqué dans le contrôle de la transition entre phases répllicative et transmissive au cours du cycle infectieux de *L. pneumophila*.

Le manuscrit ci-après sera prochainement soumis à la revue *Journal of Bacteriology*.

The nucleoid-associated protein IHF modulates the transition between physiological states in *Legionella pneumophila*.

Mike Vergnes ^{1,2}, Tobias Sahr ³, Xavier Charpentier ^{1,2}, Carmen Buchrieser ³, Max Maurin ^{1,2,4}, Dominique Schneider ^{1,2} and Elisabeth Kay ^{1,2*}

¹Laboratoire Adaptation et Pathogénie des Microorganismes, Université Joseph Fourier Grenoble, BP 170, F-38042 Grenoble cedex 9, France; ²CNRS UMR5163, F-38042 Grenoble cedex 9; ³Département Génomes et Génétique, Institut Pasteur, Paris, France and CNRS URA 2171, F-75015 Paris, France and ⁴CHU Grenoble, Université Joseph Fourier, BP 217, 38043 Grenoble, France.

Keyword: *Legionella pneumophila*, IHF, starvation, intracellular replication, cytotoxicity, global regulator of virulence, infection cycle.

Running title: *Legionella pneumophila* IHF protein controls virulence gene expression.

Abstract

The nucleoid-associated heterodimeric protein IHF is involved in DNA compaction and global transcription regulation in Gram-negative bacteria. We showed here that mutants deficient for one and/or the other subunit of IHF in the bacterial pathogen *Legionella pneumophila* are impaired in their viability and cultivability in late stationary phase as well as in their intracellular replication in human macrophages. To provide mechanistic insights for these phenotypic changes, we compared the global transcription profiles of an IHF-deficient mutant and its reference strain. Three lines of evidence suggest that IHF is likely to be involved in the control of the transition between the replicative and transmissive phases of the *Legionella* life cycle. First, IHF was found to repress the pivotal mRNA-binding protein CsrA that is known to block the expression of virulence traits, thereby promoting bacterial replication. Second, IHF induces the transcription of the alternative sigma factor RpoS and the small RNA RsmZ, which are major positive regulators of virulence gene expression during the transmissive phase. Third, IHF increases the transcription of flagellar class II genes that are involved in the biosynthesis of the flagellum basal body and hook. Finally, we identified consensus IHF-binding sites in the promoter regions of *csrA*, *rpoS*, *flgA*, *flgB* and *rsmZ* and demonstrated direct binding of purified IHF on several candidate promoter regions by EMSA. Our results suggest that IHF is a key intermediate in the complex regulatory cascade that coordinates the transition to the transmissive (or virulent) phase in *L. pneumophila*.

Introduction

Legionella pneumophila is a Gram-negative facultative intracellular bacterium identified as the major causative agent of Legionnaires' disease, a severe pneumonia that can be fatal if not timely treated with antibiotics (94, 85, 80). This bacterium is ubiquitous in natural and man-made aquatic environments where it survives mainly as an intracellular parasite of protozoa (19, 96). Human infections occur through inhalation of contaminated-water droplets generated from various aerosol-generating devices such as air-conditioners, cooling towers, showerheads, fountains, spas... Despite repeated disinfection treatments using biocides, *Legionella* can persist in these water networks mainly through protective structures associated with three types of living states of the bacterial cells: the exopolysaccharide matrix in biofilm networks, the amoebal cysts or protozoa-released vesicles (25, 39, 16) or the viable but non culturable (VBNC) physiological state in which metabolically active cells can no longer grow on routine laboratory media and that has been shown to be induced under certain stressful conditions, including treatments to disinfect water plumbing systems (51, 22, 37, 7). The VBNC state is reversible and cells can recover their growth abilities after passage in amoebal cells (92, 38). Thus, the association of *Legionella* with protozoa is a major factor of bacterial persistence in the environment. Despite the importance of the VBNC physiological state, its genetic basis is mostly unknown in *Legionella* although it may provide a more efficient control of bacterial dissemination.

In humans, *L. pneumophila* cells are engulfed by alveolar macrophages after reaching the lungs. Once internalized, they escape the typical lysosomal degradation pathway and colonize a specialized vacuole in which the cells multiply exponentially. At the end of the infectious cycle, bacteria kill and exit the infected host cells to colonize new neighboring cells (47, 23, 78). The biogenesis of the specialized *Legionella*-containing vacuole (LCP) requires the Dot/Icm type IV secretion system that allows the delivery of at least 150 effector proteins into

the host cells (89, 99, 18, 52). The intracellular fate of *Legionella* is suggested to be similar in both protozoan and macrophage cells (95), with however unique features that are host-specific (78).

The hallmark of the life cycle of *L. pneumophila* is the alternance between two phenotypically distinct forms that are specific to each of the two phases of the infection cycle: the replicative form during intracellular replication of bacterial cells and the transmissive or virulent form associated with the expression of most virulence traits including flagella synthesis, cell-dependent cytotoxicity, stress resistance, sodium sensitivity, lysosome evasion, cell shortening and pigmentation (95, 72, 17, 52). To precisely coordinate this biphasic life cycle, *Legionella* cells operate a global shift in gene expression that is orchestrated by a complex regulatory network. Several global regulators interact in this network, including on the one hand the global post-transcriptional repressor of transmissive traits CsrA and on the other hand activators of virulence traits like the small alarmone ppGpp, the transcription sigma factor RpoS, the two-component systems LetA/S, CpxR/A, PmrA/B, the small non-coding RNAs RsmY and RsmZ, and the Quorum Sensing-like system LqsS/R (13, 72, 97, 103, 9, 6, 48, 82, 86, 71). The regulatory connections between these regulators control the transition between the replicative and transmissive phases of the infection cycle. During the replicative phase, CsrA blocks the expression of transmissive traits by preventing target mRNAs translation and therefore promotes intracellular replication (73). When nutrients become limiting, the alarmone ppGpp accumulates which inhibits gene expression necessary for bacterial multiplication and stimulates LetA/S and RpoS (12, 42). As a further regulatory step, both regulators induce the transcription of at least the two small non-coding RNAs, RsmY and RsmZ, which in turn sequester CsrA, thereby relieving the repression of the expression of transmission traits (82, 86). This regulatory cascade also controls flagellar biogenesis, the cell-density dependent LqsS/R system and the two-component systems CpxR/A and PmrA/B

that promote the expression of several components and translocated effectors of the Dot/Icm secretion system (36, 97, 103, 9, 6, 82, 86, 3). Although many connected links have been identified in this regulatory network, many regulators and most environmental signals are still unknown. For example, it has recently been shown that histone-like proteins, like IHF (Integration Host Factor), may be involved in the virulence control of *L. pneumophila* (74).

To get insights into the mechanistic details of the relationship between IHF and virulence control in *L. pneumophila*, we investigated the impact of IHF on both phenotypic traits and global gene expression in *L. pneumophila*. The nucleoid-associated protein (NAP) IHF shares the major properties of all bacterial histone-like proteins (31, 28), which play an important role in both chromosomal architecture by binding, bending and condensing DNA molecules (102, 5), and chromosomal gene expression by interfering with RNA polymerase or specific regulators at promoter regions (29, 54, 28). The IHF heterodimeric protein is able to bind both specifically to a consensus asymmetric site on DNA (26, 40) and less specifically to low affinity sites (102), thereby contributing to the transcription control of more than 100 genes in both *E. coli* and *Salmonella* (10, 66). In particular, IHF has been shown to be involved in the regulation of many virulence genes in different bacterial pathogens (45, 62, 91, 66, 93, 34, 74). In the present study, we showed that inactivation of *himA* and/or *himD*, the genes encoding the two IHF subunits, was associated with various phenotypic defects in *L. pneumophila*, including a decrease in cell viability, an impairment of the cell ability to form colonies on *in vitro* solid media which could however be partially recovered after passage in amoebal cells, and a decreased ability to specifically kill macrophages, but not amoebal cells, independently from the Dot/Icm machinery. We also assessed the contribution of IHF to global gene expression by comparing the transcription profiles of the *L. pneumophila* reference and Δ *himAD* mutant strains. Moreover, we identified by computer analysis putative IHF-binding sites on candidate target promoter regions and confirmed experimentally the binding of IHF.

Materials and methods

Bacterial strains and *in vitro* growth conditions

All strains were derived from the *L. pneumophila* serogroup 1 reference strain Paris (CIP 107629T) (Table 1). Bacteria were grown *in vitro* at 37°C either in liquid N-(2-acetamido)-2-aminoethanesulfonic acid (ACES)-buffered (pH 6.9) yeast extract broth (BYE) or on ACES-buffered charcoal yeast extract (BCYE) agar plates. All BYE cultures were inoculated from 3-day old cells plated on BCYE. When needed, media were supplemented with kanamycin (15 µg.mL⁻¹), gentamicin (8 µg.mL⁻¹) or chloramphenicol (10 µg.mL⁻¹).

Culture of eukaryotic cells

The *Acanthamoeba polyphaga* amoebal cells were grown and maintained at 30°C in Peptone Yeast extract Glucose (PYG) medium in 75-cm² tissue culture flasks (69). Prior to infection, amoebal cells were washed twice, resuspended in PYG without glucose (PY) and seeded in a 96-well plate at ~1x10⁵ cells per well. The U937 human monocyte cell line was grown and maintained at 37°C in RPMI 1640 medium supplemented with 10 % heat-inactivated fetal calf serum (FCS) and 2 mM L-glutamine in a humidified atmosphere with 5 % CO₂. Prior to infection, U937 cells (1x10⁵ per well) were differentiated into macrophages with 50 ng.mL⁻¹ phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) for 48 hours (2) and then washed three times in RPMI 1640. Human monocyte-derived macrophages (hMDMs) were prepared from fresh peripheral blood monocytes obtained from healthy donors (Etablissement Français du Sang, Lyon, France) and isolated by Ficoll density gradient. Peripheral blood mononuclear cells were seeded in ultra-low attachment 6-well plate (Corning) at 1x10⁶ cells per well in RPMI 1640 with 10 % FCS and 2 mM L-glutamine, and incubated at 37°C with 5 % CO₂ for 3 days to allow adherence. Cells were then scraped, washed three times in PBS and hMDMs were counted using a hemacytometer before seeding in a 96-well plate at ~1x10⁵ cells per well.

Construction of chromosomal deletion mutants and plasmids for complementation

Mutant strains were constructed by replacing the chromosomal gene *himA* (*lpp2764*) by a gentamicin resistance cassette and *himD* (*lpp3026*) by a kanamycin resistance cassette. We describe here the construction of the *himA* mutant into details, the methodology being similar for the *himD* mutant. The two flanking regions of *himA* (~700 bp on each side) were amplified by PCR with the primer pairs PLP24-PLP25 and PLP26-PLP27 (Table S1) and cloned together into pCRII-Topo (Invitrogen). The two primers PLP25 and PLP26 were designed to each contain a SalI restriction site that, after the cloning steps, separates each of the two *himA* flanking sequence in pCRII-Topo. This results in a plasmid-borne deleted allele of *himA*. The entire insert was then isolated as a SacI-PstI fragment and cloned into the pBluescript-KS (pBS-KS) plasmid vector digested by SacI and PstI. A 0.9-kb gentamicin cassette was then inserted into the SalI site, thereby replacing *himA* and generating the pKS-*himA*::Gm^R plasmid. The same strategy was used to construct the pKS-*himD*::Kan^R plasmid, except with the primer pairs PLP28-PLP29 and PLP30-PLP31 (Table S1), PLP29 and PLP30 being designed to each contain a SalI restriction site, and a 1-kb kanamycin resistance cassette. Both plasmid inserts, each containing the chromosomal flanking regions of *himA* or *himD* together with the corresponding resistance gene, were PCR-amplified with the primer pairs PLP24-PLP27 and PLP28-PLP31, respectively, and the resulting DNA fragments were introduced separately into the *L. pneumophila* Paris strain by natural transformation, as described previously (8). Recombination events into the chromosome, leading to the replacement of *himA* or *himD* by the gentamicin or kanamycin resistance cassette, respectively, were selected by plating the cells onto BCYE plates containing the relevant antibiotic and incubating for 4-5 days at 37°C. The resulting transformants were replica plated and screened for the expected *himA* and *himD* allelic exchanges by PCR amplification with the primer pairs PLP149-PLP150 and PLP151-PLP152, respectively (Table S1). To construct

the *himA::Gm^R himD::Kan^R* double mutant strain (Δ *himAD*), a similar strategy was performed by using the PCR product containing the two flanking regions of *himA* and the gentamicin resistance cassette to transform the *himD::Kan^R* mutant strain. Transformants were selected by plating cells onto BCYE plates containing both antibiotics.

For complementation assays, PCR products containing the ribosome-binding site and the coding sequence of *himA* and *himD* were obtained using the primer pairs PLP179b-PLP180b and PLP181-PLP182 (Table S1), respectively, and cloned separately into the pMMB207C expression plasmid under the control of the inducible promoter *Ptac*, generating plasmids pLPPA121 and pLPPA122, respectively. The *Ptac* promoter was induced by adding 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) in the culture medium.

Prolonged stationary phase culture and resuscitation of bacteria by amoebae

Cultures of *L. pneumophila* were inoculated at $\text{OD}_{600} = 0.05$ in 2 mL of BYE and grown at 37°C with agitation for four days. At regular intervals, the OD_{600} was measured and serial dilutions were plated on BCYE plates to determine the number of cells able to form colonies. To estimate the proportion of bacterial cells that are revived after passage in amoebae, the same serial dilutions were used to infect *A. polyphaga*. Briefly, 1×10^5 amoebal cells per well were mixed with 20 μL of each bacterial dilution and incubated for 5 days at 37°C. Infected amoebal cells were then lysed with 0.05 % Triton X-100 and 5 μL were spread on BCYE plates. After 4 days of incubation at 37°C, the number of *L. pneumophila* colonies was scored. Three independent experiments, each in triplicate, were performed.

Intracellular replication of *L. pneumophila*

Stationary phase cultures of *L. pneumophila* strains grown in BYE were centrifuged and resuspended in serum-free RPMI and PY media for macrophage and amoeba infections, respectively. Amoebal or macrophage cell monolayers were infected using 1×10^6 bacterial cells, corresponding to an MOI of 10. Infections were synchronized by centrifugation for 10

min at 1500 rpm and started by incubating 1 h at 37°C. Cells were then washed three times in serum-free RPMI to remove extracellular bacteria (T_0) and the infection process was allowed to continue at 37°C in RPMI or PY. Intracellular replication of *L. pneumophila* in *A. polyphaga*, hMDMs and U937 cells was determined after 12, 24 and 48 h by quantifying the number of bacterial colony-forming units (CFUs) present both in the supernatant and inside the eukaryotic cells. In this latter case, before plating, the eukaryotic cells were first lysed either hypotonically for macrophages or with 0.05 % Triton X-100 for amoebal cells. Three independent infections were performed for each bacterial strain, each in triplicate.

Hemolytic and cytotoxic effects

The hemolytic activity was determined by mixing *L. pneumophila* cells with $\sim 10^7$ sheep red blood cells (sRBC).mL⁻¹ at an MOI of either 50 or 100. Samples were then centrifuged at 1700 rpm for 5 min, incubated 1 h at 37°C, resuspended by vortexing and centrifuged again at 1700 rpm for 5 min. The absorbance at 415 nm of all supernatants was determined in a microplate reader (Tecan) to quantify the release of haemoglobin. Three independent experiments were performed, each in triplicate.

The immediate cytotoxicity of *L. pneumophila* was quantified using the Alamar Blue reduction assay. Hence, the Alamar Blue dye undergoes a colorimetric modification when exposed to metabolically-active eukaryotic cells. Infections of the U937 cells were performed at an MOI of 100 for one hour at 37°C. Cells were washed three times with RPMI before adding 100 μ L of 10 % (v/v) Alamar blue (Invitrogen) per well. Infected cells were further incubated for 4 h at 37°C to allow the viable eukaryotic cells to convert the Alamar Blue from a blue oxidized state to a red reduced state. Absorbance at 565 nm was measured and corrected for background by the absorbance at 600 nm. Uninfected host cells were treated equally as an internal control. The percentage P of viable macrophages was calculated from

triplicate supernatants as $P = (OD_{565nm} - OD_{600nm})_{infected} / (OD_{565nm} - OD_{600nm})_{uninfected} \times 100$.

Mortality of eukaryotic cells was therefore calculated as $100 - P$.

RNA isolation, labelling, hybridization and microarray analysis

Two independent cultures of each of the two *L. pneumophila* Paris and $\Delta himAD$ mutant strains were grown in BYE liquid medium. Samples were collected in both the exponential growth phase ($OD_{600} < 2$, 14 h of growth) and stationary phase ($OD_{600} > 4$, 20 h of growth). Total RNAs were extracted from all samples as previously described (68). After reverse transcription with the Superscript cDNA Indirect Labelling System (Invitrogen), the cDNAs were labeled with either Cy5 or Cy3 (Amersham Bioscience) according to the supplier's protocol. The cDNA samples from each of the two strains were alternatively labeled with each fluorescent dye (dye swap). For each biological replicate, microarray hybridization experiments were duplicated. The DNA microarray we used contained 70-mer oligonucleotides specific to each of the predicted genes and intergenic regions of the genome of *L. pneumophila* strain Paris and its plasmid CR628338 (17). Hybridization experiments were performed with 250 pmol of Cy5- and Cy3-labeled cDNAs, following the manufacturer's instructions. Slides were scanned on a GenePix 4000A scanner (Axon Instruments) and resulting files were analyzed with the GenePix Pro 4.0 software (Axon Instruments). Spots with high local background fluorescence or weak intensity as well as slide abnormalities were excluded from the analysis. Data normalization and differential analysis were performed as described previously (86), using the R software (<http://www.r-project.org>) and the BioConductor package `marray` (<http://www.bioconductor.org/packages/devel/bioc/html/marray.html>). If not stated otherwise, only differentially expressed genes with a two-fold change between two samples and a *P*-value ≤ 0.001 were taken into consideration.

Real-time semi-quantitative PCR

Real-time qPCR was conducted for determining the transcription level of both *himA* and *himD* during the *in vitro* growth cycle and confirming the global transcription profiles. Two independent cultures of *L. pneumophila* were harvested after 12, 16, 20 and 26 hours of growth in BYE liquid medium at 37°C with agitation and centrifuged at 13,000 g for 2 min. Total RNA was isolated using the RNeasy Mini Kit (Qiagen) and treated with DNase (Roche). The cDNAs were prepared using AMV Reverse Transcriptase (Promega) for 1 h at 42°C with random hexamers as primers. Real-time qPCR experiments were performed in a 25-μL reaction volume containing 1 μg cDNA, 12.5 μL SYBR Green Master Mix (Roche) and 300 nM specific primers (Table S1) using the Real-Time PCR lightcycler 1.5 (Roche). Experiments were repeated twice, generating similar results. The threshold cycle (*CT*), *i.e.* the number of cycles needed for the amplification curve to increase above background noise, was measured and normalized using the 16S rRNA-encoding gene as an internal standard. The relative change in gene expression was calculated as $\Delta\Delta CT = [(CT, him - CT, 16S)_{t=x}] - [(CT, him - CT, 16S)_{t=12h}]$, for both *himA* and *himB* (64).

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Amplicons of ~200 bp, spanning the promoter regions of *csrA*, *flgA*, *flgB*, *rpoA* and *rpoS*, were generated by PCR using the [α -³²P]dCTP-labeled primer pairs PLP244-PLP245, PLP246-PLP247, PLP248-PLP249, PLP250-PLP251 and PLP258-PLP259, respectively (Table S1). All radiolabeled-PCR products were purified with the High Pure PCR product purification kit (Roche) and quantified by measuring the OD_{260nm}. Binding reactions were performed by incubating 0.2 nM of [α -³²P]dCTP-labeled DNA fragments with various amounts (0 to 20 nM) of purified *E. coli* IHF protein in a 20-μL solution containing 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 70 mM KCl, 1 mM dithiothreitol, 5 % glycerol, 50 μg.mL⁻¹ bovine serum albumin (New England BioLabs) and 1.5 mg.mL⁻¹ salmon sperm DNA (Roche). After 30 min of incubation at room temperature, all the reaction mixtures were loaded on native 8 %-

polyacrylamide gels (19:1) in 0.5X Tris-Borate-EDTA buffer and electrophoresed for 2 h at 100V. The gels were then dried, exposed to Fujifilm phosphorimager imaging plates and visualized on an FLA8000 scanner. Binding assays were also carried out in the presence of unlabeled-DNA competitors to determine binding specificity.

Results

Maximal transcription of *himA* and *himD* during stationary phase

The integration host factor IHF is a heterodimeric protein composed of two subunits, α (11 kDa) and β (11.8 kDa), encoded respectively by the genes *himA* and *himD*, denoted *lpp2764* and *lpp3026* in *L. pneumophila* (21). The *L. pneumophila* IHF protein presents 65 % identity and 77 % similarity with the *E. coli* IHF and 99 % identity and 100 % similarity with the IHF protein of *L. pneumophila* Philadelphia Lp02 strain (74).

We measured the relative levels of both the *himA* and *himD* mRNAs over 26 hours of growth in BYE liquid medium by real-time qPCR experiments (Fig. 1). We observed an ~4- and 2-fold increase in the transcription of *himA* and *himD*, respectively, upon transition into stationary phase. As in other bacteria, the transcription of the IHF-encoding genes is therefore induced when *Legionella* cells enter in stationary phase (79, 75, 4, 66).

We next analyzed *in vitro* and *in vivo* phenotypes of three mutant strains, LPP52 (Δ *himA*), LPP53 (Δ *himD*) and LPP54 (Δ *himAD*) compared to the reference Paris strain. It has to be emphasized that all measured phenotypes were identical for all three mutant strains, suggesting that IHF functions as a heterodimer in *L. pneumophila*.

Effect of *L. pneumophila* IHF on cultivability after nutritional stress

Growth of the three mutants LPP52, LPP53, LPP54, as well as of the reference Paris strain, was monitored by following the evolution of the OD_{600nm} of four-day long cultures at 37°C. No differences were observed during the four-day period between the different strains (Fig.

2A). We also measured the ability of the bacterial cells to form colonies after plating serial dilutions of the samples collected through time from each culture on BCYE plates, using two different conditions. Hence, all bacterial diluted samples were either directly plated onto BCYE (Fig. 2A) or after a five-day passage in the amoebal *A. polyphaga* cells (Fig. 2B). In the absence of amoebae, the number of bacterial cells able to form colonies on solid medium reached $\sim 10^{10}$ CFU.mL⁻¹ upon entry into stationary phase and no difference was detected between the reference and mutant strains. The fraction of cultivable cells then dramatically dropped to less than 5×10^3 CFU.mL⁻¹ after four days of growth, *i.e.* after three days of starvation. However, this strong decrease in the ability to form colonies was much faster in the IHF-deficient mutants. Hence, after two days, the number of cultivable cells decreased by more than 10^5 fold in the mutants compared to only ~ 0.2 fold in the reference strain. Overexpression of either *himA* or *himD* by *trans* complementation in LPP54 or LPP55 strains, respectively, restored the phenotypes to almost the values measured for the reference strain (Fig. 2A).

When the above experiments were repeated in the presence of *A. polyphaga*, a 10^3 to 10^4 fold increase of the number of CFU.mL⁻¹ after 48 h of growth in liquid BYE medium was observed for all mutants compared to the absence of amoebal cells (Fig. 2B). Therefore, the passage in amoebal cells partially restored the ability of the starved mutant cells to grow as colonies. However, despite this partial recovery, the mutant cells dropped at the same level as the reference strain after 4 days of culture in liquid medium. The presence of *A. polyphaga* had no effect on the reference strain.

Intracellular growth of *L. pneumophila* IHF-deficient mutants

Human macrophages, including peripheral blood hMDMs and the monocytic cell line U937, and *A. polyphaga* amoebal cells were infected with the reference Paris strain and the LPP54 (Δ *himAD*) mutant. Intracellular bacterial growth was monitored by enumeration of the

CFU.mL⁻¹ both in the culture supernatants and inside the eukaryotic host cells after 0, 12, 24 and 48 hours of infection (Fig. 3). Whereas the reference Paris strain was able to multiply in all three types of host cells with an ~10⁴-fold increase in CFU.mL⁻¹ after 48 hours of infection, the intracellular replication efficiency of LPP54 was strongly host cell-dependent. Hence, the IHF-deficient mutant exhibited only a weak 10²-fold increase in CFU.mL⁻¹ over 48 h of infection in the hMDMs (Fig. 3A). A smaller intracellular multiplication defect was observed for LPP54 in the U937 cell line (Fig. 3B), while LPP54 was fully able to multiply inside the *A. polyphaga* amoebal cells, at the same level than the reference strain (Fig. 3C). Two types of control experiments were performed: first, incubation of both *L. pneumophila* strains in cell-free RPMI over 48h did not allow bacterial multiplication nor did it affect viability (data not shown); second and as expected, the avirulent *dotB* mutant was unable to multiply in all hosts (Fig. 3). Our results showed that the nucleoid-associated protein IHF is required for intracellular multiplication in macrophages, especially in hMDMs, but not in amoebae.

Contact-dependent hemolytic and cytotoxic activities of *L. pneumophila* IHF-deficient mutants

We next determined the hemolytic activity of the five strains Paris, LPP52, LPP53, LPP54 and the *dotB* mutant towards sheep red blood cells (sRBC). All three IHF mutants were as hemolytic as the reference strain (Fig. 4A), while lysis of sRBC was abolished in the *dotB* mutant.

We also quantified the immediate cytotoxicity that is likely to be mediated by pore formation, using U937 macrophages and the same five strains. The proportion of killed macrophages, measured using the Alamar Blue assay, was essentially identical between all strains, except for the *dotB* mutant that was almost inefficient (Fig. 4B). Since both hemolysis and immediate cytotoxicity are entirely dependent upon a functional Dot/Icm secretion system (58, 70), our results confirmed that IHF does not affect the integrity of the type IV secretion machinery.

Global transcription profiles of *L. pneumophila* IHF-deficient mutants

We sought to identify all genes regulated by IHF during *in vitro* mid-exponential growth and early stationary phase using DNA microarrays, by comparing the global transcription profiles of the Δ *himAD* LPP54 mutant and Paris reference strains. Although the transcription of *himA* and *himD* increased at the onset of stationary phase, we observed statistically altered transcription in LPP54 of 161 genes in exponential phase and 27 in stationary phase. When considering a fold change cut-off of at least 2, 33 genes were found to be regulated by IHF (27 down-regulated and 6 up-regulated in the mutant) during exponential phase and 23 (14 down-regulated and 9 up-regulated in the mutant) during stationary phase (Tables 2 and 3). This suggested that the IHF protein was already present and active in exponential phase.

Among the 27 genes that were down-regulated by at least two fold in LPP54 during exponential phase, we found *rsmZ*, encoding a small RNA involved in the regulatory cascade involving RpoS/LetA/CsrA that promotes the expression of transmissible traits (86, 82); 21 genes localized on the 130-kb plasmid of *L. pneumophila* Paris (21), all of them encoding putative conjugative transfer proteins except *plpp0016* that encodes a paralog of CsrA; and two genes encoding proteins homologous to transposases (Table 2). The *rsmZ* gene is the most highly altered one, being down-regulated by almost 6 fold in LPP54. Among the 6 genes that were up-regulated by at least two fold in LPP54 during exponential phase, we found *csrA*, encoding the global repressor of transmissible virulent genes CsrA (73); and a gene encoding a protein from the integrase/recombinase family (Table 2).

Among the 14 genes that were down-regulated by at least two fold in LPP54 during stationary phase, we found 5 flagellar class II genes; two genes encoding ribosomal proteins; *rpoS* encoding the sigma factor RpoS which is one of the most important regulators of the transition into stationary phase *in vitro* and in the transmissible phase *in vivo*; and a gene,

encoding a protein similar to a carboxy-terminal protease CtpA (Table 3). As in exponential phase, the *csrA* gene was found to be up-regulated in LPP54 during stationary phase.

To summarize, two general trends emerged from the global transcription profiles. First, IHF seems to be involved in the transcription modulation of global regulatory genes which control the transition from the replicative to the transmissive phases. Hence, IHF appears to activate *rsmZ* and *rpoS* which encode activators of virulence traits and to repress *csrA* which encodes the repressor of transmissive traits. Moreover, IHF seems to activate some flagellar genes and a *ctpA*-like gene, which is conserved in many bacterial species including *Burkholderia*, *Brucella*, *Ralstonia*, *Bordetella*, *Neisseria* and *Pseudomonas*. At least in *Burkholderia mallei* and *Brucella suis*, a *ctpA* mutant strain showed attenuated virulence towards eukaryotic cells (15, 14). Second, IHF controls a number of genes that either may have been acquired by or may be involved in horizontal gene transfer events.

To confirm the data obtained by global transcription profiling, we analyzed the transcription of a subset of four selected genes (*csrA*, *rpoS*, *flgA* and *flgB*), that were found to be differentially regulated by IHF, by real-time semi-quantitative PCR. We obtained results that were in perfect agreement with the microarray data (Table 4, and compare with Tables 2 and 3). Therefore, both our transcriptomic and RT qPCR data showed that IHF is a pivotal regulator during the switch from the replicative to transmissive phases.

Identification of putative IHF-binding sites in candidate promoter regions

We carried out *in silico* DNA sequence analysis of the promoter regions of the five *csrA*, *rpoS*, *flgA*, *flgB* and *rsmZ* genes to identify putative IHF-binding sites, which may indicate direct regulation. Based on the *E. coli* consensus sequence WATCAANNNTTR (40), we found one putative IHF-binding site in the promoter regions of *csrA*, *rpoS* and *flgA*, two in the *flgB* promoter region (Fig. 5A and B), and eight in the *rsmZ* promoter region (Fig. 5C). The IHF-binding sites were located 75, 86 and 14 bp upstream of the translational start codon of *csrA*,

rpoS and *flgA*, respectively (Fig. 5A). One of the eight IHF-binding sites in the promoter region of *rsmZ* overlapped the previously characterized LetA-binding site (Fig. 5C) (86).

The two putative IHF-binding sites in the promoter region of *flgB* were located at 67 and 107 bp upstream of the ATG translational start codon (Fig. 5A). Moreover, *flgB* is the first structural gene of the *flgBCDEFGHIJKL* cluster of contiguous genes which constitutes the flagellar class II regulon involved in the synthesis of the *L. pneumophila* flagella. Whether these genes are grouped within one (or several) operon(s) has not been determined. However, and in support of an operon structure, our global transcription profiles revealed that all *flgBCDEFGHIJKL* genes were down-regulated in LPP54 during stationary phase (data not shown), although the relative expression changes were below the cut-off we used. Recently, two transcription initiation sites were determined for *flgB* (Fig. 5B), corresponding to RpoD- and RpoN-dependent promoters, respectively (3). The two putative IHF-binding sites that we identified are located on each side of the RpoN-binding region (Fig. 5B). All these data suggest, like for other bacteria, a complex regulation of the *flgBCDEFGHIJK* cluster of genes, involving at least three regulators: RpoN, FleQ (3), and IHF.

Experimental binding of purified IHF to the *csrA*, *rpoS*, *flgA* and *flgB* promoter regions

We performed DNA-binding electrophoretic mobility shift assays (EMSA) with labeled DNA fragments corresponding to each of the four *csrA*, *rpoS*, *flgA* and *flgB* promoter regions and to the *rpoA* promoter as a negative control not regulated by IHF. All fragments were incubated with increasing amounts of the IHF protein purified from *E. coli*, given the structurally and functionally high conservation between IHF proteins from enterobacteriaceae and legionellaceae (74). A shift in electrophoretic mobility was observed for all promoter regions, except *rpoA*, even at the lowest IHF concentration (5 nM) tested (Fig. 5D). One retarded band was seen for *csrA*, *rpoS* and *flgA* while two were apparent for *flgB*, consistent with our above *in silico* predictions (Fig. 5A and B). Binding specificity was checked by using a 250-fold

excess of competitive or non-competitive cold DNA. The first assay reduced the observed IHF binding, while the second assay had no detectable effect (Fig. 5D). These results strongly suggest that IHF directly regulates the transcription of *csrA*, *rpoS*, *flgA* and *flgB* by binding their promoter regions.

Discussion

Based on genomic searches of consensus IHF-binding sites, Morash *et al.* (2009) have recently suggested that ~200 genes may potentially be targets of IHF in *L. pneumophila*, including genes encoding regulators of the transition into stationary phase such as *magA*, *letA*, *letE*, *fleQ* and *rpoS*. Of these 200 genes, they confirmed direct regulation by IHF on one of them, called *magA*, encoding a phenotypic marker of mature intracellular forms in the *L. pneumophila* Philadelphia-1 strain (Morash *et al.* 2009). Here, we investigated further the regulatory role of IHF in the *L. pneumophila* life cycle by comparing the global transcription profiles of isogenic strains except for the presence of IHF. Our results support a model in which IHF would play a central role in the *Legionella* regulatory cascade that coordinates the adaptation to nutritional stress and the expression of virulence traits. In particular, IHF may be involved in the transition between the replicative and transmissive phases of the infection cycle. Moreover, we showed by using *in vitro* and *in vivo* phenotypic experiments that IHF is important for intracellular replication of *L. pneumophila* inside macrophage human cells and adaptation to nutritional stress. Furthermore, since all phenotypes that we measured were identical for mutant strains deleted for one, the other or both genes encoding each of the IHF subunits, we suggest that IHF may function as a heterodimer in *L. pneumophila*, as in other bacteria (67, 84).

We showed that the *L. pneumophila* IHF-deficient mutant lost cultivability much faster than the reference strain after an extended period of nutritional starvation. Such an involvement of IHF in the viability of bacterial cells under long term starvation was already demonstrated in

E. coli (79). Moreover and in contrast to reference cells, a fraction of mutant cells recovered the ability to grow on plates after passage in the amoebal cells *A. polyphaga*. Previous studies described a VBNC-like physiological state in *Legionella* based on two main phenotypic criteria: the loss of the ability of cells, when exposed to various stresses including starvation, to grow as colonies on solid medium and the recovery of this growth ability after passage in amoebal cells (92, 38). Based on these studies and our results, we may suggest that our IHF-deficient mutant may enter into a VBNC-like state, thereby implying IHF as a checkpoint controller of the transition into this type of physiological state.

Our *in vivo* phenotypic experiments revealed that IHF is important for virulence in *L. pneumophila* Paris and that these effects are host cell-specific, thereby confirming and extending what was very recently observed for *L. pneumophila* Lp02, a derivative of the Philadelphia-1 strain (74). However, unexpected differences were detected for the two bacterial strains. Hence, we showed here that IHF-deficient mutants were strongly impaired in their intracellular replication capacities in human macrophages, while they were able to replicate at the same level than the reference *L. pneumophila* Paris strain in amoebal cells of *A. polyphaga*. Therefore, IHF-deficient mutants may be defective for expression of virulence factors that are required for replication in human macrophages but not in amoebal cells (63, 33). In contrast to our results, an IHF-deficient mutant of the *L. pneumophila* Lp02 strain was shown to be impaired for intracellular growth in the amoebal cells of *A. castelanii* but not in human HeLa cells (74). Although we cannot exclude differences due to experimental methodologies, media composition, human and amoebal cell types used in the two studies, genetic or even epigenetic variations either in the regulatory network controlling virulence traits or in the repertoire of IHF gene targets between the two *L. pneumophila* Paris and Philadelphia strains may explain these contrasting results. Such phenotypic and genetic variations have already been observed among strains of *L. pneumophila* (87). Regulatory

differences have also been observed, with for example the accumulation of the *rpoS* transcript that was already detected during exponential phase in the Lp02 strain (13) but during post-exponential phase in the Paris strain and only under *in vitro*, and not *in vivo*, conditions (17). Moreover, RpoS-associated phenotypes may also vary depending of the parental strain (41, 12, 48). As a further example, *L. pneumophila* Lp02 is highly competent for natural transformation at 30°C whereas other *L. pneumophila* serogroup 1 strains, including the Paris strain, are not in these conditions (90). These examples of variability in regulatory pathways are common in bacteria. In *E. coli*, different relative concentrations of the alternative RpoS sigma factor have been measured in different natural isolates that generate variations in metabolic phenotypes (57). Therefore, *L. pneumophila* strains may not be different from other bacteria in having regulatory networks with various levels of plasticity, allowing adaptation to the wide diversity of environments that *Legionella* cells can cope with. Moreover, the global gene repertoire differs by more than 10 % between the two Paris and Philadelphia strains (24, 21, 27).

The comparative global transcription profiles of the IHF-deficient mutant allowed us to identify IHF-regulated genes both in exponential (replicative) and post-exponential (transmissive) phases. They highlighted IHF as a global transcriptional regulator, either directly or indirectly, of more than a hundred genes, including genes specific to the transmissive phase that had lower expression in the IHF-deficient mutant. More specifically, these experiments revealed that IHF controlled the transcription of key regulators of the transition between the replicative and transmissive phases. Therefore, IHF seems to constitute a checkpoint for the transition between the two phases of the infection cycle, by two different ways: first, by repressing the transcription of *csrA* encoding the repressor of transmissive traits and second, by activating the transcription of both *rpoS* and *rsmZ* that encode activators

of transmissive traits. Moreover, IHF induced the transcription of *flgA* and *flgB* involved in flagella biosynthesis.

The *rpoS* gene encodes the transcription sigma factor σ^S which affects the transcription of ~20 % of all predicted ORFs, mostly during post-exponential phase (48). Many virulence-related genes have been shown to be positively regulated by σ^S , including genes that encode Dot/Icm-translocated substrates, the two small RNAs RsmY and RsmZ and the two CpxR/A and PmrA/B two-component systems that directly regulate the synthesis of subsets of Dot/Icm-translocated substrates and other traits related to virulence (36, 13, 6, 48, 82, 86). As we showed direct binding of IHF to the promoter region of *rpoS*, we assume a direct role of IHF in the activation of transcription initiation. To the best of our knowledge, this is the first time that the nucleoid-associated protein IHF has been directly involved in the transcription regulation of *rpoS*. As opposed to other bacteria, transcription regulation of *rpoS* has not been extensively investigated in *L. pneumophila*. Whereas both in *E. coli* and *Pseudomonas* the LetA/S homologues are known to induce *rpoS* transcription (100, 98), it seems not to be the case in *L. pneumophila* (13). In *Pseudomonas*, the PsrA regulator directly binds to- and activates the *rpoS* promoter during stationary phase (59, 60), but no PsrA homolog has yet been identified in *L. pneumophila*. Finally, the nutritional state-sensing alarmone ppGpp may be another relevant candidate to induce *rpoS* transcription in *L. pneumophila*, since an increase in the intracellular ppGpp content results in the stimulation of RpoS-dependent virulence traits (12, 13). However, the potential underlying mechanism is mostly unknown. In *E. coli*, ppGpp may affect *rpoS* transcription elongation or transcript stability rather than transcription initiation (61). Thus, IHF appears to be the sole positive regulator of *rpoS* transcription discovered so far in *L. pneumophila*. However, since the IHF-deficient mutant has no drastic effect on *rpoS* transcription, other regulators of *rpoS* transcription must exist in *Legionella* besides IHF. Surprisingly, the IHF deficiency affected the level of *rpoS* transcript

but not of all RpoS target genes. This suggests that the IHF control on *rpoS* transcription is likely not an all-or-nothing process and may be partially compensated by other regulatory levels. Indeed, *rpoS* mRNA levels do not necessarily reflect the σ^S protein levels since diverse regulatory mechanisms are known to act on either its translation or proteolysis (43, 77). Hence, although the *rpoS* transcript level is lower in the IHF-deficient mutant compared to the reference strain, the amount of protein could be similar in both strains in stationary phase. Alternatively, the effect of IHF on *rpoS* transcription might be translated into the protein level only for a short period that we missed at the time of RNA extraction for determination of the global transcription profiles. Further precise investigations are needed to confirm these hypotheses.

Our results also revealed that IHF was a transcriptional activator of the small non-coding RNA RsmZ. As a further confirmation, we identified *in silico* eight putative IHF-binding sites in the *rsmZ* promoter region, although we did not check IHF binding experimentally. Moreover, regulation of small RNAs by IHF has recently been suggested in *Pseudomonas fluorescens* (50), although whether IHF induces or represses *rsmZ* expression in this bacterium was not investigated. The regulatory role of IHF on *rsmZ* expression in *L. pneumophila* will be addressed in our future work.

The positive regulatory connection that we found between IHF and *flgB* were confirmed by real-time qPCR experiments and was shown to be direct as IHF was able to bind to the *flgA* and *flgB* promoters. Recently, Albert-Weissenberger *et al.* (2010) demonstrated that both the enhancer-binding protein FleQ and the transcription sigma factor RpoN (σ^{54}) promote the expression of flagellar class II genes. Our results therefore suggest that maximal expression of these genes requires at least a third regulator, IHF. Previous studies reported that IHF is able to participate in σ^{54} -mediated transcription (46, 88, 20, 32, 83), including on both the *nifH* promoter in *Klebsiella pneumoniae* and the *Pu* promoter in *Pseudomonas putida*, the latter

one revealing a typical tripartite interaction between the specific enhancer-binding protein XylR, the σ^{54} -RNAP holoenzyme and IHF. Hence, the XylR protein binds to its cognate upstream activating sequence (UAS) while IHF, by binding to its specific site located between the UAS and the σ^{54} -dependent promoter, induces DNA looping that both facilitates the interaction between XylR and RNAP and leads to transcription initiation (65, 1, 20, 101). As in other bacteria, the *L. pneumophila* FleQ serves as a cognate activator of σ^{54} -dependent promoters of flagellar genes (11, 56, 53, 49, 81, 3). Therefore, FleQ and IHF may operate similarly for the σ^{54} -mediated transcription of flagellar genes.

Besides the genes encoding global regulators and proteins involved in the synthesis of the flagellar machinery, the transcription profiles revealed that IHF activated 21 genes carried on the 130 kb-plasmid present in *L. pneumophila* Paris (21). These genes encoded *tra*-like proteins probably involved in the assembly of a conjugative transfer apparatus required for plasmid transfer. Therefore, the IHF-deficient strains may be impaired for the conjugative transfer of this plasmid and experiments will investigate this hypothesis in our future work. These regulatory connections may further emphasize a role of IHF in the control of genes that either were acquired by, or are known to be involved in horizontal gene transfer, as was demonstrated for other nucleoid-associated proteins in enterobacteria (76, 30). This would be particularly relevant in *Legionella*, since horizontal gene transfer played an important role in the evolution of these bacterial pathogens (44, 35, 55).

Overall, we highlighted a key role for IHF in the adaptation of *L. pneumophila* to nutritional stress and in the transition between different physiological states, including the changes from the replicative to the transmissive phases during the infection process. To perform these functions, IHF interferes with the regulatory network that controls the virulence traits in *L. pneumophila* with opposing effects on both a global repressor of transmissive traits and two global activators of these traits. Despite remarkable progress in recent years in resolving the

regulatory network of virulence of *L. pneumophila*, the cellular or environmental signals as well as links between all the regulators discovered so far remain unclear.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the French Centre National de la Recherche Scientifique, “Bonus Qualité Recherche” of University Joseph Fourier Grenoble (to DS) and from the Finovi foundation (to DS and EK). MV thanks the French Ministry of Education and Research for a PhD fellowship and the University Joseph Fourier Grenoble for an ATER funding. We thank Steven D. Goodman for providing us with the *E. coli* purified IHF protein.

References

1. **Abril M. A., M. Buck, et J. L. Ramos.** 1991. Activation of the *Pseudomonas* TOL plasmid upper pathway operon. Identification of binding sites for the positive regulator XylR and for integration host factor protein. *J. Biol. Chem* **266**:15832-15838.
2. **Abu Kwaik Y., B. I. Eisenstein, et N. C. Engleberg.** 1993. Phenotypic modulation by *Legionella pneumophila* upon infection of macrophages. *Infect. Immun* **61**:1320-1329.
3. **Albert-Weissenberger C., T. Sahr, O. Sismeiro, J. Hacker, K. Heuner, et C. Buchrieser.** 2010. Control of flagellar gene regulation in *Legionella pneumophila* and its relation to growth phase. *J. Bacteriol* **192**:446-455.
4. **Ali Azam T., A. Iwata, A. Nishimura, S. Ueda, et A. Ishihama.** 1999. Growth phase-dependent variation in protein composition of the *Escherichia coli* nucleoid. *J. Bacteriol* **181**:6361-6370.
5. **Ali B. M., R. Amit, I. Braslavsky, A. B. Oppenheim, O. Gileadi, et J. Stavans.** 2001. Compaction of single DNA molecules induced by binding of integration host factor (IHF). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **98**:10658-10663.
6. **Al-Khodor S., S. Kalachikov, I. Morozova, C. T. Price, et Y. Abu Kwaik.** 2009. The

PmrA/PmrB two-component system of *Legionella pneumophila* is a global regulator required for intracellular replication within macrophages and protozoa. *Infect. Immun* **77**:374-386.

7. **Alleron L., N. Merlet, C. Lacombe, et J. Frère.** 2008. Long-term survival of *Legionella pneumophila* in the Viable But Nonculturable State after monochloramine treatment. *Current Microbiology* **57**:497-502.

8. **Almahmoud I., E. Kay, D. Schneider, et M. Maurin.** 2009. Mutational paths towards increased fluoroquinolone resistance in *Legionella pneumophila*. *J. Antimicrob. Chemother* **64**:284-293.

9. **Altman E., et G. Segal.** 2008. The response regulator CpxR directly regulates expression of several *Legionella pneumophila icm/dot* components as well as new translocated substrates. *J. Bacteriol* **190**:1985-1996.

10. **Arfin S. M., A. D. Long, E. T. Ito, L. Toller, M. M. Riehle, E. S. Paegle, et G. W. Hatfield.** 2000. Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12. The effects of integration host factor. *J. Biol. Chem* **275**:29672-29684.

11. **Arora S. K., B. W. Ritchings, E. C. Almira, S. Lory, et R. Ramphal.** 1997. A transcriptional activator, FleQ, regulates mucin adhesion and flagellar gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* in a cascade manner. *J. Bacteriol* **179**:5574-5581.

12. **Bachman M. A., et M. S. Swanson.** 2001. RpoS co-operates with other factors to induce *Legionella pneumophila* virulence in the stationary phase. *Mol. Microbiol* **40**:1201-1214.

13. **Bachman M. A., et M. S. Swanson.** 2004. Genetic evidence that *Legionella pneumophila* RpoS modulates expression of the transmission phenotype in both the exponential phase and the stationary phase. *Infect. Immun* **72**:2468-2476.

14. **Bandara A. B., D. DeShazer, T. J. Inzana, N. Sriranganathan, G. G. Schurig, et S. M. Boyle.** 2008. A disruption of *ctpA* encoding carboxy-terminal protease attenuates *Burkholderia mallei* and induces partial protection in CD1 mice. *Microbial Pathogenesis*

45:207-216.

15. **Bandara A. B., N. Sriranganathan, G. G. Schurig, et S. M. Boyle.** 2005. Carboxyl-terminal protease regulates *Brucella suis* morphology in culture and persistence in macrophages and mice. *J Bacteriol* **187**:5767-5775.
16. **Bouyer S., C. Imbert, M. Rodier, et Y. Héchard.** 2007. Long-term survival of *Legionella pneumophila* associated with *Acanthamoeba castellanii* vesicles. *Environ. Microbiol* **9**:1341-1344.
17. **Brüggemann H., A. Hagman, M. Jules, O. Sismeiro, M. Dillies, C. Gouyette, F. Kunst, M. Steinert, K. Heuner, J. Coppée, et C. Buchrieser.** 2006. Virulence strategies for infecting phagocytes deduced from the *in vivo* transcriptional program of *Legionella pneumophila*. *Cell. Microbiol* **8**:1228-1240.
18. **Burstein D., T. Zusman, E. Degtyar, R. Viner, G. Segal, et T. Pupko.** 2009. Genome-scale identification of *Legionella pneumophila* effectors using a machine learning approach. *PLoS Pathog* **5**:e1000508.
19. **Cargill K. L., B. H. Pyle, R. L. Sauer, et G. A. McFeters.** 1992. Effects of culture conditions and biofilm formation on the iodine susceptibility of *Legionella pneumophila*. *Can. J. Microbiol* **38**:423-429.
20. **Carmona M., F. Claverie-Martin, et B. Magasanik.** 1997. DNA bending and the initiation of transcription at sigma54-dependent bacterial promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **94**:9568-9572.
21. **Cazalet C., C. Rusniok, H. Brüggemann, N. Zidane, A. Magnier, L. Ma, M. Tichit, S. Jarraud, C. Bouchier, F. Vandenesch, F. Kunst, J. Etienne, P. Glaser, et C. Buchrieser.** 2004. Evidence in the *Legionella pneumophila* genome for exploitation of host cell functions and high genome plasticity. *Nat. Genet* **36**:1165-1173.
22. **Chang C., Y. Hwang, W. Cheng, et C. Chang.** 2007. Effects of chlorination and heat

disinfection on long-term starved *Legionella pneumophila* in warm water. J. Appl. Microbiol **102**:1636-1644.

23. **Chen Y., K. Tateda, K. Fujita, T. Ishii, Y. Ishii, S. Kimura, T. Saga, T. Annaka, S. Yamada, L. Zhao, S. Li, A. Azuma, A. Gemma, S. Kudoh, et K. Yamaguchi.** 2010. Sequential changes of *Legionella* antigens and bacterial load in the lungs and urines of a mouse model of pneumonia. Diagn. Microbiol. Infect. Dis **66**:253-260.

24. **Chien M., I. Morozova, S. Shi, H. Sheng, J. Chen, S. M. Gomez, G. Asamani, K. Hill, J. Nuara, M. Feder, J. Rineer, J. J. Greenberg, V. Steshenko, S. H. Park, B. Zhao, E. Teplitskaya, J. R. Edwards, S. Pampou, A. Georghiou, I. Chou, W. Iannuccilli, M. E. Ulz, D. H. Kim, A. Geringer-Sameth, C. Goldsberry, P. Morozov, S. G. Fischer, G. Segal, X. Qu, A. Rzhetsky, P. Zhang, E. Cayanis, P. J. De Jong, J. Ju, S. Kalachikov, H. A. Shuman, et J. J. Russo.** 2004. The genomic sequence of the accidental pathogen *Legionella pneumophila*. Science **305**:1966-1968.

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

26. **Craig N. L., et H. A. Nash.** 1984. *E. coli* integration host factor binds to specific sites in DNA. Cell **39**:707-716.

27. **D'Auria G., N. Jiménez-Hernández, F. Peris-Bondia, A. Moya, et A. Latorre.** 2010. *Legionella pneumophila* pangenome reveals strain-specific virulence factors. BMC Genomics **11**:181.

28. **Dillon S. C., et C. J. Dorman.** 2010. Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression. Nat. Rev. Microbiol **8**:185-195.

29. **Dorman C. J.** 2009. Global regulators and environmental adaptation in Gram-negative pathogens. Clin. Microbiol. Infect **15 Suppl 1**:47-50.

30. **Dorman C. J.** 2007. H-NS, the genome sentinel. Nat. Rev. Microbiol **5**:157-161.

31. **Dorman C. J., et P. Deighan.** 2003. Regulation of gene expression by histone-like proteins in bacteria. *Curr. Opin. Genet. Dev* **13**:179-184.
32. **Dworkin J., G. Jovanovic, et P. Model.** 1997. Role of upstream activation sequences and integration host factor in transcriptional activation by the constitutively active prokaryotic enhancer-binding protein PspF. *J. Mol. Biol* **273**:377-388.
33. **Engleberg N. C., C. Carter, D. R. Weber, N. P. Cianciotto, et B. I. Eisenstein.** 1989. DNA sequence of *mip*, a *Legionella pneumophila* gene associated with macrophage infectivity. *Infect. Immun* **57**:1263-1270.
34. **Fass E., et E. A. Groisman.** 2009. Control of *Salmonella* pathogenicity island-2 gene expression. *Curr. Opin. Microbiol* **12**:199-204.
35. **de Felipe K. S., R. T. Glover, X. Charpentier, O. R. Anderson, M. Reyes, C. D. Pericone, et H. A. Shuman.** 2008. *Legionella* eukaryotic-like type IV substrates interfere with organelle trafficking. *PLoS Pathog* **4**:e1000117.
36. **Gal-Mor O., et G. Segal.** 2003. Identification of CpxR as a positive regulator of *icm* and *dot* virulence genes of *Legionella pneumophila*. *J. Bacteriol* **185**:4908-4919.
37. **García M. T., B. Baladrón, V. Gil, M. L. Tarancon, A. Vilasau, A. Ibañez, C. Elola, et C. Pelaz.** 2008. Persistence of chlorine-sensitive *Legionella pneumophila* in hyperchlorinated installations. *J. Appl. Microbiol* **105**:837-847.
38. **García M. T., S. Jones, C. Pelaz, R. D. Millar, et Y. Abu Kwaik.** 2007. *Acanthamoeba polyphaga* resuscitates viable non-culturable *Legionella pneumophila* after disinfection. *Environ. Microbiol* **9**:1267-1277.
39. **Garduño R. A., E. Garduño, M. Hiltz, et P. S. Hoffman.** 2002. Intracellular growth of *Legionella pneumophila* gives rise to a differentiated form dissimilar to stationary-phase forms. *Infect. Immun* **70**:6273-6283.
40. **Goodman S. D., N. J. Velten, Q. Gao, S. Robinson, et A. M. Segall.** 1999. *In Vitro*

Selection of Integration Host Factor Binding Sites. J Bacteriol **181**:3246-3255.

41. **Hales L. M., et H. A. Shuman.** 1999. The *Legionella pneumophila rpoS* gene is required for growth within *Acanthamoeba castellanii*. J. Bacteriol **181**:4879-4889.

42. **Hammer B. K., E. S. Tateda, et M. S. Swanson.** 2002. A two-component regulator induces the transmission phenotype of stationary-phase *Legionella pneumophila*. Mol. Microbiol **44**:107-118.

43. **Hengge R.** 2009. Proteolysis of sigmaS (RpoS) and the general stress response in *Escherichia coli*. Res. Microbiol **160**:667-676.

44. **Heuner K., M. Steinert, R. Marre, et J. Hacker.** 2002. Genomic structure and evolution of *Legionella* species. Curr. Top. Microbiol. Immunol **264**:61-78.

45. **Hill S. A., D. S. Samuels, C. Nielsen, S. W. Knight, F. Pagotto, et J. A. R. Dillon.** 2002. Integration host factor interactions with *Neisseria* gene sequences: correlation between predicted binding sites and in vitro binding of *Neisseria* -derived IHF protein. Mol. Cell. Probes **16**:153-158.

46. **Hoover T. R., E. Santero, S. Porter, et S. Kustu.** 1990. The integration host factor stimulates interaction of RNA polymerase with NIFA, the transcriptional activator for nitrogen fixation operons. Cell **63**:11-22.

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

48. **Hovel-Miner G., S. Pampou, S. P. Faucher, M. Clarke, I. Morozova, P. Morozov, J. J. Russo, H. A. Shuman, et S. Kalachikov.** 2009. σ S Controls Multiple Pathways Associated with Intracellular Multiplication of *Legionella pneumophila*. J Bacteriol **191**:2461-2473.

49. **Hu R., T. Yang, S. Yang, et Y. Tseng.** 2005. Deduction of upstream sequences of *Xanthomonas campestris* flagellar genes responding to transcription activation by FleQ.

Biochem. Biophys. Res. Commun **335**:1035-1043.

50. **Humair B., N. González, D. Mossialos, C. Reimann, et D. Haas.** 2009. Temperature-responsive sensing regulates biocontrol factor expression in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. ISME J **3**:955-965.

51. **Hussong D., R. R. Colwell, M. O'Brien, E. Weiss, A. D. Pearson, R. M. Weiner, et W. D. Burge.** 1987. Viable *Legionella pneumophila* not detectable by culture on agar media. Nat Biotech **5**:947-950.

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

53. **Jacobi S., R. Schade, et K. Heuner.** 2004. Characterization of the alternative sigma factor sigma⁵⁴ and the transcriptional regulator FleQ of *Legionella pneumophila*, which are both involved in the regulation cascade of flagellar gene expression. J. Bacteriol **186**:2540-2547.

54. **Jeong H. S., S. M. Kim, M. S. Lim, K. S. Kim, et S. H. Choi.** 2010. Direct interaction between quorum-sensing regulator SmcR and RNA polymerase is mediated by integration host factor to activate vvpE encoding elastase in *Vibrio vulnificus*. J. Biol. Chem **285**:9357-9366.

55. **Juhas M., D. W. Crook, et D. W. Hood.** 2008. Type IV secretion systems: tools of bacterial horizontal gene transfer and virulence. Cell. Microbiol **10**:2377-2386.

56. **Jyot J., N. Dasgupta, et R. Ramphal.** 2002. FleQ, the major flagellar gene regulator in *Pseudomonas aeruginosa*, binds to enhancer sites located either upstream or atypically downstream of the RpoN binding site. J. Bacteriol **184**:5251-5260.

57. **King T., A. Ishihama, A. Kori, et T. Ferenci.** 2004. A regulatory trade-off as a source of strain variation in the species *Escherichia coli*. J. Bacteriol **186**:5614-5620.

58. **Kirby J. E., J. P. Vogel, H. L. Andrews, et R. R. Isberg.** 1998. Evidence for pore-

- forming ability by *Legionella pneumophila*. Mol. Microbiol **27**:323-336.
59. **Kojic M., et V. Venturi.** 2001. Regulation of *rpoS* gene expression in *Pseudomonas*: involvement of a TetR family regulator. J. Bacteriol **183**:3712-3720.
60. **Kojic M., C. Aguilar, et V. Venturi.** 2002. TetR family member *psrA* directly binds the *Pseudomonas rpoS* and *psrA* promoters. J. Bacteriol **184**:2324-2330.
61. **Lange R., D. Fischer, et R. Hengge-Aronis.** 1995. Identification of transcriptional start sites and the role of ppGpp in the expression of *rpoS*, the structural gene for the sigma S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. J. Bacteriol **177**:4676-4680.
62. **Li M., I. Rosenshine, S. L. Tung, X. H. Wang, D. Friedberg, C. L. Hew, et K. Y. Leung.** 2004. Comparative proteomic analysis of extracellular proteins of enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* strains and their *ihf* and *ler* mutants. Appl. Environ. Microbiol **70**:5274-5282.
63. **Liu M., G. M. Conover, et R. R. Isberg.** 2008. *Legionella pneumophila* EnhC is required for efficient replication in tumour necrosis factor alpha-stimulated macrophages. Cell. Microbiol **10**:1906-1923.
64. **Livak K. J., et T. D. Schmittgen.** 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. Methods **25**:402-408.
65. **de Lorenzo V., M. Herrero, M. Metzke, et K. N. Timmis.** 1991. An upstream XylR- and IHF-induced nucleoprotein complex regulates the sigma 54-dependent Pu promoter of TOL plasmid. EMBO J **10**:1159-1167.
66. **Mangan M. W., S. Lucchini, V. Danino, T. O. Cróinín, J. C. D. Hinton, et C. J. Dorman.** 2006. The integration host factor (IHF) integrates stationary-phase and virulence gene expression in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. Mol. Microbiol **59**:1831-1847.
67. **Mengeritsky G., D. Goldenberg, I. Mendelson, H. Giladi, et A. B. Oppenheim.** 1993. Genetic and biochemical analysis of the integration host factor of *Escherichia coli*. J. Mol.

Biol **231**:646-657.

68. **Milohanic E., P. Glaser, J. Coppée, L. Frangeul, Y. Vega, J. A. Vázquez-Boland, F. Kunst, P. Cossart, et C. Buchrieser.** 2003. Transcriptome analysis of *Listeria monocytogenes* identifies three groups of genes differently regulated by PrfA. *Mol. Microbiol* **47**:1613-1625.
69. **Moffat J. F., et L. S. Tompkins.** 1992. A quantitative model of intracellular growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii*. *Infect. Immun* **60**:296-301.
70. **Molmeret M., O. A. T. Alli, S. Zink, A. Flieger, N. P. Cianciotto, et Y. A. Kwaik.** 2002. *icmT* is essential for pore formation-mediated egress of *Legionella pneumophila* from mammalian and protozoan cells. *Infect. Immun* **70**:69-78.
71. **Molmeret M., S. Jones, M. Santic, F. Habyarimana, M. T. G. Esteban, et Y. A. Kwaik.** 2010. Temporal and spatial trigger of post-exponential virulence-associated regulatory cascades by *Legionella pneumophila* after bacterial escape into the host cell cytosol. *Environ. Microbiol* **12**:704-715.
72. **Molofsky A. B., et M. S. Swanson.** 2004. Differentiate to thrive: lessons from the *Legionella pneumophila* life cycle. *Mol. Microbiol* **53**:29-40.
73. **Molofsky A. B., et M. S. Swanson.** 2003. *Legionella pneumophila* CsrA is a pivotal repressor of transmission traits and activator of replication. *Mol. Microbiol* **50**:445-461.
74. **Morash M. G., A. K. C. Brassinga, M. Warthan, P. Gourabathini, R. A. Garduño, S. D. Goodman, et P. S. Hoffman.** 2009. Reciprocal expression of integration host factor and HU in the developmental cycle and infectivity of *Legionella pneumophila*. *Appl. Environ. Microbiol* **75**:1826-1837.
75. **Murtin C., M. Engelhorn, J. Geiselman, et F. Boccard.** 1998. A quantitative UV laser footprinting analysis of the interaction of IHF with specific binding sites: re-evaluation of the effective concentration of IHF in the cell. *J. Mol. Biol* **284**:949-961.

76. **Navarre W. W., S. Porwollik, Y. Wang, M. McClelland, H. Rosen, S. J. Libby, et F. C. Fang.** 2006. Selective silencing of foreign DNA with low GC content by the H-NS protein in *Salmonella*. *Science* **313**:236-238.
77. **Navarro Llorens J. M., A. Tormo, et E. Martínez-García.** 2010. Stationary phase in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev* **34**:476-495.
78. **Newton H. J., D. K. Y. Ang, I. R. van Driel, et E. L. Hartland.** 2010. Molecular pathogenesis of infections caused by *Legionella pneumophila*. *Clin. Microbiol. Rev* **23**:274-298.
79. **Nyström T.** 1995. Glucose starvation stimolon of *Escherichia coli*: role of integration host factor in starvation survival and growth phase-dependent protein synthesis. *J. Bacteriol* **177**:5707-5710.
80. **Palusińska-Szyszk M., et M. Cendrowska-Pinkosz.** 2009. Pathogenicity of the family Legionellaceae. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* **57**:279-290.
81. **Peña-Sánchez J., S. Poggio, U. Flores-Pérez, A. Osorio, C. Domenzain, G. Dreyfus, et L. Camarena.** 2009. Identification of the binding site of the sigma54 hetero-oligomeric FleQ/FleT activator in the flagellar promoters of *Rhodobacter sphaeroides*. *Microbiology (Reading, Engl.)* **155**:1669-1679.
82. **Rasis M., et G. Segal.** 2009. The LetA-RsmYZ-CsrA regulatory cascade, together with RpoS and PmrA, post-transcriptionally regulates stationary phase activation of *Legionella pneumophila* Icm/Dot effectors. *Mol. Microbiol* **72**:995-1010.
83. **Rego F. G. M., F. O. Pedrosa, L. S. Chubatsu, M. G. Yates, R. Wassem, M. B. R. Steffens, L. U. Rigo, et E. M. Souza.** 2006. The expression of *nifB* gene from *Herbaspirillum seropedicae* is dependent upon the NifA and RpoN proteins. *Can. J. Microbiol* **52**:1199-1207.
84. **Rice P. A., S. Yang, K. Mizuuchi, et H. A. Nash.** 1996. Crystal structure of an IHF-

DNA complex: a protein-induced DNA U-turn. *Cell* **87**:1295-1306.

85. **Roch N., et M. Maurin.** 2005. Antibiotic susceptibilities of *Legionella pneumophila* strain Paris in THP-1 cells as determined by real-time PCR assay. *J. Antimicrob. Chemother* **55**:866-871.

86. **Sahr T., H. Brüggemann, M. Jules, M. Lomma, C. Albert-Weissenberger, C. Cazalet, et C. Buchrieser.** 2009. Two small ncRNAs jointly govern virulence and transmission in *Legionella pneumophila*. *Mol. Microbiol.*

87. **Samrakandi M. M., S. L. G. Cirillo, D. A. Ridenour, L. E. Bermudez, et J. D. Cirillo.** 2002. Genetic and phenotypic differences between *Legionella pneumophila* strains. *J. Clin. Microbiol* **40**:1352-1362.

88. **Santero E., T. R. Hoover, A. K. North, D. K. Berger, S. C. Porter, et S. Kustu.** 1992. Role of integration host factor in stimulating transcription from the sigma 54-dependent *nifH* promoter. *J. Mol. Biol* **227**:602-620.

89. **Segal G., M. Purcell, et H. A. Shuman.** 1998. Host cell killing and bacterial conjugation require overlapping sets of genes within a 22-kb region of the *Legionella pneumophila* genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **95**:1669-1674.

90. **Sexton J. A., et J. P. Vogel.** 2004. Regulation of hypercompetence in *Legionella pneumophila*. *J. Bacteriol* **186**:3814-3825.

91. **Sieira R., D. J. Comerci, L. I. Pietrasanta, et R. A. Ugalde.** 2004. Integration host factor is involved in transcriptional regulation of the *Brucella abortus virB* operon. *Mol. Microbiol* **54**:808-822.

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

93. **Stonehouse E., G. Kovacicova, R. K. Taylor, et K. Skorupski.** 2008. Integration host

factor positively regulates virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. J. Bacteriol **190**:4736-4748.

94. **Stout J. E., et V. L. Yu.** 1997. Legionellosis. N. Engl. J. Med **337**:682-687.

95. **Swanson M. S., et B. K. Hammer.** 2000. *Legionella pneumophila* pathogenesis: a fateful journey from amoebae to macrophages. Annu. Rev. Microbiol. **54**:567-613.

96. **Taylor M., K. Ross, et R. Bentham.** 2009. *Legionella*, Protozoa, and biofilms: interactions within complex microbial systems. Microb Ecol **58**:538-547.

97. **Tiaden A., T. Spirig, S. S. Weber, H. Brüggemann, R. Bosshard, C. Buchrieser, et H. Hilbi.** 2007. The *Legionella pneumophila* response regulator LqsR promotes host cell interactions as an element of the virulence regulatory network controlled by RpoS and LetA. Cell. Microbiol **9**:2903-2920.

98. **Venturi V.** 2003. Control of *rpoS* transcription in *Escherichia coli* and *Pseudomonas*: why so different? Mol. Microbiol **49**:1-9.

99. **Vogel J. P., H. L. Andrews, S. K. Wong, et R. R. Isberg.** 1998. Conjugative Transfer by the Virulence System of *Legionella pneumophila*. Science **279**:873-876.

100. **Whistler C. A., N. A. Corbell, A. Sarniguet, W. Ream, et J. E. Loper.** 1998. The two-component regulators GacS and GacA influence accumulation of the stationary-phase sigma factor sigmaS and the stress response in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. J. Bacteriol **180**:6635-6641.

101. **Xu H., et T. R. Hoover.** 2001. Transcriptional regulation at a distance in bacteria. Curr. Opin. Microbiol **4**:138-144.

102. **Yang S. W., et H. A. Nash.** 1995. Comparison of protein binding to DNA *in vivo* and *in vitro*: defining an effective intracellular target. EMBO J **14**:6292-6300.

103. **Zusman T., G. Aloni, E. Halperin, H. Kotzer, E. Degtyar, M. Feldman, et G. Segal.** 2007. The response regulator PmrA is a major regulator of the *icm/dot* type IV secretion

system in *Legionella pneumophila* and *Coxiella burnetii*. Mol. Microbiol **63**:1508-1523.

Tables

Table 1: Strains and plasmids used in this study

Strain	Description ^a	Reference
Paris	<i>L. pneumophila</i> 1 strain Paris (CIP 107629T)	Cazalet et al., 2004
LPP52	Paris, Δ <i>himA</i> ::Gm ^R	This study
LPP53	Paris, Δ <i>himD</i> ::Kan ^R	This study
LPP54	Paris Δ <i>himA</i> ::Gm ^R Δ <i>himD</i> ::Kan ^R	This study
LPP55	LPP52 bearing pLPPA121	This study
LPP56	LPP53 bearing pLPPA122	This study
Plasmid		
pKSII	Cloning vector, Ap ^R	Stratagene TM
pMMB207C	Expression vector, Δ <i>mobA</i> , <i>Ptac</i> , Cm ^R	Chen et al., 2004
pLPPA121	pMMB207C, <i>himA</i>	This study
pLPPA122	pMMB207C, <i>himD</i>	This study

^aAbbreviations: Gm^R, gentamicin resistance; Kan^R, kanamycin resistance; Ap^R, ampicillin resistance; Cm^R, chloramphenicol resistance.

Table 2: Genes with altered expression in the Δ *himAD* mutant compared to the reference strain during exponential phase

Genes	Description of gene product	FC ^a
Down-regulated in LPP54		
<i>rsmZ</i>	RsmZ small RNA	-5.56
<i>lpp2884</i>	similar to transposase (IS21 family)	-4.17
<i>lpp2885</i>	similar to transposase (IS21 family)	-4.00
<i>lpp2763</i>	similar to putative ferredoxin 2Fe-2S protein	-3.70
<i>lpp0623</i>	unknown	-2.22
<i>lpp2809</i>	unknown	-2.13
<i>plpp0015</i>	unknown	-2.41
<i>plpp0016</i>	weakly similar to carbon storage regulator CsrA	-2.24
<i>plpp0017</i>	similar to <i>E. coli</i> TraT complement resistance protein	-2.09
<i>plpp0018</i>	unknown	-2.63
<i>plpp0022</i>	similar to fimbrial protein precursor (Pilin)	-2.44
<i>plpp0023</i>	weakly similar to conjugative transfer protein TraL	-2.64
<i>plpp0024</i>	weakly similar to conjugative transfer protein TraE	-2.42
<i>plpp0025</i>	weakly similar to conjugative transfer protein TraK	-2.43
<i>plpp0026</i>	weakly similar to conjugative transfer protein TraB	-1.97
<i>plpp0027</i>	unknown	-2.18
<i>plpp0028</i>	weakly similar to conjugative transfer protein TraC	-2.22
<i>plpp0029</i>	weakly similar to TrbI protein	-2.02

<i>plpp0030</i>	weakly similar to conjugative transfer protein TraW	-2.16
<i>plpp0031</i>	similar to conjugative transfer protein TraU	-2.47
<i>plpp0032</i>	weakly similar to conjugative transfer protein TrbC	-2.04
<i>plpp0033</i>	similar to putative conjugative transfer protein TraN	-1.83
<i>plpp0034</i>	similar to putative conjugative transfer protein TraF, putative pilus assembly and biogenesis protein	-2.31
<i>plpp0035</i>	weakly similar to putative conjugative transfer protein TrbB	-2.11
<i>plpp0036</i>	similar to conjugative transfer protein TraH, putative pilus biogenesis protein	-2.01
<i>plpp0037</i>	similar to sex pilus assembly and mating pair protein TraG	-2.07
<i>plpp0038</i>	highly similar to conjugative transfer protein TraD	-2.04
Up-regulated in LPP54		
<i>lpp2122</i>	unknown	2.52
<i>lpp2123</i>	similar to integrase/recombinase proteins	2.46
<i>lpp0257</i>	similar to chitin-binding protein CbpD	2.06
<i>lpp0561</i>	similar to carboxy-terminal protease family protein	1.96
<i>lpp0653</i>	similar to ABC transporter ATP-binding protein	1.96
<i>lpp0845</i>	global regulator CsrA	1.96

^aFold change.

Table 3: Genes with altered expression in the Δ *himAD* mutant compared to the reference strain during stationary phase

Genes	Description of gene product	FC ^a
Down-regulated in LPP54		
<i>lpp2762</i>	50S ribosomal subunit protein L13	-6.67
<i>lpp2761</i>	30S ribosomal subunit protein S9	-4.00
<i>lpp0954</i>	unknown	-3.70
<i>lpp3023</i>	unknown	-3.33
<i>lpp0953</i>	similar to kynurenine 3-monooxygenase	-2.94
<i>lpp1247</i>	RNA polymerase sigma factor RpoS	-2.56
<i>lpp0493</i>	similar to cold shock-like protein CspD	-2.44
<i>lpp0934</i>	unknown	-2.44
<i>lpp0561</i>	similar to carboxy-terminal protease family protein	-2.44
<i>lpp0970</i>	flagellar basal body P-ring biosynthesis protein FlgA	-3.03
<i>lpp1224</i>	flagellar basal-body rod protein FlgB	-2.50
<i>lpp1227</i>	flagellar hook protein FlgE	-2.50
<i>lpp1229</i>	flagellar biosynthesis protein FlgG	-2.70
<i>lpp1230</i>	flagellar L-ring protein precursor FlgH	-2.50
Up-regulated in LPP54		
<i>lpp0677</i>	similar to hypothetical protein - predicted membrane protein	4.88
<i>lpp0845</i>	global regulator CsrA	4.55
<i>lpp0788</i>	unknown	4.00
<i>lpp2719</i>	similar to dienelactone hydrolase family protein	3.35
<i>lpp1207</i>	similar to cold shock proteins	2.91
<i>lpp0257</i>	similar to chitin-binding protein CbpD	2.90

<i>lpp2263</i>	putative transmembrane protein	2.79
<i>lpp2164</i>	similar to hemin-binding protein Hbp	2.44
<i>lpp2478</i>	unknown	2.34

^aFold change.

Table 4: Relative changes in gene transcription for four selected genes as measured by real time qPCR in Δ *himA*, Δ *himD* and Δ *himAD* mutants compared to the reference strain

Strain	Growth phase ^a	Gene transcription ($2^{\Delta\Delta CT}$) ^b			
		<i>csrA</i>	<i>rpoS</i>	<i>flgA</i>	<i>flgB</i>
Δ <i>himA</i>	E	1.43	0.57	1.41	0.77
	S	7.52	0.21	0.48	0.13
Δ <i>himD</i>	E	1.42	1.23	1.14	1.16
	S	8.57	0.51	0.42	0.59
Δ <i>himAD</i>	E	1.26	1.39	0.91	0.56
	S	4.92	0.36	0.12	0.09

^aE, exponential phase; S, stationary phase.

^bThe relative change in transcription is calculated as explained in the Materials and Methods section.

Table S1: Primers used in this study

		Sequence 5'-3'	
		Forward	Reverse
Primers for construction of chromosomal deletions ^a			
<i>himA</i>	PLP24	ACAGACAACAAACCGCAGTGAAG	PLP25 TGCTTTGCTTAGGTCGACCACGATCATT
<i>himA</i>	PLP26	ATTGAAAAAATAGTCGACTAGTTTGTGTC	PLP27 GCTTGACTTCATTGCCTTTGCAC
<i>himD</i>	PLP28	AATGGCCAATATTGATCACAATACTG	PLP29 CAATGAGTTCGGAGTCGACCATATACTCACC
<i>himD</i>	PLP30	GTTCCTCACTTTTGATGTCGACTAAATTTTATTG	PLP31 TGAGAACTTTCATCGAAGTTTCAATC
<i>himA</i>	PLP149	AAATGCGTGC GGGAATGTGG	PLP150 TGCTTGCCACGTAAACGACG
<i>himD</i>	PLP151	TCGAGATGCAATAGAATATG	PLP152 CCCCAAATATACCTAAGTG
Primers for complementation			
<i>himA</i>	PLP179b	GAGAATTCAATCCTTTTGAGG	PLP180b ACATTGTCCACCCGGTGCT
<i>himD</i>	PLP181	AATACGAATTCAAACGAGGT	PLP182 GGAAAGTCGACAGGGACAAA
Primers for real-time qPCR			
<i>himA</i>	IHFA_F	AACGCACTAAGCAAAGCA	IHFA_R AACCTTCTGGCTTCCAC
<i>himD</i>	IHFB_F	ATTCGTGGCTTTGGCAGT	IHFB_R ATTGACCCGCTCTCGTAA
<i>rpoS</i>	PLP205	TGAAGAAGAGCCAATTAAGG	PLP206 CCAATTTACCCAAGTAAAG
<i>rpoA</i>	PLP207	ACGCCTAAGGTTCTCAAAGT	PLP208 AAATCAACCACATCTTCCTG
<i>flgA</i>	PLP209	GCAAGCACCAGTTTATTTTC	PLP210 TCCAGTGATTGTTTCTCT
<i>flgB</i>	PLP211	GAGATCAGAGGGCATCAGT	PLP212 TTCGAGCAAACCTCGGTAG
<i>csrA</i>	PLP181	ACTCGGCGTATAGGTGAA	PLP182 CGAATCATCAGATTCTT
Primers for EMSA			
<i>csrA</i>	PLP244	GTTTGAGTTTATTGCAG	PLP245 GACTAAAATCTCCCTAAC
<i>flgA</i>	PLP246	CCATGCTCTTTCATTTTC	PLP247 GACATAAACTCCCTTAG

<i>flgB</i>	PLP248	GACACAAATTGTATTTTG	PLP249	GCCATATTTACTCCTGTC
<i>rpoA</i>	PLP250	CTAGTTGCACATAAGGC	PLP251	CAGCTATCTCTCCGAGC
<i>rpoS</i>	PLP258	GGGTTGCCTGGGTATGGT	PLP259	ATGTTTAGCTATGCCTTG

*Sall sites are underlined.

Figure legends

Figure 1: Relative transcription levels of *himA* and *himD* during growth in liquid BYE medium. The solid line represents the growth curve of the *L. pneumophila* Paris strain during 26 hours at 37°C. The relative transcription levels of *himA* (white) and *himD* (grey) were measured after 12, 16, 20 and 26 hours of growth by real-time qPCR experiments as detailed in Materials and Methods. The transcription fold-changes are given as histograms relative to the 12h-timepoint, artificially set to 1. Values and error bars represent means and standard deviations for duplicate experiments.

Figure 2: Growth capacities of IHF-deficient mutants compared to the reference *L. pneumophila* Paris strain during *in vitro* cultures. A. Sensitivity to nutritional stress. The five *L. pneumophila* strains Paris (closed circles), LPP52 (closed squares), LPP53 (closed diamonds), LPP55 (open squares) and LPP56 (open diamonds) were grown for four days in liquid BYE medium at 37°C. Growth was monitored both by measuring the OD_{600nm} (solid lines) and by scoring the CFU.mL⁻¹ (hatched lines) after plating dilutions of culture samples on BCYE plates. For clarity, the growth of the LPP54 strain is not shown but is similar to LPP52 and LPP53. B. Effect of amoebal cells on the growth of *Legionella*. Bacterial cell counts after 5 days with *A. polyphaga* are shown with solid lines for LPP52 (squares), LPP53 (diamonds) and LPP54 (triangles). The hatched lines represent CFU.mL⁻¹ in the absence of amoebal cells and correspond to the data shown in A.

Figure 3: Intracellular multiplication of *L. pneumophila* in hMDMs (A), U937 (B) and *A. polyphaga* (C). Host cells were infected at an MOI of 10 and multiplication of *L. pneumophila* Paris (diamonds) and LPP54 (Δ *himAD*, circles) was quantified by scoring the number of CFU.mL⁻¹ by plating on BCYE plates after lysis of the host cells. An avirulent *dotB* Paris mutant strain (squares, Sexton *et al.*, 2005) was used as negative control. Three independent experiments were performed, each in triplicate. Values and error bars represent means and standard deviations for triplicates of one representative experiment.

Figure 4: Hemolytic and cytotoxic activities of IHF-deficient mutants compared to the reference *L. pneumophila* strain. A. Hemolysis of sRBC by *L. pneumophila*. Infections of sRBC were performed at an MOI of 50 for 1 hour at 37°C. Haemoglobin release by lysed sRBC was assessed by spectrophotometric measurements of supernatants at 415nm. Three independent experiments were performed, each in triplicate. Values and error bars represent means and standard deviations for triplicate of one representative experiment. B. Cytotoxicity of *L. pneumophila* Paris, LPP52, LPP53, LPP54 and *dotB* mutant strains towards U937 human monocyte-derived macrophages. Infections of U937 were performed at an MOI of 100 for 1 h at 37°C. Macrophage viability was assessed by quantifying the reduction of the Alamar Blue dye compared to non-infected cell monolayers. Two independent experiments were performed, each in triplicate. Values and error bars represent means and standard deviations for triplicate of one representative experiment.

Figure 5: A. *In silico* and experimental investigations of the promoter regions of *csrA*, *rpoS*, *flgA*, *flgB* and *rsmZ* for the presence of IHF-binding sites. A. *In silico* analysis by comparison to the *E. coli* consensus binding sequence of the promoter regions of *csrA*, *rpoS*, *flgA* and *flgB*. The identified putative IHF-binding sites are boxed. Nucleotides identical to the consensus

sequence are indicated by an asterisk. The translation start codons are highlighted in bold. B. Promoter region of the *flgB* gene. The transcription initiation sites (Albert-Weissenberger *et al.*, 2010) are shown with bent arrows. The sigma 70-, RpoN- and IHF-binding sites are indicated by the boxes. The direction of the *flgB* transcription is also shown together with the first three amino-acids of the FlgB protein. C. Promoter region of the *rsmZ* gene. The transcription initiation site is indicated by “+1” and the dashed line above the sequence represents the *rsmZ* RNA. The start and end of the two *rsmZ* adjacent genes, *lpp1663* and *lpp1662*, are shown. The grey box shows the LetA-binding site while the other boxes indicate the eight IHF-binding sites, with the asterisks revealing the nucleotides that match the IHF consensus sequence. D. EMSA with increasing amounts (0, 5, 10 and 20 nM) of the IHF protein purified from *E. coli*, incubated with 0.2 nM of labeled DNA fragments corresponding to each of the promoter regions of *csrA*, *rpoS*, *flgA*, *flgB* and *rpoA* as a negative control. Lanes “+” and “-” correspond to controls of binding specificity: lanes “+” contain, in addition to each labeled fragment and 20 nM of IHF protein, a large excess (50 nM) of cold DNA fragment corresponding to each promoter region; the lane “-” contains 50 nM of cold non specific *rpoA* DNA instead of 50 nM of cold specific DNA.

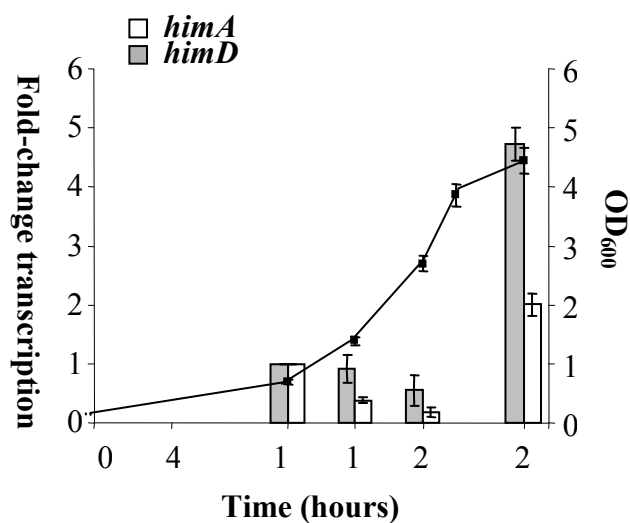


Figure 1.

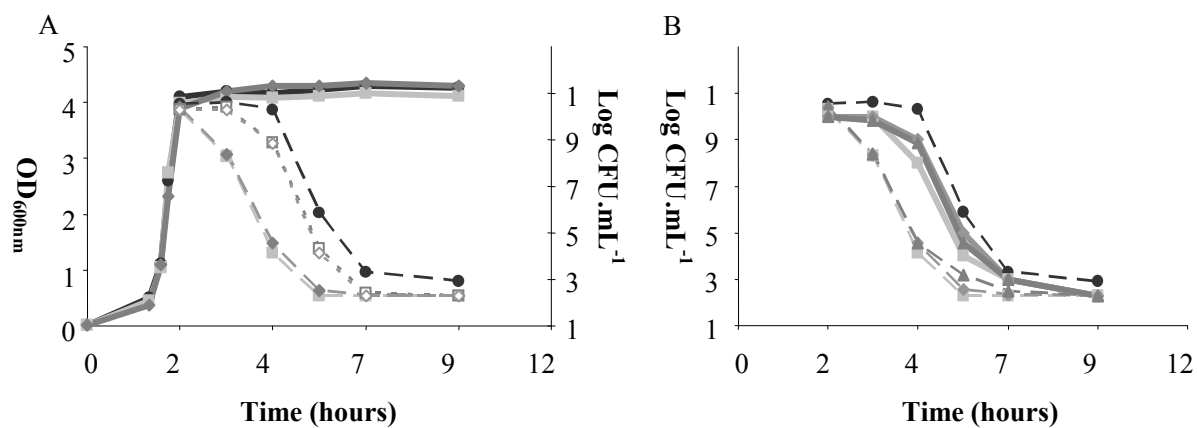


Figure 2.

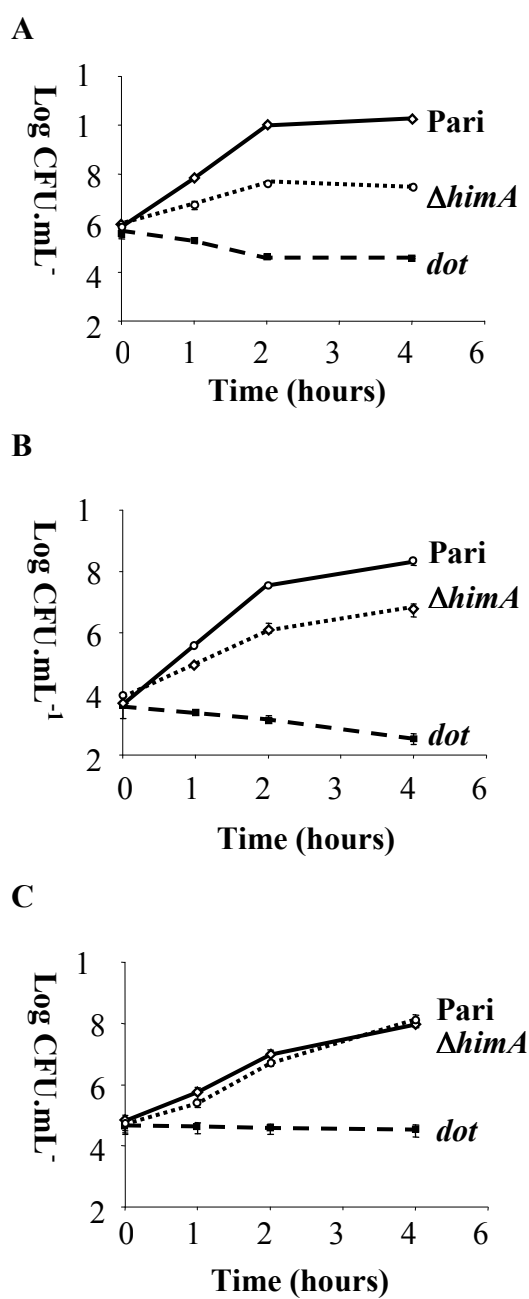


Figure 3.

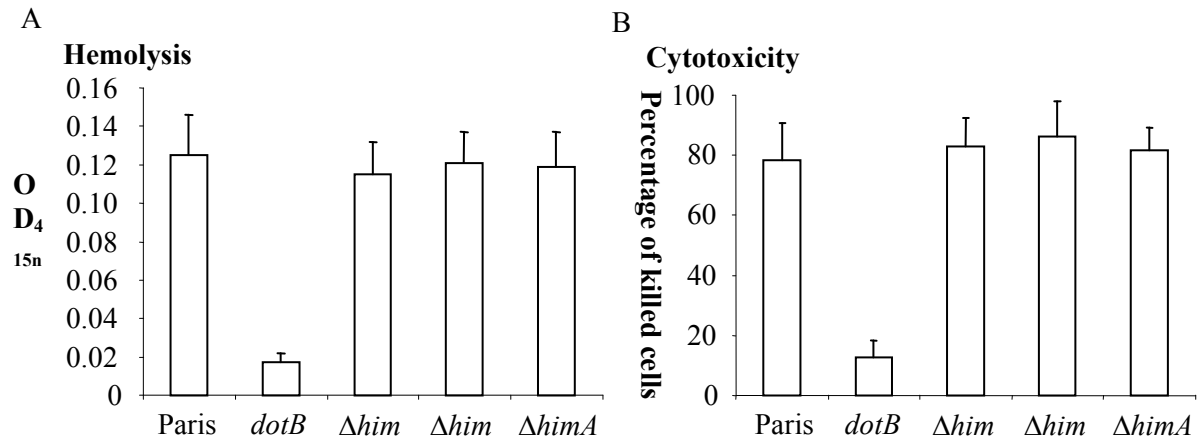


Figure 4.

A

Consensus sequence
 WATCARNNNNTTR

csrA : TTAATAATCAGAGTGTACAAATGT--/65/--TAGTCATGTTGATT

rpoS : TTATCTACAAAAAGGTTGACATA--/76/--ATACAATGCAAGAT

flgA : TAAAAAATCAATAGACTAAGGGAGTTTATGTCGTGAAAAAG

flgB : TTTTTTATCATTTTTATGTTTCA--/17/--GTATGAATCCATATAGTCTTTG--/56/--TAAAAATG GCCATT

B

Sigma 70-binding site →

AGGGAATTAGCGCTTGGATGTTTCATTTTCTCATTTTTGGATAATGGCACAATGTTTGCTTTGTTTAAATAGCA

IHF-binding site 1 IHF-binding site 2 →

TTTTTTTATCATTTTTATGTTTCAGTGAAGTTGGAAACAAGTATGAAATCCATATAGTCTTTGGAAAATTGGCA

RpoN-binding site

TAAATGTCAAATGATGATTAAGACTTAAATAACAATAAGACAGGAGTAAAT ATG GCC AAG

M K K

→ *flgB*

C

lpp1663

TAATCATACCCCGCTACATTTTCATCGTAAATAAACTACCATATCTTATGACATAATCAAGCAGCATATTGCTC

M

LetA-binding site

TAAAAGATAAATGACGTATTTAGCTGTAATTGAATGAAAGAAATTTCTCAATGCCATAGSAAGAAATTATTCTG

TTTACCTGACAATAATTCTTACACAGTTATGTAACATAATTGATTATTATAAAATAAATAATAAGGCTATTTCT

GAGTTGAAAAATAGTATTGAGTGAAAATGTGATTAGCACCTTGCCTTCCCCCATTCGAATTGCTAAATTTAATC

+1 *rsmZ*

AAGACTTATAIGGATAGAGTCGTGCAAAATGGATTTGCAATTAGATGGATCTGATTTGTCAGGATGACAATAAGA

lpp1662

ACGCAAGTTCTTATACGGATGACTGCGAAAAGCCAGGCTGAGTCCCTGGCTTACTTTTATGCTAC

D

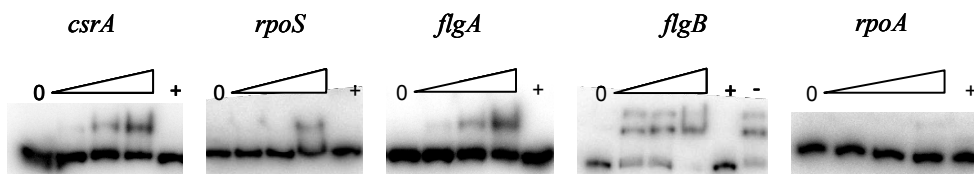


Figure 5.

Chapitre 4 : Utilisation des séquences d'insertion IS comme marqueurs moléculaires

Les bactéries du genre *Legionella* sont ubiquitaires dans les environnements hydriques naturels et colonisent également tous les réseaux d'eau construits par l'Homme, qui peuvent constituer ainsi une source importante d'infections humaines. En cas d'épidémie, il est nécessaire d'avoir des outils permettant une identification rapide et sûre de la souche responsable, afin de traiter le plus rapidement et efficacement possible la source à l'origine de l'épidémie. Ces dernières années, différentes méthodes de typage ont été mises au point : MAb, PFGE, SBT et AFLP (voir chapitre 1 section II.2). Ces méthodes ont permis de regrouper les bactéries du genre *Legionella* en espèces et sérogroupes. Cependant, ces méthodes ont des limites de résolution. D'une part, elles discriminent mal les isolats de la souche *L. pneumophila* Paris entre eux, cette souche étant responsable de nombreux cas de légionellose partout en Europe. D'autre part, la différenciation entre les isolats de l'environnement et les isolats cliniques de *Legionella* issus des patients n'est pas optimale. Pour ces raisons, de nouvelles méthodes plus discriminantes doivent être élaborées et combinées à celles existantes.

Les séquences d'insertion bactériennes IS sont des éléments génétiques mobiles de petites tailles (700 à 2500 pb), ne codant généralement aucune autre fonction que celle liée à leur transposition et à sa régulation (Mahillon & Chandler, 1998). Elles sont retrouvées dans quasiment tous les génomes bactériens séquencés et présentent une très grande diversité, puisque plus de 2000 types d'éléments ont été mis en évidence et regroupés dans 20 familles différentes. De plus, leur localisation et leur nombre de copies sont également très variables selon les génomes, y compris entre différents isolats d'une même espèce bactérienne. De par leur activité intrinsèque de transposition, mais aussi d'événements de recombinaison entre copies homologues, les éléments IS peuvent fortement affecter la structure et l'expression des génomes. Les IS peuvent donc affecter la valeur sélective d'une souche. Dans certains cas, ils peuvent également être impliqués dans la virulence de bactéries pathogènes, soit en modifiant

l'expression de gènes, soit par acquisition de gènes par transfert horizontal (Hacker *et al.*, 1997; Berge *et al.*, 1998).

Les propriétés des éléments IS ont entraîné leur utilisation comme marqueurs épidémiologiques chez de nombreuses bactéries pathogènes, comme *S. pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *C. burnetii*, *Yersinia*, *Mycobacterium*, *Salmonella* et *Leptospira* (voir le manuscrit ci-dessous pour des références détaillées). Nous avons ainsi décidé d'utiliser les séquences d'insertion IS comme marqueurs moléculaires pour analyser leur potentiel discriminatoire et leur capacité à identifier la source à l'origine d'une infection au sein des isolats de *L. pneumophila* Paris. A ce jour, aucune étude n'existe quant aux analyses des séquences IS chez *L. pneumophila*.

Nous avons entrepris d'une part de typer des isolats de *L. pneumophila* suivant le nombre et la position des séquences IS dans leur génome et d'autre part de comparer cette nouvelle méthode de typage chez *Legionella* avec les méthodes MAb, PFGE et SBT. Pour cela, 86 isolats cliniques et environnementaux de *L. pneumophila* ont été analysés, dont 84 de type Paris provenant de 25 investigations cliniques indépendantes, suite à des cas de légionellose survenus en France entre 2001 et 2007. Ces isolats ont été obtenus grâce au CNR des Légionelles de Lyon. Tous ces isolats ont été typés par les méthodes MAb, PFGE, SBT et par notre méthode de RFLP-IS (Restriction Fragment Length Polymorphism – Insertion Sequence). Le principe est d'utiliser les éléments IS comme sondes moléculaires lors d'expériences d'hybridation avec les ADN génomiques des isolats analysés. Les profils d'hybridation obtenus peuvent alors être comparés entre les différents isolats analysés.

Chez la souche de référence *L. pneumophila* Paris, dont le génome a été séquencé, nous avons pu identifier six types d'éléments IS potentiellement fonctionnels : ISLpn1, ISLpn8, ISLpn9, ISLpn10, ISLpn11 et ISLpn12. Des sondes moléculaires marquées ont été obtenues pour chacun de ces types d'éléments IS et ont été hybridées à l'ADN génomique

extrait de chacun des 86 isolats de *Legionella* et digéré par des enzymes de restriction. Les profils d'hybridation obtenus ont démontré qu'un des ces éléments IS, IS*Lpn11*, disposait d'un très bon pouvoir discriminatoire (indice de discrimination de 82 %), bien supérieur à celui des méthodes MAb et SBT (indices de discrimination de 53 % et 14 %, respectivement). La combinaison des trois méthodes permet d'obtenir un index de discrimination très élevé de 90 %. De plus, nous avons pu démontrer en comparant les profils d'hybridation obtenus chez les isolats environnementaux et cliniques que la méthode de typage RFLP-IS*Lpn11* permettait d'obtenir une meilleure fiabilité quant à l'identification de la source de l'infection. Une étude phylogénétique a également été entreprise à partir des différents profils IS et nous a permis de confirmer que les isolats de *L. pneumophila* de type Paris étaient issus d'une expansion clonale. Cette expansion, combinée à une virulence importante, explique ainsi la prévalence de cette souche dans les épidémies actuelles.

Ces résultats font l'objet d'un article scientifique qui a été accepté le 18 octobre 2010 par la revue *Journal of Clinical Microbiology* (JCM).

Réponse de l'éditeur de la revue *Journal of Clinical Microbiology*

Prof. Dominique Schneider
Université Joseph Fourier CNRS UMR5163
Laboratoire Adaptation et Pathogénie des Microorganismes
Institut Jean Roget Campus Santé
Domaine de la Merci La Tronche
Grenoble 38700
France

Re: Insertion Sequences as highly resolutive genomic markers for ST1 Legionella pneumophila Paris. (JCM01261-10 Version 3)

Dear Dr. Schneider:

Your manuscript has been accepted, and I am forwarding it to the ASM Journals Department for publication. For your reference, ASM Journals' address is given below. Before it can be scheduled for publication, your manuscript must be checked by the ASM production editor to make sure that all elements meet the technical requirements for publication. Charles Brown, the production editor for the Journal of Clinical Microbiology (JCM), or his assistant will contact you if anything needs to be revised before copyediting and production begin.

Corresponding authors who are ASM members are entitled to discounted page charges, reprint fees, and color figure fees. For 2010 issues, page charges (subject to change without notice) will be assessed at \$65 per printed page for the first eight pages and \$125 for each page in excess of eight for a corresponding author who is an ASM member or \$75 per printed page for the first eight pages and \$250 for each page in excess of eight for a nonmember corresponding author. A corresponding author who is not a member may join ASM to obtain the member rate. If the research was not supported, you may send a request for a waiver of page charges to the Director, Journals. For more details, including types of articles not charged, see the Instructions to Authors. Color charges for 2010 issues are \$170 per figure for a member corresponding author and \$375 per figure for a nonmember corresponding author. Please note that any figures you supplied in color will automatically be processed as color and you will be responsible for color costs.

To offset the costs associated with posting journal article supplemental material, ASM charges a flat fee for authors who wish to post supplemental material as an adjunct to their published article. The 2010 fee is \$190, with a limit of 10 supplemental files per article. (Exceptions: Minireviews and Commentaries are exempt from this fee.) The official letter of acceptance from the ASM production editor will notify you of the charge, if it is applicable.

ASM is also now offering authors the option of paying a fee to allow immediate open access to both the preliminary "Accepts" version and the final, typeset version of their articles. The 2010 fee is \$2,000, which is in addition to current publication charges. The open access provided through NIH's PubMed Central repository is separate and will continue regardless; all primary research published in ASM journals is freely available through PubMed Central 6 months after publication. Please contact the ASM production editor immediately if you wish to pay the optional open access fee.

An official letter of acceptance and a copyright transfer agreement will be sent to the person

listed as the corresponding author on the manuscript title page once your article has been scheduled for an issue.

Note the following about publish ahead of print: For its primary-research journals, ASM posts online PDF versions of manuscripts that have been peer reviewed and accepted but not yet copyedited. This feature is called “JCM Accepts” and is accessible from the Journals website. The manuscripts are published online as soon as possible after acceptance, on a weekly basis, before the copyedited, typeset versions are published. They are posted “As Is” (i.e., as submitted by the authors at the modification stage), and corrections/changes are NOT accepted. Accordingly, there may be differences between the JCM Accepts version and the final, typeset version. The manuscripts remain listed on the JCM Accepts page until the final, typeset versions are posted, at which point they are removed from the JCM Accepts page. Any supplemental material intended, and accepted, for publication is not posted until publication of the final, typeset article.

IMPORTANT NOTICE: Effective April 2008, the NIH initiated a policy requiring that all investigators funded by the NIH either submit or have submitted for them to the National Library of Medicine’s PubMed Central an electronic version of their final peer-reviewed manuscripts upon acceptance for publication, to be made publicly available no later than 12 months after the official date of publication. Authors of ASM journal articles are automatically in compliance with this policy and need take no action themselves. For the past several years, the ASM has deposited in PubMed Central all publications from all ASM journals. Further, all primary ASM literature is made available to everyone, free, 6 months after publication through PubMed Central, HighWire, and international PubMed Central-like repositories. By having initiated these policies, the ASM is in full compliance with NIH policy.

Thank you for submitting your paper to JCM.

Sincerely,
Paul Bourbeau
Editor, Journal of Clinical Microbiology (JCM)

Journals Department
American Society for Microbiology
1752 N St., NW
Washington, DC 20036
E-mail: journalsrr@asmusa.org
Phone: 202-942-9384
Fax: 202-942-9355

**Insertion Sequences as highly resolutive genomic markers for ST1
Legionella pneumophila Paris.**

Mike Vergnes,^{1,2} Christophe Ginevra,^{3,4} Elisabeth Kay,^{1,2} Philippe Normand,⁵ Jean Thioulouse,⁶ Sophie Jarraud,^{3,4} Max Maurin,^{1,2,7} and Dominique Schneider^{1,2*}

Laboratoire Adaptation et Pathogénie des Microorganismes, Université Joseph Fourier Grenoble 1, BP 170, F-38042 Grenoble cedex 9, France¹; CNRS UMR5163²; Faculté de Médecine Laennec, Laboratoire de Bactériologie, Université Lyon 1³; INSERM U851, 7 rue Guillaume Paradin, F-69372 Lyon cedex 08⁴; Laboratoire Ecologie Microbienne, CNRS UMR5557, Université Lyon 1, Bâtiment Mendel, 69622 Villeurbanne Cedex, France⁵; Laboratoire Biométrie et Biologie Evolutive, UMR CNRS 5558 Université Lyon 1, Bâtiment Mendel, 69622 Villeurbanne Cedex, France⁶; CHU Grenoble, Université Joseph Fourier, BP 217, 38043 Grenoble, France⁷.

*Correspondent footnote. Laboratoire Adaptation et Pathogénie des Microorganismes, CNRS UMR5163, Université Joseph Fourier, Institut Jean Roget, Campus Santé, Domaine de la Merci, BP170, 38042 Grenoble Cedex 9, France. Phone: +33 (0)4 76 63 74 90; fax: +33 (0)4 76 63 74 97. E-mail: dominique.schneider@ujf-grenoble.fr

Running title: IS elements as epidemiological tools in *Legionella*

Supplemental material for this article may be found at <http://jcm.asm.org/>.

ABSTRACT

The causative agent of legionellosis, *Legionella pneumophila*, colonizes all natural and man-made water networks, thus constituting the source of contaminated aerosols responsible for air-borne human infections. Efficient control of infections, especially during epidemics, necessitates the fastest and most resolute identification possible of the bacterial source for subsequent disinfection of reservoirs. We thus compared recognized typing approaches in *Legionella* with a method based on characterization of Insertion Sequence content. A total of 86 clinical or environmental isolates of *L. pneumophila* including 84 Paris isolates, sampled from 25 clinical investigations in France between 2001 and 2007, were obtained from the *Legionella* National Reference Center. All strains were typed by monoclonal antibody subgrouping, sequence-based typing, pulsed-field gel electrophoresis and restriction fragment length polymorphism based on the presence or absence of Insertion Sequence (IS) elements. We identified six different types of IS elements in *L. pneumophila* Paris and used them as genomic markers in hybridization experiments. One IS type, IS*Lpn11*, revealed a high discriminatory power. The Simpson's index of discrimination, calculated from the distribution of IS elements, was higher than that obtained with the other typing methods used for *L. pneumophila* Paris. Moreover, specific IS*Lpn11* copies were found only in strains isolated from particular cities. In more than half of the cases, each clinical isolate had an IS*Lpn11* profile that was recovered in at least one environmental isolate from the same geographical location, suggesting that our method could identify the infection source. Phylogenetic analysis suggests a clonal expansion for the *L. pneumophila* Paris strain.

INTRODUCTION

Legionella species are facultative intracellular Gram-negative bacteria causing legionellosis, which may develop into a severe pneumonia called Legionnaires' disease but also as a much more benign flu-like illness known as Pontiac fever. *Legionella* is widely distributed in the environment and colonizes all natural and man-made water networks such as those of hospitals, thermal baths, hotels..., providing an abundant and prevalent reservoir for human infections (16, 41, 62). In these environments, *Legionella* can multiply inside protozoan cells (51). Human infection occurs through inhalation of aerosolized water contaminated with *Legionella* cells. Although the genus *Legionella* comprises more than 50 species and 64 serogroups, *Legionella pneumophila* serogroup 1 is the most common pathogenic species, accounting for more than 90% of legionellosis cases (43, 63) despite representing only 28% of environmental isolates (13). To offer efficient control of human infections, fast and accurate identification of the isolates involved and their water reservoirs are necessary. This is particularly important in the context of a legionellosis outbreak where rapid treatment of contaminated water sources will allow effective prevention of the occurrence of new infections. Highly resolutive typing will also further optimize current surveillance measures of water systems for prevention of the disease. Over the last decades and besides culture on selective media (54), several methods have been used for *Legionella* typing. Before giving an overview of these methods, it is important to emphasize that no clear differentiation of clinical versus environmental isolates is presently possible for *L. pneumophila* strains (2, 4).

Classification of *Legionella* spp. into serogroups and monoclonal subgroups has been performed by monoclonal antibody (MAb) typing using an international panel of MAbs (27, 32). Many genotyping methods have been developed, including Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), amplified fragment length polymorphism (AFLP), restriction endonuclease analysis, or arbitrarily primed PCR (21). However, these methods have

limitations in both resolution level and interlaboratory typing reproducibility. Therefore, a multilocus sequence typing approach, called sequence-based typing (SBT), either applicable to bacterial strains or directly to clinical samples, was developed by members of the European Working Group for *Legionella* Infections (EWGLI). This method is based on the allelic profiling of clinical and environmental isolates based on nucleotide sequences of protein-coding loci (22, 23). Seven loci typing is now proposed as a standard epidemiological method allowing the classification of isolates into ST types (47). A further improvement using nested PCR-based SBT was recently applied to clinical samples (24). Recently, the availability of DNA arrays for *Legionella* permitted to use differential genomic hybridization but this did not allow to infer the genetic origin of the infection (4). Moreover, DNA arrays may be difficult to set up in laboratories.

Several studies combined these different methodologies to infer the distribution of *Legionella* isolates, especially from *L. pneumophila* serogroup 1, using collections of isolates sampled all over the world in Japan (1), Canada (49, 58), United States (35), Korea (37) and Europe (22, 23, 26). A consensus trend emerged with all data revealing both a high level of genetic diversity in *Legionella* and the emergence of specific groups of clones that showed high similarities and were responsible for both sporadic legionellosis cases and worldwide outbreaks (1, 4, 26, 34, 35, 37, 49, 58). In particular, isolates from ST1 (that includes the widely distributed Paris strain), ST47, ST222 have been detected in sporadic and outbreak cases. Among clinical isolates sampled in France over the 2001-2007 period, 6.4% to 11.3% were found to belong to the Paris strain, the proportion in 2009 being 10.8% among a total of 213 studied isolates (data from the *Legionella* National Reference Center, Lyon, France). Expansion of these particular clones may be related to specific fitness and/or virulence traits. Although combinations of MAb and molecular typing methods are used in epidemiological investigations to compare human and environmental *L. pneumophila* strains, the source of

infection remains often difficult, or even impossible to identify, emphasizing the need for additional more resolutive approaches. We decided in this study to use Insertion Sequence (IS) mobile genetic elements as genomic markers for typing *L. pneumophila* serogroup 1 Paris strains and to investigate both their discriminatory power and ability to identify the environmental source of legionellosis outbreaks. Such highly discriminant genetic tool may also be applied to the identification of clinically-relevant bacterial subtypes and the investigation of genetic determinants of bacterial fitness and virulence.

Insertion sequence (IS) elements are small DNA sequences (500 to 2,500 bp) that generally encode no function other than those involved in their mobility (39). They are widely distributed in virtually all bacterial genomes and show a huge diversity in element types and copy numbers. They are often considered as selfish parasitic DNA elements but their activity may also confer to the cells that harbor them increased fitness in certain circumstances (9, 44). They contribute significantly to spontaneous mutagenesis in bacteria and can have profound effects on gene expression through their transposing activity (see 39 for a review). Moreover, DNA rearrangements can also occur through recombination between IS copies. For all these reasons, IS elements have been extensively used in molecular epidemiological studies and in some cases, these genotyping tools have been standardized by the international community. Moreover, IS elements have even been reported to play a role in virulence (31). Genotyping has been performed using specific IS elements for pneumonic pathogens other than *Legionella*, for example *Streptococcus pneumoniae* (38, 50, 56), *Staphylococcus aureus* (30, 64), *S. epidermidis* (12), and *Coxiella burnetii* (60). More generally, Restriction Fragment Length Polymorphism using IS elements (RFLP-IS) has been performed for typing natural isolates in numerous bacterial human pathogens including *Yersinia* (59), *Mycobacterium* (61), *Salmonella* (20) and *Leptospira* (65). Their discrimination power was also used in

experimental evolution experiments to differentiate clones derived from the same common ancestral strain and to measure genetic diversity (44).

In the work reported here, we identified the IS elements in the genome sequence of the *L. pneumophila* Paris strain (5) and subsequently used them as genomic markers in RFLP-IS experiments to characterize 86 clinical or environmental isolates of *L. pneumophila* including 84 Paris isolates, in combination with MAb, PFGE and SBT typing methods. We found that a single IS element, *ISLpn11*, had by itself a significantly higher discrimination power than other methods. Moreover, in more than half of the cases, a genetic link could be detected between clinical and environmental isolates sampled at identical geographical locations during independent epidemiological investigations. Phylogenetic analyses using the obtained RFLP-IS profiles revealed, as previously suggested, a clonal expansion of the Paris strain. However, Between-Group Analysis revealed some correlation between geographical locations and specific IS copies.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and growth conditions. The bacterial strains used in this study were provided by the *Legionella* National Reference Center (Lyon, France) and are listed in Tables 1 and 2. All bacterial strains were plated on N-(2-acetamido)-2-aminoethanesulfonic acid (ACES)-buffered charcoal yeast extract (BCYE) agar plates and incubated at 37°C for 2 or 3 days for PFGE and MAb subtyping or genomic DNA extraction, respectively.

Genomic DNA extraction. Between 10^9 and 10^{10} bacterial cells of each strain were scraped from Petri dishes and resuspended in 500 μ L of lysis solution (50 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, 100 mM glucose and 4 mg/mL lysozyme). After incubation on ice for 10 min, 100 μ L of 10 % SDS (w/vol) were added and the mixture further incubated at 37°C for 10 min.

Proteins and cell debris were removed by adding 800 μ L of acetate-phenol (50/50 vol/vol) followed by vortexing during 10 min at room temperature and centrifugation at 10,000 x g for 10 min at 4°C. The supernatant was collected and genomic DNA precipitated by the addition of 1/10 volume of 3 M sodium acetate pH 5.2 and 3 volumes of cold absolute ethanol. The DNA pellet was then washed with cold 70 % ethanol (vol/vol) to remove salts, dried and resuspended in 200 μ L of sterile water.

Southern blot hybridization. Genomic DNA was digested by BamHI and PvuII, since the IS elements studied all lacked these restriction sites, and the resulting fragments were separated by electrophoresis in 0.8 % agarose gels in 1X TAE buffer. The DNA fragments were then transferred onto a nylon membrane (Schleicher and Schuell Bioscience, Dassel, Germany). Hybridizations were performed at high stringency (68°C) using internal fragments of the IS elements as probes. These internal sequences all lacked BamHI and PvuII restriction sites, so that each hybridizing fragment represented a unique copy of the relevant IS element. The IS internal fragments were generated by PCR using primer pairs listed in Table 3 and cold-labelled using the DIG system (Roche, Meylan, France). Filters for Southern blot hybridizations were probed with each IS element successively, and each hybridized probe was stripped prior to reprobing. An example of Southern hybridization is given in Fig. S1 in the supplemental material. Each of the 86 strains was scored for the presence (1) or absence (0) of each fragment carrying a particular IS element, representing a genotype-specific IS fingerprint. This scoring yielded a matrix of 86 clones and 35 fragments over the six IS elements that was used in subsequent analyses. (For the most discriminating element, *ISLpn11* (see Results section), a total of 15 IS-containing fragments was detected). The RFLP-IS scoring data are given in Table S1 in the supplemental material for the 76 *L. pneumophila* Paris isolates (Table 2).

PFGE subtyping. *L. pneumophila* cells were resuspended in TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8) and mixed with an equal volume of 1% SeaKem gold agarose (Tebu, Le Perray En Yvelines, France) for casting plugs. Plugs were then treated with Proteinase K (50 µg/mL) in TE buffer for 24 h at 55°C. DNA was then digested with 20 units of SfiI restriction enzyme (Roche, Meylan, France) for 16 h at 50°C. Fragments of DNA were separated by electrophoresis in 0.8% agarose gels and run in 0.5X Tris-borate-EDTA buffer (pH 8.3) in a contour-clamped homogeneous field apparatus (CHEF DRII system; Bio-Rad, Ivry-sur-Seine, France) with a constant voltage of 150 V. Runs were carried out with constant pulse times (25 s) for 11 h at 10°C followed by increasing pulse times (35 to 60 s) for 11 h at 10°C. PFGE patterns were analyzed using the GelComparII software (Applied Maths, Kortrijk, Belgium).

Monoclonal antibody (MAb) subgrouping. These experiments were based on the international MAb subgrouping scheme (27). The *L. pneumophila* cells were resuspended in saline buffer and analyzed by indirect immunofluorescence using the Dresden panel monoclonal antibodies. The bacterial suspensions (10 µL) were allowed to dry at room temperature on each well of Teflon-coated microscope slides. After one hour incubation of the slides on a heater plate, monoclonal antibodies were added and incubated in a humid chamber for 45 min at 37°C. The slides were then washed for 5 min in 10 mM phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.2 and air dried. Fluorescein-labelled goat anti-mouse immunoglobulin was then added and incubated in a humid chamber for 30 minutes at 37°C. After a PBS wash, slides were mounted and examined with an epifluorescence microscope (Axioskop, Zeiss).

Sequence-based typing (SBT). All isolates were processed for SBT using the EWGLI standard scheme. Seven genes were PCR-amplified, namely *asd*, *flaA*, *mip*, *mompS*, *pilE*, *proA* and *neuA* (22, 47), using the same oligonucleotide primers and conditions described previously (22, 47, <http://www.ewgli.org>). They yielded 245- to 648-bp PCR products that were then sequenced (GATC Biotech, Konstanz, Germany). The resulting sequences for each gene locus were trimmed and compared to previously assigned allele numbers in the online database (<http://www.ewgli.org>). Based on a predetermined order (*flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA*, *neuA*), the combination of seven alleles at each of the loci was defined as a seven-digit allelic profile (e.g., 1-4-3-1-1-1-1 and each combination type was attributed an allelic profile number or ST (e.g., ST1) using the EWGLI sequence quality tool (http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/legionella/legionella_sbt/php/sbt_homepage.php). No new variant was found in this study. The SBT methodology applied to *Legionella* is distinct from the more typical Multi-Locus Sequence Typing (MLST) scheme since it includes genes under diversifying pressure whereas MLST is based exclusively on house-keeping genes.

Simpson's diversity index. Discriminating power was assessed by computing the diversity index of Simpson (29) according to: $D = 1 - \frac{\sum_{i=1}^S n_i(n_i - 1)}{N(N - 1)}$, where S is the number of different profiles, N is the total number of sampled profiles and n is the number of isolates with the same profile.

Phylogenetic analyses. Identical profiles were eliminated from the IS-derived matrix comprising 86 strains and 15 IS fragments (containing the discriminating IS*Lpn11* element) and resolved as 17 Operational Taxonomic Units (OTUs). The matrix was then formatted for treatment using the Phylip software (19).

A parsimony approach was used with the Wagner method (15, 33), where both 0 to 1 and 1 to 0 changes are allowed with the assumption that 0 is the ancestral state. It is also assumed that different characters evolve and that different lineages evolve independently. The different trees yielded by the approach were condensed using consensus, the consensus tree program written by Margush and McMorris (40). Another parsimony approach using the Dollo method (17) is possible. However, it assumes that the direction of mutation is known, with 0 to 1 being much more probable than the reverse, while the Wagner method does not assume such a preferential mutational direction. Moreover, the Wagner method is more largely used in the literature (3, 53, 55) for comparable data sets. We thus also applied the Dollo method which may further confirm the robustness of branches in the phylogenetic trees.

The IS elements were treated as 1,000-nucleotide loci using RestDist, written initially for restriction site analysis (42). A distance matrix (substitutions/site) was generated and treated by Neighbor-Joining according to Saitou and Nei (52). A bootstrap analysis was then performed according to Felsenstein (18).

Between-Group Analysis. Analyses of the differences between cities in the distribution of IS elements in *Legionella* strains were performed by Between-Group Analysis or BGA (11, 14) which is a multivariate analysis technique derived from principal component analysis (PCA, 46). The aim of PCA is to summarize a data table by searching orthogonal axes on which the projection of items (rows of the table) has the highest possible variance. This characteristic ensures that the associated graphs, or principal component maps, will best represent the initial dataset. Principal components (PCs) have the property of having the highest possible correlation with the original variables (columns of the table).

From a theoretical point of view, BGA is the particular case of PCA with respect to instrumental variables (PCAIV, 36, 46), in which the instrumental variable table is reduced to

only one dummy variable. This variable defines groups of rows in the data table, and BGA is simply the PCA of the table of group means (here, the groups correspond to the cities where *Legionella* strains were collected). The group means table has a number of rows equal to the number of groups, and the same columns as the original table. The objective of BGA is to separate the groups, and it can be considered as a robust alternative to discriminant analysis. A Monte-Carlo (permutation) test was used to check the significance of the differences between groups. Computations and graphical displays were carried out with the R software (45), using both `ade4` (6) and `ade4TkGUI` (57) packages. This software is available at <http://www.pbil.univ-lyon1.fr/ade4/>.

RESULTS

IS families in *L. pneumophila* Paris. We analyzed the available genome sequence of *L. pneumophila* Paris (5) for the presence of different IS element families, based on four IS features: presence of terminal Inverted Repeats (IRs), presence of small duplications directly outside the IRs representing the target sites of the IS elements, presence of one or two ORF, and/or homology of the translated products with known transposases (39). Identities with known IS families is expected to yield information about the type of IS detected. We identified six different types of potentially functional IS elements in *L. pneumophila* Paris, which are all present in several copies in the genome (Table 4). The 6 IS elements belonged to 5 different IS families. Comparison with the genomes of three other *L. pneumophila* strains, Lens (5), Philadelphia (7) and Corby (25), revealed a differential distribution of these IS elements, reflecting the high plasticity of the *Legionella* genome. Two IS elements, *ISLpn1* and *ISLpn10*, were specifically found only in the Paris strain, whereas *ISLpn9* and *ISLpn12* were present in only one of the other *L. pneumophila* strains, Philadelphia and Corby, respectively. Two IS elements were detected in two of the other strains: *ISLpn8* in

Philadelphia and Lens and IS*Lpn11* in Philadelphia and Corby. The copy number of the different IS elements was also found to be variable across the four genomes (Table 4).

Validation of RFLP-IS as a typing method of *L. pneumophila* isolates. As a first step to evaluate RFLP-IS typing, we used 8 isolates of *L. pneumophila* including two classified as serogroup 1, PFGE Paris, ST1 and MAb subgroup Olda and six as Philadelphia (Table 1). Using the six different IS elements that were identified in *L. pneumophila* Paris as probes, we obtained five different hybridization profiles and this discrimination threshold was obtained with a unique IS element, IS*Lpn11*, the other probes adding no further discriminating power. The RFLP-IS therefore yielded a very high Simpson's diversity index D value of 79 %, compared to SBT or PFGE that could not discriminate these isolates and to MAb with a Simpson's index value of only 43 %. These experiments also revealed IS*Lpn11* as a strongly discriminating molecular tool that alone was better than the combination of the three other typing methods.

To assess whether the RFLP-IS method could be extended to non-Paris *L. pneumophila* isolates, two isolates were investigated including one from serogroup 1 but with a unique PFGE profile, ST79 and MAb Olda, and one from serogroup 8. As expected for a discriminating tool, two distinct and unique RFLP-IS profiles were obtained (Table 1).

As a second step, we therefore extended these studies to a set of specifically selected *L. pneumophila* Paris isolates presenting the same PFGE typing profile. We performed RFLP-IS typing and the data were treated in three ways: i) phylogenetic reconstruction analysis, ii) Between-Group Analyses to measure differences between cities in the distribution of IS copies in *Legionella* strains, iii) comparative estimation of the discriminating power of RFLP-IS versus SBT and MAb typing methods as well as its ability to relate clinical isolates to the environmental source clone.

Phylogenetic analyses. We performed RFLP-IS typing on a set of 76 *L. pneumophila* Paris isolates sampled during 25 epidemiological investigations that occurred between 2001 and 2007, including 30 isolates from patients and 46 from putative contaminating roots (Table 2). Again, *ISLpn11* was the only IS element discriminating the isolates, all the other IS elements giving identical profiles for all isolates. The RFLP-*ISLpn11* scoring for this set of 76 isolates is given in Table S1 in the supplemental material, together with an example of Southern hybridization in Fig. S1. Combining the data obtained for this set of 76 isolates (Table S1) with the above set of 10 clinical isolates (Table 1), a total of 15 different copies of *ISLpn11* was found with a mean copy number of 6.87 +/- 0.81. We found 17 different hybridization profiles. Ten isolates were found to have unique profiles, while the most represented one was found 32 times (Fig. 1, Tables 1 and S1). This particular profile will be called Ref7 in the following sections; it belongs to the reference *L. pneumophila* Paris strain initially isolated from a clinical case (5). One IS copy was present in all isolates tested, while three IS copies were present in a single isolate.

The Wagner tree (Fig. 1), including all 86 isolates, was found to group reliably OTUs #76, #55, #114 and #32, as well as OTUs #132, #86 and #29 at consensus levels of 0.84 and 1.00, respectively. Several OTUs with a single representative (#91, #52, #61, #33 and #35) were grouped at a consensus level of 0.51. The Neighbor-Joining tree was found to group OTUs #132, #86 and #29 as for the Wagner parsimony (data not shown). Although the Wagner method is most likely to better reflect our data set (see Materials and Methods), we also applied the Dollo parsimony method to see if some branches could also be recovered with a less suitable method, thus reinforcing the robustness of these relationships. It was indeed the case for OTUs #91 and #52, OTUs #132, #86 and #29 and for others, if we tolerate one missing OTU: OTUs #91, #52, #61, #33 and #35; and OTUs #78, #32, #98, #76, and #55.

The matrix distance allowed us to compute the average distance of each OTU to the others (Fig. 2). The OTU with the smallest distance was the reference strain with the profile Ref7, with 0.08 substitution per site while the longest was #78 with 0.25. An inverse relationship between distance and number of isolates per OTU was thus found suggesting the emergence of better adapted isolates linked to IS transposition-induced mutation rate.

Between-Group Analysis. Next, we analyzed our data according to the city of origin of the different isolates. All 86 isolates originated from 26 different cities (Tables 1 and 2). BGA was performed to investigate whether the IS distribution was affected by the city of origin of the different *L. pneumophila* isolates (Fig. 3). The raw data table comprised 86 rows corresponding to the 86 *Legionella* isolates analyzed here and 15 columns corresponding to the 15 IS*Lpn11* copies labelled V1 to V15. Values in the table correspond to the presence (1) or absence (0) of each IS copy in each isolate. Since the IS copy number varies among isolates, these values were first transformed to row percentages and the BGA then computed to yield the mean values for the 26 cities. The Monte-Carlo test of the BGA shows that the difference between cities was statistically highly significant ($p \approx 0.001$). The BGA was displayed under the form of a biplot with both IS copies and cities on the same graph where long arrows correspond to IS copies that discriminated cities, while shorter arrows correspond to common IS copies (Fig. 3). Each of four specific IS copies, V6, V7, V9 and V11, were characteristic of each of four groups of cities. The *Legionella* isolates coming from cities that are located in the same direction as one of these IS copies tended to possess this particular IS copy. It must be noted that the directions, symbolized by arrows, are important in both ways: for example, the position of Brest city on the graph is due to both the presence of the IS copy V9 and the absence of the IS copy V6, but not to the presence of the IS copy V11 in the isolates collected in Brest.

Discriminatory power of RFLP-IS and identification of the source of infection. We used here the data of RFLP-IS obtained with the 76 *L. pneumophila* Paris isolates (Table 2) to check whether the environmental isolates sampled during epidemiological investigations might be related to the pathogenic isolates sampled from the patients. For comparative purposes, each isolate was also tested by SBT and MAb typing. All data are given in the supplemental material in Table S1. First, we confirmed that the discriminatory power (D) of the RFLP-IS was far better (80 %) compared to each of the SBT and MAb methods (14 and 53 %, respectively). Moreover, when two typing techniques were simultaneously used, the best combinations always included the RFLP-IS typing with D increasing to 82 and 88 % when RFLP-IS was combined to SBT and MAb, respectively, while only 58 % was obtained with both SBT and MAb (Table 5). Combining all three typing methods did not significantly improve D, which increased to 90%.

Second, we compared the different typing methods by investigating the same set of isolates for the level of relationship between environmental and clinical isolates sampled at the same geographical locations during the different epidemiological investigations (Table 5). At some extreme, the strong discriminating power of RFLP-IS may lead to the absence of detection of the isolate that may constitute the source of the infection in the environmental settings. However, while more than two thirds of the cases allowed the recovery of the profile of the isolates sampled from a patient in environmental isolates, this was also true in about half of the cases when either RFLP-IS and MAb or all three typing methods were combined. Therefore, RPLP-IS $Lpn11$ increased the confidence of detecting the source of infection by refining the molecular identification and differentiation ability between closely related isolates.

DISCUSSION

Based on the available genome sequence of *L. pneumophila* Paris, which is one of the major pathogenic strains of these bacterial species, we identified the potentially functional IS elements. We used them as hybridization probes in RFLP experiments to evaluate their value as epidemiological tools, compared to other typing methods.

Discriminating genotyping methods are of high importance to precisely evaluate the genetic diversity in *L. pneumophila*, and more generally in pathogenic bacteria, since it has important consequences for a precise understanding of epidemiology and persistence in the environment. Here, we used two sets of strains including 10 independent clinical isolates and 76 *L. pneumophila* Paris isolates with both environmental and clinical isolates sampled during 25 epidemiological investigations that occurred between 2001 and 2007. For this particular set of isolates, we showed that RFLP-IS had the highest discriminatory power compared to MAb, PFGE and SBT methods, which was described as a very efficient tool to generate epidemiological and highly discriminatory data in the closely related *L. pneumophila* serogroup 1 strains (47). This was even better when both RFLP-IS and MAb were combined. A very high level of genetic diversity was detected even for the closely related Paris isolates, confirming the genetic plasticity of *Legionella* (5). However, one major profile, Ref7, was repeatedly observed and our phylogenetic analyses provided further support for a clonal population structure for *L. pneumophila* (10), with a dominant epidemic clone that showed diversification profiles.

In almost all cases, a common profile was detected by SBT between environmental and clinical isolates sampled from each geographical location (Table 5). Using the more discriminatory RFLP-IS tool, related profiles were observed in about three quarters of the cases. Combining RFLP-IS and MAb still allowed the detection of related profiles in more than half of the cases. It has to be emphasized that we used a small number of environmental

and clinical isolates sampled from the same geographical locations. Yet, even under these conditions, we detected related profiles for more than half of the cases and increasing the number of analyzed samples should allow an even better coverage. Therefore, the RFLP-IS tool not only allowed a high discrimination but also improved confidence for detection of the source of infection as compared to SBT and MAb typing approaches, which should result in a better control of legionellosis infections. This is a huge advantage of the technique in the context of epidemic situations. Comparison of clinical and environmental isolates using RFLP-IS tool may offer for the first time the opportunity to rapidly and accurately identify the water-borne source of infection and to prevent extension of outbreaks by effective decontamination of the bacterial reservoir. By defining subgroups of *L. pneumophila* Paris isolates with potentially longer persistence in the environment and/or higher infectious traits for humans, the RFLP-IS tool may also reinforce current surveillance procedures of man-made water-distribution systems recommended for legionellosis prevention purposes. It should however be noted that we used a relatively small number of isolates that mostly belong to the Paris ST1 group. Since the RFLP-IS method generated convincing results with this set of isolates, its broader use as epidemiological tool can now be tested with other related isolates, including for example the Philadelphia 1 group.

The high discriminatory power that we detected was associated to the diversity generated by a single IS element, *ISLpn11*, suggesting that this mobile element is actively moving in the Paris isolates, thereby largely contributing to their polymorphism and genomic plasticity. Bacterial IS elements are known to transpose at a high frequency depending on both environmental conditions and host factors (39). Moreover, identical copies of IS elements may serve as substrates for homologous recombination which may lead to chromosomal rearrangements like inversions, deletions or duplications. Therefore, all the changes that we detected in the RFLP profiles using *ISLpn11* may be related to either transposition events or

rearrangements associated with recombination between homologous copies of *ISLpn11*. The *ISLpn11* element therefore constitutes a very efficient genomic marker for epidemiological purposes in *L. pneumophila*. In some extreme cases, we could even detect *ISLpn11* copies that were specific to some cities. It would be of interest to understand the molecular biology and physiology linked to the transposition of this element. In particular, one could investigate whether its transposition is dependent upon differential environmental conditions including the contact with eukaryotic host cells and second to quantify the fitness of the strains and its link with particular genes up- or down-regulated following IS transposition. To the best of our knowledge, nothing is currently known about the stability of *ISLpn11* in *L. pneumophila* and about its specificity of integration. We detected no obvious preferences either on target sites or on chromosomal localization for the distribution of *ISLpn11* in the sequenced genomes (Table 4), suggesting that it may transpose into various sites.

RFLP-IS revealed to be a very reliable, simple and easy to reproduce genotyping method since data were obtained for all analyzed isolates. Moreover, the possibility to express the data as matrices with binary codes allows easy standardization and transfer of results. The availability of a wide range of epidemiological tools is of primary importance to investigate the extent and nature of genetic diversity of bacterial pathogens. This is particularly important for addressing epidemiological questions, identifying the source of infection episodes and understanding the evolutionary processes driving their distribution and phenotypic properties.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the French Centre National de la Recherche Scientifique, a “Bonus Qualité Recherche” from the University Joseph Fourier and from the Agence française de sécurité sanitaire de l’environnement et du travail (Afsset, grant EST-

2007-1) (to DS). MV thanks the French Ministry of Education and Research for a PhD fellowship and the University Joseph Fourier for an ATER funding.

We thank JH Helbig for providing antibodies for MAb subgrouping. We thank all our colleagues for sending *Legionella* isolates to the National Reference Center.

REFERENCES

1. **Amemura-Maekawa, J., F. Kura, B. Chang, and H. Watanabe.** 2005. *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from cooling towers in Japan form a distinct genetic cluster. *Microbiol. Immunol.* **49**:1027-1033.
2. **Aurell, H., P. Farge, H. Meugnier, M. Gouy, F. Forey, G. Lina, F. Vandenesch, J. Etienne, and S. Jarraud.** 2005. Clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila* serogroup 1 cannot be distinguished by sequence analysis of two surface protein genes and three housekeeping genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:282-289.
3. **Bukhari, Y. M., K. Koivu, and P. M. A. Tigerstedt.** 1999. Phylogenetic analysis of *Acacia* (*Mimosaceae*) as revealed from chloroplast RFLP data. *Theor. Appl. Genet.* **98**:291-298.
4. **Cazalet, C., S. Jarraud, Y. Ghavi-Helm, F. Kunst, P. Glaser, J. Etienne, and C. Buchrieser.** 2008. Multigenome analysis identifies a worldwide distributed epidemic *Legionella pneumophila* clone that emerged within a highly diverse species. *Genome Res.* **18**:431-441.
5. **Cazalet, C., C. Rusniok, H. Bruggemann, N. Zidane, A. Magnier, L. Ma, M. Tichit, S. Jarraud, C. Bouchier, F. Vandenesch, F. Kunst, J. Etienne, P. Glaser, and C. Buchrieser.** 2004. Evidence in the *Legionella pneumophila* genome for exploitation of host cell functions and high genome plasticity. *Nat. Genet.* **36**:1165-1173.

6. **Chessel, D., A-B. Dufour, and J. Thioulouse.** 2004. The ade4 package - I : One-table methods. *R News* **4**:5-10.
7. **Chien, M., I. Morozova, S. Shi, H. Sheng, J. Chen, S. M. Gomez, G. Asamani, K. Hill, J. Nuara, M. Feder, et al.** 2004. The genomic sequence of the accidental pathogen *Legionella pneumophila*. *Science* **305**:1966-1968.
8. **Cleveland, W. S., E. Grosse, and W. M. Shyu.** 1992. Local regression models, Chapter 8 of statistical models in S. *In* J. M. Chambers, and T. J. Hastie (ed.), Wadsworth and Brooks/Cole.
9. **Cooper, V. S., D. Schneider, M. Blot, and R. E. Lenski.** 2001. Mechanisms causing rapid and parallel losses of ribose catabolism in evolving populations of *Escherichia coli* B. *J. Bacteriol.* **183**:2834-2841.
10. **Coscolla, M., M. J. Gosalbes, V. Catalan, and F. Gonzalez-Candelas.** 2006. Genetic variability in environmental isolates of *Legionella pneumophila* from Comunidad Valenciana (Spain). *Environ. Microbiol.* **8**:1056-1063.
11. **Culhane, A. C., G. Perrière, E. C. Considine, T. G. Cotter, and D. G. Higgins.** 2002. Between-group analysis of microarray data. *Bioinformatics* **18**:1600-1608.
12. **Deplano, A., M. Vaneechoutte, G. Verschraegen, and M. J. Struelens.** 1997. Typing of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strains by PCR analysis of inter-IS256 spacer length polymorphisms. *J. Clin. Microbiol.* **35**:2580-2587.
13. **Doléans, A., H. Aurell, M. Reyrolle, G. Lina, J. Freney, F. Vandenesch, J. Etienne, and S. Jarraud.** 2004. Clinical and environmental distributions of *Legionella* strains in France are different. *J. Clin. Microbiol.* **42**:458-460.

14. **Dolédéc, S., and D. Chessel.** 1987. Rythmes saisonniers et composantes stationnelles en milieu aquatique I- Description d'un plan d'observations complet par projection de variables. *Acta Oecol.* **8**:403-426.
15. **Eck, R. V., and M. O. Dayhoff.** 1966. Atlas of protein sequence and structure. National Biomedical Research Foundation, Silver Spring, Maryland.
16. **Edagawa, A., A. Kimura, H. Doi, H. Tanaka, K. Tomioka, K. Sakabe, C. Nakajima, and Y. Suzuki.** 2008. Detection of culturable and nonculturable *Legionella* species from hot water systems of public buildings in Japan. *J. Appl. Microbiol.* **105**:2104-2114.
17. **Farris, J. S.** 1977. Phylogenetic analysis under Dollo's law. *Syst. Zool.* **26**:77-88.
18. **Felsenstein, J.** 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* **39**:783-791.
19. **Felsenstein, J.** 1989. PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics* **5**:164-166.
20. **Fica, A. E., H. W. Horowitz, H. Lior, and F. C. Cabello.** 1994. Demonstration of persistence of *Salmonella typhimurium* in an AIDS patient by molecular methods. *J. Clin. Microbiol.* **32**:2327-2330.
21. **Fry, N. K., S. Alexiou-Daniel, J. M. Bangsberg, S. Bernander, M. Castellani Pastoris, J. Etienne, B. Forsblom, V. Gaia, J. H. Helbig, D. Lindsay, P. C. Lück, C. Pelaz, S. A. Uldum, and T. G. Harrison.** 1999. A multicenter evaluation of genotypic methods for the epidemiologic typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1: results of a pan-European study. *Clin. Microbiol. Infect.* **5**:462-477.
22. **Gaia, V., N. K. Fry, B. Afshar, P. C. Lück, H. Meugnier, J. Etienne, R. Peduzzi, and T. G. Harrison.** 2005. Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*. *J. Clin. Microbiol.* **43**:2047-2052.

23. **Gaia, V., N. K. Fry, T. G. Harrison, and R. Peduzzi.** 2003. Sequence-based typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 offers the potential for true portability in legionellosis outbreak investigation. *J. Clin. Microbiol.* **41**:2932-2939.
24. **Ginevra, C., M. Lopez, F. Forey, M. Reyrolle, H. Meugnier, F. Vandenesch, J. Etienne, S. Jarraud, and M. Molmeret.** 2009. Evaluation of a nested-PCR-derived sequence-based typing method applied directly to respiratory samples from patients with Legionnaires' disease. *J. Clin. Microbiol.* **47**:981-987.
25. **Glockner, G., C. Albert-Weissenberger, E. Weinmann, S. Jacobi, E. Schunder, M. Steinert, J. Hacker, and K. Heuner.** 2008. Identification and characterization of a new conjugation/type IVA secretion system (*trb/tra*) of *Legionella pneumophila* Corby localized on two mobile genomic islands. *Int. J. Med. Microbiol.* **298**:411-428.
26. **Harrison, T. G., B. Afshar, N. Doshi, N. K. Fry, and J. V. Lee.** 2009. Distribution of *Legionella pneumophila* serogroups, monoclonal antibody subgroups and DNA sequence types in recent clinical and environmental isolates from England and Wales (2000-2008). *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **28**:781-791.
27. **Helbig, J. H., S. Bernander, M. Castellani Pastoris, J. Etienne, V. Gaia, S. Lauwers, D. Lindsay, P. C. Lück, T. Marques, S. Mentula, M. F. Peeters, C. Pelaz, M. Struelens, S. A. Uldum, G. Wewalka, and T. G. Harrison.** 2002. Pan-European study on culture-proven Legionnaires' disease: distribution of *Legionella pneumophila* serogroups and monoclonal subgroups. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **21**:710-716.
28. **Helbig, J. H., E. Fernandez-Moreira, E. Jacobs, P. C. Lück and M. Witt.** 2006. Lipopolysaccharide architecture of *Legionella pneumophila* grown in broth and host cells, p. 261-264. *In* N. P. Cianciotto (ed.), *Legionella: state of the art 30 years after its recognition*. American Society for Microbiology, Washington, DC.

29. **Hunter, P. R., and M. A. Gaston.** 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* **26**:2465-2466.
30. **Huygens, F., G. R. Nimmo, J. Schooneveldt, W. J. Munckhof, and P. M. Giffard.** 2002. Genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by assaying for the presence of variable elements associated with *mecA*. *J. Clin. Microbiol.* **40**:3093-3097.
31. **Ichikawa, K., T. Yagi, M. Moriyama, T. Inagaki, T. Nakagawa, K. Uchiya, T. Nikai, and K. Ogawa.** 2009. Characterization of *Mycobacterium avium* clinical isolates in Japan using subspecies-specific insertion sequences, and identification of a new insertion sequence, ISMav6. *J. Med. Microbiol.* **58**:945-950.
32. **Joly, J. R., R. M. McKinney, J. O. Tobin, W. F. Bibb, I. D. Watkins, and D. Ramsay.** 1986. Development of a standardized subgrouping scheme for *Legionella pneumophila* serogroup 1 using monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.* **23**:768-771.
33. **Kluge, A. G., and J. S. Farris.** 1969. Quantitative phyletics and the evolution of anurans. *Systematic Zoology* **18**:1-32.
34. **Ko, K. S., H. Miyamoto, H. K. Lee, M. Y. Park, K. Fukuda, B. J. Park, and Y. H. Kook.** 2006. Genetic diversity of *Legionella pneumophila* inferred from *rpoB* and *dotA* sequences. *Clin. Microbiol. Infect.* **12**:254–261.
35. **Kozak, N. A., R. F. Benson, E. Brown, N. T. Alexander, T. H. Taylor Jr, B. G. Shelton, and B. S. Fields.** 2009. Distribution of *lag-1* alleles and sequence-based types among *Legionella pneumophila* serogroup 1 clinical and environmental isolates in the United States. *J. Clin. Microbiol.* **47**:2525-2535.
36. **Lebreton, J. D., R. Sabatier, G. Banco, and A. M. Bacou.** 1991. Principal component and correspondence analyses with respect to instrumental variables: an overview of their role in studies of structure-activity and species–environment relationships, p. 85 –114. *In J.*

Devillers, and W. Karcher W. (ed.), Applied Multivariate Analysis in SAR and Environmental Studies, Kluwer Academic Publishers.

37. **Lee, H. K., J. I. Shim, H. E. Kim, J. Y. Yu, and Y. H. Kang.** 2010. Distribution of *Legionella* species from environmental water sources of public facilities and genetic diversity of *L. pneumophila* sg 1 in Korea. Appl. Environ. Microbiol., in press. AEM00422-10.
38. **Luna, V. A., D. B. Jernigan, A. Tice, J. D. Kellner, and M. C. Roberts.** 2000. A novel multiresistant *Streptococcus pneumoniae* serogroup 19 clone from Washington State identified by Pulsed-Field Gel Electrophoresis and restriction fragment length patterns. J. Clin. Microbiol. **38**:1575-1580.
39. **Mahillon, J., and M. Chandler.** 1998. Insertion Sequences. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **62**:725-774. Margush, T. and F. R. McMorris. 1981. Consensus n-trees. Bulletin of Mathematical Biology **43**: 239-244
40. **Margush, T., and F. R. McMorris.** 1981. Consensus n-trees. Bull. Math. Biol. **43**:239-244.
41. **Mouchtouri, V., E. Velonakis, and C. Hadjichristodoulou.** 2007. Thermal disinfection of hotels, hospitals, and athletic venues hot water distribution systems contaminated by *Legionella* species. Am. J. Infect. Control **35**:623-627
42. **Nei, M., and W. H. Li.** 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**:5269-5273.
43. **Newton, H. J., D. K. Y. Ang, I. R. van Driel, and E. L. Hartland.** 2010. Molecular pathogenesis of infections caused by *Legionella pneumophila*. Clin. Microbiol. Rev. **23**:274-298.
44. **Papadopoulos, D., D. Schneider, J. Meier-Eiss, W. Arber, R. E. Lenski, and M. Blot.** 1999. Genomic evolution during a 10,000-generation experiment with bacteria. Proc. Natl.

Acad. Sci. USA **96**:3807-3812.

45. **R Development Core Team.** 2007. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, <http://www.R-project.org>. ISBN 3-900051-07-0.
46. **Rao, C.R.** 1964. The use and interpretation of principal component analysis in applied research. *Sankhya* **26**:329–359.
47. **Ratzow, S., V. Gaia, J. H. Helbig, N. K. Fry, and P. C. Lück.** 2007. Addition of *neuA*, the gene encoding N-acylneuraminyl transferase, increases the discriminatory ability of the consensus sequence-based scheme for typing *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. *J. Clin. Microbiol.* **45**:1965-1968.
48. **Reichardt, K., E. Jacobs, I. Röske, and J. H. Helbig.** 2010. *Legionella pneumophila* carrying the virulence-associated lipopolysaccharide epitope possesses two functionally different LPS components. *Microbiol.*, in press.
49. **Reimer, A. R., S. Au, S. Schindle, and K. A. Bernard.** 2010. *Legionella pneumophila* monoclonal antibody subgroups and DNA sequence types isolated in Canada between 1981 and 2009: Laboratory component of national surveillance. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **29**:191-205.
50. **Robinson, D. A., S. K. Hollingshead, J. M. Musser, A. J. Parkinson, D. E. Briles, and M. J. Crain.** 1998. The *IS1167* insertion sequence is a phylogenetically informative marker among isolates of serotype 6B *Streptococcus pneumoniae*. *J. Mol. Evol.* **47**:222-229.
51. **Rowbotham, T. J.** 1980. Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J. Clin. Pathol.* **33**:1179-1183.
52. **Saitou, N., and M. Nei.** 1987. The Neighbor-joining Method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**:406-425.

53. **Schilling, E. E.** 1997. Phylogenetic analysis of *Helianthus* (Asteraceae) based on chloroplast DNA restriction site data. *Theor. Appl. Genet.* **94**:925-933.
54. **Stout, J. E., and V. L. Yu.** 1997. Legionellosis. *N. Engl. J. Med.* **337**:682-687.
55. **Suzuki, H., Y. Kawamoto, O. Takenaka, I. Munechika, H. Hori, and S. Sakurai.** 1994. Phylogenetic relationships among *Homo sapiens* and related species based on restriction site variations in rDNA spacers. *Biochem. Genet.* **32**:257-269.
56. **Tamura, G. S., M. Herndon, J. Przekwas, C. E. Rubens, P. Ferrieri, and S. L. Hillier.** 2000. Analysis of Restriction Fragment Length Polymorphisms of the Insertion Sequence *IS1381* in group B Streptococci. *J. Infect. Dis.* **181**:364-368.
57. **Thioulouse, J., and S. Dray.** 2007. Interactive multivariate data analysis in R with the *ade4* and *ade4TkGUI* packages. *J. Stat. Softw.* **22**:1-14.
58. **Tijet, N., P. Tang, M. Romilowych, C. Duncan, V. Ng, D. N. Fisman, F. Jamieson, D. E. Low, and C. Guyard.** 2010. New endemic *Legionella pneumophila* serogroup 1 clones, Ontario, Canada. *Emerg. Infect. Dis.* **16**:447-454.
59. **Torrea, G., V. Chenal-Francisque, A. Leclercq, and E. Carniel.** 2006. Efficient tracing of global isolates of *Yersinia pestis* by restriction fragment length polymorphism analysis using three insertion sequences as probes. *J. Clin. Microbiol.* **44**:2084-2092.
60. **Vaidya, V. M., S. V. S. Malik, S. Kaur, S. Kumar, and S. B. Barbuddhe.** 2008. Comparison of PCR, immunofluorescence assay, and pathogen isolation for diagnosis of Q fever in humans with spontaneous abortions. *J. Clin. Microbiol.* **46**:2038-2044.
61. **Warren, R. M., T. C. Victor, E. M. Streicher, M. Richardson, G. D. van der Spuy, R. Johnson, V. N. Chihota, C. Loch, P. Supply, and P. D. van Helden.** 2004. Clonal expansion of a globally disseminated lineage of *Mycobacterium tuberculosis* with low *IS6110* copy numbers. *J. Clin. Microbiol.* **42**:5774-5782.
62. **Wellinghausen, N., C. Frost, and R. Marre.** 2001. Detection of legionellae in hospital

water samples by quantitative real-time LightCycler PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:3985-3993.

63. **Yáñez, M. A., C. Carrasco-Serrano, V. M. Barberá, and V. Catalán.** 2005. Quantitative detection of *Legionella pneumophila* in water samples by immunomagnetic purification and real-time PCR amplification of the *dotA* gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:3433-3441.
64. **Yoshida, T., N. Kondo, Y. A. Hanifah, and K. Hiramatsu.** 1997. Combined use of ribotyping, PFGE typing and IS431 typing in the discrimination of nosocomial strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Immunol.* **41**:687-695.
65. **Zuerner, R. L., and C. A. Bolin.** 1997. Differentiation of *Leptospira interrogans* isolates by IS1500 hybridization and PCR assays. *J. Clin. Microbiol.* **35**:2612-2617.

TABLES

TABLE 1. Strains of *L. pneumophila* isolated from non related cases with their PFGE, SBT, MAb and RFLP-IS profiles

City	Isolate number	PFGE ^a	SBT ^b	MAb ^c	RFLP-IS ^d
Paris Clamart	HL 0213 2010	Paris	ST1	Olda	000001011001101
Paris	HL 0051 4008	Paris	ST1	Olda	000011110001101
Annecy	HL 0228 2021	Paris	ST1	Philadelphia	000011011001101
Compiègne	HL 0215 1004	Paris	ST1	Philadelphia	000011011001101
Meaux	HL 0230 4016	Paris	ST1	Philadelphia	000011011011101
Paris	HL 0036 4001	Paris	ST1	Philadelphia	000011011001101
Paris	HL 0337 3012	Paris	ST1	Philadelphia	000010011001101
Paris	HL 0102 3035	Paris	ST1	Philadelphia	000011011001101
Paris	HL 0501 3042	unique	ST79	Olda	001001010001001

Poitiers HL 0323 1005 unique NA NA 000001011001111

^aPFGE, pulsed field gel electrophoresis. The PFGE profile is given for each isolate, with the Paris profile being similar to the one of the reference strain CIP107629 (5), while unique profiles differ by at least one fragment from the ones present in the library of the *Legionella* National Reference Center.

^bSBT, sequence-based typing. The ST number is given for each isolate, ST1 and ST79 corresponding to the 1-4-3-1-1-1-1 and 1-4-3-4-1-1-15 allelic codes, respectively. NA, not applicable since the *L. pneumophila* HL 0323 1005 isolate belongs to the serogroup 8. Its ST number has not been assigned as the *neuA* gene could not be sequenced which is typical for isolates of *L. pneumophila* serogroup other than 1.

^cMAb, monoclonal antibody typing. Isolates from group “Olda” react with MAb8/4 but not with MAb3/1 and MAb26/1 while isolates from group “Philadelphia” react with MAb8/4 and with MAb3/1 but not with MAb3 (27). NA, not applicable since MAb subtyping is specific to *L. pneumophila* serogroup 1 and the *L. pneumophila* HL 0323 1005 isolate belongs to the serogroup 8. Although MAb subtyping may not be reliable since the expression of the lipopolysaccharide types that react with the monoclonal antibodies is prone to phase variation and may also depend on the growth stage (28), it was shown recently that the MAb3/1 epitope is expressed during all growth phases (48). Moreover, MAb typing is widely used according to strictly standardized protocols to take these potential questions into consideration.

^dRFLP-IS, restriction fragment length polymorphism using IS elements as probes. Here, only the RFLP-IS hybridization scoring for the most discriminating ISLpn11 is given with 0 and 1

corresponding to the absence and presence, respectively, of each of the 15 hybridizing IS-containing fragments.

TABLE 2. Isolates of *L. pneumophila* Paris, as determined by PFGE typing, sampled from patients and from putative corresponding contaminating sources of 25 epidemiological investigations

Epidemiological investigation	Year of isolation	Isolate	Origin	City ^a
1	2001	HL 0128 1038	clinical	Paris 15ème
		2001 I n°1	environmental	Paris 15ème
		2001 I n°2	environmental	Paris 15ème
		HL 0128 4004	environmental	Paris 15ème
2	2002	HL 0230 4014	clinical	Meaux
		HL 0230 4015	clinical	Meaux
		HL 0230 4016	clinical	Meaux
		HL 0230 4019	environmental	Meaux
		HL 0230 4021	environmental	Meaux
3	2002	HL 0233 3024	clinical	Evry
		HL 0234 2010	environmental	Evry
		HL 0234 2011	environmental	Evry
4	2003	HL 0311 1002	clinical	Nice
		HL 0311 1005	environmental	Nice
		HL 0311 1006	environmental	Nice
5	2003	HL 0312 2043	clinical	Clermont Ferrand

		HL 0312 2044	environmental	St Etienne
6	2003	HL 0315 5019	clinical	Nice
		HL 0317 3023	clinical	Nice
		HL 0317 3011	environmental	Nice
		HL 0317 3008	environmental	Nice
7	2003	HL 0332 1022	clinical	Rouen
		HL 0333 2001	environmental	Rouen
		HL 0333 2002	environmental	Rouen
8	2004	HL 0416 3014	clinical	Brest
		HL 0416 3015	environmental	Brest
		HL 0416 3016	environmental	Brest
9	2004	HL 0425 3033	clinical	Eaubonne
		HL 0427 4016	clinical	Eaubonne
		HL 0427 4017	environmental	Eaubonne
		HL 0427 4018	environmental	Eaubonne
10	2004	HL 0428 3017	clinical	Strasbourg
		HL 0430 4020	environmental	Strasbourg
11	2004	HL 0430 4040	clinical	Nice
		HL 0430 4043	environmental	Nice
		HL 0430 4044	environmental	Nice
12	2005	HL 0504 5030	clinical	Marseille
		HL 0504 5031	environmental	Marseille
13	2005	HL 0525 4042	clinical	Nice
		HL 0526 3026	environmental	Nice
14	2005	HL 0530 1024	clinical	Nantes

		HL 0531 4007	environmental	Poitiers
		HL 0531 4008	environmental	Poitiers
		HL 0650 5002	environmental	Poitiers
15	2005	HL 0533 5004	clinical	Amiens
		HL 0532 3007	environmental	Tours
		HL 0532 3008	environmental	Tours
16	2005	HL 0534 5006	clinical	Beauvais
		HL 0534 5007	environmental	Beauvais
		HL 0534 5008	environmental	Beauvais
17	2005	HL 0534 3013	clinical	Grenoble
		HL 0540 1036	environmental	Grenoble
18	2006	HL 0631 2017	clinical	Argenteuil
		HL 0631 5002	environmental	Eaubonne
		HL 0631 5003	environmental	Eaubonne
19	2006	HL 0641 5016	clinical	Montpellier
		HL 0644 4026	environmental	Fréjus
		HL 0644 1005	environmental	Fréjus
20	2006	HL 0644 2011	clinical	Nice
		HL 0644 2012	clinical	Nice
		HL 0644 5004	environmental	Nice
21	2007	HL 0701 3011	clinical	Rueil Malmaison
		HL 0701 3003	environmental	Rueil Malmaison
		HL 0701 3004	environmental	Rueil Malmaison
22	2006	HL 0651 3023	clinical	Annecy
		HL 0703 5017	environmental	Annecy

		HL 0703 5018	environmental	Annecy
23	2007	HL 0712 5004	clinical	Aulnay
		HL 0714 2027	environmental	Aulnay
24	2007	LG 0713 5006	clinical	Paris 15ème
		LG 0713 5007	environmental	Paris 15ème
		LG 0713 5008	environmental	Paris 15ème
		LG 0725 3019	environmental	Paris 15ème
		LG 0725 3022	environmental	Paris 15ème
25	2007	LG 0725 4014	clinical	Argenteuil
		LG 0725 5011	environmental	Eaubonne

^aFor clinical isolates, the city where the patients were hospitalized is given.

TABLE 3. Primers used to generate the IS-derived probes

Primer	Sequence	IS
PLP71	5'-GAATTCGTTGAAGTAGCTCACTGATTCATTG-3'	<i>ISLpn9</i>
PLP72	5'-TAAAATTGCTAATCTTCACAACAGTTTTTC-3'	
PLP73	5'-ATTAATTGAAAAGAAGGCAGTTTTATAGTGG-3'	<i>ISLpn10</i>
PLP74	5'-GCGCATCCAAATGAGCGCTCCGGCCAAATG-3'	
PLP75	5'-GAGCAGTTACTTTTTTAAAGTGTACATTAAC-3'	<i>ISLpn1</i>
PLP76	5'-ACTCAGCTCAAAGCGCCACATTCAATAAATG-3'	
PLP77	5'-ATGCCCAAGAAAGATTGTATCCTAAATTTAC-3'	<i>ISLpn11</i>
PLP78	5'-TCAAGAACACAAAACCTTTAACCTTAACCTAT-3'	
PLP81	5'-TAGTTGTATTCCTGATTAGAGTTCTCCAAG-3'	<i>ISLpn8</i>
PLP82	5'-CCCCATATTTAGTGGCATCCTAAATTAGAG-3'	
PLP85	5'-TTTGCCGACTGAAAATTGATCCCCCTACTATAG-3'	<i>ISLpn12</i>

TABLE 4. Characteristics of potentially functional IS elements detected in *L. pneumophila* Paris

Name	Family	Sub-group	Gene ORF1	Gene ORF2	End	IR (bp)	DR (bp)	Length (bp)	Copy number			
									Paris	Philadelphia	Lens	Corby
<i>ISLpn1</i>	IS4	IS10	<i>lpp0125</i>	No	CT	16	0	1,355	2	0	0	0
<i>ISLpn8</i>	IS3	IS407	<i>lpp0199</i>	<i>lpp0200</i>	TG	32	0	1,199	2	2	1	0
<i>ISLpn9</i>	IS4	IS10	<i>lpp0038</i>	<i>lpp0039</i>	CT	60	9	1,628	7(+2) ^a	1	0	0
<i>ISLpn10</i>	IS5	IS427	<i>lpp0083</i>	No	GG	22	2	896	2	0	0	0
<i>ISLpn11^b</i>	ISL3		<i>lpp2037</i>	No	GG	20	8	1,326	6	0(+1) ^a	0	1
<i>ISLpn12</i>	IS21		<i>lpp1563</i>	<i>lpp1564</i>	TG	41	7	1,996	2	0	0	1

For each IS element, the following features are given: family and sub-group belonging, name of the genes encoding ORF1 and ORF2, last two nucleotides, length of IRs, length of the direct repeats (DR) generated upon insertion of the IS, total length, and copy number in the genome of the four strains Paris, Lens (5), Philadelphia (7) and Corby (25).

^aIn some cases, truncated copies of some IS elements are present and their number are indicated in parentheses.

^bWhile one of the six *ISLpn11* copies in *L. pneumophila* Paris presented no duplication of the target site, the five others led to 8-bp duplications of the insertion target, with no obvious similarity between them (data not shown). Moreover, the insertion sites are widely distributed on the Paris chromosome, even if two insertions occurred close to tRNA-encoding genes,

tRNALys and tRNAMet, respectively. In the Philadelphia strain, the unique ISLpn11 copy is also localized close to the tRNAMet-encoding gene.

TABLE 5. Differentiation of 76 *L. pneumophila* Paris isolates sampled from patients and potential contaminating roots by SBT, MAb and RFLP-IS

	1 method ^a		2 methods		3 methods		
	SBT	MAb	RFLP-IS	SBT+MAb	RFLP-IS+SBT	RFLP-IS+MAb	RFLP-IS+SBT+MAb
Different profiles	4	6	14	8	17	23	25
Unique profiles	1	0	7	1	8	10	11
Related cases (%)	24(96%)	17(68%)	18(72%)	17(68%)	18(72%)	14(56%)	14(56%)
Simpson's index D	14%	53%	80%	58%	82%	88%	90%

^aFor each typing method and each combination of methods, the number of different and unique profiles is given together with the number of related cases which correspond to epidemiological investigations with one or more environmental isolates presenting the same profile as the corresponding isolate sampled from patients. The Simpson's index (D) is calculated for each method or combination of methods.

FIGURE LEGENDS

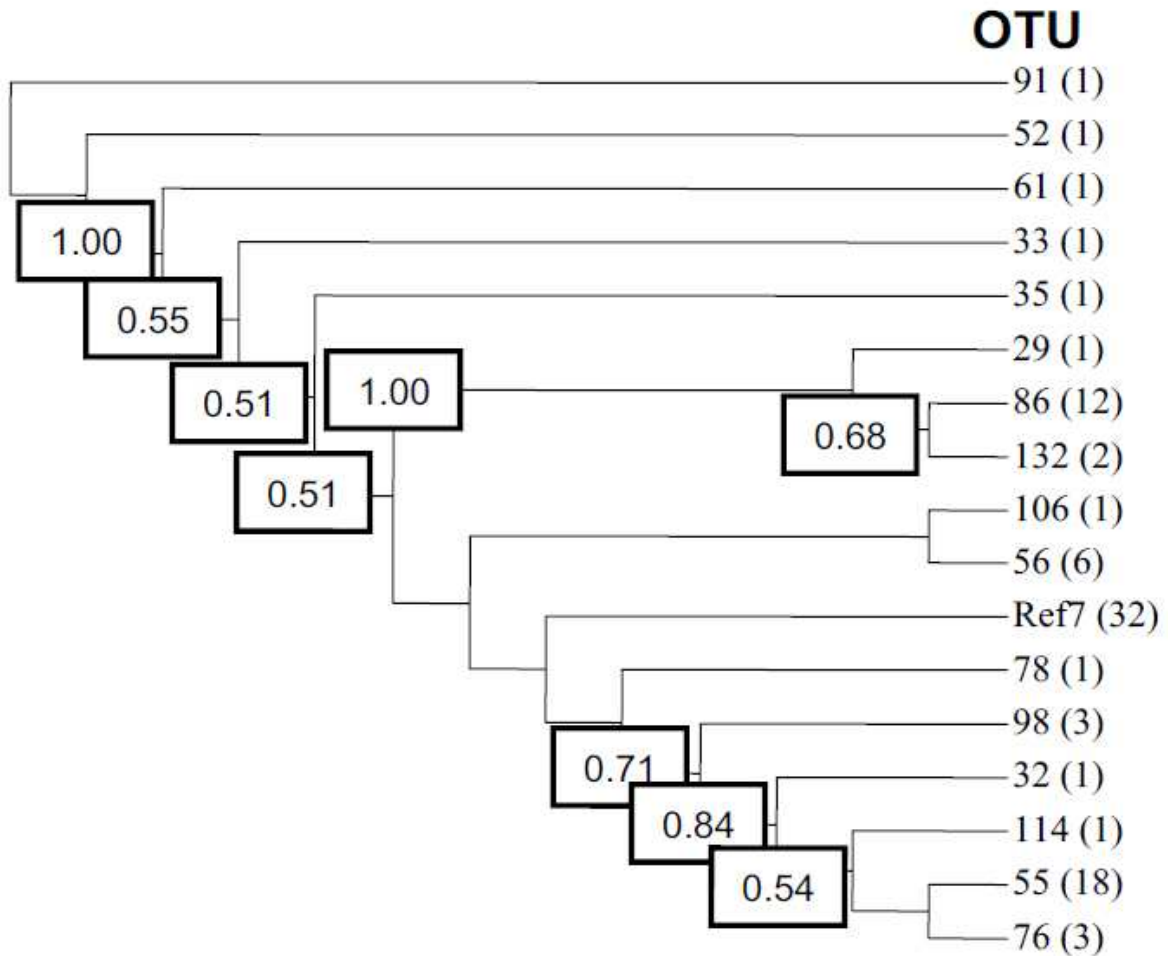


FIG. 1. Wagner parsimony phylogenetic tree. By using RFLP-IS, 17 different OTUs were found and the number of isolates showing the corresponding profile is indicated in parentheses. Ref7 is the OTU of the reference *L. pneumophila* strain Paris as well as the most represented profile. Boxes indicate consensus levels above 50 %.

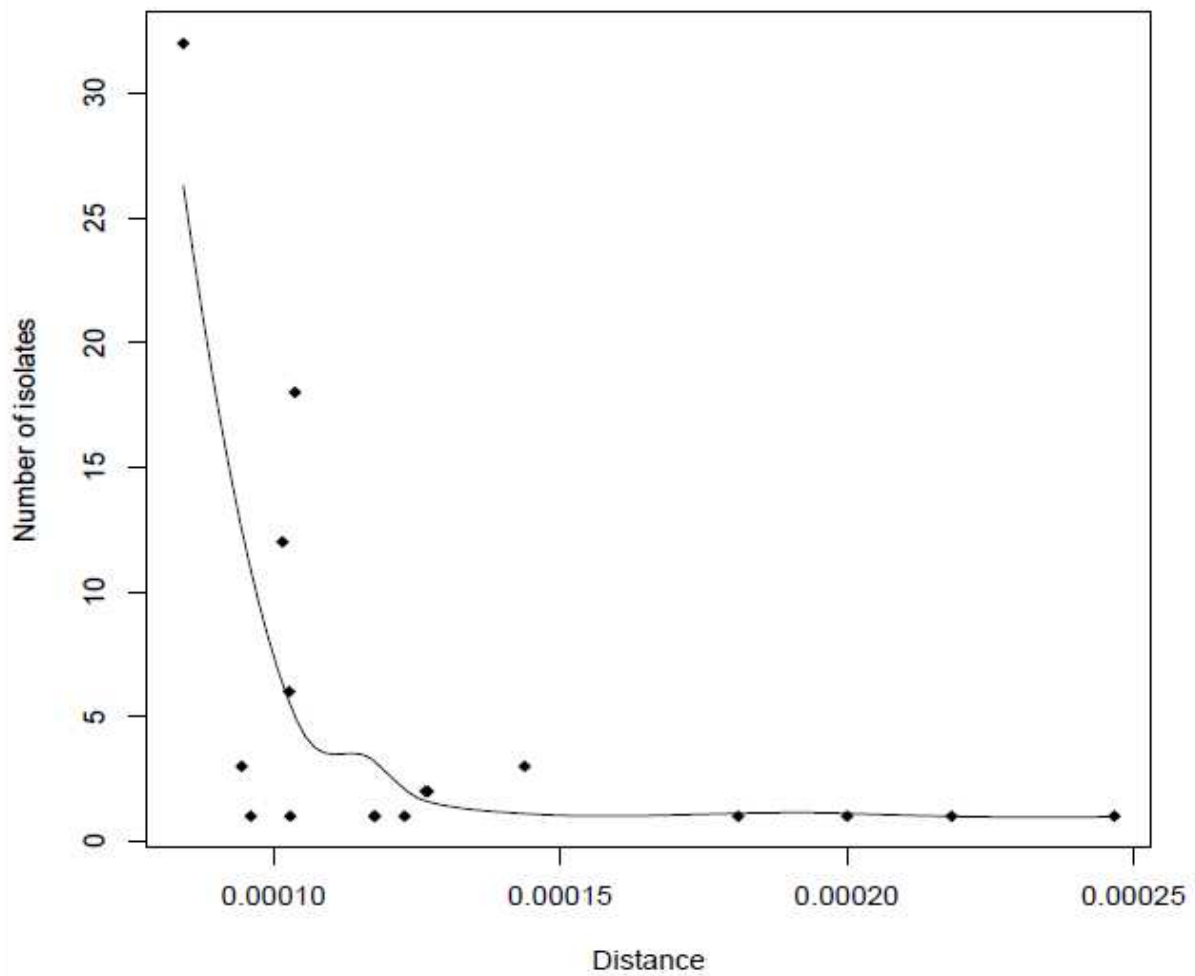


FIG. 2. Relationship between distance and the number of isolates within each OTU. For each of the 17 OTUs, the average distance is calculated to each other and is expressed as substitutions/site. Diamonds represent data points and the curve is a locally weighted regression (Loess model, 8) of the number of isolates against the average distance between OTU.

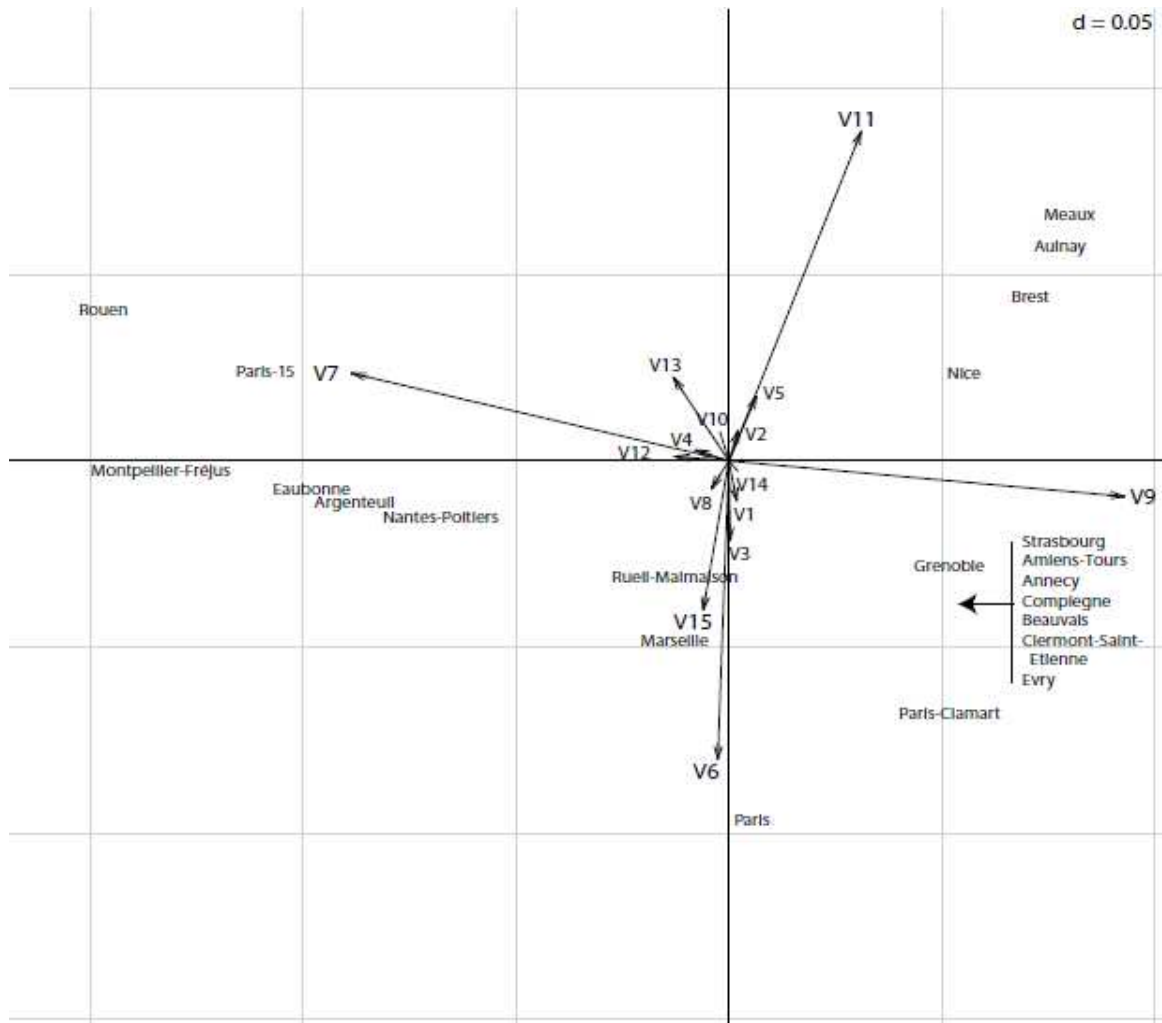


FIG. 3. Between-Group Analysis of the presence of IS elements in 86 *Legionella* isolates sampled from 26 cities. The 86 isolates from Tables 1 and 2 were included in the analysis. Difference between cities is highly statistically significant ($p \approx 0.001$). The scale is given in the upper right corner of the graph by the value d , which is the size of the background grid.

Chapitre 5 : Conclusions et perspectives

I. Implication des protéines IHF et Dps dans la virulence

Les bactéries du genre *Legionella* présentent une forte plasticité de leur génome ce qui leur permet probablement de s'adapter aux nombreuses conditions de l'environnement qu'elles rencontrent. Les résultats que nous avons obtenus avec les mutants des gènes codant les protéines de type histone Dps et IHF révèlent leur implication dans l'adaptation de ces bactéries à la fois *in vitro* suite à différents stress et *in vivo* dans les macrophages humains. Les protéines Dps et IHF sont impliquées dans différents processus : la virulence et d'une part la sensibilité au stress oxydatif pour Dps et d'autre part la résistance aux carences nutritionnelles et l'entrée dans l'état VBNC pour IHF. Ces deux protéines pourraient ainsi intervenir à différentes étapes du cycle de réplication intracellulaire.

Concernant la protéine Dps, nos résultats suggèrent qu'elle pourrait être impliquée à deux étapes différentes du cycle infectieux. De par son implication dans la diminution de la sensibilité au stress oxydatif, elle pourrait d'une part permettre une meilleure survie dans la vacuole phagocytaire. Cependant, Dps n'est impliquée dans la réplication intracellulaire qu'à l'intérieur des macrophages humains et ne semble pas avoir d'effet dans les cellules amibiennes. La différence de multiplication du mutant *dps* dans les amibes et les macrophages pourrait alors être liée à une différence de concentration de radicaux oxydatifs dans les vacuoles. Pour confirmer cette hypothèse, il serait intéressant de mesurer le taux de radicaux contenus dans ces vacuoles au cours de la multiplication. D'autre part, au vu des différences observées pour le mutant *dps* entre les expériences de réplication intracellulaire, de cytotoxicité et d'hémolyse, la protéine Dps pourrait également être impliquée dans la lyse cellulaire à la fin du cycle infectieux, un défaut de lyse conduisant à une diminution du nombre de bactéries relarguées (Figure 22). La protéine Dps serait alors impliquée soit dans la formation de pores dans les cellules hôtes soit dans la régulation de gènes impliqués dans

cette activité. La comparaison des profils globaux de transcription entre souches de référence et mutante devrait apporter des informations à ce sujet.

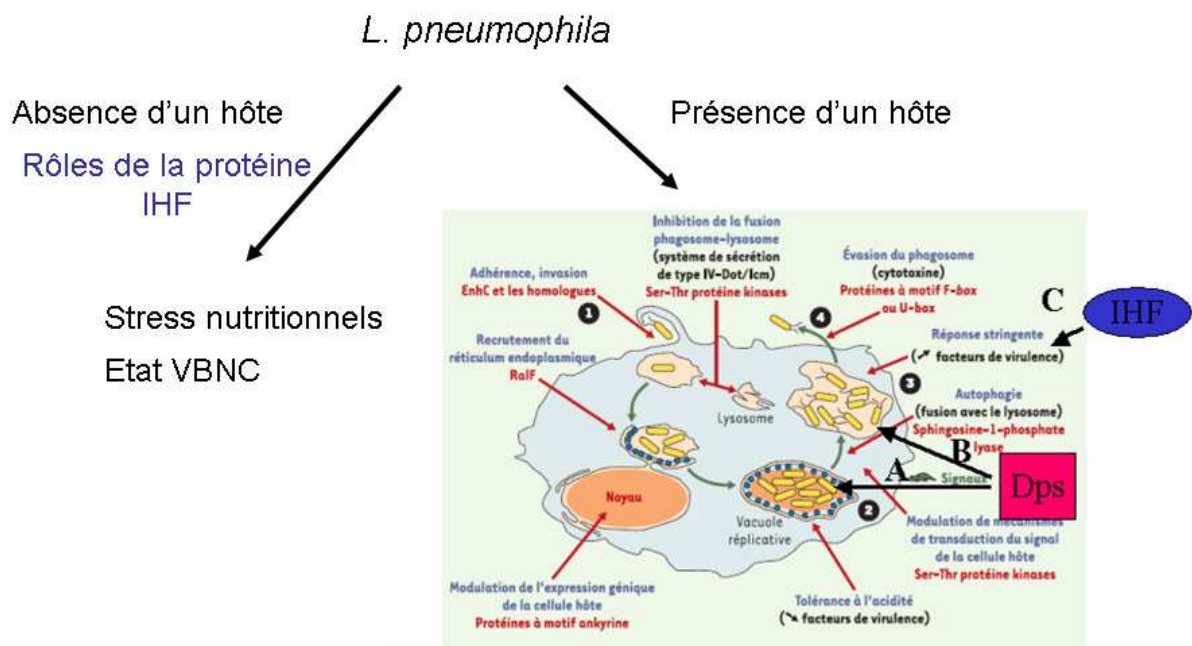


Figure 22 : Intervention potentielle des protéines Dps et IHF au cours du cycle intracellulaire de *L. pneumophila* dans les macrophages humains. En bleu sont indiquées les étapes importantes dans le cycle infectieux de *L. pneumophila*. En rouge sont indiquées les protéines connues pour interférer dans ces étapes du cycle cellulaire. En noir sont indiqués les effets potentiels des protéines de type histone Dps et IHF. A. Implication potentielle de Dps dans la tolérance au stress oxydatif. B. Implication de Dps dans la lyse cellulaire. C. Implication d'IHF dans le contrôle de l'expression des facteurs de virulence. Selon Cazalet *et al.* (2005).

Nos résultats concernant la protéine IHF suggèrent qu'elle serait impliquée dans la cascade de régulation contrôlant l'expression des facteurs de virulence. En effet, la comparaison des profils globaux de transcription du mutant des gènes codant IHF et de la souche de référence de *L. pneumophila* suggère que IHF influence l'expression de gènes codant des régulateurs globaux connus pour réguler la virulence chez *L. pneumophila* : RpoS,

CsrA et le petit ARN *rsmZ* (Figure 23). La protéine IHF permettrait la régulation du passage de la phase répllicative à la phase transmissive et ce, de deux façons complémentaires (Figure 22). D'une part, IHF réprimerait la transcription du gène *csrA* codant CsrA, le répresseur des gènes impliqués dans la phase transmissive et qui est nécessaire à la phase répllicative. D'autre part, IHF activerait la transcription des gènes *rpoS* et *rsmZ* codant tous deux des régulateurs nécessaires à la phase transmissive. La protéine IHF est donc un régulateur impliqué dans le changement de phase chez *Legionella*. De plus, la protéine IHF participe à la régulation de l'expression de gènes impliqués dans la synthèse du flagelle, même si l'effet n'est pas absolu, puisque les observations microscopiques montrent la présence de flagelles chez le mutant dépourvu de la protéine IHF.

Enfin, IHF serait impliquée dans la survie et la cultivabilité suite à des carences nutritionnelles prolongées. De plus, la présence d'amibes permet de restaurer partiellement la cultivabilité, ce qui n'est pas le cas de la souche sauvage. Ces résultats suggèreraient ainsi qu'un mutant IHF pourrait être altéré dans le passage à un état de type VBNC et que la protéine IHF pourrait ainsi constituer un point de contrôle du moment d'entrée dans l'état VBNC, lorsque les conditions environnementales sont altérées. La protéine IHF serait ainsi, également *in vitro*, un point de contrôle assurant la transition entre deux états physiologiques. Le mécanisme par lequel IHF contrôlerait cette transition n'a pas été mis en évidence pour le moment.

Les effets des PTH que nous avons observés d'une part sur les phénotypes de sensibilité *in vitro* et de virulence *in vivo* et d'autre part sur l'expression globale des gènes pourraient également être réalisés via leur impact sur la superhélicité de l'ADN. Selon cette hypothèse, des modifications de la superhélicité de l'ADN pourraient ainsi jouer un rôle dans la virulence de *L. pneumophila*, comme cela a été décrit chez d'autres pathogènes (McEvoy *et*

al., 2007; Siguier *et al.*, 2006). Il serait ainsi intéressant d'étudier l'impact de changements de superhélicité de l'ADN sur les phénotypes de virulence chez *L. pneumophila*.

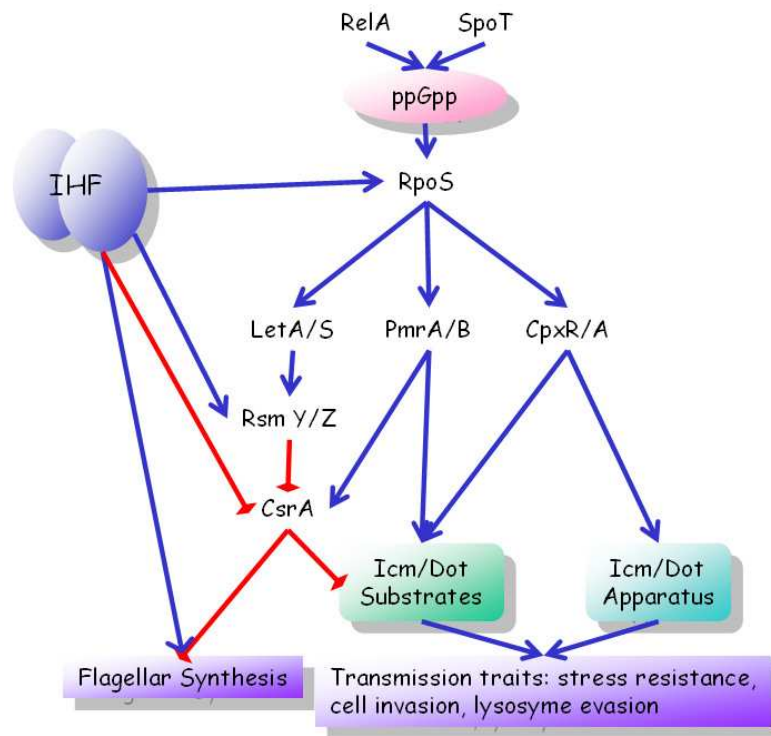


Figure 23 : Modèle de régulation de la virulence chez *L. pneumophila*. Les traits en rouge terminés par une barre indiquent une régulation négative, les flèches en bleu une régulation positive.

II. Réseau de régulation des protéines de type histone

Au cours de cette thèse, seul l'effet de deux protéines de type histone, Dps et IHF, sur la virulence de *L. pneumophila* a été étudié. Chez *L. pneumophila*, il existe deux autres protéines de type histone, Fis et HU, avec une spécificité originale en ce qui concerne Fis. En effet, les bactéries du genre *Legionella* sont les seules connues à ce jour pour présenter trois gènes codant des protéines homologues de Fis. L'étude de ces trois protéines Fis est en cours au sein de notre équipe par le Dr. Elisabeth Kay. Nos résultats préliminaires révèlent l'implication de Fis dans certains phénotypes de virulence. La protéine HU quant à elle

semble être requise pour la survie de cette bactérie, au vu de résultats publiés (Morash *et al.*, 2009).

Les PTH ont un rôle important de façon générale dans l'adaptation des bactéries à leur environnement et plus spécifiquement dans la virulence des bactéries pathogènes. Ici, nous avons démontré l'implication des PTH majeures dans la virulence chez *L. pneumophila*. Tous ces résultats nous ont conduit à émettre l'hypothèse qu'un réseau de régulation, centré autour des PTH, pourrait exister et être impliqué dans le contrôle des phénotypes de virulence. La dynamique de ce réseau permettrait alors l'adaptation de *L. pneumophila* aux fluctuations de l'environnement et serait ainsi impliquée dans le contrôle de la virulence et en particulier de la transition entre phases répllicative et transmissive. Pour valider ou infirmer cette hypothèse, un modèle de réseau de régulation des protéines de type histone est en cours d'élaboration, en collaboration avec le professeur Hans Geiselmann. Le but est de rechercher des connexions régulatrices entre les PTH, ainsi que d'autres acteurs intervenant dans le contrôle de la topologie de l'ADN, puis d'intégrer ces données au sein d'un modèle mathématique. Ce modèle prédictif pourra servir à terme à associer un état du réseau à un phénotype, comme la virulence. Il devrait permettre par ailleurs d'orienter l'expérimentation en prédisant l'effet de la perte d'un des composants du modèle par exemple. Il serait aisé de tester le modèle en obtenant un mutant pour l'un des gènes et de mesurer l'expression des autres dans ce mutant.

Au cours de ma thèse, j'ai commencé à obtenir les données nécessaires à l'établissement d'un tel modèle, à savoir la recherche de connexions transcriptionnelles entre gènes de PTH notamment. Pour ce faire, j'ai mesuré la transcription de dix gènes à différents temps au cours de la croissance de *L. pneumophila* en milieu liquide *in vitro* par PCR semi-quantitative. Les dix gènes en question sont *gyrA* et *topA*, codant une sous-unité de la gyrase et la TopoI respectivement, *ihfA* et *ihfB* codant les deux sous-unités de IHF, le gène *hubB* codant HU, *dps*, *rpoS* et les trois gènes codant chacune des trois protéines Fis. Les profils de

transcription de ces gènes ont été réalisés à partir des ARN extraits au cours de la croissance de cinq souches différentes : la souche de référence *L. pneumophila* Paris et les quatre mutants *dps*, *ihfA*, *ihfB* et *ihfAB*. Les résultats obtenus, comme attendu selon notre hypothèse, montrent une régulation croisée des gènes codant les PTH entre eux. Cependant, aucun réseau intuitif simple ne peut être déduit de ces interactions et cela nécessite ainsi l'établissement d'un modèle plus élaboré qui est actuellement en cours de réalisation.

III. Les séquences d'insertion comme marqueurs moléculaires

Le suivi épidémiologique, et notamment la capacité de discrimination entre les isolats, sont extrêmement importants, car ils permettent de déterminer la source de la contamination. De plus, une détection rapide du foyer infectieux permet de traiter la source et d'éviter de nouvelles contaminations. Cependant à l'heure actuelle, aucun outil épidémiologique ne permet de distinguer entre eux les isolats de la souche *L. pneumophila* Paris. Or cette souche est retrouvée partout en Europe, où elle est impliquée dans plus de 10 % des cas de légionellose (Aurell *et al.*, 2003). Une partie des travaux de cette thèse a consisté à trouver un nouveau marqueur moléculaire pour la discrimination des isolats *L. pneumophila* de type Paris entre eux. L'utilisation des séquences d'insertion IS et notamment l'une d'entre elles, *ISLpn11*, a permis d'obtenir un tel outil. Son utilisation devrait permettre de conforter la détermination d'un foyer d'infection. En effet, le pouvoir discriminant d'*ISLpn11* est bien plus important que les techniques utilisées aujourd'hui et son utilisation permet également d'accroître le seuil de confiance pour la détection de la source de l'infection. La distinction moléculaire entre isolats proches génétiquement est donc accrue. Ces résultats suggèrent ainsi une activité importante de l'*ISLpn11*, ce qui pourrait contribuer à la plasticité et à la variabilité des bactéries du genre *Legionella*. Cette IS pourrait ainsi être impliquée dans les capacités d'adaptation de ces bactéries à leur environnement.

Alors que les IS ont été utilisées comme marqueurs génomiques chez de nombreuses bactéries, il s'agit de la première étude de ce type chez *Legionella*. Ceci est sans doute lié au fait qu'à l'heure actuelle, aucune donnée concernant les IS des bactéries du genre *Legionella* n'a été publiée. Deux types d'études peuvent être envisagées : une globale afin d'analyser la transposition des IS en fonction des conditions de l'environnement et une, plus spécifique, pour analyser la transposition d'IS*Lpn11*. En effet, il serait pertinent, au vu de nos résultats, d'étudier la transposition d'IS*Lpn11* en fonction des conditions de l'environnement. Pour le premier type d'étude, une stratégie de piège à transposons pourrait être développée. Brièvement, un plasmide répliquatif chez les bactéries du genre *Legionella*, portant un gène de résistance à un antibiotique sous le contrôle d'un répresseur codé par un gène porté par ce même plasmide, est introduit chez *Legionella*. Puis, une sélection des bactéries sur milieu contenant l'antibiotique est réalisée. Les bactéries résistantes sont celles présentant une mutation dans le gène répresseur. Les plasmides mutants sont alors analysés quant à la nature des mutations, certaines d'entre elles pouvant correspondre à des insertions d'IS.

Plusieurs caractéristiques sont en faveur de la fonctionnalité d'IS*Lpn11*. D'une part, la variabilité des profils d'hybridation des isolats de *L. pneumophila* Paris obtenus avec IS*Lpn11* suggère une activité élevée. D'autre part, les profils globaux de transcription réalisés pour la souche de référence *L. pneumophila* Paris et les souches mutantes déficientes pour IHF révèlent la présence d'un transcrit correspondant à cette IS. Afin d'analyser l'effet de l'état physiologique des bactéries sur l'activité de transposition d'IS*Lpn11*, deux types d'expériences sont envisageables : (i) la transcription du gène de la transposase d'IS*Lpn11* peut être étudiée dans différentes conditions de cultures, *in vitro* et *in vivo* lors de l'infection d'un hôte eucaryote, (ii) un gène rapporteur codant la protéine fluorescente verte GFP peut être cloné entre les séquences inversées répétées d'IS*Lpn11* et les variations d'expression peuvent alors être mesurées par fluorescence.

De façon générale, les résultats obtenus au cours de cette thèse nous ont permis de démontrer l'impact des réseaux de régulation de l'expression des gènes, et en particulier des PTH, sur les phénotypes de sensibilité à des stress *in vitro* et de virulence *in vivo* chez *L. pneumophila*. L'adaptation de cette bactérie à ses environnements très divers dépend ainsi de la plasticité fonctionnelle de son génome.

Nous avons également démontré que la plasticité structurale du génome de *L. pneumophila* pouvait constituer un très bon outil épidémiologique pour identifier la source de l'infection au cours d'une épidémie et pour discriminer entre eux des isolats de la souche la plus communément retrouvée lors d'épidémies de légionellose en Europe.

Références bibliographiques

- Abu Kwaik Y, Eisenstein BI & Engleberg NC (1993) Phenotypic modulation by *Legionella pneumophila* upon infection of macrophages. *Infect. Immun* **61**: 1320-1329
- Abu Kwaik Y, Gao LY, Harb OS & Stone BJ (1997) Transcriptional regulation of the macrophage-induced gene (*gspA*) of *Legionella pneumophila* and phenotypic characterization of a null mutant. *Mol. Microbiol* **24**: 629-642
- Abu Kwaik Y & Pederson LL (1996) The use of differential display-PCR to isolate and characterize a *Legionella pneumophila* locus induced during the intracellular infection of macrophages. *Mol. Microbiol* **21**: 543-556
- Abu-Zant A, Jones S, Asare R, Suttles J, Price C, Graham J & Kwaik YA (2007) Anti-apoptotic signalling by the Dot/Icm secretion system of *L. pneumophila*. *Cell. Microbiol* **9**: 246-264
- Adeleke A, Pruckler J, Benson R, Rowbotham T, Halablab M & Fields B (1996) *Legionella*-like amebal pathogens--phylogenetic status and possible role in respiratory disease. *Emerging Infect. Dis* **2**: 225-230
- Adeleke AA, Fields BS, Benson RF, Daneshvar MI, Pruckler JM, Ratcliff RM, Harrison TG, Weyant RS, Birtles RJ, Raoult D & Halablab MA (2001) *Legionella drozanskii* sp. nov., *Legionella rowbothamii* sp. nov. and *Legionella fallonii* sp. nov.: three unusual new *Legionella* species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol* **51**: 1151-1160
- Akermi M, Doleans A, Forey F, Reyrolle M, Meugnier H, Freney J, Vandenesch F, Etienne J & Jarraud S (2006) Characterization of the *Legionella anisa* population structure by pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiol. Lett* **258**: 204-207
- Albert-Weissenberger C, Sahr T, Sismeiro O, Hacker J, Heuner K & Buchrieser C (2010) Control of flagellar gene regulation in *Legionella pneumophila* and its relation to growth phase. *J. Bacteriol* **192**: 446-455
- Alexandre V & Blanco M (1987) Heterogeneity in the level of ampicillin resistance conferred by pBR322 derivatives with different DNA supercoiling. *Mol. Gen. Genet* **209**: 56-60
- Ali Azam T, Iwata A, Nishimura A, Ueda S & Ishihama A (1999) Growth phase-dependent variation in protein composition of the *Escherichia coli* nucleoid. *J. Bacteriol* **181**: 6361-6370
- Ali BM, Amit R, Braslavsky I, Oppenheim AB, Gileadi O & Stavans J (2001) Compaction of single DNA molecules induced by binding of integration host factor (IHF). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **98**: 10658-10663
- Al-Khodor S, Kalachikov S, Morozova I, Price CT & Abu Kwaik Y (2009) The PmrA/PmrB two-component system of *Legionella pneumophila* is a global regulator required for intracellular replication within macrophages and protozoa. *Infect. Immun* **77**: 374-386
- Allard KA, Dao J, Sanjeevaiah P, McCoy-Simandle K, Chatfield CH, Crumrine DS, Castignetti D & Cianciotto NP (2009) Purification of Legiobactin and importance of

- this siderophore in lung infection by *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun* **77**: 2887-2895
- Allard KA, Viswanathan VK & Cianciotto NP (2006) lbtA and lbtB are required for production of the *Legionella pneumophila* siderophore legiobactin. *J. Bacteriol* **188**: 1351-1363
- Allegra S, Berger F, Berthelot P, Grattard F, Pozzetto B & Riffard S (2008) Use of flow cytometry to monitor *Legionella* viability. *Appl. Environ. Microbiol* **74**: 7813-7816
- Alleron L, Merlet N, Lacombe C & Frère J (2008) Long-Term Survival of *Legionella pneumophila* in the Viable But Nonculturable State After Monochloramine Treatment. *Current Microbiology* **57**: 497-502
- Almahmoud I, Kay E, Schneider D & Maurin M (2009) Mutational paths towards increased fluoroquinolone resistance in *Legionella pneumophila*. *J. Antimicrob. Chemother* **64**: 284-293
- Almirón M, Link AJ, Furlong D & Kolter R (1992) A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli*. *Genes Dev* **6**: 2646-2654
- Altman E & Segal G (2008) The response regulator CpxR directly regulates expression of several *Legionella pneumophila* icm/dot components as well as new translocated substrates. *J. Bacteriol* **190**: 1985-1996
- Altuvia S, Almirón M, Huisman G, Kolter R & Storz G (1994) The dps promoter is activated by OxyR during growth and by IHF and sigma S in stationary phase. *Mol. Microbiol* **13**: 265-272
- Amel BK, Amine B & Amina B (2008) Survival of *Vibrio fluvialis* in seawater under starvation conditions. *Microbiol. Res* **163**: 323-328
- Andrews SC, Robinson AK & Rodríguez-Quinones F (2003) Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol. Rev* **27**: 215-237
- Anuchin AM, Mulyukin AL, Suzina NE, Duda VI, El-Registan GI & Kaprelyants AS (2009) Dormant forms of *Mycobacterium smegmatis* with distinct morphology. *Microbiology (Reading, Engl.)* **155**: 1071-1079
- Aragon V, Rossier O & Cianciotto NP (2002) *Legionella pneumophila* genes that encode lipase and phospholipase C activities. *Microbiology (Reading, Engl.)* **148**: 2223-2231
- Arfin SM, Long AD, Ito ET, Tolleri L, Riehle MM, Paegle ES & Hatfield GW (2000) Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12. The effects of integration host factor. *J. Biol. Chem* **275**: 29672-29684
- Aurell H, Etienne J, Forey F, Reyrolle M, Girardo P, Farge P, Decludt B, Campese C, Vandenesch F & Jarraud S (2003) *Legionella pneumophila* serogroup 1 strain Paris: endemic distribution throughout France. *J. Clin. Microbiol* **41**: 3320-3322

- Avery OT, Macleod CM & McCarty M (1944) Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* type III. *J. Exp. Med* **79**: 137-158
- Bachman MA & Swanson MS (2004) Genetic evidence that *Legionella pneumophila* RpoS modulates expression of the transmission phenotype in both the exponential phase and the stationary phase. *Infect. Immun* **72**: 2468-2476
- Balandina A, Claret L, Hengge-Aronis R & Rouviere-Yaniv J (2001) The *Escherichia coli* histone-like protein HU regulates rpoS translation. *Mol. Microbiol* **39**: 1069-1079
- Balke VL & Gralla JD (1987) Changes in the linking number of supercoiled DNA accompany growth transitions in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol* **169**: 4499-4506
- Bandyopadhyay P & Steinman HM (1998) *Legionella pneumophila* catalase-peroxidases: cloning of the *katB* gene and studies of KatB function. *J. Bacteriol* **180**: 5369-5374
- Bandyopadhyay P, Byrne B, Chan Y, Swanson MS & Steinman HM (2003) *Legionella pneumophila* catalase-peroxidases are required for proper trafficking and growth in primary macrophages. *Infect. Immun* **71**: 4526-4535
- Bandyopadhyay P, Liu S, Gabbai CB, Venitelli Z & Steinman HM (2007) Environmental mimics and the Lvh type IVA secretion system contribute to virulence-related phenotypes of *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun* **75**: 723-735
- Bej AK, Mahbubani MH & Atlas RM (1991) Detection of viable *Legionella pneumophila* in water by polymerase chain reaction and gene probe methods. *Appl. Environ. Microbiol* **57**: 597-600
- Bellinger-Kawahara C & Horwitz MA (1990) Complement component C3 fixes selectively to the major outer membrane protein (MOMP) of *Legionella pneumophila* and mediates phagocytosis of liposome-MOMP complexes by human monocytes. *J. Exp. Med* **172**: 1201-1210
- Ben Said M, Masahiro O & Hassen A (2010) Detection of viable but non cultivable *Escherichia coli* after UV irradiation using a lytic Qbeta phage. *Ann Microbiol* **60**: 121-127
- Benson RF & Fields BS (1998) Classification of the genus *Legionella*. *Semin Respir Infect* **13**: 90-99
- Berge A, Rasmussen M & Björck L (1998) Identification of an insertion sequence located in a region encoding virulence factors of *Streptococcus pyogenes*. *Infect. Immun* **66**: 3449-3453
- Berger KH & Isberg RR (1993) Two distinct defects in intracellular growth complemented by a single genetic locus in *Legionella pneumophila*. *Mol. Microbiol* **7**: 7-19
- Blanco S, Lacoma A, Prat C, Cuesta MA, Fuenzalida L, Latorre I & Domínguez J (2008)

- Detection of *Legionella* antigen in nonconcentrated and concentrated urine samples by a new immunochromatographic assay. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis* **27**: 1249-1251
- den Boer JW, Yzerman EPF, Jansen R, Bruin JP, Verhoef LPB, Neve G & van der Zwaluw K (2007) Legionnaires' disease and gardening. *Clin. Microbiol. Infect* **13**: 88-91
- Boldur I, Kahana H, Kazak R, Cwikel B & Sarov I (1991) Western blot analysis of immune response to *Legionella bozemanii* antigens. *J. Clin. Pathol* **44**: 932-935
- Bordes P, Conter A, Morales V, Bouvier J, Kolb A & Gutierrez C (2003) DNA supercoiling contributes to disconnect sigmaS accumulation from sigmaS-dependent transcription in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol* **48**: 561-571
- Bouyer S, Imbert C, Rodier M & Héchard Y (2007) Long-term survival of *Legionella pneumophila* associated with *Acanthamoeba castellanii* vesicles. *Environ. Microbiol* **9**: 1341-1344
- Bradley MD, Beach MB, de Koning APJ, Pratt TS & Osuna R (2007) Effects of Fis on *Escherichia coli* gene expression during different growth stages. *Microbiology (Reading, Engl.)* **153**: 2922-2940
- Brenner DJ, Steigerwalt AG, Epple P, Bibb WF, McKinney RM, Starnes RW, Colville JM, Selander RK, Edelstein PH & Moss CW (1988) *Legionella pneumophila* serogroup Lansing 3 isolated from a patient with fatal pneumonia, and descriptions of *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* subsp. nov., *L. pneumophila* subsp. *fraseri* subsp. nov., and *L. pneumophila* subsp. *pascullei* subsp. nov. *J. Clin. Microbiol* **26**: 1695-1703
- Brenner DJ, Steigerwalt AG & McDade JE (1979) Classification of the Legionnaires' disease bacterium: *Legionella pneumophila*, genus novum, species nova, of the family *Legionellaceae*, familia nova. *Ann. Intern. Med* **90**: 656-658
- Brieland J, McClain M, Heath L, Chrisp C, Huffnagle G, LeGendre M, Hurley M, Fantone J & Engleberg C (1996) Coinoculation with *Hartmannella vermiformis* enhances replicative *Legionella pneumophila* lung infection in a murine model of Legionnaires' disease. *Infect. Immun* **64**: 2449-2456
- Brown PO & Cozzarelli NR (1981) Catenation and knotting of duplex DNA by type 1 topoisomerases: a mechanistic parallel with type 2 topoisomerases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **78**: 843-847
- Brüggemann H, Hagman A, Jules M, Sismeiro O, Dillies M, Gouyette C, Kunst F, Steinert M, Heuner K, Coppée J & Buchrieser C (2006) Virulence strategies for infecting phagocytes deduced from the in vivo transcriptional program of *Legionella pneumophila*. *Cell. Microbiol* **8**: 1228-1240
- Bunker ST, Bates TC & Oliver JD (2004) Effects of temperature on detection of plasmid or chromosomally encoded gfp- and lux-labeled *Pseudomonas fluorescens* in soil. *Environ Biosafety Res* **3**: 83-90

- Burnsed LJ, Hicks LA, Smithee LMK, Fields BS, Bradley KK, Pascoe N, Richards SM, Mallonee S, Littrell L, Benson RF & Moore MR (2007) A large, travel-associated outbreak of legionellosis among hotel guests: utility of the urine antigen assay in confirming Pontiac fever. *Clin. Infect. Dis* **44**: 222-228
- Burstein D, Zusman T, Degtyar E, Viner R, Segal G & Pupko T (2009) Genome-scale identification of *Legionella pneumophila* effectors using a machine learning approach. *PLoS Pathog* **5**: e1000508
- Cabiscol E, Tamarit J & Ros J (2000) Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int. Microbiol* **3**: 3-8
- Cambronne ED & Roy CR (2007) The *Legionella pneumophila* IcmSW complex interacts with multiple Dot/Icm effectors to facilitate type IV translocation. *PLoS Pathog* **3**: e188
- Cameron S, Roder D, Walker C & Feldheim J (1991) Epidemiological characteristics of *Legionella* infection in South Australia: implications for disease control. *Aust N Z J Med* **21**: 65-70
- Cappelier JM, Minet J, Magras C, Colwell RR & Federighi M (1999) Recovery in embryonated eggs of viable but nonculturable *Campylobacter jejuni* cells and maintenance of ability to adhere to HeLa cells after resuscitation. *Appl. Environ. Microbiol* **65**: 5154-5157
- Cargill KL, Pyle BH, Sauer RL & McFeters GA (1992) Effects of culture conditions and biofilm formation on the iodine susceptibility of *Legionella pneumophila*. *Can. J. Microbiol* **38**: 423-429
- Cazalet C, Gomez-Valero L, Rusniok C, Lomma M, Dervins-Ravault D, Newton HJ, Sansom FM, Jarraud S, Zidane N, Ma L, Bouchier C, Etienne J, Hartland EL & Buchrieser C (2010) Analysis of the *Legionella longbeachae* genome and transcriptome uncovers unique strategies to cause Legionnaires' disease. *PLoS Genet* **6**: e1000851
- Cazalet C, Jarraud S, Ghavi-Helm Y, Kunst F, Glaser P, Etienne J & Buchrieser C (2008) Multigenome analysis identifies a worldwide distributed epidemic *Legionella pneumophila* clone that emerged within a highly diverse species. *Genome Res* **18**: 431-441
- Cazalet C, Rusniok C, Brüggemann H, Zidane N, Magnier A, Ma L, Tichit M, Jarraud S, Bouchier C, Vandenesch F, Kunst F, Etienne J, Glaser P & Buchrieser C (2004) Evidence in the *Legionella pneumophila* genome for exploitation of host cell functions and high genome plasticity. *Nat. Genet* **36**: 1165-1173
- Champoux JJ (2001) DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu. Rev. Biochem* **70**: 369-413
- Chang C, Hwang Y, Cheng W & Chang C (2007) Effects of chlorination and heat disinfection on long-term starved *Legionella pneumophila* in warm water. *J. Appl. Microbiol* **102**:

- Chen DE, Podell S, Sauer J, Swanson MS & Saier MH (2008) The phagosomal nutrient transporter (Pht) family. *Microbiology (Reading, Engl.)* **154**: 42-53
- Chen D, Zheng X & Lu Y (2006) Identification and characterization of novel ColE1-type, high-copy number plasmid mutants in *Legionella pneumophila*. *Plasmid* **56**: 167-178
- Cheng B, Zhu C, Ji C, Ahumada A & Tse-Dinh Y (2003) Direct interaction between *Escherichia coli* RNA polymerase and the zinc ribbon domains of DNA topoisomerase I. *J. Biol. Chem* **278**: 30705-30710
- Chien M, Morozova I, Shi S, Sheng H, Chen J, Gomez SM, Asamani G, Hill K, Nuara J, Feder M, Rineer J, Greenberg JJ, Steshenko V, Park SH, Zhao B, Teplitskaya E, Edwards JR, Pampou S, Georghiou A, Chou I *et al.* (2004) The genomic sequence of the accidental pathogen *Legionella pneumophila*. *Science* **305**: 1966-1968
- Cianciotto NP (2001) Pathogenicity of *Legionella pneumophila*. *Int J Med Microbiol* **291**: 331-43
- Cianciotto NP (2005) Type II secretion: a protein secretion system for all seasons. *Trends Microbiol* **13**: 581-588
- Cianciotto NP (2007) Iron acquisition by *Legionella pneumophila*. *Biometals* **20**: 323-331
- Cianciotto NP (2009) Many substrates and functions of type II secretion: lessons learned from *Legionella pneumophila*. *Future Microbiol* **4**: 797-805
- Ciesielski CA, Blaser MJ & Wang WL (1986) Serogroup specificity of *Legionella pneumophila* is related to lipopolysaccharide characteristics. *Infect. Immun* **51**: 397-404
- Cirillo JD, Cirillo SL, Yan L, Bermudez LE, Falkow S & Tompkins LS (1999) Intracellular growth in *Acanthamoeba castellanii* affects monocyte entry mechanisms and enhances virulence of *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun* **67**: 4427-4434
- Cirillo JD, Falkow S & Tompkins LS (1994) Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion. *Infect. Immun* **62**: 3254-3261
- Cirillo SL, Bermudez LE, El-Etr SH, Duhamel GE & Cirillo JD (2001) *Legionella pneumophila* entry gene *rtxA* is involved in virulence. *Infect. Immun* **69**: 508-517
- Cirillo SL, Lum J & Cirillo JD (2000) Identification of novel loci involved in entry by *Legionella pneumophila*. *Microbiology (Reading, Engl.)* **146 (Pt 6)**: 1345-1359
- Collins MT, McDonald J, Høiby N & Aalund O (1984) Agglutinating antibody titers to members of the family *Legionellaceae* in cystic fibrosis patients as a result of cross-reacting antibodies to *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Microbiol* **19**: 757-762
- Colwell RR, Brayton P, Herrington D, Tall B, Huq A & Levine MM (1996) Viable but non-

- culturable *Vibrio cholerae* O1 revert to a cultivable state in the human intestine. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **12**: 28-31
- Corbett KD & Berger JM (2004) Structure, molecular mechanisms, and evolutionary relationships in DNA topoisomerases. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **33**: 95-118
- Cordevant C, Tang JS, Cleland D & Lange M (2003) Characterization of members of the *Legionellaceae* family by automated ribotyping. *J. Clin. Microbiol* **41**: 34-43
- Craig NL & Nash HA (1984) *E. coli* integration host factor binds to specific sites in DNA. *Cell* **39**: 707-716
- Dalebroux ZD, Edwards RL & Swanson MS (2009) SpoT governs *Legionella pneumophila* differentiation in host macrophages. *Mol. Microbiol* **71**: 640-658
- Dalebroux ZD, Svensson SL, Gaynor EC & Swanson MS (2010) ppGpp conjures bacterial virulence. *Microbiol. Mol. Biol. Rev* **74**: 171-199
- Dame RT & Goosen N (2002) HU: promoting or counteracting DNA compaction. *FEBS Lett* **529**: 151-156
- D'Auria G, Jiménez-Hernández N, Peris-Bondia F, Moya A & Latorre A (2010) *Legionella pneumophila* pangenome reveals strain-specific virulence factors. *BMC Genomics* **11**: 181
- De Luca G, Stampi S, Lezzi L & Zanetti F (1999) Effect of heat and acid decontamination treatments on the recovery of *Legionella pneumophila* from drinking water using two selective media. *New Microbiol* **22**: 203-208
- Denamur E, Bonacorsi S, Giraud A, Duriez P, Hilali F, Amorin C, Bingen E, Andremont A, Picard B, Taddei F & Matic I (2002) High frequency of mutator strains among human uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *J. Bacteriol* **184**: 605-609
- Denamur E & Matic I (2006) Evolution of mutation rates in bacteria. *Mol. Microbiol* **60**: 820-827
- Dennis PJ & Lee JV (1988) Differences in aerosol survival between pathogenic and non-pathogenic strains of *Legionella pneumophila* serogroup 1. *J. Appl. Bacteriol* **65**: 135-141
- Diederer BMW (2008) *Legionella* spp. and Legionnaires' disease. *J. Infect* **56**: 1-12
- Diederer BMW & Peeters MF (2006) Evaluation of two new immunochromatographic assays (Rapid U *Legionella* antigen test and SD Bioline *Legionella* antigen test) for detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in urine. *J. Clin. Microbiol* **44**: 2991-2993
- Dietrich C, Heuner K, Brand BC, Hacker J & Steinert M (2001) Flagellum of *Legionella pneumophila* positively affects the early phase of infection of eukaryotic host cells. *Infect. Immun* **69**: 2116-2122

- Dillon SC & Dorman CJ (2010) Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression. *Nat. Rev. Microbiol* **8**: 185-195
- Diogo A, Veríssimo A, Nobre MF & da Costa MS (1999) Usefulness of fatty acid composition for differentiation of *Legionella* species. *J. Clin. Microbiol* **37**: 2248-2254
- Doleans A, Aurell H, Reyrolle M, Lina G, Freney J, Vandenesch F, Etienne J & Jarraud S (2004) Clinical and environmental distributions of *Legionella* strains in France are different. *J. Clin. Microbiol* **42**: 458-460
- Doléans-Jordheim A, Akermi M, Ginevra C, Cazalet C, Kay E, Schneider D, Buchrieser C, Atlan D, Vandenesch F, Etienne J & Jarraud S (2006) Growth-phase-dependent mobility of the lvh-encoding region in *Legionella pneumophila* strain Paris. *Microbiology (Reading, Engl.)* **152**: 3561-3568
- Dorer MS, Kirton D, Bader JS & Isberg RR (2006) RNA interference analysis of *Legionella* in *Drosophila* cells: exploitation of early secretory apparatus dynamics. *PLoS Pathog* **2**: e34
- Dorman CJ (1991) DNA supercoiling and environmental regulation of gene expression in pathogenic bacteria. *Infect. Immun* **59**: 745-749
- Dorman CJ (2009) Global regulators and environmental adaptation in Gram-negative pathogens. *Clin. Microbiol. Infect* **15 Suppl 1**: 47-50
- Dorman CJ & Higgins CF (1987) Fimbrial phase variation in *Escherichia coli*: dependence on integration host factor and homologies with other site-specific recombinases. *J. Bacteriol* **169**: 3840-3843
- Dorman CJ (2006) DNA supercoiling and bacterial gene expression. *Sci Prog* **89**: 151-166
- Dorman CJ & Deighan P (2003) Regulation of gene expression by histone-like proteins in bacteria. *Curr. Opin. Genet. Dev* **13**: 179-184
- Dorman CJ & Corcoran CP (2009) Bacterial DNA topology and infectious disease. *Nucleic Acids Res* **37**: 672-678
- Dove SL & Dorman CJ (1994) The site-specific recombination system regulating expression of the type 1 fimbrial subunit gene of *Escherichia coli* is sensitive to changes in DNA supercoiling. *Mol. Microbiol* **14**: 975-988
- Drlica K & Rouviere-Yaniv J (1987) Histone-like proteins of bacteria. *Microbiol. Rev* **51**: 301-319
- Drlica K & Zhao X (1997) DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol. Mol. Biol. Rev* **61**: 377-392

- Drlica K, Hiasa H, Kerns R, Malik M, Mustaev A & Zhao X (2009) Quinolones: action and resistance updated. *Curr Top Med Chem* **9**: 981-998
- Drolet M, Broccoli S, Rallu F, Hraiky C, Fortin C, Massé E & Baaklini I (2003) The problem of hypernegative supercoiling and R-loop formation in transcription. *Front. Biosci* **8**: d210-221
- Du M, Chen J, Zhang X, Li A & Li Y (2007) Characterization and resuscitation of viable but nonculturable *Vibrio alginolyticus* VIB283. *Arch. Microbiol* **188**: 283-288
- Endo T, Sasaki N, Tanaka I & Nakata M (2002) Compact form of DNA induced by DNA-binding protein HU. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **290**: 546-551
- Eriksson PR, Mendiratta G, McLaughlin NB, Wolfsberg TG, Mariño-Ramírez L, Pompa TA, Jainerin M, Landsman D, Shen C & Clark DJ (2005) Global regulation by the yeast Spt10 protein is mediated through chromatin structure and the histone upstream activating sequence elements. *Mol. Cell. Biol* **25**: 9127-9137
- Espeli O & Marians KJ (2004) Untangling intracellular DNA topology. *Mol. Microbiol* **52**: 925-931
- Fass E & Groisman EA (2009) Control of *Salmonella* pathogenicity island-2 gene expression. *Curr. Opin. Microbiol* **12**: 199-204
- Feeley JC, Gibson RJ, Gorman GW, Langford NC, Rasheed JK, Mackel DC & Baine WB (1979) Charcoal-yeast extract agar: primary isolation medium for *Legionella pneumophila*. *J. Clin. Microbiol* **10**: 437-441
- de Felipe KS, Glover RT, Charpentier X, Anderson OR, Reyes M, Pericone CD & Shuman HA (2008) *Legionella* eukaryotic-like type IV substrates interfere with organelle trafficking. *PLoS Pathog* **4**: e1000117
- Fenstersheib MD, Miller M, Diggins C, Liska S, Detwiler L, Werner SB, Lindquist D, Thacker WL & Benson RF (1990) Outbreak of Pontiac fever due to *Legionella anisa*. *Lancet* **336**: 35-37
- Fernández JA, López P, Orozco D & Merino J (2002) Clinical study of an outbreak of Legionnaire's disease in Alcoy, Southeastern Spain. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis* **21**: 729-735
- Ferrándiz M, Martín-Galiano AJ, Schwartzman JB & de la Campa AG (2010) The genome of *Streptococcus pneumoniae* is organized in topology-reacting gene clusters. *Nucleic Acids Res* Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate1.inist.fr/pubmed/20176571> [Accédé Juin 1, 2010]
- Fields BS (1996) The molecular ecology of legionellae. *Trends Microbiol* **4**: 286-290
- Fields BS, Benson RF & Besser RE (2002) *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin. Microbiol. Rev* **15**: 506-526

- Filutowicz M, Ross W, Wild J & Gourse RL (1992) Involvement of Fis protein in replication of the *Escherichia coli* chromosome. *J. Bacteriol* **174**: 398-407
- Fliermans (1996) Ecology of *Legionella*: From Data to Knowledge with a Little Wisdom. *Microb. Ecol* **32**: 203-228
- Fliermans CB, Cherry WB, Orrison LH, Smith SJ, Tison DL & Pope DH (1981) Ecological distribution of *Legionella pneumophila*. *Appl. Environ. Microbiol* **41**: 9-16
- Forsbach-Birk V, McNealy T, Shi C, Lynch D & Marre R (2004) Reduced expression of the global regulator protein CsrA in *Legionella pneumophila* affects virulence-associated regulators and growth in *Acanthamoeba castellanii*. *Int. J. Med. Microbiol* **294**: 15-25
- Fournier B & Klier A (2004) Protein A gene expression is regulated by DNA supercoiling which is modified by the ArlS-ArlR two-component system of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology (Reading, Engl.)* **150**: 3807-3819
- Franco IS, Shuman HA & Charpentier X (2009) The perplexing functions and surprising origins of *Legionella pneumophila* type IV secretion effectors. *Cell. Microbiol* **11**: 1435-1443
- Fraser DW, Tsai TR, Orenstein W, Parkin WE, Beecham HJ, Sharrar RG, Harris J, Mallison GF, Martin SM, McDade JE, Shepard CC & Brachman PS (1977) Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. *N. Engl. J. Med* **297**: 1189-1197
- Frenkiel-Krispin D, Ben-Avraham I, Englander J, Shimoni E, Wolf SG & Minsky A (2004) Nucleoid restructuring in stationary-state bacteria. *Mol. Microbiol* **51**: 395-405
- Frenkiel-Krispin D, Levin-Zaidman S, Shimoni E, Wolf SG, Wachtel EJ, Arad T, Finkel SE, Kolter R & Minsky A (2001) Regulated phase transitions of bacterial chromatin: a non-enzymatic pathway for generic DNA protection. *EMBO J* **20**: 1184-1191
- Fry NK, Bangsberg JM, Bergmans A, Bernander S, Etienne J, Franzin L, Gaia V, Hasenberger P, Baladrón Jiménez B, Jonas D, Lindsay D, Mentula S, Papoutsi A, Struelens M, Uldum SA, Visca P, Wannet W & Harrison TG (2002) Designation of the European Working Group on *Legionella* Infection (EWGLI) amplified fragment length polymorphism types of *Legionella pneumophila* serogroup 1 and results of intercentre proficiency testing Using a standard protocol. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis* **21**: 722-728
- Fry NK, Alexiou-Daniel S, Bangsberg JM, Bernander S, Castellani Pastoris M, Etienne J, Forsblom B, Gaia V, Helbig JH, Lindsay D, Christian Lück P, Pelaz C, Uldum SA & Harrison TG (1999) A multicenter evaluation of genotypic methods for the epidemiologic typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1: results of a pan-European study. *Clin. Microbiol. Infect* **5**: 462-477
- Gaia V, Fry NK, Afshar B, Lück PC, Meugnier H, Etienne J, Peduzzi R & Harrison TG (2005) Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*. *J. Clin. Microbiol* **43**: 2047-2052

- Galán JE & Curtiss R (1990) Expression of *Salmonella typhimurium* genes required for invasion is regulated by changes in DNA supercoiling. *Infect. Immun* **58**: 1879-1885
- Gal-Mor O & Segal G (2003) Identification of CpxR as a positive regulator of *icm* and *dot* virulence genes of *Legionella pneumophila*. *J. Bacteriol* **185**: 4908-4919
- Gao LY & Abu Kwaik Y (1999) Apoptosis in macrophages and alveolar epithelial cells during early stages of infection by *Legionella pneumophila* and its role in cytopathogenicity. *Infect. Immun* **67**: 862-870
- Gao LY & Kwaik YA (2000) The mechanism of killing and exiting the protozoan host *Acanthamoeba polyphaga* by *Legionella pneumophila*. *Environ. Microbiol* **2**: 79-90
- Gao LY, Stone BJ, Brieland JK & Abu Kwaik Y (1998) Different fates of *Legionella pneumophila pmi* and *mil* mutants within macrophages and alveolar epithelial cells. *Microb. Pathog* **25**: 291-306
- García MT, Baladrón B, Gil V, Tarancon ML, Vilasau A, Ibañez A, Elola C & Pelaz C (2008) Persistence of chlorine-sensitive *Legionella pneumophila* in hyperchlorinated installations. *J. Appl. Microbiol* **105**: 837-847
- García MT, Jones S, Pelaz C, Millar RD & Abu Kwaik Y (2007) *Acanthamoeba polyphaga* resuscitates viable non-culturable *Legionella pneumophila* after disinfection. *Environ. Microbiol* **9**: 1267-1277
- Garduño RA, Garduño E & Hoffman PS (1998) Surface-associated hsp60 chaperonin of *Legionella pneumophila* mediates invasion in a HeLa cell model. *Infect. Immun* **66**: 4602-4610
- Gellert M, O'Dea MH, Itoh T & Tomizawa J (1976) Novobiocin and coumermycin inhibit DNA supercoiling catalyzed by DNA gyrase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **73**: 4474-4478
- Gião MS, Wilks SA, Azevedo NF, Vieira MJ & Keevil CW (2009) Validation of SYTO 9/propidium iodide uptake for rapid detection of viable but noncultivable *Legionella pneumophila*. *Microb. Ecol* **58**: 56-62
- Glick TH, Gregg MB, Berman B, Mallison G, Rhodes WW & 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
- Glöckner G, Albert-Weissenberger C, Weinmann E, Jacobi S, Schunder E, Steinert M, Hacker J & Heuner K (2008) Identification and characterization of a new conjugation/type IVA secretion system (*trb/tra*) of *Legionella pneumophila* Corby localized on two mobile genomic islands. *Int. J. Med. Microbiol* **298**: 411-428
- Gmuender H, Kuratli K, Di Padova K, Gray CP, Keck W & Evers S (2001) Gene expression changes triggered by exposure of *Haemophilus influenzae* to novobiocin or ciprofloxacin: combined transcription and translation analysis. *Genome Res* **11**: 28-42

- Goldberg DJ, Wrench JG, Collier PW, Emslie JA, Fallon RJ, Forbes GI, McKay TM, Macpherson AC, Markwick TA & Reid D (1989) Lochgoilhead fever: outbreak of non-pneumonic legionellosis due to *Legionella micdadei*. *Lancet* **1**: 316-318
- Goldstein E & Drlica K (1984) Regulation of bacterial DNA supercoiling: plasmid linking numbers vary with growth temperature. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **81**: 4046-4050
- Gomez-Valero L, Rusniok C & Buchrieser C (2009) *Legionella pneumophila*: Population genetics, phylogeny and genomics. *Infection, Genetics and Evolution* **9**: 727-739
- González-Gil G, Bringmann P & Kahmann R (1996) FIS is a regulator of metabolism in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol* **22**: 21-29
- Goodman SD, Velten NJ, Gao Q, Robinson S & Segall AM (1999) In Vitro Selection of Integration Host Factor Binding Sites. *J Bacteriol* **181**: 3246-3255
- Goosen N & van de Putte P (1995) The regulation of transcription initiation by integration host factor. *Mol. Microbiol* **16**: 1-7
- Grant RA, Filman DJ, Finkel SE, Kolter R & Hogle JM (1998) The crystal structure of Dps, a ferritin homolog that binds and protects DNA. *Nat. Struct. Biol* **5**: 294-303
- Griffin AT, Peyrani P, Wiemken T & Arnold F (2010) Macrolides versus quinolones in *Legionella pneumoniae*: results from the Community-Acquired Pneumonia Organization international study. *Int. J. Tuberc. Lung Dis* **14**: 495-499
- Guerrero C, Toldos CM, Yagüe G, Ramírez C, Rodríguez T & Segovia M (2004) Comparison of diagnostic sensitivities of three assays (Bartels enzyme immunoassay [EIA], Biotest EIA, and Binax NOW immunochromatographic test) for detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in urine. *J. Clin. Microbiol* **42**: 467-468
- Hacker J, Blum-Oehler G, Mühldorfer I & Tschäpe H (1997) Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol. Microbiol* **23**: 1089-1097
- Hadjifrangiskou M & Koehler TM (2008) Intrinsic curvature associated with the coordinately regulated anthrax toxin gene promoters. *Microbiology (Reading, Engl.)* **154**: 2501-2512
- Haikarainen T & Papageorgiou AC (2010) Dps-like proteins: structural and functional insights into a versatile protein family. *Cell. Mol. Life Sci* **67**: 341-351
- Hales LM & Shuman HA (1999a) *Legionella pneumophila* contains a type II general secretion pathway required for growth in amoebae as well as for secretion of the Msp protease. *Infect. Immun* **67**: 3662-3666
- Hales LM & Shuman HA (1999b) The *Legionella pneumophila* rpoS gene is required for growth within *Acanthamoeba castellanii*. *J. Bacteriol* **181**: 4879-4889
- Halsey TA, Vazquez-Torres A, Gravidahl DJ, Fang FC & Libby SJ (2004) The ferritin-like

- Dps protein is required for *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* oxidative stress resistance and virulence. *Infect. Immun* **72**: 1155-1158
- Hammer BK & Swanson MS (1999) Co-ordination of *legionella pneumophila* virulence with entry into stationary phase by ppGpp. *Mol. Microbiol* **33**: 721-731
- Han JH, Nguyen JC, Harada S, Baddour LM & Edelstein PH (2010) Relapsing *Legionella pneumophila* cellulitis: a case report and review of the literature. *J Infect Chemother*
- Harb OS & Abu Kwaik Y (2000) Characterization of a macrophage-specific infectivity locus (*milA*) of *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun* **68**: 368-376
- Hardy CD & Cozzarelli NR (2005) A genetic selection for supercoiling mutants of *Escherichia coli* reveals proteins implicated in chromosome structure. *Mol. Microbiol* **57**: 1636-1652
- Heidtman M, Chen EJ, Moy M & Isberg RR (2009) Large-scale identification of *Legionella pneumophila* Dot/Icm substrates that modulate host cell vesicle trafficking pathways. *Cell. Microbiol* **11**: 230-248
- Helbig JH, Bernander S, Castellani Pastoris M, Etienne J, Gaia V, Lauwers S, Lindsay D, Lück PC, Marques T, Mentula S, Peeters MF, Pelaz C, Struelens M, Uldum SA, Wewalka G & Harrison TG (2002) Pan-European study on culture-proven Legionnaires' disease: distribution of *Legionella pneumophila* serogroups and monoclonal subgroups. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis* **21**: 710-716
- Helbig JH, Kurtz JB, Pastoris MC, Pelaz C & Lück PC (1997) Antigenic lipopolysaccharide components of *Legionella pneumophila* recognized by monoclonal antibodies: possibilities and limitations for division of the species into serogroups. *J. Clin. Microbiol* **35**: 2841-2845
- Helbig JH, Lück PC, Knirel YA, Witzleb W & Zähringer U (1995) Molecular characterization of a virulence-associated epitope on the lipopolysaccharide of *Legionella pneumophila* serogroup 1. *Epidemiol. Infect* **115**: 71-78
- Heller R, Höller C, Süssmuth R & Gundermann KO (1998) Effect of salt concentration and temperature on survival of *Legionella pneumophila*. *Lett. Appl. Microbiol* **26**: 64-68
- Hengen PN, Bartram SL, Stewart LE & Schneider TD (1997) Information analysis of Fis binding sites. *Nucleic Acids Res* **25**: 4994-5002
- Heroven AK, Böhme K, Tran-Winkler H & Dersch P (2007) Regulatory elements implicated in the environmental control of invasins expression in enteropathogenic *Yersinia*. *Adv. Exp. Med. Biol* **603**: 156-166
- Herpers BL, de Jongh BM, van der Zwaluw K & van Hannen EJ (2003) Real-time PCR assay targets the 23S-5S spacer for direct detection and differentiation of *Legionella* spp. and *Legionella pneumophila*. *J. Clin. Microbiol* **41**: 4815-4816
- Herwaldt LA, Gorman GW, McGrath T, Toma S, Brake B, Hightower AW, Jones J, Reingold

- AL, Boxer PA & Tang PW (1984) A new *Legionella* species, *Legionella feeleii* species nova, causes Pontiac fever in an automobile plant. *Ann. Intern. Med* **100**: 333-338
- Heuner K, Dietrich C, Skriwan C, Steinert M & Hacker J (2002) Influence of the alternative sigma(28) factor on virulence and flagellum expression of *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun* **70**: 1604-1608
- Heuner K & Steinert M (2003) The flagellum of *Legionella pneumophila* and its link to the expression of the virulent phenotype. *Int. J. Med. Microbiol* **293**: 133-143
- Hiasa H & Marians KJ (1996) Two distinct modes of strand unlinking during theta-type DNA replication. *J. Biol. Chem* **271**: 21529-21535
- Hickey EK & Cianciotto NP (1997) An iron- and fur-repressed *Legionella pneumophila* gene that promotes intracellular infection and encodes a protein with similarity to the *Escherichia coli* aerobactin synthetases. *Infect. Immun* **65**: 133-143
- Higgins CF, Dorman CJ, Stirling DA, Waddell L, Booth IR, May G & Bremer E (1988) A physiological role for DNA supercoiling in the osmotic regulation of gene expression in *S. typhimurium* and *E. coli*. *Cell* **52**: 569-584
- Hilbi H, Jarraud S, Hartland E & Buchrieser C (2010) Update on Legionnaires' disease: pathogenesis, epidemiology, detection and control. *Molecular Microbiology* **76**: 1-11
- Hindré T, Brüggemann H, Buchrieser C & Héchard Y (2008) Transcriptional profiling of *Legionella pneumophila* biofilm cells and the influence of iron on biofilm formation. *Microbiology (Reading, Engl.)* **154**: 30-41
- Hirsch M & Elliott T (2005) Fis regulates transcriptional induction of RpoS in *Salmonella enterica*. *J. Bacteriol* **187**: 1568-1580
- Hoffman PS, Ripley M & Weeratna R (1992) Cloning and nucleotide sequence of a gene (*ompS*) encoding the major outer membrane protein of *Legionella pneumophila*. *J. Bacteriol* **174**: 914-920
- Horwitz MA (1983) The Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes. *J. Exp. Med* **158**: 2108-2126
- Horwitz MA (1984) Phagocytosis of the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) occurs by a novel mechanism: engulfment within a pseudopod coil. *Cell* **36**: 27-33
- Hovel-Miner G, Pampou S, Faucher SP, Clarke M, Morozova I, Morozov P, Russo JJ, Shuman HA & Kalachikov S (2009) σ S Controls Multiple Pathways Associated with Intracellular Multiplication of *Legionella pneumophila*. *J Bacteriol* **191**: 2461-2473
- Huo Y, Zhang Y, Xiao Y, Zhang X, Buck M, Kolb A & Wang Y (2009) IHF-binding sites inhibit DNA loop formation and transcription initiation. *Nucleic Acids Res* **37**: 3878-3886

- Hussong D, Colwell RR, O'Brien M, Weiss E, Pearson AD, Weiner RM & Burge WD (1987) Viable *Legionella pneumophila* Not Detectable by Culture on Agar Media. *Nat Biotech* **5**: 947-950
- Isberg RR, O'Connor TJ & Heidtman M (2009) The *Legionella pneumophila* replication vacuole: making a cosy niche inside host cells. *Nat. Rev. Microbiol* **7**: 13-24
- Jacobi S, Schade R & Heuner K (2004) Characterization of the Alternative Sigma Factor σ_{54} and the Transcriptional Regulator FleQ of *Legionella pneumophila*, Which Are Both Involved in the Regulation Cascade of Flagellar Gene Expression. *J Bacteriol* **186**: 2540-2547
- Jeong HS, Kim SM, Lim MS, Kim KS & Choi SH (2010) Direct interaction between quorum-sensing regulator SmcR and RNA polymerase is mediated by integration host factor to activate *vvpE* encoding elastase in *Vibrio vulnificus*. *J. Biol. Chem* **285**: 9357-9366
- Johnson RC, Bruist MF & Simon MI (1986) Host protein requirements for in vitro site-specific DNA inversion. *Cell* **46**: 531-539
- Jonas D, Meyer HG, Matthes P, Hartung D, Jahn B, Daschner FD & Jansen B (2000) Comparative evaluation of three different genotyping methods for investigation of nosocomial outbreaks of Legionnaires' disease in hospitals. *J. Clin. Microbiol* **38**: 2284-2291
- Jovanovich SB & Lebowitz J (1987) Estimation of the effect of coumermycin A1 on *Salmonella typhimurium* promoters by using random operon fusions. *J. Bacteriol* **169**: 4431-4435
- Juhas M, Crook DW & Hood DW (2008) Type IV secretion systems: tools of bacterial horizontal gene transfer and virulence. *Cell. Microbiol* **10**: 2377-2386
- Kagan JC, Stein M, Pypaert M & Roy CR (2004) *Legionella* subvert the functions of Rab1 and Sec22b to create a replicative organelle. *J. Exp. Med* **199**: 1201-1211
- Kallings I & Nordström K (1983) The pattern of immunoglobulins with special reference to IgM in Legionnaires' disease patients during a 2 year follow-up period. *Zentralbl Bakteriolog Mikrobiol Hyg A* **255**: 27-32
- Kana BD, Gordhan BG, Downing KJ, Sung N, Vostroktunova G, Machowski EE, Tsenova L, Young M, Kaprelyants A, Kaplan G & Mizrahi V (2008) The resuscitation-promoting factors of *Mycobacterium tuberculosis* are required for virulence and resuscitation from dormancy but are collectively dispensable for growth in vitro. *Mol. Microbiol* **67**: 672-684
- Kana BD & Mizrahi V (2010) Resuscitation-promoting factors as lytic enzymes for bacterial growth and signaling. *FEMS Immunol. Med. Microbiol* **58**: 39-50
- Kar S & Adhya S (2001) Recruitment of HU by piggyback: a special role of GalR in repressosome assembly. *Genes Dev* **15**: 2273-2281

- Kar S, Edgar R & Adhya S (2005) Nucleoid remodeling by an altered HU protein: reorganization of the transcription program. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **102**: 16397-16402
- Karem K & Foster JW (1993) The influence of DNA topology on the environmental regulation of a pH-regulated locus in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol* **10**: 75-86
- Kashuba AD & Ballow CH (1996) *Legionella* urinary antigen testing: potential impact on diagnosis and antibiotic therapy. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis* **24**: 129-139
- Katz SM & Hammel JM (1987) The effect of drying, heat, and pH on the survival of *Legionella pneumophila*. *Ann. Clin. Lab. Sci* **17**: 150-156
- Kaufmann AF, McDade JE, Patton CM, Bennett JV, Skaliy P, Feeley JC, Anderson DC, Potter ME, Newhouse VF, Gregg MB & Brachman PS (1981) Pontiac fever: isolation of the etiologic agent (*Legionella pneumophila*) and demonstration of its mode of transmission. *Am. J. Epidemiol* **114**: 337-347
- Keane OM & Dorman CJ (2003) The gyr genes of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* are repressed by the factor for inversion stimulation, Fis. *Mol. Genet. Genomics* **270**: 56-65
- Kelly A, Goldberg MD, Carroll RK, Danino V, Hinton JCD & Dorman CJ (2004) A global role for Fis in the transcriptional control of metabolism and type III secretion in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Microbiology (Reading, Engl.)* **150**: 2037-2053
- Kessler HH, Reinthaler FF, Pschaid A, Pierer K, Kleinhappl B, Eber E & Marth E (1993) Rapid detection of *Legionella* species in bronchoalveolar lavage fluids with the EnviroAmp *Legionella* PCR amplification and detection kit. *J. Clin. Microbiol* **31**: 3325-3328
- Kim MJ, Sohn JW, Park DW, Park SC & Chun BC (2003) Characterization of a lipoprotein common to *Legionella* species as a urinary broad-spectrum antigen for diagnosis of Legionnaires' disease. *J. Clin. Microbiol* **41**: 2974-2979
- Kimura S, Tateda K, Ishii Y, Horikawa M, Miyairi S, Gotoh N, Ishiguro M & Yamaguchi K (2009) *Pseudomonas aeruginosa* Las quorum sensing autoinducer suppresses growth and biofilm production in *Legionella* species. *Microbiology (Reading, Engl.)* **155**: 1934-1939
- King T, Ishihama A, Kori A & Ferenci T (2004) A regulatory trade-off as a source of strain variation in the species *Escherichia coli*. *J. Bacteriol* **186**: 5614-5620
- Kirby JE, Vogel JP, Andrews HL & Isberg RR (1998) Evidence for pore-forming ability by *Legionella pneumophila*. *Mol. Microbiol* **27**: 323-336
- Kohler RB, Winn WC & Wheat LJ (1984) Onset and duration of urinary antigen excretion in

- Legionnaires disease. *J. Clin. Microbiol* **20**: 605-607
- Kohler RB, Zimmerman SE, Wilson E, Allen SD, Edelstein PH, Wheat LJ & White A (1981) Rapid radioimmunoassay diagnosis of Legionnaires' disease: detection and partial characterization of urinary antigen. *Ann. Intern. Med* **94**: 601-605
- Köhler R, Fanghänel J, König B, Lüneberg E, Frosch M, Rahfeld J, Hilgenfeld R, Fischer G, Hacker J & Steinert M (2003) Biochemical and functional analyses of the Mip protein: influence of the N-terminal half and of peptidylprolyl isomerase activity on the virulence of *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun* **71**: 4389-4397
- Konishi T, Yamashiro T, Koide M & Nishizono A (2006) Influence of temperature on growth of *Legionella pneumophila* biofilm determined by precise temperature gradient incubator. *J. Biosci. Bioeng* **101**: 478-484
- Kooistra O, Lüneberg E, Lindner B, Knirel YA, Frosch M & Zähringer U (2001) Complex O-acetylation in *Legionella pneumophila* serogroup 1 lipopolysaccharide. Evidence for two genes involved in 8-O-acetylation of legionaminic acid. *Biochemistry* **40**: 7630-7640
- Kostrewa D, Granzin J, Koch C, Choe HW, Raghunathan S, Wolf W, Labahn J, Kahmann R & Saenger W (1991) Three-dimensional structure of the *E. coli* DNA-binding protein FIS. *Nature* **349**: 178-180
- Kozak NA, Benson RF, Brown E, Alexander NT, Taylor TH, Shelton BG & Fields BS (2009) Distribution of lag-1 alleles and sequence-based types among *Legionella pneumophila* serogroup 1 clinical and environmental isolates in the United States. *J. Clin. Microbiol* **47**: 2525-2535
- Kozak NA, Buss M, Lucas CE, Frace M, Govil D, Travis T, Olsen-Rasmussen M, Benson RF & Fields BS (2010) Virulence factors encoded by *Legionella longbeachae* identified on the basis of the genome sequence analysis of clinical isolate D-4968. *J. Bacteriol* **192**: 1030-1044
- Krinos C, High AS & Rodgers FG (1999) Role of the 25 kDa major outer membrane protein of *Legionella pneumophila* in attachment to U-937 cells and its potential as a virulence factor for chick embryos. *J. Appl. Microbiol* **86**: 237-244
- Kubori T, Hyakutake A & Nagai H (2008) *Legionella* translocates an E3 ubiquitin ligase that has multiple U-boxes with distinct functions. *Mol. Microbiol* **67**: 1307-1319
- La Scola B, Birtles RJ, Greub G, Harrison TJ, Ratcliff RM & Raoult D (2004) *Legionella drancourtii* sp. nov., a strictly intracellular amoebal pathogen. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol* **54**: 699-703
- Laguna RK, Creasey EA, Li Z, Valtz N & Isberg RR (2006) A *Legionella pneumophila*-translocated substrate that is required for growth within macrophages and protection from host cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **103**: 18745-18750
- Lai C, Chen S, Lin I, Chang C & Wong H (2009) Change of protein profiles in the induction

- of the viable but nonculturable state of *Vibrio parahaemolyticus*. *Int. J. Food Microbiol* **135**: 118-124
- Lammertyn E & Anné J (2004) Protein secretion in *Legionella pneumophila* and its relation to virulence. *FEMS Microbiol. Lett* **238**: 273-279
- Lau HY & Ashbolt NJ (2009) The role of biofilms and protozoa in *Legionella pathogenesis*: implications for drinking water. *J. Appl. Microbiol* **107**: 368-378
- Lautier T & Nasser W (2007) The DNA nucleoid-associated protein Fis co-ordinates the expression of the main virulence genes in the phytopathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Microbiol* **66**: 1474-1490
- Lawrence C, Ronco E, Dubrou S, Leclercq R, Nauciel C & Matsiota-Bernard P (1999) Molecular typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from patients and the nosocomial environment by arbitrarily primed PCR and pulsed-field gel electrophoresis. *J. Med. Microbiol* **48**: 327-333
- Lawrence JG & Ochman H (1998) Molecular archaeology of the *Escherichia coli* genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **95**: 9413-9417
- LeClerc JE, Li B, Payne WL & Cebula TA (1996) High mutation frequencies among *Escherichia coli* and *Salmonella* pathogens. *Science* **274**: 1208-1211
- Leoni E & Legnani PP (2001) Comparison of selective procedures for isolation and enumeration of *Legionella* species from hot water systems. *J. Appl. Microbiol* **90**: 27-33
- Levine C, Hiasa H & Marians KJ (1998) DNA gyrase and topoisomerase IV: biochemical activities, physiological roles during chromosome replication, and drug sensitivities. *Biochim. Biophys. Acta* **1400**: 29-43
- Liles MR, Scheel TA & Cianciotto NP (2000) Discovery of a nonclassical siderophore, legiobactin, produced by strains of *Legionella pneumophila*. *J. Bacteriol* **182**: 749-757
- Liu LF & Wang JC (1987) Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **84**: 7024-7027
- Livak KJ & Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**: 402-408
- Lleò MDM, Benedetti D, Tafi MC, Signoretto C & Canepari P (2007) Inhibition of the resuscitation from the viable but non-culturable state in *Enterococcus faecalis*. *Environmental Microbiology* **9**: 2313-2320
- Lorenz M, Hillisch A, Goodman SD & Diekmann S (1999) Global structure similarities of intact and nicked DNA complexed with IHF measured in solution by fluorescence resonance energy transfer. *Nucleic Acids Res* **27**: 4619-4625
- Lück PC, Helbig JH, Drasar V, Bornstein N, Fallon RJ & Castellani-Pastoris M (1995)

- Genomic heterogeneity amongst phenotypically similar *Legionella micdadei* strains. *FEMS Microbiol. Lett* **126**: 49-54
- Lück PC, Helbig JH, Günter U, Assmann M, Blau R, Koch H & Klepp M (1994) Epidemiologic investigation by macrorestriction analysis and by using monoclonal antibodies of nosocomial pneumonia caused by *Legionella pneumophila* serogroup 10. *J. Clin. Microbiol* **32**: 2692-2697
- Lück PC, Köhler J, Maiwald M & Helbig JH (1995) DNA polymorphisms in strains of *Legionella pneumophila* serogroups 3 and 4 detected by macrorestriction analysis and their use for epidemiological investigation of nosocomial legionellosis. *Appl. Environ. Microbiol* **61**: 2000-2003
- Luijsterburg MS, Noom MC, Wuite GJL & Dame RT (2006) The architectural role of nucleoid-associated proteins in the organization of bacterial chromatin: a molecular perspective. *J. Struct. Biol* **156**: 262-272
- Lüneberg E, Zähringer U, Knirel YA, Steinmann D, Hartmann M, Steinmetz I, Rohde M, Köhl J & Frosch M (1998) Phase-variable expression of lipopolysaccharide contributes to the virulence of *legionella pneumophila*. *J. Exp. Med* **188**: 49-60
- Luo Y, Han Z, Chin SM & Linn S (1994) Three chemically distinct types of oxidants formed by iron-mediated Fenton reactions in the presence of DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **91**: 12438-12442
- Lurie-Weinberger MN, Gomez-Valero L, Merault N, Glöckner G, Buchrieser C & Gophna U (2010) The origins of eukaryotic-like proteins in *Legionella pneumophila*. *Int J Med*
- Lynch D, Fieser N, Glöggler K, Forsbach-Birk V & Marre R (2003) The response regulator LetA regulates the stationary-phase stress response in *Legionella pneumophila* and is required for efficient infection of *Acanthamoeba castellanii*. *FEMS Microbiol. Lett* **219**: 241-248
- Mahillon J & Chandler M (1998) Insertion Sequences. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 725-774
- Malik M, Bensaïd A, Rouviere-Yaniv J & Drlica K (1996) Histone-like protein HU and bacterial DNA topology: suppression of an HU deficiency by gyrase mutations. *J. Mol. Biol* **256**: 66-76
- Mangan MW, Lucchini S, Danino V, Cróinín TO, Hinton JCD & Dorman CJ (2006) The integration host factor (IHF) integrates stationary-phase and virulence gene expression in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Mol. Microbiol* **59**: 1831-1847
- Marra A, Blander SJ, Horwitz MA & Shuman HA (1992) Identification of a *Legionella pneumophila* locus required for intracellular multiplication in human macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **89**: 9607-9611
- Martinez A & Kolter R (1997) Protection of DNA during oxidative stress by the nonspecific DNA-binding protein Dps. *J. Bacteriol* **179**: 5188-5194

- Massé E & Drolet M (1999) *Escherichia coli* DNA topoisomerase I inhibits R-loop formation by relaxing transcription-induced negative supercoiling. *J. Biol. Chem* **274**: 16659-16664
- Matthews M & Roy CR (2000) Identification and subcellular localization of the *Legionella pneumophila* IcmX protein: a factor essential for establishment of a replicative organelle in eukaryotic host cells. *Infect. Immun* **68**: 3971-3982
- McClintock B (1953) Induction of Instability at Selected Loci in Maize. *Genetics* **38**: 579-599
- McConkey J, Obeius M, Valentini J & Beeson MS (2006) *Legionella pneumonia* presenting with rhabdomyolysis and acute renal failure: a case report. *J Emerg Med* **30**: 389-392
- McDade JE, Brenner DJ & Bozeman FM (1979) Legionnaires' disease bacterium isolated in 1947. *Ann. Intern. Med* **90**: 659-661
- McDade JE, Shepard CC, Fraser DW, Tsai TR, Redus MA & Dowdle WR (1977) Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *N. Engl. J. Med* **297**: 1197-1203
- McEvoy CRE, Falmer AA, Gey van Pittius NC, Victor TC, van Helden PD & Warren RM (2007) The role of IS6110 in the evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)* **87**: 393-404
- Mechold U, Cashel M, Steiner K, Gentry D & Malke H (1996) Functional analysis of a *relA/spoT* gene homolog from *Streptococcus equisimilis*. *J. Bacteriol* **178**: 1401-1411
- Mégarbane B, Montambault S, Chary I, Guibert M, Axler O & Brivet FG (2000) Acute pancreatitis caused by severe *Legionella pneumophila* infection. *Infection* **28**: 329-331
- Merriam JJ, Mathur R, Maxfield-Boumil R & Isberg RR (1997) Analysis of the *Legionella pneumophila* *fliI* gene: intracellular growth of a defined mutant defective for flagellum biosynthesis. *Infect. Immun* **65**: 2497-2501
- Mintz CS, Chen JX & Shuman HA (1988) Isolation and characterization of auxotrophic mutants of *Legionella pneumophila* that fail to multiply in human monocytes. *Infect. Immun* **56**: 1449-1455
- Mintz CS, Schultz DR, Arnold PI & Johnson W (1992) *Legionella pneumophila* lipopolysaccharide activates the classical complement pathway. *Infect. Immun* **60**: 2769-2776
- Miyamoto H, Yoshida S, Taniguchi H & Shuman HA (2003) Virulence conversion of *Legionella pneumophila* by conjugal transfer of chromosomal DNA. *J. Bacteriol* **185**: 6712-6718
- Moffat JF & Tompkins LS (1992) A quantitative model of intracellular growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii*. *Infect. Immun* **60**: 296-301
- Molmeret M, Zink SD, Han L, Abu-Zant A, Asari R, Bitar DM & Abu Kwaik Y (2004)

- Activation of caspase-3 by the Dot/Icm virulence system is essential for arrested biogenesis of the *Legionella*-containing phagosome. *Cell. Microbiol* **6**: 33-48
- Molofsky AB, Shetron-Rama LM & Swanson MS (2005) Components of the *Legionella pneumophila* flagellar regulon contribute to multiple virulence traits, including lysosome avoidance and macrophage death. *Infect. Immun* **73**: 5720-5734
- Molofsky AB & Swanson MS (2003) *Legionella pneumophila* CsrA is a pivotal repressor of transmission traits and activator of replication. *Mol. Microbiol* **50**: 445-461
- Molofsky AB & Swanson MS (2004) Differentiate to thrive: lessons from the *Legionella pneumophila* life cycle. *Mol. Microbiol* **53**: 29-40
- Morash MG, Brassinga AKC, Warthan M, Gourabathini P, Garduño RA, Goodman SD & Hoffman PS (2009) Reciprocal expression of integration host factor and HU in the developmental cycle and infectivity of *Legionella pneumophila*. *Appl. Environ. Microbiol* **75**: 1826-1837
- Morio F, Corvec S, Caroff N, Le Gallou F, Drugeon H & Reynaud A (2008) Real-time PCR assay for the detection and quantification of *Legionella pneumophila* in environmental water samples: utility for daily practice. *Int J Hyg Environ Health* **211**: 403-411
- Moss CW, Bibb WF, Karr DE, Guerrant GO & Lambert MA (1983) Cellular fatty acid composition and ubiquinone content of *Legionella feeleii* sp. nov. *J. Clin. Microbiol* **18**: 917-919
- Moss CW, Karr DE & Dees SB (1981) Cellular fatty acid composition of *Legionella longbeachae* sp. nov. *J. Clin. Microbiol* **14**: 692-694
- Mukamolova GV, Kaprelyants AS, Young DI, Young M & Kell DB (1998) A bacterial cytokine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **95**: 8916-8921
- Muraca P, Stout JE & Yu VL (1987) Comparative assessment of chlorine, heat, ozone, and UV light for killing *Legionella pneumophila* within a model plumbing system. *Appl. Environ. Microbiol* **53**: 447-453
- Muskhelishvili G & Travers A (2003) Transcription factor as a topological homeostat. *Front. Biosci* **8**: d279-285
- Nagai H, Kagan JC, Zhu X, Kahn RA & Roy CR (2002) A bacterial guanine nucleotide exchange factor activates ARF on *Legionella* phagosomes. *Science* **295**: 679-682
- Newton HJ, Ang DKY, van Driel IR & Hartland EL (2010) Molecular pathogenesis of infections caused by *Legionella pneumophila*. *Clin. Microbiol. Rev* **23**: 274-298
- Neyens E & Baeyens J (2003) A review of classic Fenton's peroxidation as an advanced oxidation technique. *J. Hazard. Mater* **98**: 33-50
- Ni Bhriain N, Dorman CJ & Higgins CF (1989) An overlap between osmotic and anaerobic stress responses: a potential role for DNA supercoiling in the coordinate regulation of

- gene expression. *Mol. Microbiol* **3**: 933-942
- Nishino K & Yamaguchi A (2004) Role of Histone-Like Protein H-NS in Multidrug Resistance of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **186**: 1423-1429
- van Noort J, Verbrugge S, Goosen N, Dekker C & Dame RT (2004) Dual architectural roles of HU: formation of flexible hinges and rigid filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **101**: 6969-6974
- Nyström T (1995) Glucose starvation stimolon of *Escherichia coli*: role of integration host factor in starvation survival and growth phase-dependent protein synthesis. *J. Bacteriol* **177**: 5707-5710
- O Cróinín T, Carroll RK, Kelly A & Dorman CJ (2006) Roles for DNA supercoiling and the Fis protein in modulating expression of virulence genes during intracellular growth of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Mol. Microbiol* **62**: 869-882
- Ohno A, Kato N, Yamada K & Yamaguchi K (2003) Factors influencing survival of *Legionella pneumophila* serotype 1 in hot spring water and tap water. *Appl. Environ. Microbiol* **69**: 2540-2547
- Oliver JD & Bockian R (1995) In vivo resuscitation, and virulence towards mice, of viable but nonculturable cells of *Vibrio vulnificus*. *Appl. Environ. Microbiol* **61**: 2620-2623
- Oliver JD (2005) The viable but nonculturable state in bacteria. *J. Microbiol* **43 Spec No**: 93-100
- Oliver JD (2010) Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev* **34**: 415-425
- Olsen KN, Larsen MH, Gahan CGM, Kallipolitis B, Wolf XA, Rea R, Hill C & Ingmer H (2005) The Dps-like protein Fri of *Listeria monocytogenes* promotes stress tolerance and intracellular multiplication in macrophage-like cells. *Microbiology (Reading, Engl.)* **151**: 925-933
- Ott M, Bender L, Lück PC, Meyer P & Hacker J (1992) Distribution of legionellae in a hospital water system: prevalence of immunologically and genetically related *Legionella pneumophila* serogroup 6 isolates. *FEMS Microbiol. Lett* **74**: 201-205
- Ott M, Messner P, Heesemann J, Marre R & Hacker J (1991) Temperature-dependent expression of *flagella* in *Legionella*. *J. Gen. Microbiol* **137**: 1955-1961
- Palusińska-Szyszk M & Cendrowska-Pinkosz M (2009) Pathogenicity of the family *Legionellaceae*. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* **57**: 279-290
- Park M, Yun ST, Hwang S, Chun C & Ahn TI (2006) The *dps* gene of symbiotic "*Candidatus Legionella jeonii*" in *Amoeba proteus* responds to hydrogen peroxide and phagocytosis. *J. Bacteriol* **188**: 7572-7580
- Peter BJ, Arsuaga J, Breier AM, Khodursky AB, Brown PO & Cozzarelli NR (2004)

Genomic transcriptional response to loss of chromosomal supercoiling in *Escherichia coli*. *Genome Biol* **5**: R87

- Philippe C, Blech MF & Hartemann P (2006) Intra-amoebal development of *Legionella pneumophila* and the potential role of *amoebae* in the transmission of Legionnaires' disease. *Med Mal Infect* **36**: 196-200
- Plouffe JF, File TM, Breiman RF, Hackman BA, Salstrom SJ, Marston BJ & Fields BS (1995) Reevaluation of the definition of Legionnaires' disease: use of the urinary antigen assay. Community Based Pneumonia Incidence Study Group. *Clin. Infect. Dis* **20**: 1286-1291
- Potrykus K & Cashel M (2008) (p)ppGpp: still magical? *Annu. Rev. Microbiol* **62**: 35-51
- Pruckler JM, Mermel LA, Benson RF, Giorgio C, Cassidy PK, Breiman RF, Whitney CG & Fields BS (1995) Comparison of *Legionella pneumophila* isolates by arbitrarily primed PCR and pulsed-field gel electrophoresis: analysis from seven epidemic investigations. *J. Clin. Microbiol* **33**: 2872-2875
- Pruss GJ & Drlica K (1989) DNA supercoiling and prokaryotic transcription. *Cell* **56**: 521-523
- Quinn FD & Tompkins LS (1989) Analysis of a cloned sequence of *Legionella pneumophila* encoding a 38 kD metalloprotease possessing haemolytic and cytotoxic activities. *Mol. Microbiol* **3**: 797-805
- Ramstein J, Hervouet N, Coste F, Zelwer C, Oberto J & Castaing B (2003) Evidence of a thermal unfolding dimeric intermediate for the *Escherichia coli* histone-like HU proteins: thermodynamics and structure. *J. Mol. Biol* **331**: 101-121
- Rasis M & Segal G (2009) The LetA-RsmYZ-CsrA regulatory cascade, together with RpoS and PmrA, post-transcriptionally regulates stationary phase activation of *Legionella pneumophila* Icm/Dot effectors. *Mol. Microbiol* **72**: 995-1010
- Ratzow S, Gaia V, Helbig JH, Fry NK & Lück PC (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
- Reinthaler FF, Sattler J, Schaffler-Dullnig K, Weinmayr B & Marth E (1993) Comparative study of procedures for isolation and cultivation of *Legionella pneumophila* from tap water in hospitals. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 1213-1216
- Reyes-Domínguez Y, Contreras-Ferrat G, Ramírez-Santos J, Membrillo-Hernández J & Gómez-Eichelmann MC (2003) Plasmid DNA supercoiling and gyrase activity in *Escherichia coli* wild-type and *rpoS* stationary-phase cells. *J. Bacteriol* **185**: 1097-1100
- Ricketts KD & Joseph CA (2007) Legionnaires disease in Europe: 2005-2006. *Euro Surveill* **12**: E7-8

- Ridenour DA, Cirillo SLG, Feng S, Samrakandi MM & Cirillo JD (2003) Identification of a gene that affects the efficiency of host cell infection by *Legionella pneumophila* in a temperature-dependent fashion. *Infect. Immun* **71**: 6256-6263
- Riffard S, Lo Presti F, Vandenesch F, Forey F, Reyrolle M & Etienne J (1998) Comparative analysis of infrequent-restriction-site PCR and pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. *J. Clin. Microbiol* **36**: 161-167
- Rivers B & Steck TR (2001) Viable but nonculturable uropathogenic bacteria are present in the mouse urinary tract following urinary tract infection and antibiotic therapy. *Urol. Res* **29**: 60-66
- Robey M & Cianciotto NP (2002) *Legionella pneumophila* *feoAB* promotes ferrous iron uptake and intracellular infection. *Infect. Immun* **70**: 5659-5669
- Rogers J, Dowsett AB, Dennis PJ, Lee JV & Keevil CW (1994) Influence of Plumbing Materials on Biofilm Formation and Growth of *Legionella pneumophila* in Potable Water Systems. *Appl. Environ. Microbiol* **60**: 1842-1851
- Ross W, Thompson JF, Newlands JT & Gourse RL (1990) *E.coli* Fis protein activates ribosomal RNA transcription in vitro and in vivo. *EMBO J* **9**: 3733-3742
- Rossier O & Cianciotto NP (2001) Type II protein secretion is a subset of the PILD-dependent processes that facilitate intracellular infection by *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun* **69**: 2092-2098
- Rossier O, Starkenburg SR & Cianciotto NP (2004) *Legionella pneumophila* type II protein secretion promotes virulence in the A/J mouse model of Legionnaires' disease pneumonia. *Infect. Immun* **72**: 310-321
- Rouvière-Yaniv J & Gros F (1975) Characterization of a novel, low-molecular-weight DNA-binding protein from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **72**: 3428-3432
- Rowbotham TJ (1980) Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J. Clin. Pathol* **33**: 1179-1183
- Rowland S, Boocock MR & Stark WM (2006) DNA bending in the Sin recombination synapse: functional replacement of HU by IHF. *Mol. Microbiol* **59**: 1730-1743
- Ruf B, Schürmann D, Horbach I, Fehrenbach FJ & Pohle HD (1990) Prevalence and diagnosis of *Legionella pneumonia*: a 3-year prospective study with emphasis on application of urinary antigen detection. *J. Infect. Dis* **162**: 1341-1348
- Rui S & Tse-Dinh Y (2003) Topoisomerase function during bacterial responses to environmental challenge. *Front. Biosci* **8**: d256-263
- Ryan VT, Grimwade JE, Nievera CJ & Leonard AC (2002) IHF and HU stimulate assembly of pre-replication complexes at *Escherichia coli* *oriC* by two different mechanisms.

- Sadosky AB, Wilson JW, Steinman HM & Shuman HA (1994) The iron superoxide dismutase of *Legionella pneumophila* is essential for viability. *J. Bacteriol* **176**: 3790-3799
- Saha SK, Saha S & Sanyal SC (1991) Recovery of injured *Campylobacter jejuni* cells after animal passage. *Appl. Environ. Microbiol* **57**: 3388-3389
- Sahr T, Brüggemann H, Jules M, Lomma M, Albert-Weissenberger C, Cazalet C & Buchrieser C (2009) Two small ncRNAs jointly govern virulence and transmission in *Legionella pneumophila*. *Mol. Microbiol* **72**: 741-762
- Sauer J, Bachman MA & Swanson MS (2005) The phagosomal transporter A couples threonine acquisition to differentiation and replication of *Legionella pneumophila* in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **102**: 9924-9929
- Schechter LM, Jain S, Akbar S & Lee CA (2003) The small nucleoid-binding proteins H-NS, HU, and Fis affect *hilA* expression in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Infect. Immun* **71**: 5432-5435
- Schneider R, Lurz R, Lüder G, Tolksdorf C, Travers A & Muskhelishvili G (2001) An architectural role of the *Escherichia coli* chromatin protein FIS in organising DNA. *Nucleic Acids Res* **29**: 5107-5114
- Schneider R, Travers A, Kutateladze T & Muskhelishvili G (1999) A DNA architectural protein couples cellular physiology and DNA topology in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol* **34**: 953-964
- Schneider R, Travers A & Muskhelishvili G (2000) The expression of the *Escherichia coli* *fis* gene is strongly dependent on the superhelical density of DNA. *Mol. Microbiol* **38**: 167-175
- Schroeder GN, Petty NK, Mousnier A, Harding CR, Vogrin AJ, Wee B, Fry NK, Harrison TG, Newton HJ, Thomson NR, Beatson SA, Dougan G, Hartland E & Frankel G (2010) The genome of *Legionella pneumophila* strain 130b contains a unique combination of type IV secretion systems and encodes novel Dot/Icm secretion system effector proteins. *J Bacteriol*
- Segal G, Purcell M & Shuman HA (1998) Host cell killing and bacterial conjugation require overlapping sets of genes within a 22-kb region of the *Legionella pneumophila* genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **95**: 1669-1674
- Segal G, Feldman M & Zusman T (2005) The Icm/Dot type-IV secretion systems of *Legionella pneumophila* and *Coxiella burnetii*. *FEMS Microbiol. Rev* **29**: 65-81
- Sewitz S, Crellin P & Chalmers R (2003) The positive and negative regulation of Tn10 transposition by IHF is mediated by structurally asymmetric transposon arms. *Nucleic Acids Res* **31**: 5868-5876

- Shen X, Banga S, Liu Y, Xu L, Gao P, Shamovsky I, Nudler E & Luo Z (2009) Targeting eEF1A by a *Legionella pneumophila* effector leads to inhibition of protein synthesis and induction of host stress response. *Cell. Microbiol* **11**: 911-926
- Sheridan SD, Benham CJ & Hatfield GW (1998) Activation of gene expression by a novel DNA structural transmission mechanism that requires supercoiling-induced DNA duplex destabilization in an upstream activating sequence. *J. Biol. Chem* **273**: 21298-21308
- Shindo H, Furubayashi A, Shimizu M, Miyake M & Imamoto F (1992) Preferential binding of *E.coli* histone-like protein HU alpha to negatively supercoiled DNA. *Nucleic Acids Res* **20**: 1553-1558
- Sieira R, Comerci DJ, Pietrasanta LI & Ugalde RA (2004) Integration host factor is involved in transcriptional regulation of the *Brucella abortus virB* operon. *Mol. Microbiol* **54**: 808-822
- Siguier P, Filée J & Chandler M (2006) Insertion sequences in prokaryotic genomes. *Curr. Opin. Microbiol* **9**: 526-531
- Singh A, Goering RV, Simjee S, Foley SL & Zervos MJ (2006) Application of Molecular Techniques to the Study of Hospital Infection. *Clin Microbiol Rev* **19**: 512-530
- Smith B & Oliver JD (2006) In situ and in vitro gene expression by *Vibrio vulnificus* during entry into, persistence within, and resuscitation from the viable but nonculturable state. *Appl. Environ. Microbiol* **72**: 1445-1451
- Smits WK, Kuipers OP & Veening J (2006) Phenotypic variation in bacteria: the role of feedback regulation. *Nat. Rev. Microbiol* **4**: 259-271
- Söderberg MA, Dao J, Starckenburg SR & Cianciotto NP (2008) Importance of type II secretion for survival of *Legionella pneumophila* in tap water and in amoebae at low temperatures. *Appl. Environ. Microbiol* **74**: 5583-5588
- Sopena N, Sabrià M, Pedro-Botet ML, Reynaga E, García-Núñez M, Domínguez J & Matas L (2002) Factors related to persistence of *Legionella* urinary antigen excretion in patients with legionnaires' disease. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis* **21**: 845-848
- Spirig T, Tiaden A, Kiefer P, Buchrieser C, Vorholt JA & Hilbi H (2008) The *Legionella* autoinducer synthase LqsA produces an alpha-hydroxyketone signaling molecule. *J. Biol. Chem* **283**: 18113-18123
- St John G & Steinman HM (1996) Periplasmic copper-zinc superoxide dismutase of *Legionella pneumophila*: role in stationary-phase survival. *J. Bacteriol* **178**: 1578-1584
- Steele TW, Lanser J & Sangster N (1990a) Isolation of *Legionella longbeachae* serogroup 1 from potting mixes. *Appl. Environ. Microbiol* **56**: 49-53
- Steele TW, Moore CV & Sangster N (1990b) Distribution of *Legionella longbeachae*

- serogroup 1 and other *legionellae* in potting soils in Australia. *Appl. Environ. Microbiol* **56**: 2984-2988
- Steinert M, Emödy L, Amann R & Hacker J (1997) Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. *Appl. Environ. Microbiol* **63**: 2047-2053
- Steinert M, Heuner K, Buchrieser C, Albert-Weissenberger C & Glöckner G (2007) *Legionella* pathogenicity: Genome structure, regulatory networks and the host cell response. *International Journal of Medical Microbiology* **297**: 577-587
- Stewart CR, Rossier O & Cianciotto NP (2009) Surface translocation by *Legionella pneumophila*: a form of sliding motility that is dependent upon type II protein secretion. *J. Bacteriol* **191**: 1537-1546
- Stølhaug A & Bergh K (2006) Identification and differentiation of *Legionella pneumophila* and *Legionella* spp. with real-time PCR targeting the 16S rRNA gene and species identification by mip sequencing. *Appl. Environ. Microbiol* **72**: 6394-6398
- Stone BJ & Abu Kwaik Y (1998) Expression of multiple pili by *Legionella pneumophila*: identification and characterization of a type IV *pilin* gene and its role in adherence to mammalian and protozoan cells. *Infect. Immun* **66**: 1768-1775
- Stonehouse E, Kovacikova G, Taylor RK & Skorupski K (2008) Integration host factor positively regulates virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol* **190**: 4736-4748
- Stout JE & Yu VL (1997) Legionellosis. *N. Engl. J. Med* **337**: 682-687
- Su M, Cavallo S, Stefanini S, Chiancone E & Chasteen ND (2005) The so-called Listeria innocua ferritin is a Dps protein. Iron incorporation, detoxification, and DNA protection properties. *Biochemistry* **44**: 5572-5578
- Sussman M, Loya Y, Fine M & Rosenberg E (2003) The marine fireworm *Hermodice carunculata* is a winter reservoir and spring-summer vector for the coral-bleaching pathogen *Vibrio shiloi*. *Environ. Microbiol* **5**: 250-255
- Sutak R, Lesuisse E, Tachezy J & Richardson DR (2008) Crusade for iron: iron uptake in unicellular eukaryotes and its significance for virulence. *Trends Microbiol* **16**: 261-268
- Sutherland IW (2001) Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* **147**: 3-9
- Swanson MS & Hammer BK (2000) *Legionella pneumophila* pathogenesis: A Fateful Journey from Amoebae to Macrophages. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**: 567-613
- Taylor M, Ross K & Bentham R (2009) *Legionella*, *Protozoa*, and Biofilms: Interactions Within Complex Microbial Systems. *Microb Ecol* **58**: 538-547

- Tenover FC, Arbeit RD & Goering RV (1997) How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. *Infect Control Hosp Epidemiol* **18**: 426-439
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH & Swaminathan B (1995) Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol* **33**: 2233-2239
- Tilton RC (1979) Legionnaires' disease antigen detected by enzyme-linked immunosorbent assay. *Ann. Intern. Med* **90**: 697-698
- Tossa P, Deloge-Abarkan M, Zmirou-Navier D, Hartemann P & Mathieu L (2006) Pontiac fever: an operational definition for epidemiological studies. *BMC Public Health* **6**: 112
- Ussery D, Larsen TS, Wilkes KT, Friis C, Worning P, Krogh A & Brunak S (2001) Genome organisation and chromatin structure in *Escherichia coli*. *Biochimie* **83**: 201-212
- Valens M, Penaud S, Rossignol M, Cornet F & Boccard F (2004) Macrodomain organization of the *Escherichia coli* chromosome. *EMBO J* **23**: 4330-4341
- Valsangiacomo C, Baggi F, Gaia V, Balmelli T, Peduzzi R & Piffaretti JC (1995) Use of amplified fragment length polymorphism in molecular typing of *Legionella pneumophila* and application to epidemiological studies. *J. Clin. Microbiol* **33**: 1716-1719
- Vincent CD, Friedman JR, Jeong KC, Buford EC, Miller JL & Vogel JP (2006) Identification of the core transmembrane complex of the *Legionella* Dot/Icm type IV secretion system. *Mol. Microbiol* **62**: 1278-1291
- Visca P, Goldoni P, Lück PC, Helbig JH, Cattani L, Giltri G, Bramati S & Castellani Pastoris M (1999) Multiple types of *Legionella pneumophila* serogroup 6 in a hospital heated-water system associated with sporadic infections. *J. Clin. Microbiol* **37**: 2189-2196
- Viswanathan VK, Edelstein PH, Pope CD & Cianciotto NP (2000) The *Legionella pneumophila* *iraAB* locus is required for iron assimilation, intracellular infection, and virulence. *Infect. Immun* **68**: 1069-1079
- Viswanathan VK, Kurtz S, Pedersen LL, Abu-Kwaik Y, Krcmarik K, Mody S & Cianciotto NP (2002) The cytochrome c maturation locus of *Legionella pneumophila* promotes iron assimilation and intracellular infection and contains a strain-specific insertion sequence element. *Infect. Immun* **70**: 1842-1852
- Vivero A, Baños RC, Mariscotti JF, Oliveros JC, García-del Portillo F, Juárez A & Madrid C (2008) Modulation of horizontally acquired genes by the Hha-YdgT proteins in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *J. Bacteriol* **190**: 1152-1156
- Vogel JP, Andrews HL, Wong SK & Isberg RR (1998) Conjugative Transfer by the Virulence

System of *Legionella pneumophila*. *Science* **279**: 873-876

- Wadowsky RM, Wolford R, McNamara AM & Yee RB (1985) Effect of temperature, pH, and oxygen level on the multiplication of naturally occurring *Legionella pneumophila* in potable water. *Appl. Environ. Microbiol* **49**: 1197-1205
- Wang EE, Manson B, Corey M, Bernard K & Prober CG (1987) False positivity of *Legionella* serology in patients with cystic fibrosis. *Pediatr. Infect. Dis. J* **6**: 256-259
- Wang X, Dubey AK, Suzuki K, Baker CS, Babitzke P & Romeo T (2005) CsrA post-transcriptionally represses *pgaABCD*, responsible for synthesis of a biofilm polysaccharide adhesin of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol* **56**: 1648-1663
- Watnick P & Kolter R (2000) Biofilm, city of microbes. *J. Bacteriol* **182**: 2675-2679
- Weinstein-Fischer D, Elgrably-Weiss M & Altuvia S (2000) *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide: a role for DNA supercoiling, topoisomerase I and Fis. *Mol. Microbiol* **35**: 1413-1420
- Wieland H, Faigle M, Lang F, Northoff H & Neumeister B (2002) Regulation of the *Legionella mip*-promotor during infection of human monocytes. *FEMS Microbiol. Lett* **212**: 127-132
- Winn WC (1988) Legionnaires disease: historical perspective. *Clin. Microbiol. Rev* **1**: 60-81
- Wintermeyer E, Flügel M, Ott M, Steinert M, Rdest U, Mann KH & Hacker J (1994) Sequence determination and mutational analysis of the *lly* locus of *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun* **62**: 1109-1117
- Woese CR & Fox GE (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **74**: 5088-5090
- Wolf SG, Frenkiel D, Arad T, Finkel SE, Kolter R & Minsky A (1999) DNA protection by stress-induced biocrystallization. *Nature* **400**: 83-85
- Wolska KI, Grudniak AM & Kraczkiewicz-Dowjat A (2007) Genetic and physiological regulation of bacterial endospore development. *Pol. J. Microbiol* **56**: 11-17
- Wong H & Liu S (2008) Characterization of the low-salinity stress in *Vibrio vulnificus*. *J. Food Prot* **71**: 416-419
- Xu H-, Roberts N, Singleton FL, Attwell RW, Grimes DJ & Colwell RR (1982) Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microbial Ecology* **8**: 313-323
- Yamamoto H, Ezaki T, Ikedo M & Yabuuchi E (1991) Effects of biocidal treatments to inhibit the growth of legionellae and other microorganisms in cooling towers. *Microbiol. Immunol* **35**: 795-802
- Yamamoto Y, Poole LB, Hantgan RR & Kamio Y (2002) An iron-binding protein, Dpr, from

- Streptococcus mutans* prevents iron-dependent hydroxyl radical formation in vitro. *J. Bacteriol* **184**: 2931-2939
- Yang SW & Nash HA (1995) Comparison of protein binding to DNA in vivo and in vitro: defining an effective intracellular target. *EMBO J* **14**: 6292-6300
- Ye F, Brauer T, Niehus E, Drlica K, Josenhans C & Suerbaum S (2007) Flagellar and global gene regulation in *Helicobacter pylori* modulated by changes in DNA supercoiling. *Int. J. Med. Microbiol* **297**: 65-81
- Yu M, Ren J, Zeng Y, Zhou S & Lu Y (2009) The *Legionella pneumophila* Dps homolog is regulated by iron and involved in multiple stress tolerance. *J. Basic Microbiol* **49 Suppl 1**: S79-86
- Yu VL, Plouffe JF, Pastoris MC, Stout JE, Schousboe M, Widmer A, Summersgill J, File T, Heath CM, Paterson DL & Cheresky A (2002) Distribution of *Legionella* species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: an international collaborative survey. *J. Infect. Dis* **186**: 127-128
- Yzerman EPF, den Boer JW, Lettinga KD, Schellekens J, Dankert J & Peeters M (2002) Sensitivity of three urinary antigen tests associated with clinical severity in a large outbreak of Legionnaires' disease in The Netherlands. *J. Clin. Microbiol* **40**: 3232-3236
- Zechiedrich EL, Khodursky AB, Bachellier S, Schneider R, Chen D, Lilley DM & Cozzarelli NR (2000) Roles of topoisomerases in maintaining steady-state DNA supercoiling in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem* **275**: 8103-8113
- Zechiedrich EL, Khodursky AB & Cozzarelli NR (1997) Topoisomerase IV, not gyrase, decatenates products of site-specific recombination in *Escherichia coli*. *Genes Dev* **11**: 2580-2592
- Zhao G, Ceci P, Ilari A, Giangiacomo L, Laue TM, Chiancone E & Chasteen ND (2002) Iron and hydrogen peroxide detoxification properties of DNA-binding protein from starved cells. A ferritin-like DNA-binding protein of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem* **277**: 27689-27696
- Zou CH, Knirel YA, Helbig JH, Zähringer U & Mintz CS (1999) Molecular cloning and characterization of a locus responsible for O acetylation of the O polysaccharide of *Legionella pneumophila* serogroup 1 lipopolysaccharide. *J. Bacteriol* **181**: 4137-4141
- Zusman T, Aloni G, Halperin E, Kotzer H, Degtyar E, Feldman M & Segal G (2007) The response regulator PmrA is a major regulator of the *icm/dot* type IV secretion system in *Legionella pneumophila* and *Coxiella burnetii*. *Mol. Microbiol* **63**: 1508-1523
- Zusman T, Gal-Mor O & Segal G (2002) Characterization of a *Legionella pneumophila* *relA* insertion mutant and roles of RelA and RpoS in virulence gene expression. *J. Bacteriol* **184**: 67-75

Résumé :

Le genre *Legionella* regroupe des bactéries pouvant causer chez l'homme une pneumonie fatale dans 10% des cas, la légionellose. Elles sont capables de coloniser tous les réseaux d'eau. Le génome de ces bactéries révèle une forte plasticité génomique, aux niveaux fonctionnel et structural.

La première partie de cette thèse analyse l'impact des protéines de type histone sur la régulation de la virulence chez *L. pneumophila*. Ces protéines structurent le chromosome bactérien et influencent l'expression génique. Des mutants des gènes codant les protéines Dps et IHF ont été obtenus chez *L. pneumophila* et analysés pour leur sensibilité aux stress et leurs propriétés de virulence. Ces deux protéines sont impliquées dans la régulation de la virulence chez *Legionella*. De plus, Dps permet de diminuer la sensibilité au stress oxydatif et IHF régulerait l'entrée dans l'état VBNC (viable but non-culturable), un état physiologique dans lequel les bactéries sont viables mais ne sont plus cultivables.

La seconde partie vise à utiliser la plasticité structurale, notamment celle induite par les éléments génétiques mobiles IS, comme outil épidémiologique. A l'heure actuelle, les méthodes d'identification ne permettent pas de discriminer les isolats de même espèce. Afin d'éviter de nouvelles contaminations, il est impératif d'identifier rapidement et avec précision l'installation contaminée, à partir des prélèvements de patients comme élément comparatif. L'utilisation d'une méthode RFLP-IS a permis de mettre en évidence une IS particulière, IS*Lpn11*, possédant un taux de discrimination de 80% au sein de la souche *L. pneumophila* Paris, qui est responsable de plus de 10 % des épidémies en Europe.

Abstract:

The genus *Legionella* includes bacteria that can cause a severe human pneumonia, called legionellosis, that is lethal in 10% of the cases. They are able to colonize all water systems. Their genomes reveal a high plasticity, at both functional and structural levels.

The first part of this thesis analyses the impact of histone-like proteins on the regulation of virulence in *L. pneumophila*. These proteins are involved both in the structuration of the bacterial chromosome and in global regulation of gene expression. Mutants for the genes encoding the Dps and IHF proteins were constructed in *L. pneumophila* and analyzed for both their sensitivity to different stress conditions and virulence properties. Both IHF and Dps are involved in the regulation of virulence in *Legionella*. Moreover, Dps reduces sensitivity to oxidative stress and IHF may regulate the entry into the VBNC state (viable non-culturable), a particular physiological state in which bacterial cells are viable but can not grow anymore.

The second part aims at using the genomic structural plasticity, especially the one induced by IS mobile genetic elements, as epidemiological tool. Currently, identification methods are unable to discriminate isolates from the same species. To prevent new infections, it is however crucial to quickly and accurately identify the contaminated settings, using clinical samples from patients as comparative elements. The development of an RFLP-IS method revealed an IS element, IS*Lpn11*, as a highly resolutive tool with a discrimination rate of 80% in the strain *L. pneumophila* Paris, which is responsible for >10 % of the European outbreaks.