



HAL
open science

**Interactions amibes libres / micro-organismes :
préférence trophique et étude comparative avec les
macrophages**

Elodie Maisonneuve

► **To cite this version:**

Elodie Maisonneuve. Interactions amibes libres / micro-organismes : préférence trophique et étude comparative avec les macrophages. *Ecologie, Environnement*. Université de Poitiers, 2017. Français. NNT : 2017POIT2257 . tel-01858349

HAL Id: tel-01858349

<https://theses.hal.science/tel-01858349>

Submitted on 20 Aug 2018

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.

THESE

Pour l'obtention du Grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS

(Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées)
(Diplôme National - Arrêté du 25 mai 2016)

Ecole Doctorale : Science pour l'environnement Gay Lussac

Secteur de Recherche : Biologie de l'environnement, écologie, environnement

Présentée par :

Elodie Maisonneuve

Interactions amibes libres / micro-organismes : préférence trophique et étude comparative avec les macrophages

Directeur de Thèse : Pr Marie-Hélène Rodier
Co-directeur de Thèse : Dr Estelle Perraud

Soutenue le 23 Mars 2017 devant la Commission d'Examen

JURY

Présidente : Mme Hélène Yéra, Maître de conférences - Praticien Hospitalier, Université de Paris V

Rapporteurs : M. Loïc Favennec, Professeur - Praticien Hospitalier, Université de Rouen
M. Olivier Lesouhaitier, Professeur, Université de Rouen

Examineurs : M. Franck Morel, Professeur, Université de Poitiers
Mme Marie-Hélène Rodier, Professeur - Praticien Hospitalier, Université de Poitiers
Mme Estelle Perraud, Maître de conférences - Praticien Hospitalier, Université de Poitiers

THESE

Pour l'obtention du Grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS

(Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées)
(Diplôme National - Arrêté du 25 mai 2016)

Ecole Doctorale : Science pour l'environnement Gay Lussac

Secteur de Recherche : Biologie de l'environnement, écologie, environnement

Présentée par :

Elodie Maisonneuve

Interactions amibes libres / micro-organismes : préférence trophique et étude comparative avec les macrophages

Directeur de Thèse : Pr Marie-Hélène Rodier

Co-directeur de Thèse : Dr Estelle Perraud

Soutenue le 23 Mars 2017 devant la Commission d'Examen

JURY

Présidente : Mme Hélène Yéra, Maître de conférences - Praticien Hospitalier, Université de Paris V

Rapporteurs : M. Loïc Favennec, Professeur - Praticien hospitalier, Université de Rouen
M. Olivier Lesouhaitier, Professeur, Université de Rouen

Examineurs : M. Franck Morel, Professeur, Université de Poitiers
Mme Marie-Hélène Rodier, Professeur - Praticien Hospitalier, Université de Poitiers
Mme Estelle Perraud, Maître de conférences - Praticien Hospitalier, Université de Poitiers

*“La science, qui nourrit l’âme,
Vaut le pain, qui nourrit le corps.”*

P. Lachambeaudie

Remerciements

*Cette étude a été effectuée dans l'équipe Microbiologie de l'Eau du Laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions dirigé par le Professeur **Didier Bouchon**. Je tiens à lui adresser mes remerciements pour m'avoir permis de réaliser ces travaux au sein de son laboratoire. Je tiens également à remercier le Professeur **Yann Héchard** et le professeur **Jean-Marc Berjeaud** de m'avoir accueillie dans leur équipe.*

*Je tiens à remercier Monsieur **Loïc Favennec**, Professeur et Praticien Hospitalier au Service de Parasitologie du CHU de Rouen et Monsieur **Olivier Lesouhaitier**, Professeur au Laboratoire Microbiologie, Signaux et Microenvironnement à l'Université d'Evreux, de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs de ce travail.*

*Je remercie également Madame **Hélène Yéra**, Maître de Conférences et Praticien Hospitalier au laboratoire de Parasitologie et Mycologie à l'Hôpital Cochin à Paris et Monsieur **Franck Morel**, Professeur à l'université de Poitiers, d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse et d'évaluer ce travail.*

*Je tiens à remercier tout particulièrement mes directrices **Marie-Hélène Rodier** et **Estelle Perraud** pour m'avoir encadrée et guidée dans mon apprentissage. Je tiens à les remercier pour la confiance qu'elles m'ont accordée et pour m'avoir permis de réaliser ce projet. Je les remercie pour le temps qu'elles m'ont consacré et pour toutes nos discussions scientifiques et personnelles. Je vous en suis très reconnaissante.*

*Je remercie également grandement le Professeur **Jean-Marc Berjeaud** qui m'a donnée ma chance pour mon stage de Master. Je le remercie pour la confiance qu'il m'a accordée mais aussi pour sa disponibilité et ses conseils. Si j'en suis là aujourd'hui, c'est en partie grâce à lui.*

*Mes remerciements vont également à toutes les personnes avec lesquelles j'ai pu collaborer au cours de ce travail et en particulier au Professeur **Nicolas Leveque** pour avoir cru en ce projet et de m'avoir permis de travailler au sein de son équipe de virologie ainsi que pour le temps qu'il m'a accordé, sa gentillesse et sa disponibilité, mais aussi au Docteur **Agnès Beby-Defaux** pour le temps qu'elle m'a consacré en biologie moléculaire. Je remercie également **Agnès** et **Martine** deux super techniciennes qui m'ont appris les cultures cellulaire et virale, mais aussi pour leur accueil et leur enseignement des bases de la virologie. Un grand merci également aux ingénieurs **Nathalie Quellard** et **Sihem Kaaki** pour leur travail sur la MET, pour avoir pris le temps de m'enseigner son fonctionnement et pour leur aide précieuse pour l'analyse des images. Merci également au Professeur **Franck Morel** pour m'avoir fourni les macrophages et m'avoir donné des conseils pour les cultiver.*

*Un grand merci également à tous les membres de l'équipe Microbiologie de l'Eau et plus particulièrement certaines personnes. **Julien** dit juju qui me supporte depuis cinq ans maintenant et qui m'a aidée pour l'HPLC et la spectrométrie de masse. Merci à **Camille** que je n'ai pas vraiment eu le temps de connaître mais qui m'a été d'une aide précieuse dans la dernière ligne droite pour l'analyse des spectres de MS assez complexes. Merci également à **Nono**, **Adrienne**, **Vincent**, **Damien** et **Emilie** pour leur disponibilité et leurs conseils durant ces trois ans de thèse et même avant. Merci aussi pour toutes les conversations hautes en couleur que l'on a pu avoir au cours de ces cinq dernières années. Merci aussi à **Stéphanie** pour toutes nos conversations et les bons moments passés en TP. Je remercie également les techniciennes du Laboratoire de Parasitologie du CHU de Poitiers et plus particulièrement*

Laëtitia et Marylène pour leur bonne humeur, leur gentillesse et surtout pour avoir accepté d'être mes testeuses culinaires.

*Un grand merci également aux stagiaires que j'ai encadrés et avec qui j'ai partagé de bons moments : **Christophe** (le premier et pas des moindres), **Jikat**, **Laurianne**, **Lucile**, **Marion** (alias Post-it).*

*Je remercie également les thésards du labo. **Luce**, merci à toi pour tous les moments de rigolade et de stress qu'on a partagé ensemble, bon courage Lucette c'est presque fini. Un merci à mes petits loulous **Clément** et **Marie-Hélène**. J'ai passé de supers moments avec vous et j'espère qu'ils continueront après. Bon courage les petits jeunes **Meg** et **Steven**.*

*Enfin, je tiens à remercier ma famille, notamment mes parents, mon frère et ma tata qui ont cru en moi tout au long de mes études. Un grand merci à mes amies **Ninon** et **Elodie** qui m'ont soutenues pendant ces trois ans. Un grand merci à **Louis**, mon mari, qui a su me supporter et me motiver pendant ces trois années et plus particulièrement pendant cette période de rédaction. Et surtout un énorme merci à **Loïc**, mon petit amour et ma plus belle réussite qui illumine ma vie depuis 1 an et demi et qui m'a rendue plus forte et plus combative.*

*Un grand **MERCI** à vous tous.*

Sommaire

LISTE DES ABREVIATIONS	1
LISTE DES FIGURES.....	4
LISTE DES TABLEAUX	7
CHAPITRE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	9
1. Les cellules phagocytaires.....	10
1.1. Les amibes libres : exemple <i>d'Acanthamoeba castellanii</i>	10
1.1.1. Généralités.....	10
1.1.1.1. Classification	11
1.1.1.2. Morphologie	12
1.1.2. Ecologie.....	14
1.1.3. Cycle réplicatif et nutrition	15
1.1.3.1. Cycle réplicatif	15
1.1.3.2. Nutrition	18
1.1.4. Pathogénicité	18
1.2. Les macrophages	20
1.2.1. Généralités.....	20
1.2.2. Cycle réplicatif et mode d'action	21
1.2.2.1. Cycle réplicatif	21
1.2.2.2. Activation des macrophages.....	24
1.2.2.2.1. Activation classique	25
1.2.2.2.2. Activation alternative.....	26
1.2.2.3. Mode d'action	27
2. Les micro-organismes étudiés	30
2.1. Les bactéries	30
2.1.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	30
2.1.1.1. Généralités.....	30
2.1.1.1.1. Classification.....	30
2.1.1.1.2. Morphologie.....	31
2.1.1.2. Ecologie.....	32
2.1.1.3. Pathogénicité	33
2.1.1.3.1. Facteurs de pathogénicité.....	33
2.1.1.3.2. Pathogénicité.....	35
2.1.1.3.3. Epidémiologie	36
2.1.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	37

2.1.2.1.	Généralités.....	37
2.1.2.1.1.	Classification.....	37
2.1.2.1.2.	Morphologie.....	38
2.1.2.2.	Ecologie.....	39
2.1.2.3.	Pathogénicité.....	40
2.1.2.3.1.	Facteurs de virulence.....	40
2.1.2.3.2.	Pathogénicité.....	43
2.1.2.3.3.	Epidémiologie.....	44
2.2.	Les champignons : <i>Aspergillus fumigatus</i>	45
2.2.1.	Généralités.....	45
2.2.1.1.	Classification.....	45
2.2.1.2.	Morphologie.....	46
2.2.2.	Ecologie.....	48
2.2.3.	Cycle de vie et cycle infectieux.....	49
2.2.3.1.	Cycle de vie.....	49
2.2.3.2.	Cycle infectieux.....	50
2.2.4.	Pathogénicité.....	51
2.2.4.1.	Facteurs de virulence.....	51
2.2.4.2.	Pathogénicité.....	53
2.2.4.3.	Epidémiologie.....	55
2.3.	Les Adénovirus.....	55
2.3.1.	Généralités.....	55
2.3.2.	Morphologie.....	56
2.3.2.1.	Structure de la capside.....	57
2.3.2.2.	Structure du génome.....	60
2.3.3.	Pathogénicité.....	62
2.3.3.1.	Cycle viral.....	62
2.3.3.2.	Pathogénicité.....	65
2.3.3.3.	Epidémiologie.....	66
3.	Interactions avec les micro-organismes et phagocytose.....	67
3.1.	Interactions des amibes libres avec les micro-organismes.....	67
3.1.1.	Les bactéries.....	68
3.1.2.	Les champignons.....	70
3.1.3.	Les virus.....	71
3.2.	Résistance des micro-organismes à la phagocytose.....	72
3.2.1.	Mécanisme de phagocytose.....	72
3.2.1.1.	Définition et généralités.....	72

3.2.1.2. Processus de phagocytose	73
3.2.2. Mécanismes d'échappement à la phagocytose.....	76
3.2.2.1. Evitement de contact avec les phagocytes	76
3.2.2.2. Inhibition de l'internalisation.....	77
3.2.2.3. Survie dans les phagocytes.....	77
3.2.2.3.1. Inhibition de la maturation des phagosomes.....	78
3.2.2.3.2. Survie dans les phagosomes.....	81
3.2.2.3.3. Echappement du phagosome.....	83
3.2.2.4. Induction de l'apoptose des cellules phagocytaires	85
CHAPITRE 2 : OBJECTIFS DE LA THESE.....	87
CHAPITRE 3 : MATERIEL ET METHODES	89
1. Cellules et conditions de culture	90
1.1. Micro-organismes.....	90
1.2. Lignées Cellulaires	91
1.3. Souches amibiennes	91
1.4. Conditions de culture	91
1.4.1. Micro-organismes.....	91
1.4.1.1. Bactéries	91
1.4.1.2. Surnageant de culture bactérienne.....	92
1.4.1.3. Souches fongiques.....	92
1.4.1.4. Virus	93
1.4.1.5. Amibes	93
1.4.2. Lignées cellulaires.....	94
1.4.2.1. Macrophages	94
1.4.2.2. Cellules Hep-2.....	94
2. Méthodes de microbiologie.....	94
2.1. Tests de préférence trophique	94
2.2. Tests de diffusibilité	95
2.3. Tests de co-culture	96
2.3.1. Co-culture cellules phagocytaires et bactéries	96
2.3.2. Co-culture cellules phagocytaires et <i>A. fumigatus</i>	97
2.3.3. Co-culture cellules phagocytaires et virus	98
2.4. Tests de co-incubation.....	98
2.4.1. Co-incubation de <i>K. pneumoniae</i> avec le surnageant amibien.....	98
2.4.2. Co-incubation d' <i>A. fumigatus</i> avec le surnageant amibien.....	99
2.5. Effet de la gentamicine sur la croissance bactérienne en présence ou non de cellules phagocytaires.....	99

2.6.	Dénombrement des micro-organismes.....	100
2.6.1.	Par densité optique	100
2.6.2.	Par numération des unités formant colonies (UFC).....	100
2.6.3.	Par numération sur cellule de comptage	101
2.7.	Viabilité des cellules	101
2.8.	Titrage des virus	101
2.9.	Inhibition de l'adhérence.....	103
2.10.	Test d'adhérence et d'internalisation	103
3.	Méthodes de biologie moléculaire.....	104
3.1.	Extraction d'ADN	104
3.2.	PCR quantitative (qPCR)	105
4.	Méthodes biochimiques.....	106
4.1.	Extraction en phase solide.....	106
4.2.	Chromatographie liquide haute performance en phase inverse (HPLC).....	106
4.3.	Spectrométrie de masse	107
4.4.	Détermination de la nature des molécules d'intérêt	108
4.4.1.	Détection des sucres	108
4.4.2.	Détection des lipides	108
4.4.3.	Détection des peptides.....	109
5.	Microscopie	109
5.1.	Microscopie optique inversée.....	109
5.2.	Microscopie électronique à transmission	109
5.3.	Immunofluorescence	111
CHAPITRE 4 : RESULTATS.....		113
1.	Préférence trophique des amibes	114
1.1.	Etude de la préférence trophique.....	114
1.2.	Sécrétion de molécules par les pathogènes sélectionnés.....	115
1.3.	Etude de la diffusibilité ou non des molécules sécrétées	116
1.4.	Fractionnement des surnageants de culture.....	117
1.5.	Purification des surnageants de culture par HPLC.....	118
1.5.1.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	118
1.5.2.	<i>Staphylococcus aureus</i>	120
1.6.	Détermination de la nature des molécules actives	121
1.7.	Analyse par spectrométrie de masse	122
1.7.1.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	122
1.7.1.1.	Analyse de la fraction A.....	122
1.7.1.2.	Analyse de la fraction B	123

1.7.1.3.	Analyse de la fraction C	125
1.7.1.4.	Analyse de la fraction D	126
1.7.1.5.	Analyse de la fraction E	128
1.7.1.6.	Récapitulatif des fractions analysées pour <i>K. pneumoniae</i>	129
1.7.2.	<i>Staphylococcus aureus</i>	131
1.7.2.1.	Analyse de la fraction A	131
1.7.2.2.	Analyse de la fraction B	132
1.7.2.3.	Analyse de la fraction C	133
1.7.2.4.	Récapitulatif des fractions analysées pour <i>S. aureus</i>	134
2.	Interaction des pathogènes avec des amibes libres et des macrophages	136
2.1.	Etude des interactions entre <i>K. pneumoniae</i> et les cellules phagocytaires.....	136
2.1.1.	Article 1 : An observational study of phagocytes and <i>Klebsiella pneumoniae</i> relationships: different behaviors	136
2.1.2.	Résultats complémentaires	148
2.1.2.1.	Co-culture <i>K. pneumoniae</i> - <i>V. vermiformis</i>	148
2.1.2.2.	Effet de la gentamicine sur la croissance de <i>K. pneumoniae</i> en présence de <i>V. vermiformis</i>	149
2.1.2.3.	Inhibition de l'attachement de <i>K. pneumoniae</i> à <i>V. vermiformis</i>	150
2.1.2.4.	Fractionnement du surnageant d' <i>A. castellanii</i>	151
2.2.	Etude des interactions entre <i>S. aureus</i> et les cellules phagocytaires.....	152
2.2.1.	Expérience de co-culture	152
2.2.1.1.	Co-culture <i>S. aureus</i> - <i>A. castellanii</i>	153
2.2.1.2.	Co-culture <i>S. aureus</i> - <i>V. vermiformis</i>	153
2.2.1.3.	Co-culture <i>S. aureus</i> - Thp-1	154
2.2.2.	Co-culture de <i>S. aureus</i> et des cellules phagocytaires en présence de gentamicine	155
2.2.2.1.	Co-culture <i>S. aureus</i> - <i>A. castellanii</i> en présence de gentamicine	155
2.2.2.2.	Co-culture <i>S. aureus</i> - <i>V. vermiformis</i> en présence de gentamicine	157
2.2.2.3.	Co-culture <i>S. aureus</i> - Thp-1 en présence de gentamicine	158
2.2.3.	Inhibition de l'attachement aux cellules phagocytaires	159
2.2.3.1.	Inhibition de l'attachement de <i>S. aureus</i> à <i>A. castellanii</i>	159
2.2.3.2.	Inhibition de l'attachement de <i>S. aureus</i> à <i>V. vermiformis</i>	160
2.2.3.3.	Inhibition de l'attachement de <i>S. aureus</i> aux Thp-1	160
2.3.	Etudes des interactions entre <i>A. fumigatus</i> et les cellules phagocytaires.....	162
2.3.1.	Article 2 : <i>Vermamoeba vermiformis</i> - <i>Aspergillus fumigatus</i> relationships and comparison with other phagocytic cells	162
2.4.	Etude des interactions entre adénovirus et cellules phagocytaires.....	175

2.4.1. Article 3 : Comparative study of human adenovirus replication in <i>Acanthamoeba castellanii</i> and Thp-1 macrophagic cells.....	175
CHAPITRE 5 : DISCUSSION	197
CHAPITRE 6 : CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	211
CHAPITRE 7 : BIBLIOGRAPHIE.....	215
CHAPITRE 8 : ANNEXES	245

Liste des abréviations

ABPA : Aspergillose broncho-pulmonaire allergique

ACN : Acétonitrile

ADP : Adenovirus death protein

AdV : Adénovirus

agr : accessory gene regulator

ARB : Amoeba-resisting bacteria

CAR : Coxsackie and adenovirus receptor

CCM : Chromatographie sur couche mince

CFTR : Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

CFU-GM : Granulocyte-Macrophage -Colony stimulating factor

CFW : CalcoFluor White

CLP : Progéniteurs communs lymphoïdes

CMH I : Complexe d'histocompatibilité de classe I

CMH II : Complexe d'histocompatibilité de classe II

CMP : Progéniteurs communs myéloïdes

CSH : Cellules souches hématopoïétiques

DBP : DNA Binding protein

DICT/TCID : Tissue Culture Infective Dose

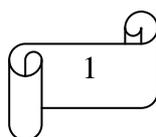
DO : Densité optique

ECP : Effet cytopathique

ESI-MS : Spectrométrie de masse en électrospray

FcR : Récepteurs de la partie Fc des immunoglobulines

GAE : Encéphalite granulomateuse amibienne



GILT : γ – inducible lysosomal thiol reductase

GMP : Progéniteurs communs granulocytaires monocytaires

HPLC : Chromatographie liquide haute performance

IAC : Infection acquise communautaire

IAH : Infection acquise en milieu hospitalier

ICE : Eléments d'intégration et de conjugaison

IFN- γ : Interféron γ

IL-x : Interleukine x

iNOS : inducible Nitric oxyde synthase

ITR : Inverted terminal repeats

LB : Lysogeny Broth

LLO : Listeriolysine O

LPS : Lipopolysaccharide

M-CSF : Macrophage – Colony stimulating factor

MEP : Progéniteurs communs mégacaryocytaires érythroblastiques

MET : Microscopie électronique à transmission

MH : Mueller Hinton

MNGC : Cellules géantes multi-nuclées

MOI : Multiplicité d'infection

MS-MS : Spectrométrie de masse couplée à la spectrométrie de masse

NNA : Non-nutritive agar

NO : Nitric oxyde

PAMPs : Pathogen-associated molecular patterns

PAS : Page's modified Neff's amoeba saline

PCR : Polymerase chain reaction

PKC : Protéine kinase C

PMA : Phorbol-12-myristate-13-acétate

PRR : Pattern recognition receptors

PTH : Hormone parathyroïdienne

PYG : Proteose peptone, Yeast extract, Glucose

PYNFH : Peptone, Yeast extract, Nucleic acid, Folic acid, Hemin

qPCR : PCR quantitative

ROS : Reactive oxygen species

SVF : Sérum de veau foetal

TCR : T cell receptor

TFA : acide trifluoroacétique

TLR : Toll-Like Receptors

TNF- α : Tumor necrosis factor α

TP : Terminal Protein

TSST-1 : Toxine du syndrome de choc toxique 1

UFC : Unités formant colonies

Liste des figures

Figure 1 : Classification des principaux genres d'amibes libres	12
Figure 2 : Schéma de la structure d' <i>Acanthamoeba</i>	13
Figure 3 : Trophozoïte d' <i>A. castellanii</i> en microscopie électronique à balayage.....	13
Figure 4 : Kystes matures d' <i>Acanthamoeba spp.</i> en microscopie électronique à balayage	14
Figure 5 : Cycle d' <i>Acanthamoeba</i>	16
Figure 6 : Les différentes étapes d'enkystement d' <i>A. castellanii</i>	16
Figure 7 : Les différentes étapes du déenkystement d' <i>A. castellanii</i>	17
Figure 8 : Schéma de la structure d'un macrophage	20
Figure 9 : Schéma de l'hématopoïèse	22
Figure 10 : Développement et différenciation des macrophages	23
Figure 11 : Activation des macrophages	24
Figure 12 : Hétérogénéité fonctionnelle des macrophages	28
Figure 13 : Classification du genre <i>Klebsiella</i> pathogène pour l'Homme	31
Figure 14 : <i>Klebsiella pneumoniae</i> en microscopie électronique à balayage et en coloration de Gram.....	32
Figure 15 : Représentation des facteurs de pathogénicité de <i>K. pneumoniae</i>	33
Figure 16 : Classification du genre <i>Staphylococcus</i>	38
Figure 17 : <i>Staphylococcus aureus</i> en microscopie électronique à balayage et en coloration de Gram.....	39
Figure 18 : Classification du genre <i>Aspergillus</i> pathogène pour l'Homme	46
Figure 19 : Aspect d'une colonie d' <i>Aspergillus fumigatus</i> sur gélose	47
Figure 20 : Morphologie d' <i>A. fumigatus</i>	47
Figure 21 : Cycle de vie d' <i>Aspergillus</i>	49
Figure 22 : Cycle infectieux d' <i>A. fumigatus</i>	50
Figure 23 : Structure d'un adénovirus	57
Figure 24 : Structure de la capsidie des adénovirus	58

Figure 25 : Organisation du génome des adénovirus	61
Figure 26 : Cycle d'infection et de multiplication des adénovirus	63
Figure 27 : Schéma de la phagocytose dans les macrophages	74
Figure 28 : Stratégies utilisées par différents micro-organismes pour inhiber la maturation des phagosomes	78
Figure 29 : Pathogènes persistant dans le phagosome	82
Figure 30 : Stratégies utilisées par différents micro-organismes pour échapper aux phagosomes	83
Figure 31 : Schéma du test de préférence trophique	95
Figure 32 : Schéma du test de diffusibilité.....	96
Figure 33 : Chromatogramme de la fraction éluée à 40 % d'ACN du surnageant de culture de <i>K. pneumoniae</i> , obtenu par HPLC en phase inverse.	119
Figure 34 : Chromatogramme de la fraction éluée à 20 % d'ACN du surnageant culture de <i>S. aureus</i> obtenu par HPLC en phase inverse.	120
Figure 35 : Spectre ESI-MS de faible énergie de la fraction A pour <i>K. pneumoniae</i>	123
Figure 36 : Spectre ESI-MS de faible énergie de la fraction B pour <i>K. pneumoniae</i>	124
Figure 37 : Spectre ESI-MS de faible énergie de la fraction C pour <i>K. pneumoniae</i>	126
Figure 38 : Spectre ESI-MS de faible énergie de la fraction D pour <i>K. pneumoniae</i>	127
Figure 39 : Spectre ESI-MS de faible énergie la fraction E pour <i>K. pneumoniae</i>	128
Figure 40 : Spectre ESI-MS de faible énergie de la fraction A pour <i>S. aureus</i>	131
Figure 41 : Spectre ESI-MS de faible énergie de la fraction B pour <i>S. aureus</i>	133
Figure 42 : Spectre ESI-MS de faible énergie de la fraction C pour <i>S. aureus</i>	134
Figure 43 : Numération des UFC de <i>K. pneumoniae</i> à 3 h, 6 h, 24 h ou 48 h en co-culture avec <i>V. vermiformis</i>	148
Figure 44 : Numération des UFC de <i>K. pneumoniae</i> en co-culture avec <i>V. vermiformis</i> après ajout de gentamicine à 3h et 24h de co-culture.	150
Figure 45 : Numération de <i>K. pneumoniae</i> ayant adhéré à <i>V. vermiformis</i> en présence des sucres.....	151
Figure 46 : Numération des UFC de <i>S. aureus</i> en co-culture avec <i>A. castellanii</i>	153
Figure 47 : Numération des UFC de <i>S. aureus</i> en co-culture avec <i>V. vermiformis</i>	154
Figure 48 : Numération des UFC de <i>S. aureus</i> en co-culture avec les cellules Thp-1.....	155

Figure 49 : Numération des UFC de *S. aureus* en co-culture avec *A. castellanii* après ajout de gentamicine à 3h et 24h de co-culture..... 156

Figure 50 : Numération des UFC de *S. aureus* en co-culture avec *V. vermiformis* après ajout de gentamicine à 3h et 24h de co-culture..... 157

Figure 51 : Numération des UFC de *S. aureus* en co-culture avec les macrophages Thp-1 après ajout de gentamicine à 3h et 24h de co-culture. 158

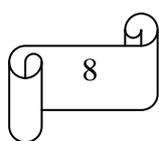
Figure 52 : Numération des *S. aureus* ayant adhéré à *A. castellanii* en fonction ou non de la présence de glucose, galactose, mannose, rhamnose ou fructose. 159

Figure 53 : Numération des *S. aureus* ayant adhéré à *V. vermiformis* en fonction ou non de la présence de glucose, galactose, mannose, rhamnose ou fructose. 160

Figure 54 : Numération des *S. aureus* ayant adhéré aux cellules Thp-1 en fonction ou non de la présence de glucose, galactose, mannose, rhamnose ou fructose. 161

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principales pathologies classées en fonction des sous-groupes d'adénovirus	66
Tableau 2 : Souches de micro-organismes utilisés dans l'étude	90
Tableau 3 : Exemple de calcul du titre d'une suspension virale	102
Tableau 4 : Résultats de la préférence trophique des amibes <i>A. castellanii</i> et <i>V. vermiformis</i>	115
Tableau 5 : Résultats de l'attractivité des bactéries tuées ou de leur surnageant sur <i>A. castellanii</i>	116
Tableau 6 : Résultats des tests d'attraction d' <i>A. castellanii</i> par les différentes fractions des surnageants de culture.	118
Tableau 7 : Résultats de la détermination de la nature des molécules actives	122
Tableau 8 : Tableau récapitulatif des masses expérimentales (m/z) des molécules identifiées et de leurs différentes formes pour le surnageant de <i>K. pneumoniae</i>	130
Tableau 9 : Tableau récapitulatif des masses expérimentales (m/z) des molécules identifiées et de leurs différentes formes pour le surnageant de <i>S. aureus</i>	135
Tableau 10 : Effet des fractions du surnageant d' <i>A. castellanii</i> obtenues par Sep-Pak sur la croissance de <i>K. pneumoniae</i>	152



Chapitre 1 : Etude bibliographique

1. Les cellules phagocytaires

Les cellules phagocytaires sont, selon l'étymologie du mot, des cellules "mangeuses". En effet, elles peuvent absorber et digérer des particules inorganiques (comme les nutriments) ou organiques (comme les micro-organismes). Les cellules phagocytaires les plus connues sont les cellules du système immunitaire et plus particulièrement les macrophages qui possèdent un rôle de défense de l'organisme. Les amibes représentent un autre type de cellules phagocytaires, pouvant être retrouvées dans l'environnement et se nourrissant principalement de micro-organismes. Certaines d'entre elles peuvent être pathogènes pour l'Homme.

1.1. Les amibes libres : exemple d'*Acanthamoeba castellanii*

1.1.1. Généralités

Les amibes sont des protozoaires appartenant à la classe des Rhizopodes. Elles peuvent être classées en deux grandes catégories :

- Les amibes parasites, qui sont à la recherche d'un hôte et se développent peu dans l'environnement, même si elles peuvent y survivre.
- Les amibes libres ou telluriques qui se développent de manière autonome dans l'environnement, indépendamment de l'Homme ou des animaux. Certaines de ces amibes peuvent parasiter l'Homme, induisant alors des pathologies souvent graves.

1.1.1.1. Classification

La classification des amibes libres a été un processus complexe ayant évolué au cours du temps en fonction des avancées techniques, biologiques et moléculaires. La classification des amibes libres a d'abord été basée sur la morphologie des cellules observées uniquement en microscopie optique (Schaeffer, 1926). Par la suite, la division nucléaire a été prise en compte pour différencier les amibes et donc proposer de nouvelles classifications (Singh, 1952). Ensuite, le mode de locomotion des amibes ainsi que le mouvement de leur cytoplasme ont été pris en compte. Cependant tous ces critères se sont avérés être limitants dans la distinction des espèces (Jahn and Bovee, 1965 ; Jahn et al., 1974).

Dans les années 80, l'utilisation de la microscopie électronique a permis la mise en évidence d'ultrastructures et de particularités du cycle de vie des amibes. Ces nouvelles observations ont conduit à une meilleure description des amibes déjà connues ainsi qu'à celle de nouvelles amibes. En 1987, Page proposa une nouvelle classification se basant ces nouvelles observations : ultra-structurales, biologiques et physiologiques (Page, 1987). Depuis, le développement des outils de biologie moléculaire a permis une révision régulière de cette classification.

Une classification des eucaryotes avec une hiérarchie simplifiée pour chaque rang a été publiée en 2005 par Adl (Adl et al., 2005). Elle a été révisée en 2012 (Adl et al., 2012) puis en 2015 (Cavalier-Smith et al., 2015). La Figure 1 présente la place des principaux genres amibiens à l'intérieur des eucaryotes.

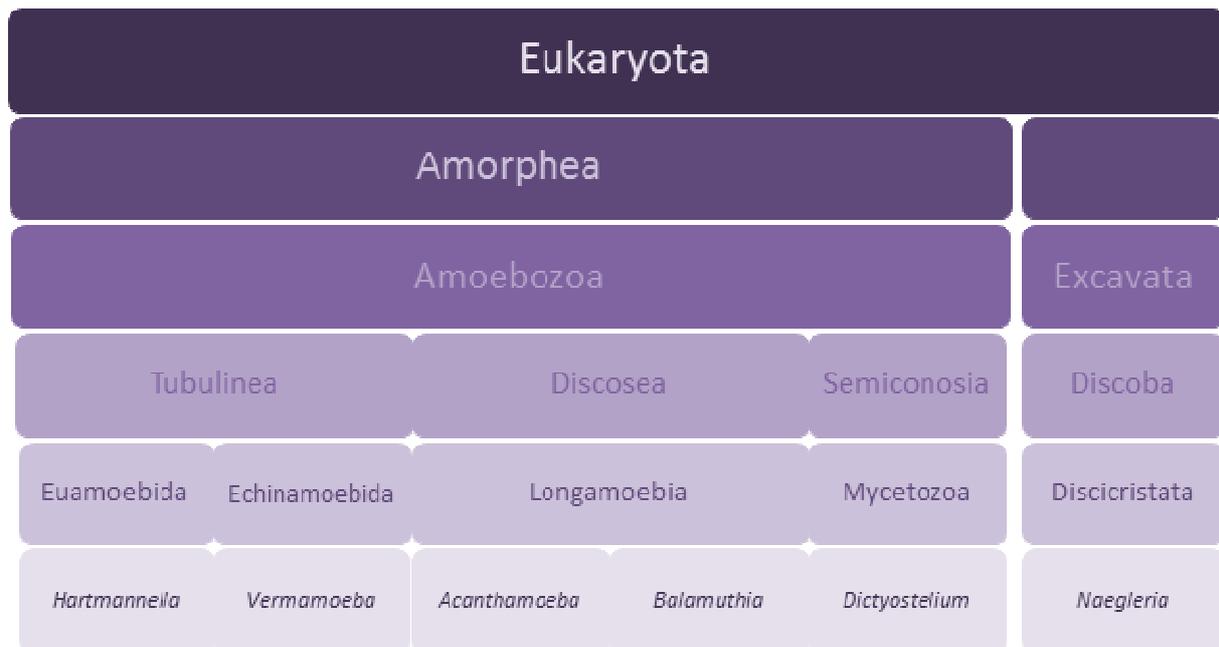


Figure 1 : Classification des principaux genres d'amibes libres

(Adl et al., 2012 ; Cavalier-Smith et al., 2015)

D'autre part, avant 2011, le genre *Hartmannella* comprenait de nombreuses espèces telles que *H. cantabrigensis*, *H. lobifera* mais aussi *H. vermiformis*, fréquemment rencontrée dans l'environnement. Cependant, certains auteurs ont montré que cette dernière espèce n'était pas liée aux autres espèces du genre et ont donc permis sa reclassification dans un nouveau genre appelé *Vermamoeba* dont elle constitue la seule espèce sous le nom de *V. vermiformis* (Smirnov et al., 2011).

1.1.1.2. Morphologie

Les amibes *Acanthamoeba castellanii* sont des cellules eucaryotes, organisées en structures complexes, comprenant de nombreux types de vacuoles (Bowers and Korn, 1968). On retrouve les organites habituels des cellules eucaryotes : un noyau, un appareil de Golgi, un réticulum endoplasmique et des mitochondries (Figure 2). On décrit en outre :

- les acanthopodes permettant la locomotion grâce aux filaments d'actine

- les vacuoles contractiles, capables d'expulser l'eau en excès de l'amibe afin de réguler l'osmose
- les vacuoles alimentaires ou vacuoles de phagocytose permettant la digestion
- le cytoplasme composé de deux parties : l'ectoplasme représentant la couche superficielle de l'amibe et l'endoplasme qui en est la partie centrale

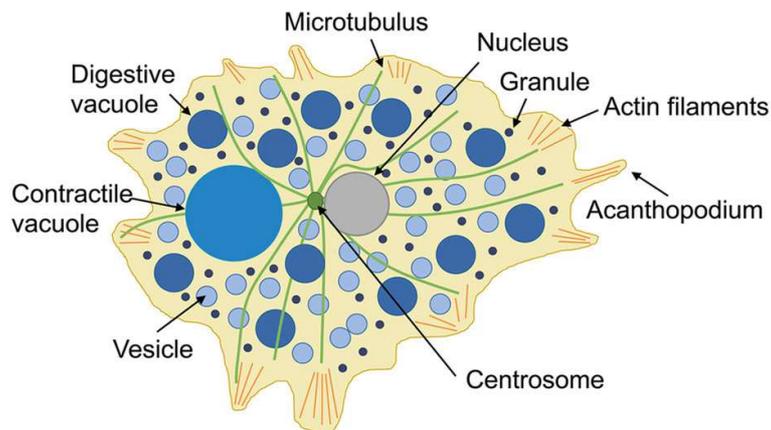


Figure 2 : Schéma de la structure d'*Acanthamoeba*

(Reverey et al., 2015)

Ces amibes sont retrouvées sous deux formes : une forme végétative appelée trophozoïte et une forme dormante ou forme kystique. Les trophozoïtes (Figure 3) mesurent entre 25 et 40 μm et sont biologiquement actifs. Ils ont la capacité de se déplacer par des mouvements amoéboïdes et d'adhérer à certains substrats (Bowers and Korn, 1968).



Figure 3 : Trophozoïte d'*A. castellanii* en microscopie électronique à balayage

(Collection personnelle)

Les kystes (Figure 4) mesurent entre 13 et 20 μm et sont biologiquement inactifs. Ils représentent la forme de résistance des amibes lorsque les conditions de l'environnement deviennent défavorables pour les trophozoïtes. L'activité métabolique des formes kystiques est réduite, leur permettant une survie prolongée (Bowers and Korn, 1969).

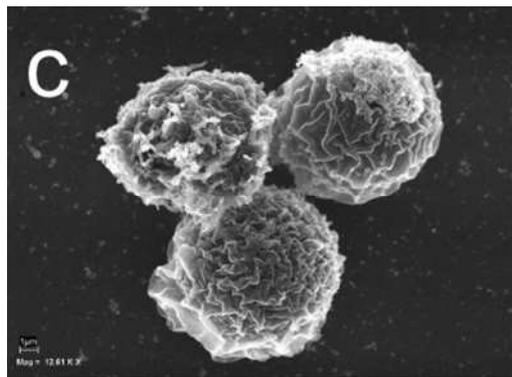


Figure 4 : Kystes matures d'*Acanthamoeba* spp. en microscopie électronique à balayage

(Lorenzo-Morales et al., 2008)

1.1.2. Ecologie

Les *Acanthamoeba* sont présentes dans tous les types d'environnements, qu'ils soient naturels ou artificiels telles que des constructions humaines.

Ces amibes peuvent être mises en évidence dans le sol, les poussières, les eaux douces comme les lacs, les rivières mais aussi dans les eaux salées (Rivera et al., 1987 ; Rodríguez-Zaragoza, 1994 ; Marciano-Cabral and Cabral, 2003). On les retrouve également dans l'air sous forme kystique permettant ainsi leur dissémination. En effet, Lawande a pu isoler 38 souches d'amibes libres sur des géloses recouvertes d'*Escherichia coli* exposées à l'harmattan, un vent soufflant du nord vers le sud-ouest africain (Lawande, 1983).

Les *Acanthamoebae* sont également retrouvées dans des environnements artificiels créés par l'Homme. En effet, les conditions de température, d'humidité et de nourriture peuvent y être favorables à leur développement. De nombreuses études ont montré leur présence dans les réseaux d'alimentation en eau des villes, avec une part plus importante pour le genre *Acanthamoeba* (Jacquemin et al., 1981 ; Delafont et al., 2013). Il est également possible de les retrouver dans les tours aéro-réfrigérantes des centrales nucléaires, les systèmes de climatisation mais aussi les piscines chauffées ou les aquariums (Rivera et al., 1993 ; Barbeau and Buhler, 2001).

Ces amibes ont également été isolées dans des environnements liés à la santé humaine tels que les unités de soins dentaires et les réseaux d'eau des hôpitaux. Elles sont aussi régulièrement retrouvées à la surface de lentilles de contact (Larkin et al., 1990 ; Barbeau and Buhler, 2001).

1.1.3. Cycle réplicatif et nutrition

1.1.3.1. Cycle réplicatif

Nous avons vu que le cycle de vie d'*Acanthamoeba* ne se déroule que sous deux formes : les kystes et les trophozoïtes (Figure 5). Contrairement à *Naegleria fowleri*, autre amibe libre, il n'existe pas de stade flagellé. Les trophozoïtes qui sont les formes biologiquement actives de l'amibe se multiplient par mitose. Ils représentent également les formes infectieuses de ces protozoaires, même si les kystes sont eux aussi capables de pénétrer dans le corps humain par voie nasale, oculaire ou cutanée. Certaines espèces du genre *Acanthamoeba* sont responsables de pathologies comme la kératite chez le sujet

immunocompétent ou l'encéphalite amibienne granulomateuse chez le sujet immunodéficient
(<https://www.cdc.gov/parasites/acanthamoeba/biology.html>, consulté le 01/06/2016).

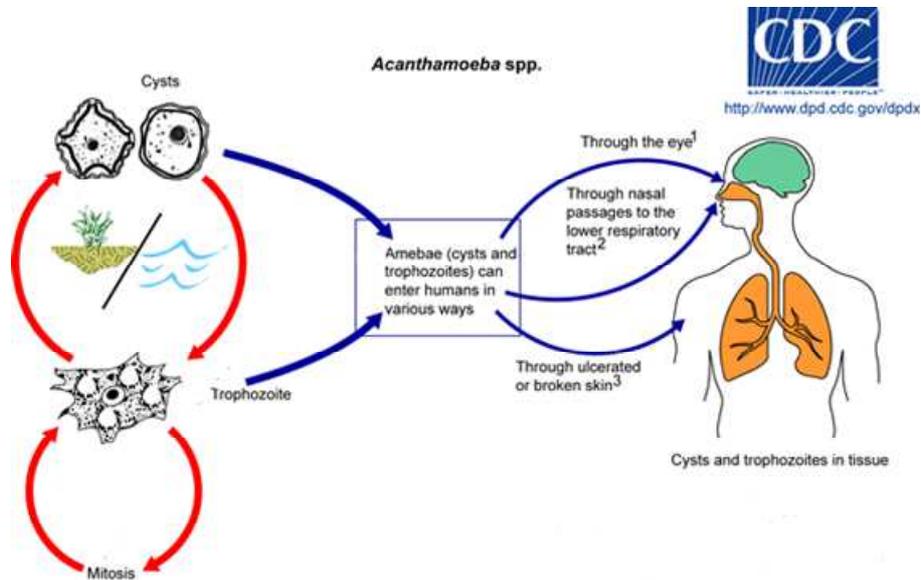


Figure 5 : Cycle d'*Acanthamoeba*

(<https://www.cdc.gov/parasites/acanthamoeba/biology.html>, consulté le 01/06/2016)

Les trophozoïtes sont majoritaires dans les conditions optimales de croissances (Khan, 2009). L'enkystement se produit lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables (Marciano-Cabral and Cabral, 2003) et s'accompagne de changements morphologiques et d'un ralentissement du cycle cellulaire.

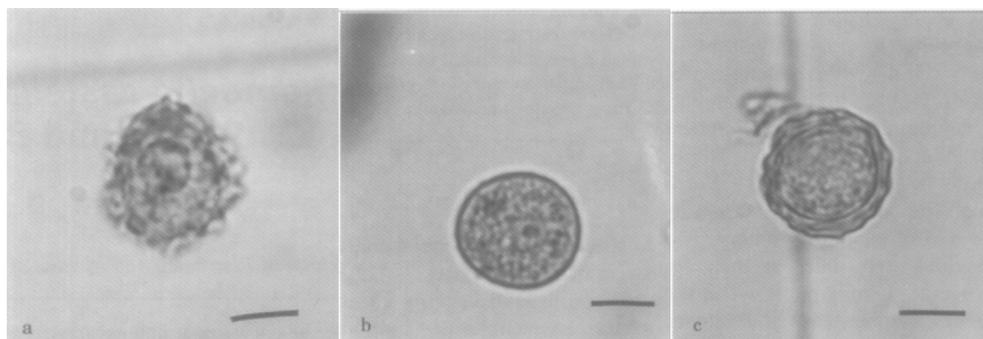


Figure 6 : Les différentes étapes d'enkystement d'*A. castellanii*

(a) Trophozoïte (b) Jeune kyste (c) Kyste mature (Khunkitti et al., 1998)

L'enkystement se déroule en trois étapes (Figure 6) (Khunkitti et al., 1998):

- Pré-enkystement : le trophozoïte perd sa mobilité, s'arrondit et son diamètre diminue.
- Début de la synthèse de la paroi : la paroi externe appelée ectokyste est synthétisée puis c'est au tour de la paroi interne, l'endokyste.
- Phase de dormance

Les kystes, très résistants, peuvent rester viables pendant de nombreuses années (Sriram et al., 2008). Cette forme permet également une meilleure dissémination de l'amibe dans l'environnement. Lorsque les conditions environnementales redeviennent favorables, les amibes se désenkystent pour redevenir des trophozoïtes (Figure 7). La vacuole contractile redevient tout d'abord visible et se déplace vers la paroi, permettant ainsi au trophozoïte de se séparer de l'endokyste puis de la totalité de la paroi du kyste pour reprendre son cycle de division (Murti and Shukla, 1984).

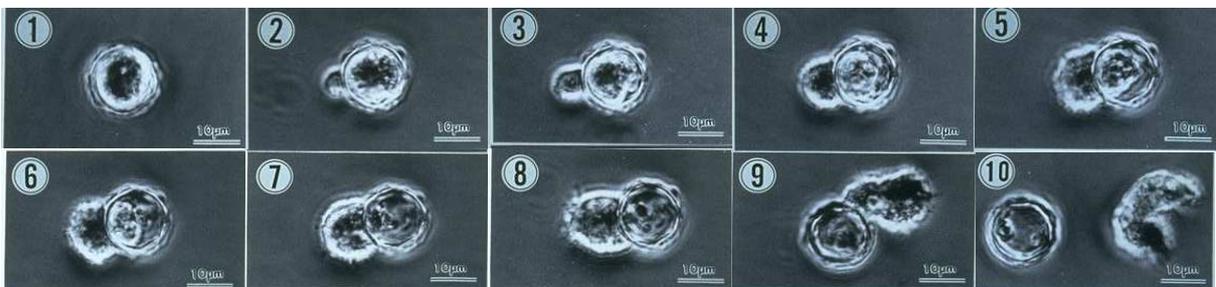


Figure 7 : Les différentes étapes du désenkystement d'*A. castellanii*

(1) Kyste mature, (2 à 4) Phase de pré-émergence, (5 à 8) Emergence du trophozoïte, (9-10) Trophozoïte libre. (protist.i.hosei.ac.jp/PDB/Images/Sarcodina/acanth/03.html consulté le 05/06/2016)

1.1.3.2. Nutrition

Les amibes du genre *Acanthamoeba spp.* utilisent deux processus de nutrition : la phagocytose et la pinocytose. Elles se nourrissent dans l'environnement de micro-organismes tels que des bactéries, des champignons ou des virus. Le principal mode de nutrition alors retrouvé est la phagocytose qui permet la capture et l'ingestion de particules solides, par l'extension de pseudopodes qui vont entourer la particule puis former un phagosome (Bowers, 1977).

La pinocytose permet l'internalisation de liquides organiques et d'éléments nutritifs (Bowers, 1977) et se fait par invagination de la membrane plasmique. Ce phénomène, permettant la culture des amibes libres dans un milieu nutritif axénique en absence de micro-organismes, est utilisé en laboratoire pour le maintien des souches.

1.1.4. Pathogénicité

A. castellanii peut être responsable de pathologies humaines comme la kératite amibienne ou l'encéphalite granulomateuse amibienne (GAE). Des atteintes cutanées ont également été rapportées.

La kératite amibienne est une inflammation de la cornée pouvant évoluer vers la cécité (Seal et al., 2003). Elle est généralement retrouvée chez les porteurs de lentilles de contact et associée au mauvais entretien de ces matériels. La pathologie peut également survenir après un contact avec de l'eau contaminée. L'infection est causée par les trophozoïtes d'*A. castellanii* qui se développent après avoir adhéré à l'épithélium cornéen. Les trophozoïtes pénètrent alors l'épithélium, provoquant une inflammation du nerf optique puis une nécrose. L'étape suivante est une invasion du stroma, détruisant ainsi les fibres de collagène et les

kératinocytes (Garner, 1993 ; Kim et al., 2006). La symptomatologie de la kératite amibienne associe un œil rouge et une douleur oculaire généralement accompagnée de photophobie. Cependant, ces symptômes ne sont pas spécifiques car semblables à ceux retrouvés lors de kératites bactériennes, fongiques ou virales. La mise en évidence des amibes est donc nécessaire pour établir le diagnostic.

La GAE est une infection du système nerveux central mortelle dans environ 90 % des cas et touchant principalement les patients immunodéprimés (Marciano-Cabral and Cabral, 2003 ; Schuster and Visvesvara, 2004). La contamination se fait par voies respiratoire, cutanée ou oculaire, les amibes se propageant ensuite jusqu'à l'encéphale en traversant la barrière hémato-encéphalique. Les principaux symptômes retrouvés sont une fièvre, des nausées, des vomissements accompagnés d'une raideur de nuque, de céphalées et de troubles du comportement. Après quelques semaines à quelques mois, la pathologie évolue vers le coma et la mort du patient. Le diagnostic de la GAE étant difficile, il se fait souvent lors d'un examen post-mortem, révélant des œdèmes et des zones nécrosées.

Des atteintes cutanées ont été rapportées, à type de lésions nodulaires et d'ulcères, touchant principalement les immunodéprimés (Steinberg et al., 2002). Sans traitement, ces ulcères peuvent évoluer vers des plaques de nécrose. Les infections localisées peuvent également permettre l'entrée d'*A. castellanii* dans la circulation sanguine, provoquant des lésions à distance et des affections systémiques.

1.2. Les macrophages

1.2.1. Généralités

Le nom macrophage vient du grec makros = gros et phagein = manger. Les macrophages sont des cellules phagocytaires participant à l'immunité innée. Ils ont un rôle de défense non-spécifique. Leur fonction principale est de phagocyter les micro-organismes pathogènes mais aussi les débris cellulaires.

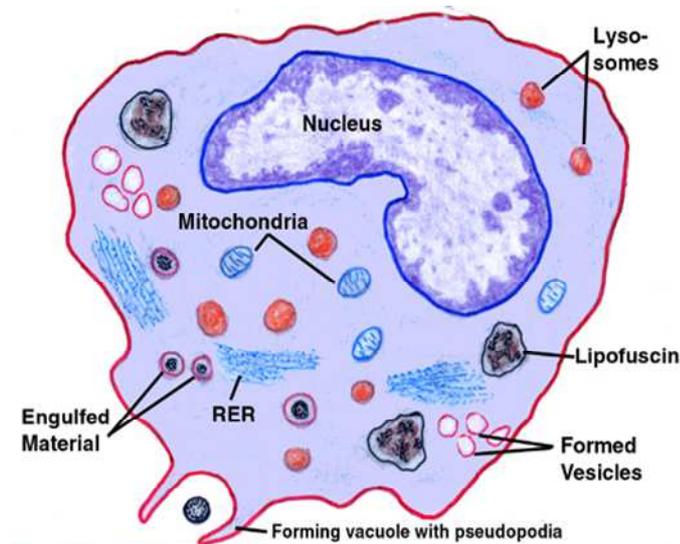


Figure 8 : Schéma de la structure d'un macrophage

(<http://www.doctorc.net/Labs/Lab5/lab5.htm> consulté le 10/06/2016)

Les macrophages peuvent mesurer de 25 à 50 μm de diamètre. Ce sont des cellules eucaryotes organisées en structure complexe possédant de nombreuses vacuoles (endosomes, lysosomes, phagosomes, phagolysosomes...). Le noyau est excentré dans la cellule et peut être réniforme ou arrondi. L'appareil de Golgi est retrouvé à côté du noyau et le réticulum endoplasmique rugueux est dispersé dans le cytoplasme. On observe de nombreuses mitochondries et des lysosomes situés près de la membrane cytoplasmique, pouvant se lier

aux phagosomes, formant ainsi des phagolysosomes (Figure 8). Les macrophages sont également des cellules adhérentes qui peuvent se déplacer grâce au cytosquelette formé de microtubules et de filaments d'actine (Auger and Ross, 1992).

1.2.2. Cycle répliatif et mode d'action

1.2.2.1. Cycle répliatif

Les macrophages sont formés au cours de l'hématopoïèse, comme toutes les cellules sanguines (leucocytes, érythrocytes, thrombocytes), et ont pour origine la moelle osseuse chez les mammifères adultes (van Furth, 1989).

L'hématopoïèse (Figure 9) commence dans la moelle osseuse par les cellules souches hématopoïétiques (CSH) qui vont donner naissance aux différentes cellules sanguines (Birbrair and Frenette, 2016). Les CSH vont ainsi se différencier en progéniteurs qui subiront trois processus de différenciation :

- l'érythropoïèse, processus permettant la fabrication des globules rouges ou érythrocytes
- la leucopoïèse, processus permettant la fabrication des globules blancs ou leucocytes (polynucléaires, monocytes/macophages et lymphocytes)
- la thrombocytopoïèse, processus permettant la fabrication des plaquettes ou thrombocytes

Il existe deux types de progéniteurs primitifs provenant des CSH : les progéniteurs communs myéloïdes (CMP) et les progéniteurs communs lymphoïdes (CLP). Ces progéniteurs primitifs se différencient ensuite en progéniteurs différenciés. Les CLP aboutissent aux progéniteurs des lymphocytes et des cellules dendritiques. Les CMP sont à

l'origine des progéniteurs communs granulocytaires monocytaires (GMP) ainsi qu'à celle des progéniteurs communs mégacaryocytaires érythroblastiques (MEP). Les MEP sont les progéniteurs de l'érythropoïèse et de la thrombopoïèse. Les GMP sont les progéniteurs de la leucopoïèse qui nous intéresse ici. Les progéniteurs différenciés produisent ensuite des progéniteurs tardifs qui évolueront vers des précurseurs, premières cellules morphologiquement identifiables pour chaque lignée cellulaire (Fernández and de Alarcón, 2013 ; <http://www.hematocell.fr/index.php/enseignement-de-lhematologie-cellulaire> consulté le 10/11/2016).

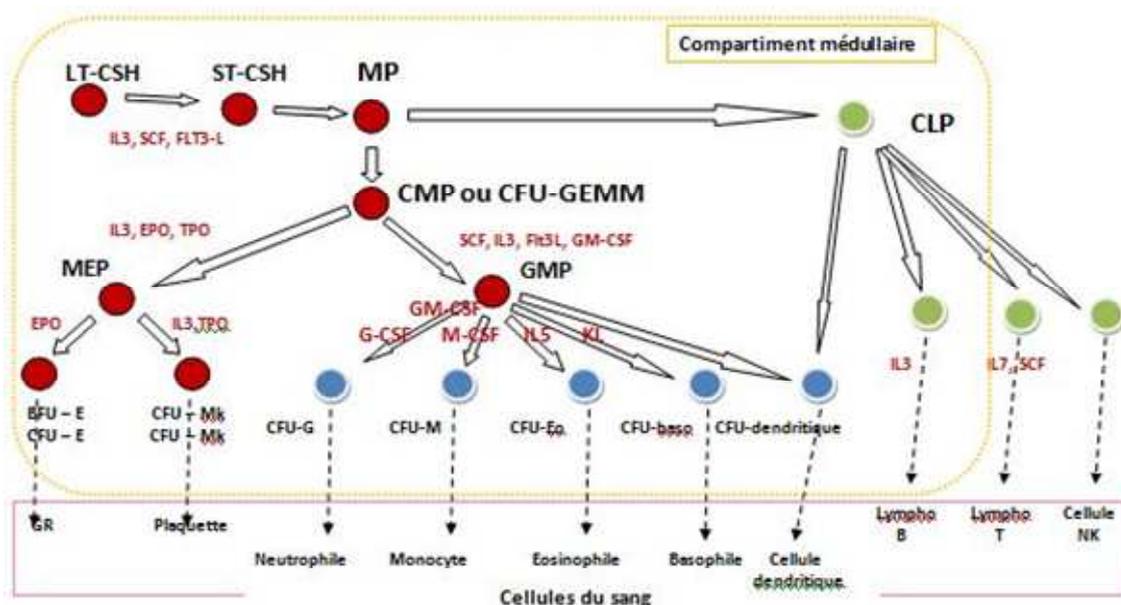


Figure 9 : Schéma de l'hématopoïèse

(<http://www.hematocell.fr/index.php/enseignement-de-lhematologie-cellulaire> consulté le 10/11/2016)

Pour la lignée monocyttaire, le progéniteur tardif est de type CFU-GM (Colony Forming Unit of Granulocyte - Macrophages), il aboutit aux monoblastes, précurseurs de la lignée, en présence de GM-CSF (Granulocyte Macrophage-colony stimulating factor), de M-CSF (Macrophage-colony stimulating factor) ainsi que d'IL-3 (Interleukine 3) et d'IL-6 (Interleukine 6) (Auger and Ross, 1992). Le monoblaste évolue ensuite vers les promonocytes

qui se diviseront pour donner des monocytes qui quitteront alors la moelle osseuse pour entrer dans la circulation sanguine, où ils circuleront pendant 1 à 3 jours avant de migrer dans les organes où ils se différencieront en macrophages (Bosque et al., 1997).

La dispersion des monocytes à travers l'organisme se déroule au hasard, de façon continue. Lors d'une infection ou d'un traumatisme, un afflux en monocytes est dû à l'expression accrue des adhésines à la surface des cellules endothéliales des vaisseaux (Auger and Ross, 1992). Les monocytes se différencient en macrophages lors de l'infiltration dans les différents organes et, suivant le tissu dans lequel ils se situent, ils prennent différents noms et morphologies (Figure 10). On les retrouve dans le foie (cellules de Kupffer), dans la rate, les tissus lymphoïdes, les poumons (macrophages alvéolaires), les os (ostéoclastes), les tissus conjonctifs (chondroclastes), le système nerveux central (microglie)... (Bosque et al., 1997 ; Rickard and Young, 2009).

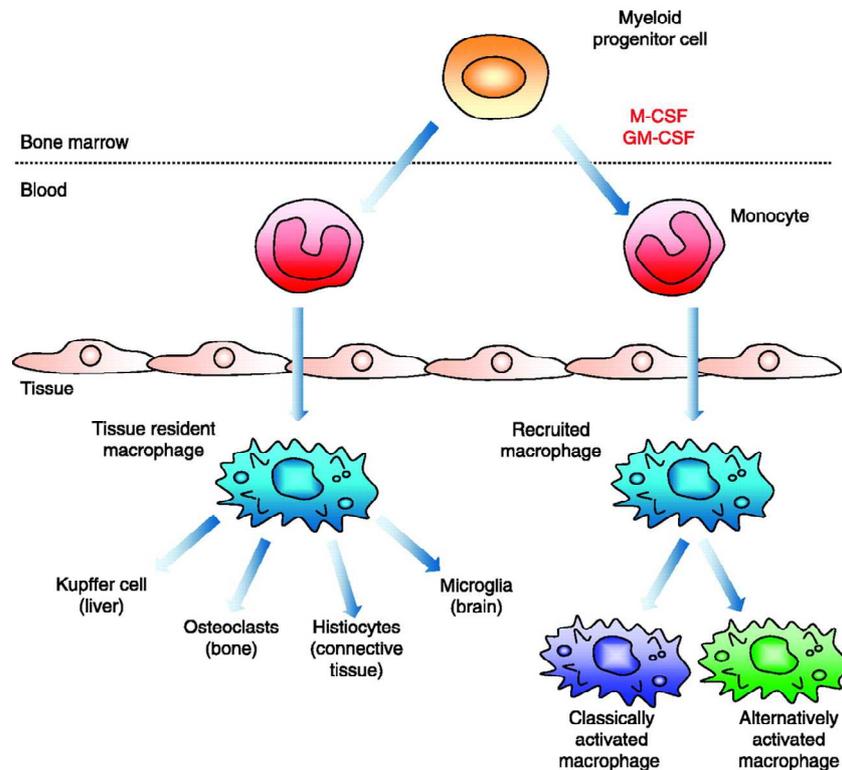


Figure 10 : Développement et différenciation des macrophages

(Rickard and Young, 2009)

Les monocytes en tant que réservoir réactif et les macrophages en tant qu'effecteurs immédiats sont des acteurs-clés de l'inflammation et sont essentiels à la défense innée vis-à-vis des différents pathogènes. Ces cellules constituent ainsi la première ligne de défense de l'organisme contre les infections et font le lien avec l'immunité adaptative.

1.2.2.2. Activation des macrophages

L'inflammation lors des infections entraîne l'activation des macrophages résidents, augmentant la production de cytokines, de chemokines ainsi que le recrutement de monocytes. On distingue l'activation des macrophages M1 qui est une activation dite classique et l'activation des macrophages M2 qui est une activation dite alternative.

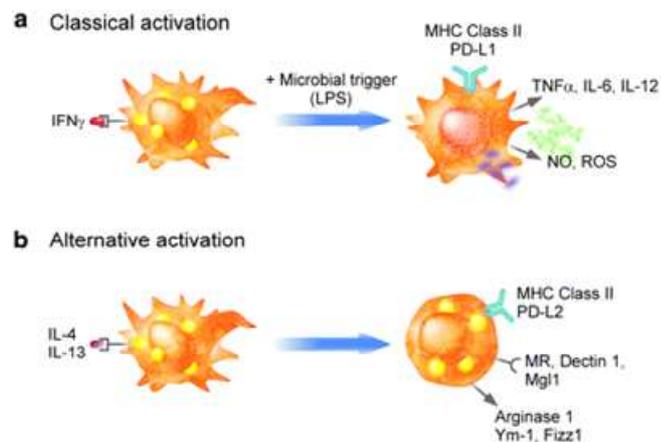


Figure 11 : Activation des macrophages

(a) Activation classique par les cytokines de type Th1 et les produits microbiens tel que le LPS (b) Activation alternative des macrophages par les cytokines de type Th2 (Chawla, 2010)

Les macrophages M1 sont induits par les cytokines Th1, IFN- γ et TNF- α alors que les macrophages M2 sont induits par les cytokines Th2, IL-4 et IL-13 (Gordon, 2003; Mosser, 2003; Gordon, 2008). L'activation des différents macrophages varie en fonction du micro-

environnement dans lequel ils se trouvent ainsi que des récepteurs exprimés à leur surface (Figure 11).

1.2.2.2.1. Activation classique

L'activation classique des macrophages M1 est une différenciation induite par l'IFN- γ , associée à un stimulus microbien comme le lipopolysaccharide ou des cytokines comme le TNF- α (Mosser, 2003 ; Martinez et al., 2006).

L'interaction entre les pathogènes et les senseurs cellulaires, les PRR (Pattern Recognition Receptors) entraîne la production de chimiokines par les macrophages. Cette production permet le recrutement des cellules de l'immunité innée comme les cellules natural killer (NK) produisant de l'IFN- γ . L'IFN- γ active les macrophages qui vont alors produire de l'IL-12 qui est un signal fort pour obtenir une réponse Th1. Ces cellules Th-1 vont à leur tour produire de l'IFN- γ , dont la production atteint ainsi un niveau plus élevé permettant alors une activation classique des macrophages, totale et de manière plus durable. Il s'agit ici d'une activation des macrophages lors d'une réponse immune à médiation cellulaire. L'activation des macrophages M1 va donc favoriser la phagocytose des pathogènes grâce aux immunoglobulines et au complément. En effet, la présence de l'IFN- γ augmente l'expression des TLR (Toll-Like Receptors) et des FcR (Récepteurs de la partie Fc des immunoglobulines) à la surface des macrophages, facilitant de ce fait les interactions avec les pathogènes (Schroder et al., 2006 ; Mantovani et al., 2007).

L'activation de cette voie permet la production de réactifs intermédiaires de l'oxygène et de l'azote, induisant une activité microbicide efficace. Cette activité est associée à la présentation de l'antigène par les molécules du complexe d'histocompatibilité de classe II (CHM II) dont l'expression est augmentée par l'IFN- γ .

L'activation des macrophages M1 permet la résistance contre les pathogènes intracellulaires comme certaines bactéries ou les virus et favorise la résistance contre les tumeurs (Mantovani et al., 2007).

1.2.2.2.2. Activation alternative

Le terme M2 est donné aux macrophages activés autrement que de la manière classique comme les macrophages M1. L'utilisation du terme M2 est justifiée par des propriétés fonctionnelles similaires (comme un faible taux d'IL-12), leur implication dans l'immunorégulation ou encore le remodelage des tissus. Cependant, il existe trois formes de macrophages M2 bien définies :

- M2a (a pour alternative) induite par l'IL-4 et l'IL-13
- M2b induite par des complexes immuns et des agonistes de TLR
- M2c induite par l'IL-10 et par des hormones glucocorticoïdes (Mantovani et al., 2004).

Les macrophages activés diffèrent au niveau de leurs récepteurs, de la production des cytokines mais aussi de leurs fonctions effectrices. Les macrophages M2 possèdent un grand nombre de récepteurs non opsoniques comme le récepteur au mannose. De plus, la voie de l'arginase prédomine dans les macrophages M2a et M2c, entraînant la production d'ornithine et de polyamines, ce qui n'est pas le cas pour les macrophages M2b. L'IL-10 qui induit les macrophages M2c inhibe l'expression de TLR4 et donc la voie de signalisation MyD88 contrairement à l'IFN- γ qui permet l'activation des macrophages M1 (Bosisio et al., 2002 ; Mosser, 2003).

La production de cytokines est différente en fonction de la polymérisation des macrophages. Les macrophages M2 ont un phénotype IL-12 faible et IL-10 haut permettant

l'expression du CMH II ainsi que la production de NO (Nitric Oxyde) (Gordon, 2003 ; Verreck et al., 2004). Les macrophages M2 produisent peu de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1, le TNF ou encore l'IL-6. Cependant, les macrophages M2b sont une exception car ils conservent une production élevée de cytokines inflammatoires tout en favorisant la différenciation des Th2 et la production d'anticorps (Mosser and Karp, 1999 ; Mosser, 2003).

L'activation alternative est définie comme une réponse aux interleukines IL-4 et IL-13. Ces molécules sont produites par les cellules de l'immunité innée telles que les polynucléaires éosinophiles ou basophiles, mais aussi par les cellules de l'immunité adaptative comme les lymphocytes Th2 (Gordon, 2003). Les macrophages M2 ajustent la réponse inflammatoire et l'immunité adaptative, éliminent les débris et favorisent l'angiogenèse ainsi que le remodelage et la réparation tissulaires. De plus, les variations de phénotype accentuent ces propriétés. L'intégration et la promotion des réponses de type II prédominent chez les macrophage M2a alors que la suppression et la régulation de l'inflammation et de l'immunité prédominent chez les macrophages M2b (Mantovani et al., 2004).

1.2.2.3. Mode d'action

Les macrophages détruisent les corps étrangers comme les pathogènes et informent également le système immunitaire. Ceci se fait en quatre étapes : l'infiltration dans les tissus, la captation des particules étrangères, l'information du système immunitaire et enfin la régulation du système immunitaire (Degos, 1987). Les macrophages se retrouvent donc dans presque tous les tissus et exercent de nombreuses fonctions comme la défense de l'hôte, l'élimination des débris cellulaires, mais aussi le remodelage des tissus ainsi que la régulation de la réponse inflammatoire (Chawla, 2010) (Figure 12).

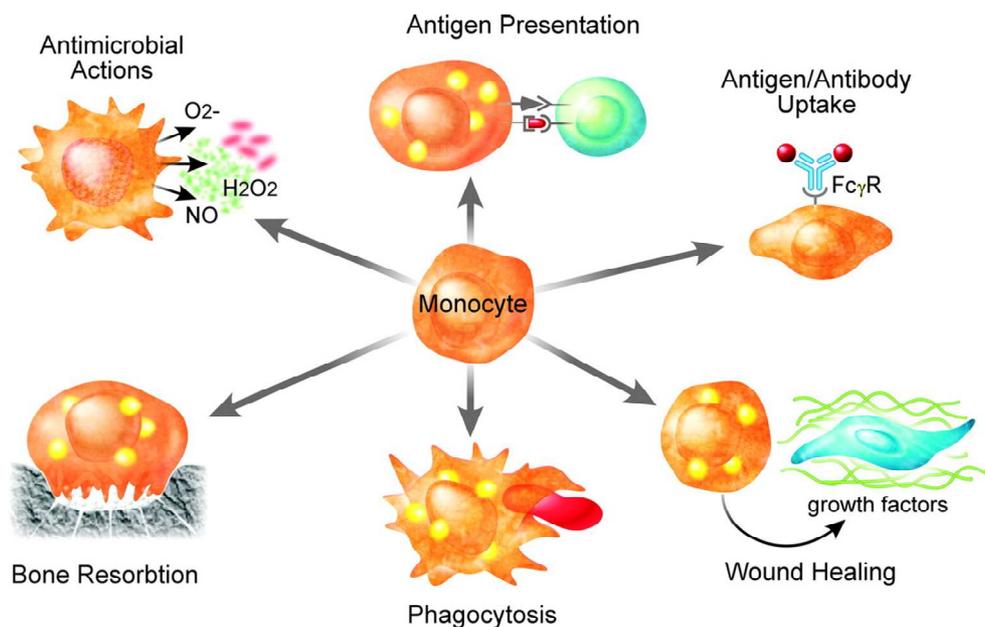


Figure 12 : Hétérogénéité fonctionnelle des macrophages

(Chawla, 2010)

Les macrophages captent par phagocytose des particules étrangères telles que les micro-organismes pathogènes. Ils phagocytent les micro-organismes en les digérant grâce aux peroxydases et aux estérases (Hume et al., 2002 ; Lee et al., 2003). Cette étape sera développée dans le paragraphe 3.2. La digestion n'est pas complète car les macrophages présentent les antigènes aux lymphocytes T, permettant l'information du système immunitaire en cas d'infection. La présentation des antigènes se fait de trois manières :

- présentation de l'antigène exogène grâce aux molécules du CMH II aux lymphocytes T CD4+
- présentation de l'antigène endogène grâce aux molécules du CMH I aux lymphocytes T CD8+
- expression de molécules de co-stimulation permettant à la réponse des lymphocytes T de s'amplifier. Parmi ces molécules, on trouve des médiateurs de la réponse inflammatoire comme l'IL-1 ou les interférons, des molécules de co-stimulation comme les CD40, CD80,

mais aussi des cytokines permettant la modulation de fonctions effectrices comme l'IL-4 ou l'IL-12 (Medzhitov and Janeway, 1997).

Un des rôles des macrophages est de phagocyter d'autres cellules ainsi que des tissus endommagés. Cette fonction permet en outre la cicatrisation des plaies. Pour cela, les macrophages sont stimulés par la faible teneur en oxygène dans l'environnement, leur permettant de produire des facteurs induisant et accélérant l'angiogenèse. Ils permettent également la création de tissu cicatriciel. Les macrophages sécrètent ensuite des facteurs de croissance ainsi que des cytokines impliquées dans la prolifération des cellules épithéliales (Mercandetti and Cohen, 2005 ; De la Torre and Sholar, 2006 ; Rosenberg and De la Torre, 2008).

La résorption osseuse est un autre rôle des macrophages et plus particulièrement des ostéoclastes qui sont les macrophages résidents du tissu osseux. La résorption osseuse est le mécanisme par lequel les ostéoclastes décomposent le tissu des os, libérant ainsi les minéraux et entraînant un transfert de calcium de l'os vers le sang (Teitelbaum, 2000). Pour cela, l'ostéoclaste se fixe sur l'ostéone puis sécrète de la collagénase ainsi que d'autres enzymes. Par la suite de fortes quantités de calcium, de magnésium, de phosphate ainsi que des produits de collagène sont libérés dans le milieu extracellulaire au fur et à mesure que les ostéoclastes avancent, formant un tunnel dans l'os. Les ostéoclastes ont un rôle majeur lors de certains troubles rhumatologiques (Mensah et al., 2008). Les récepteurs au calcium dans la parathyroïde en contrôlent la concentration sanguine. Une faible concentration de calcium stimule la libération de la PTH (Hormone ParaThyroïdienne), qui va alors augmenter le nombre et l'activité des ostéoclastes (Teitelbaum, 2000).

2. Les micro-organismes étudiés

2.1. Les bactéries

2.1.1. *Klebsiella pneumoniae*

2.1.1.1. Généralités

Le genre bactérien *Klebsiella* a été nommé ainsi en l'honneur des travaux du microbiologiste Edwin Klebs en 1877.

2.1.1.1.1. Classification

La classification du genre bactérien *Klebsiella* a évolué au cours du temps. L'espèce *Klebsiella pneumoniae* auparavant appelée bacille de Friedlander est constituée de trois sous-espèces : *K. pneumoniae* ssp. *pneumoniae*, *ozaenae* et *rhinoscleromatis*. Les organismes pathogènes pour l'Homme sont présentés dans la figure 13.

Les espèces *K. planticola*, *K. terrigena* et *K. ornithinolytica* étaient classées dans le genre *Klebsiella* mais font maintenant partie du genre *Raoultella* (Drancourt et al., 2001). De plus, *K. trevisanii* n'est plus reconnue car considérée comme un synonyme de *Raoultella planticola*.

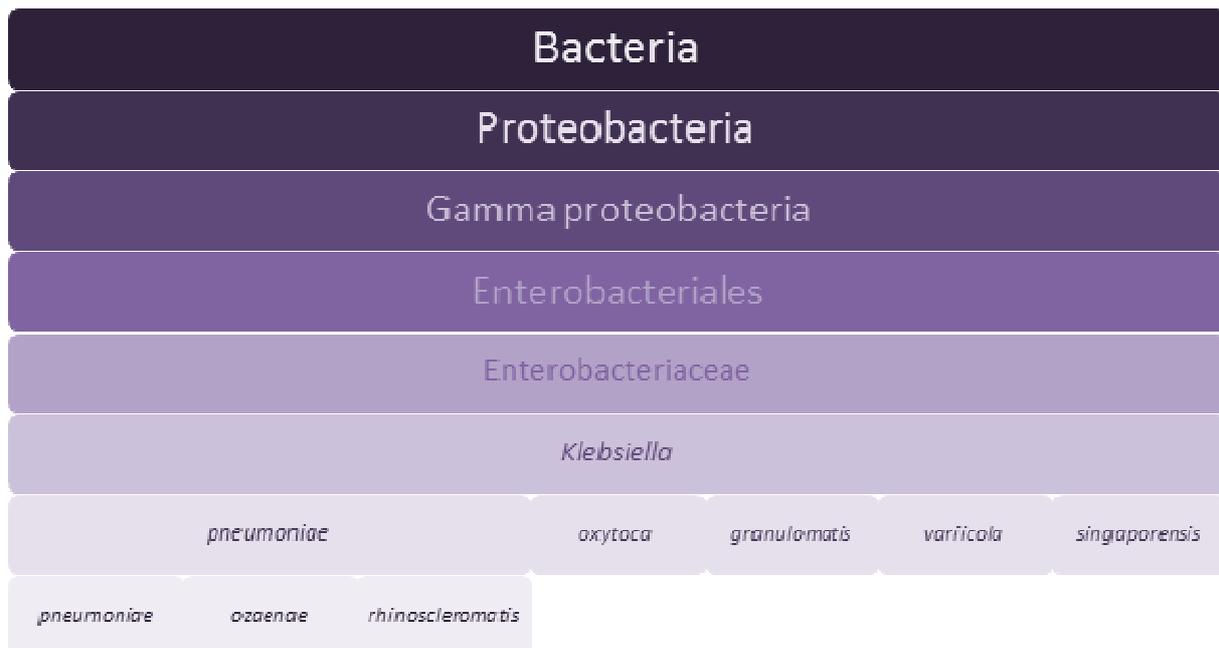


Figure 13 : Classification du genre *Klebsiella* pathogène pour l’Homme
(Euzéby, 1997)

2.1.1.1.2. Morphologie

Les bactéries du genre *Klebsiella* sont des bacilles à Gram négatif, immobiles et souvent encapsulés (Figure 14). Ce sont des bactéries anaérobies facultatives dont la taille varie de 0,3 à 1 µm de largeur et de 0,6 à 6 µm de longueur, formant souvent des colonies mucoïdes (Abbott, 2011). Le genre comprend 77 antigènes capsulaires appelés antigènes K, soit K1 à K72, K74, K79 à K82, donnant ainsi naissance à différents sérogroupes. Les espèces *K. pneumoniae* et *K. oxytoca* se répartissent dans un grand nombre de sérogroupes de par leur hétérogénéité capsulaire.

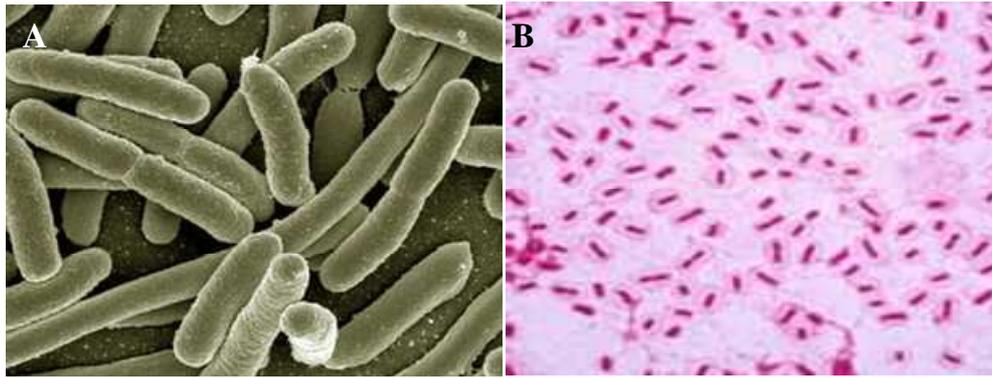


Figure 14 : *Klebsiella pneumoniae* en (A) microscopie électronique à balayage (klebsiella-pneumoniae.org consulté le 30/08/2016) **(B) coloration de Gram** (http://www.easynotecards.com/print_list/7661?fs=0&dis=1&pi=on consulté le 30/08/2016)

2.1.1.2. Ecologie

K. pneumoniae est une espèce ubiquitaire. On la retrouve dans des environnements naturels comme les sols, les eaux de surface et les végétaux ainsi que dans des environnements artificiels tels que les réseaux d'eau et plus principalement les eaux usées. On la retrouve également aussi dans la flore commensale de l'Homme et des animaux (Bagley et al., 1978 ; Cooke et al., 1979).

Elle colonise les individus au niveau des muqueuses digestives mais aussi nasopharyngées. Cependant, la colonisation augmente très fortement chez les patients hospitalisés (Haverkorn and Michel, 1979 ; Joly and Reynaud, 2003). *K. pneumoniae* est une espèce que l'on peut retrouver sur les mains du personnel et sur différents objets présents dans les services hospitaliers.

2.1.1.3. Pathogénicité

2.1.1.3.1. Facteurs de pathogénicité

Le terme pathogénicité définit la capacité de la bactérie à causer une maladie alors que la virulence est la mesure ou le degré de pathogénicité (Podschun and Ullmann, 1992). Cinq types de facteurs de pathogénicité ont fait l'objet d'études : les antigènes de surface, les adhésines, les sidérophores, l'îlot de pathogénicité et enfin l'élément d'intégration et de conjugaison (Figure 15).

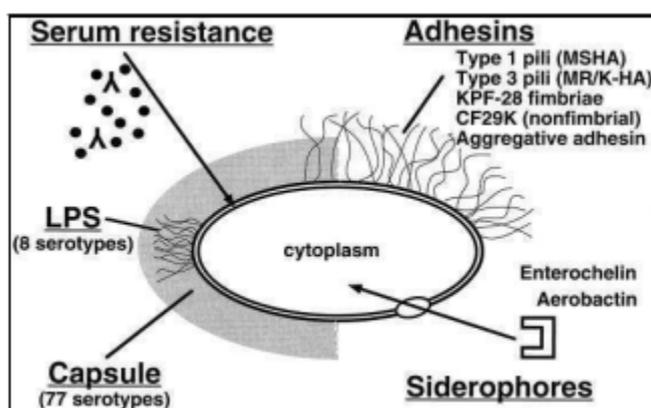


Figure 15 : Représentation des facteurs de pathogénicité de *K. pneumoniae*

(Podschun et al., 1998)

➤ Antigènes de surface : il existe deux types d'antigènes exprimés à la surface de la bactérie. Le premier est l'antigène O, composant du lipopolysaccharide (LPS) et le second l'antigène capsulaire K (Williams et al., 1983).

○ Le LPS est composé de deux parties : une partie lipidique (lipide A) et une partie oligosaccharidique (polysaccharide central et chaîne latérale O). Il contribue à l'intégrité structurelle de la cellule. Il joue également un rôle dans l'adhérence aux surfaces (formation de biofilms) ainsi que dans l'interaction avec différentes cellules hôtes dont les amibes libres (Shevchuk et al., 2011). Le LPS se lie aux récepteurs

TLR4 déclenchant ainsi la cascade de la réponse inflammatoire (Friedman, 2002). Il a également été montré que la présence de LPS de haut poids moléculaire permet l'inhibition de la fusion phagosome-lysosome (Jamilloux et al., 2012).

- La capsule est de nature polysaccharidique (Hennequin and Forestier, 2007). Elle est essentielle à la virulence des bactéries en formant un épais faisceau de structure fibrillaire protégeant la bactérie de la phagocytose et de l'effet bactéricide de facteurs sériques (Highsmith and Jarvis, 1985 ; Simoons-Smit et al., 1986 ; Cryz et al., 1990). Cependant, il existe des différences de virulence importantes en fonction des sérotypes capsulaires, corrélées avec le contenu en mannose de la capsule (Podschun and Ullmann, 1992 ; Kabha et al., 1995).

- Adhésines : ces molécules jouent un rôle essentiel dans la première étape du processus infectieux. L'adhérence se fait principalement par les *pili* ou *fimbriae* qui sont des structures protéiques non flagellaires et filamenteuses. Les plus rencontrés chez *K. pneumoniae* sont les *pili* de type 1 et 3 (Podschun et al., 1998). Les *pili* de type 1 ont la plus grande capacité d'adhérence par liaison aux résidus mannose (Schembri et al., 2005). Ils sont impliqués dans la colonisation des tractus respiratoire et urinaire (Struve et al., 2008), mais favorisent la phagocytose. Les *pili* de type 3 permettent la liaison à la membrane basale des tissus humains, cependant leur rôle en tant que facteurs de virulence reste hypothétique (van Aartsen et al., 2012).

- Sidérophores : ils permettent la captation du fer environnant, essentiel à la croissance et à la réplication des bactéries. Dans les cellules hôtes, le fer n'est pas libre mais associé à des glycoprotéines comme la lactoferrine d'où la nécessité d'un système avec une forte affinité pour le fer afin d'entrer en compétition avec ces glycoprotéines. Les

sidérophores sont des chélateurs de bas poids moléculaire se liant au fer Fe^{3+} en dehors de la cellule, formant ainsi des complexes permettant l'internalisation cellulaire du fer. Il en existe trois types : les entérobactines qui sont les plus souvent rencontrées, les aérobactines présentes dans une faible proportion de souches possédant une affinité plus faible pour le fer (Nassif and Sansonetti, 1986) et les yersiniabactines (Lawlor et al., 2007).

➤ Ilot de pathogénicité : il s'agit d'un grand fragment d'ADN chromosomique (35 à 45 kb) qui porte les gènes de virulence. La présence de cet îlot dans le genre *Klebsiella* serait due à un transfert horizontal à partir du chromosome de *Yersina* chez qui il a d'abord été décrit (Koczura and Kaznowski, 2003).

➤ Éléments d'intégration et de conjugaison (ICE) : ils sont associés aux îlots de pathogénicité. Ils contiennent des clusters de gènes associés à la virulence et sont reliés au caractère pathogène d'une souche bactérienne (Lin et al., 2008).

2.1.1.3.2. Pathogénicité

Les bactéries du genre *Klebsiella* sont des pathogènes opportunistes qui peuvent être transmises par contact cutané avec des objets, des surfaces ou du matériel contaminés (Podschun and Ullmann, 1998 ; Janda and Abbott, 2006). Elles peuvent également être transmises d'une personne à une autre.

Ces bactéries, particulièrement redoutables chez les immunodéprimés, sont à l'origine de pneumonies nosocomiales, de septicémies, d'infections urinaires, d'infections de plaies mais aussi de septicémies néonatales (Bennet et al., 1985 ; Janda and Abbott, 2006).

K. pneumoniae est une cause importante de pneumopathies et d'abcès pulmonaires d'origine communautaire ou nosocomiale. Sa localisation la plus fréquente se situe au niveau des lobes supérieurs. Les symptômes les plus courants en sont la fièvre, les frissons, et il est possible de retrouver des crachats de type "gelée de groseille" (expectoration gélatineuse de teinte rose). Des complications peuvent survenir, comme une évolution de l'infection en nécrose de l'ensemble du lobe pulmonaire (Janda and Abbott, 2006).

K. pneumoniae est également responsable de méningites et d'abcès cérébraux entraînant céphalées, fièvre, altération de l'état de conscience, crises convulsives avec choc septique.

Cette bactérie est également un agent important d'abcès pyogènes du foie intéressant surtout le lobe droit. On note alors de la fièvre, des douleurs abdominales prédominant au niveau du quadrant supérieur droit, des nausées, des vomissements, ainsi qu'une diarrhée (Peng et al., 1991).

2.1.1.3.3. Epidémiologie

Les bactéries du genre *Klebsiella* sont cosmopolites et causent principalement des infections nosocomiales. Les espèces du genre *Klebsiella* sont endémiques dans les services de néonatalogie. Les hommes adultes sont plus vulnérables aux infections par *Klebsiella* que les femmes (Janda and Abbott, 2006). Ces bactéries peuvent persister plusieurs mois chez les nouveau-nés mais seulement quelques jours à quelques semaines chez l'adulte.

Le risque d'infection à *Klebsiella* augmente avec la durée du séjour à l'hôpital, et l'utilisation inappropriée d'antibiotiques a conduit à l'apparition de bêta-lactamases à large spectre (Janda and Abbott, 2006 ; Podschun and Ullmann, 1998).

K. pneumoniae est l'espèce la plus pathogène pour l'Homme et les infections dont elle est responsable sont associées à une morbidité et mortalité importantes (Podschun and Ullmann, 1998). Les espèces du genre *Klebsiella* sont responsables de 16 à 43 % des infections du système nerveux central. Il est à noter que les souches de *K. pneumoniae* présentes dans l'environnement sont aussi virulentes que les souches cliniques (Podschun et al., 2001).

2.1.2. *Staphylococcus aureus*

2.1.2.1. Généralités

Des cocci mis en évidence dans les années 1870 dans des pus et des abcès ont été tout d'abord dénommés *Coccobacteria septicum* par Billroth en 1874. L'espèce *Staphylococcus aureus* a été décrite en 1884 par Rosenbach et nommée ainsi à cause de sa pigmentation en culture (Hill, 1981 ; Licitra, 2013).

2.1.2.1.1. Classification

Les genres *Staphylococcus*, *Micrococcus* et *Neisseria* ont été séparés en 1925 grâce à l'apparition progressive des tests biochimiques d'identification comme la capacité d'utilisation du mannitol ou du glucose. Les techniques génomiques, introduites dans les années 1970, ont permis de préciser les classifications, entraînant des modifications, amenant à la taxonomie actuelle. Le genre *Staphylococcus* a donc été définitivement différencié des *Micrococcus* en étudiant l'ADN et son contenu en guanine et cytosine, faible pour les *Staphylococcus* (30 à 38%) et élevé pour les *Micrococcus* (65 à 75%) (Hill, 1981 ; Bes and

Brun, 2002). Les principales bactéries du genre *Staphylococcus* retrouvées chez l'Homme sont représentées dans la figure 16.

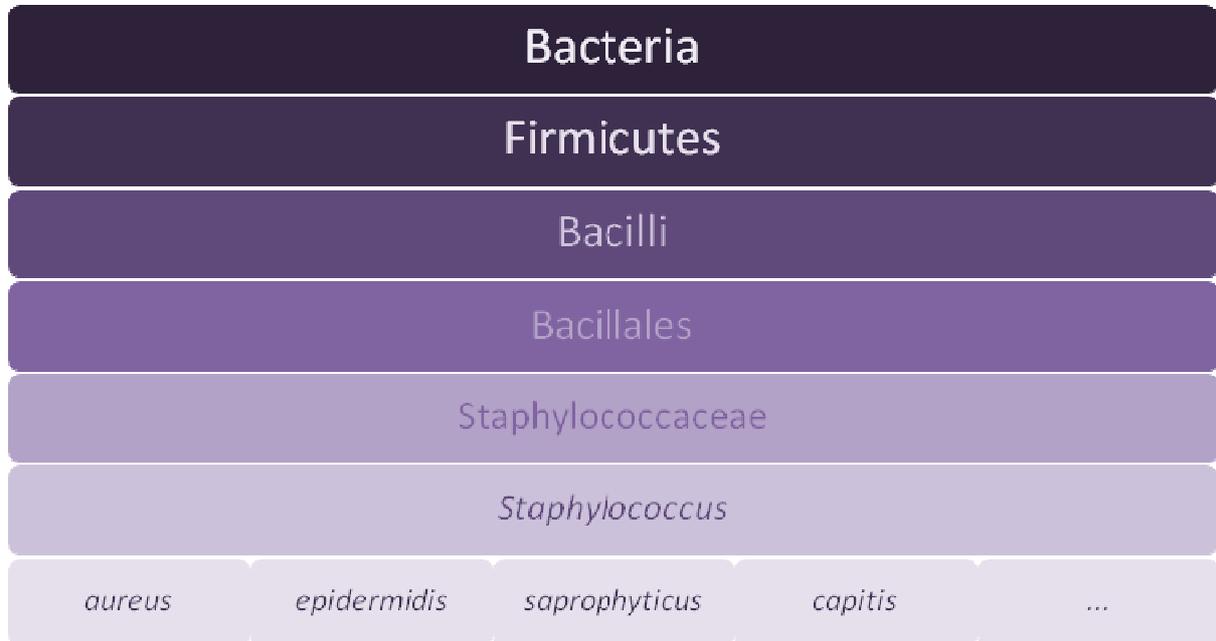


Figure 16 : Classification du genre *Staphylococcus*

(Bes and Brun, 2002)

Grâce à l'analyse du gène 16S, le genre *Staphylococcus* est classé dans la famille des *Staphylococcaceae* tout comme les bactéries du genre *Gemella*, *Micrococcus*, *Jeotgalicoccus* ainsi que *Salinococcus*. Le genre *Staphylococcus* est composé de 47 espèces dont 17 peuvent être retrouvées chez l'Homme (Bes and Brun, 2002).

2.1.2.1.2. Morphologie

Les *Staphylococcus* sont des bactéries en forme de coque à coloration de Gram positif et généralement regroupées en amas ou en grappes. Elles ont un diamètre d'environ 1 μm , sont immobiles et ne produisent pas de spores (Figure 17). Ce sont des bactéries aérobies facultative, mésophiles, pouvant croître à des températures comprises entre 10 et 42 °C avec

un optimum à 37 °C. *S. aureus* se distingue des autres espèces par la production d'un pigment doré.

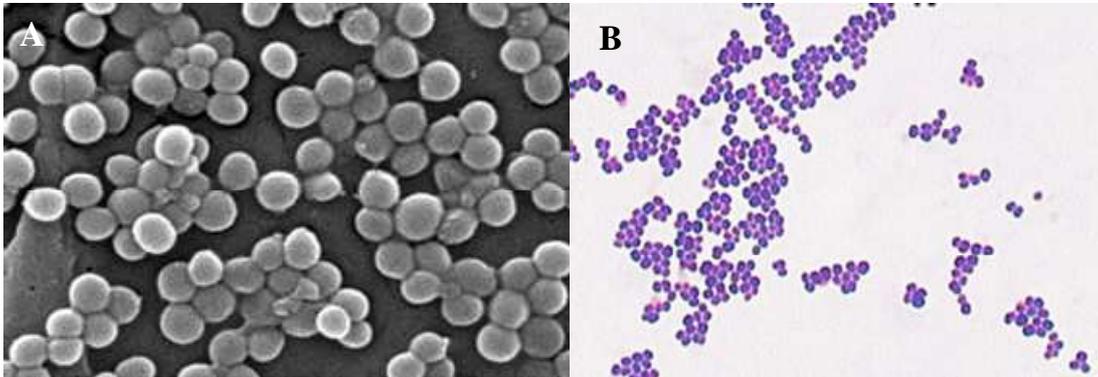


Figure 17 : *Staphylococcus aureus* en (A) microscopie électronique à balayage

(https://www.koshland-science-museum.org/sites/all/exhibits/exhib_infectious/antibiotics_02.jsp consulté le 25/08/2016) **(B) coloration de Gram** (<https://microbitos.wordpress.com/2011/08/03/staphylococcus-aureus-epidermidis-saprophyticus/> consulté le 25/08/2016)

2.1.2.2. Ecologie

Les *Staphylococcus* sont des bactéries ubiquitaires, que l'on peut retrouver dans de nombreux sites de l'environnement comme l'eau ou les sols, mais aussi de manière commensale chez l'Homme. La bactérie colonise la peau, le tube digestif ainsi que la région périnéale des nouveau-nés.

De plus, l'Homme peut être porteur sain de la bactérie au niveau des cavités nasales, avec une fréquence de 15 % à 30 % de porteurs en fonction des pays (Sivaraman et al., 2009 ; Best et al., 2011). Ces porteurs sains servent alors de réservoirs pour la bactérie, permettant ainsi sa dissémination dans la population. Les personnes immunodéprimées ainsi que les personnes toxicomanes par voie intraveineuse semblent présenter un portage de la bactérie au niveau des cavités nasales plus important que le reste de la population (Sivaraman et al., 2009).

Les différents facteurs de risque d'infections à *S. aureus* sont le sexe (les hommes étant plus touchés que les femmes), l'âge, l'éthylisme, le diabète, mais aussi la présence d'une insuffisance rénale ou d'une pathologie pulmonaire. *S. aureus* peut être retrouvé sur la peau et disséminé par aérosol à partir du rhinopharynx. De plus, la bactérie peut être retrouvée sur les vêtements ainsi que dans les poussières permettant ainsi une transmission indirecte (Wertheim et al., 2005).

2.1.2.3. Pathogénicité

2.1.2.3.1. Facteurs de virulence

Les infections à *S. aureus* sont dues à une succession d'étapes où la bactérie va mettre en œuvre des facteurs de virulence ainsi que des systèmes d'évitement des défenses de l'hôte (Caby et al., 2009).

➤ Les protéines de surface : Les protéines de surface sont nombreuses et jouent un rôle initial dans l'infection à *S. aureus*. Elles possèdent une séquence signal sécrétrice, une partie dans le cytoplasme composée d'acides aminés chargés positivement, un domaine hydrophobe qui se trouve dans la membrane et enfin une zone d'ancrage dans la paroi cellulaire (Lowy, 1998).

Certaines de ces protéines possèdent un domaine de liaison, leur permettant d'avoir des propriétés d'adhésine. La protéine A peut se lier à la partie Fc des immunoglobulines, ce qui lui confère des propriétés antiphagocytaires. Cette fixation crée une interférence entre la phagocytose et l'opsonisation rendant moins efficace l'action du système immunitaire (Flandrois, 1997). Les protéines MSCRAMM (Microbial Surface Components Reconizing

Adhesive Matrix Molecules) sont caractérisées par leur capacité à se lier à des éléments de la matrice extracellulaire comme la fibronectine, et jouent un rôle dans la capacité d'invasion des tissus de l'hôte par *S. aureus*, permettant la colonisation sans lésion préalable (Flandrois, 1997).

➤ Les protéines sécrétées : De nombreuses molécules sont produites par les staphylocoques et sont regroupées en fonction de leur mécanisme d'action. On retrouve des cytotoxines, des toxines et des enzymes.

○ Les cytotoxines : elles permettent la formation de pores ainsi que des modifications pro-inflammatoires dans la cellule. Ces modifications engendrent des dommages cellulaires et participent à l'infection microbienne (Lowy, 1998).

○ Les toxines : elles possèdent une action cytolytique détruisant des cellules immunitaires de l'hôte. On décrit une fixation aux cellules cibles, ce qui provoque la formation de canaux membranaires permettant l'échange d'ions. La fuite osmotique du contenu cellulaire, et plus particulièrement de l'ATP provoque l'apoptose cellulaire et favorise la dissémination bactérienne dans l'hôte (Bantel et al., 2001). Les toxines les plus connues sont :

- Les entérotoxines, responsables d'intoxications alimentaires et de chocs toxiques, se lient aux protéines du CMH II, ainsi qu'au TCR (T Cell Receptor) des lymphocytes T. Cette interaction entraîne une forte production de cytokines et de médiateurs de l'inflammation, responsables de la symptomatologie (Flandrois, 1997 ; Vincenot et al., 2008).
- La TSST-1 (toxine du syndrome du choc toxique 1) responsable du choc toxique staphylococcique (Flandrois, 1997).

- Les toxines exfoliatives responsables d'érythèmes et de décollements de la peau par fixation à des protéines cutanées intracellulaires (Flandrois, 1997; Vincenot et al., 2008).

- o Les enzymes: de nombreuses enzymes sont produites par *S. aureus*.

Elles sont responsables de la destruction des tissus de l'hôte et permettent aux bactéries de disséminer dans les tissus mais leur rôle dans la pathogénicité n'est pas clairement défini. Parmi ces enzymes, on peut retrouver :

- la bêta-lactamase qui se trouve dans la membrane cytoplasmique. Elle permet l'inactivation de la pénicilline, entraînant la résistance des bactéries à cet antibiotique et à ses dérivés ainsi qu'aux céphalosporines (Lowy, 1998).
- la coagulase qui se fixe à la prothrombine, formant un complexe appelé staphylothrombine. Ce complexe polymérise le fibrinogène en fibrine, formant un caillot qui permet une protection de *S. aureus* contre la phagocytose (Lowy, 1998).

Les protéines de surface sont synthétisées lors de la phase exponentielle de croissance et sont sécrétées lors de la phase stationnaire. Ces différents facteurs de virulence sont régulés principalement par le système *agr* (accessory gene regulator) qui permet la répression de la transcription de protéines de la membrane cellulaire (coagulase, protéine A) mais aussi l'activation de la transcription de différentes exoprotéines (hémolysine, TSST-1). Ce système permet, en fonction de la densité bactérienne, d'hyper-réguler 104 gènes et d'hypo-réguler 34 autres. Lorsque la densité bactérienne est faible, le système *agr* n'est pas activé, entraînant majoritairement la synthèse des protéines d'adhérence alors que la forte densité bactérienne active le système *agr* permettant principalement la synthèse d'enzymes et d'hémolysines (Lowy, 1998 ; Dunman et al., 2001 ; Bronner et al., 2004).

2.1.2.3.2. Pathogénicité

Il existe deux types d'infection à *S. aureus* : les IAH (infections acquises en milieu hospitalier) qui touchent principalement les personnes âgées et les IAC (infections acquises communautaires) impliquant principalement les enfants et les adolescents (Maltezou and Giamarellou, 2006).

On retrouve deux types de syndromes : les toxémies staphylococciques (dues aux toxines produites lors d'une infection ou présentes dans les aliments ingérés) et les infections suppuratives (dues à une invasion des tissus, par la rupture des barrières physiologiques, puis une multiplication de la bactérie suivie d'une destruction des tissus) (Lowy, 1998 ; Batard et al., 2007).

➤ Les infections suppuratives : ce sont des infections locales ou locorégionales, au niveau cutané, sous-cutané ou au niveau des muqueuses. Elles déterminent, entre autres, des panaris, des abcès ou des furoncles. Les plaies, quelle que soit leur origine, le diabète, les traitements immunosuppresseurs ainsi que les déficits immunitaires favorisent ces infections à partir d'une simple colonisation. *S. aureus* est également responsable d'infections ORL comme des otites, des sinusites ou des angines (Flandrois, 1997). Des infections profondes peuvent compliquer les infections superficielles, pouvant entraîner des septicémies, responsables d'abcès bulleux, d'ostéomyélites, d'endocardites ou d'abcès cérébraux (Vincenot et al., 2008).

➤ Les toxémies : *S. aureus* est responsable d'intoxications alimentaires après l'ingestion de toxines présentes dans des aliments contaminés (viande, produits laitiers). Elles provoquent la synthèse d'acide arachidonique qui agit au niveau gastro-intestinal, entraînant

diarrhée et vomissements (Vincenot et al., 2008). Les toxines peuvent également être responsables d'entéocolites qui surviennent lors d'une antibiothérapie, responsables de fièvre et de diarrhée sanglante (<http://cnr-staphylocoques.univ-lyon1.fr/webapp/website/website.html?id=2021394&pageId=129389> consulté le 05/09/2016). Les autres infections causées par les toxines sont le syndrome de choc toxique staphylococcique, dû à la toxine TSST-1 (fièvre, hypotension, diarrhée, vomissements, myalgies...), des toxémies cutanées ou encore des pneumopathies nécrosantes (<http://cnr-staphylocoques.univ-lyon1.fr/webapp/website/website.html?id=2021394&pageId=129389> consulté le 05/09/2016).

2.1.2.3.3. Epidémiologie

Les infections à *S. aureus* ont augmenté au cours des dernières années dans le monde entier. En 2003, la bactérie a été responsable de 400 000 hospitalisations aux Etats-Unis dont 19 000 décès. *S. aureus* est la principale cause d'endocardites (30 %), et est responsable d'un nombre croissant de bactériémies dans les hôpitaux (Boucher and Corey, 2008).

Après une étape de colonisation, 20 % des individus sains deviennent porteurs chroniques de la bactérie et 30 à 50 % seront porteurs intermittents. Les porteurs chroniques sont colonisés par une seule souche présente en forte quantité alors que les porteurs intermittents sont colonisés par différentes souches au fil du temps, et en quantité plus faible (Wertheim et al., 2005).

2.2. Les champignons : *Aspergillus fumigatus*

2.2.1. Généralités

Micheli, en 1729, a donné le nom d'*Aspergillus* à ces champignons en référence à leur forme, ressemblant au goupillon (*Aspergillum* en latin) utilisé lors des messes pour la bénédiction. *Aspergillus fumigatus* a été décrit pour la première fois en 1896 par le botaniste Fresenius.

2.2.1.1. Classification

La première classification du genre *Apergillus* a été proposée en 1926 par Thorn et Church, regroupant alors 69 espèces (Thom and Church, 1926). De nombreuses classifications sont ensuite apparues, jusqu'à celle proposée par Pitt et toujours utilisée de nos jours (Pitt, 1994). Elle tient compte de la nomenclature publiée en 1965 par Raper et Fennell, mais aussi de la division du genre en sous-groupes proposée par Gams en 1985 (Figure 18) (Raper and Fennell, 1965 ; Gams et al., 1985).

Les champignons sont classés en fonction de leur mode de reproduction sexuée ou asexuée. Une partie des espèces du genre *Aspergillus* est connue pour avoir une reproduction sexuée et est donc classée dans l'embranchement des Ascomycètes et l'autre partie, sans reproduction sexuée connue, est classée dans l'embranchement des Deutéromycètes. *A. fumigatus* appartient aux Ascomycètes car son mode de reproduction sexuée est connu depuis 2008 (O'Gorman et al., 2009).

A. fumigatus est l'espèce la plus fréquemment pathogène chez l'Homme et les oiseaux. D'autres champignons du genre *Aspergillus* comme *A. terreus*, *A. niger* ou encore *A. flavus*

peuvent également être responsables de pathologies humaines (Jones and Orosz, 2000 ; Kunkle, 2003).

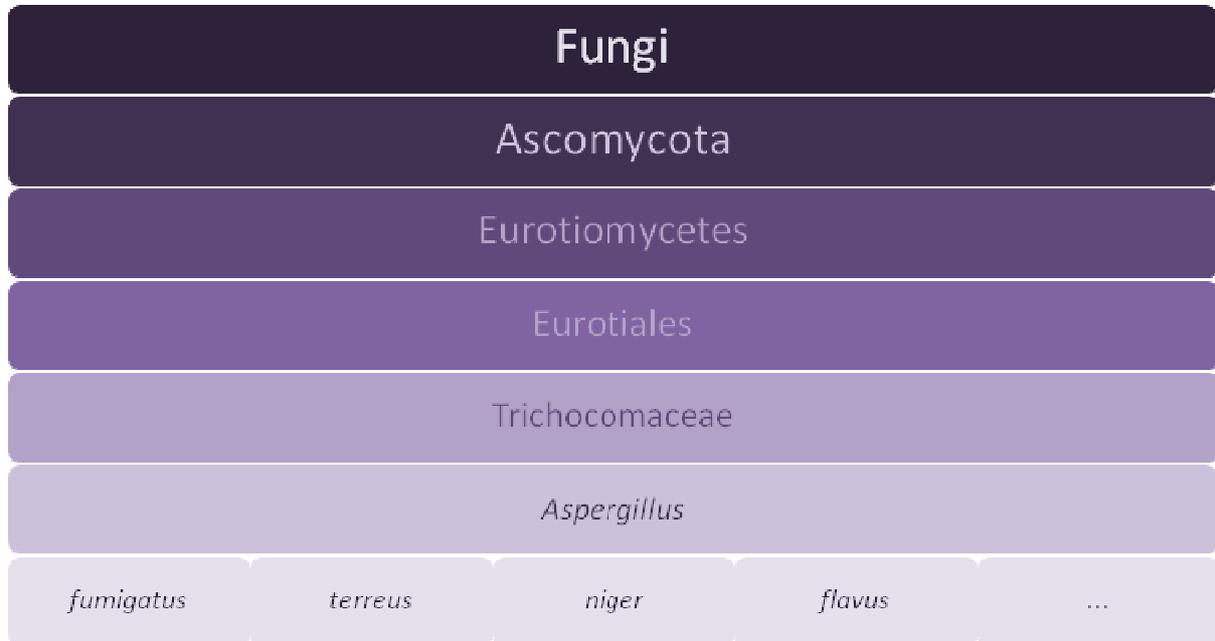


Figure 18 : Classification du genre *Aspergillus* pathogène pour l'Homme
(Bennett, 2010)

2.2.1.2. Morphologie

A. fumigatus pousse en culture sous la forme de colonies blanches tout d'abord, puis qui prennent une coloration bleu-vert, virant ensuite au vert foncé (Figure 19). Ce sont des colonies extensives, de croissance rapide (48h) : elles peuvent croître de 4 cm en 7 jours à des températures avoisinant 37 °C (Schmidt and Wolff, 1997).

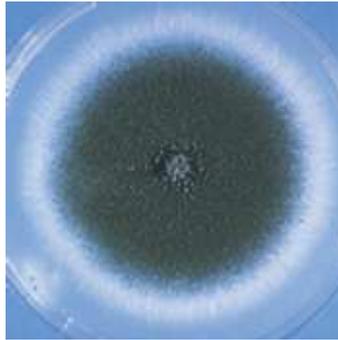


Figure 19 : Aspect d'une colonie d'*Aspergillus fumigatus* sur gélose

(http://bioweb.uwlax.edu/bio203/s2008/miller_melo/Reproduction.htm consulté le 15/09/2016)

A l'examen microscopique d'*A. fumigatus* on retrouve une vésicule hémisphérique de 20 à 30 μm portant des phialides parallèles entre elles et se situant uniquement sur la partie supérieure de la vésicule. De ces phialides naissent des spores, ou conidies, vertes, globuleuses et échinulées d'un diamètre d'environ 3 μm . Les têtes aspergillaires sont portées par des filaments appelés conidiophores, qui, dans le cas d'*A. fumigatus* sont courts, lisses et incolores (Figure 20A) (Chermette and Bussi eras, 1993). Les filaments d'*A. fumigatus* ont un diamètre fin et constant, sont septés et présentent des ramifications régulières (Figure 20B) (McCormick et al., 2010).

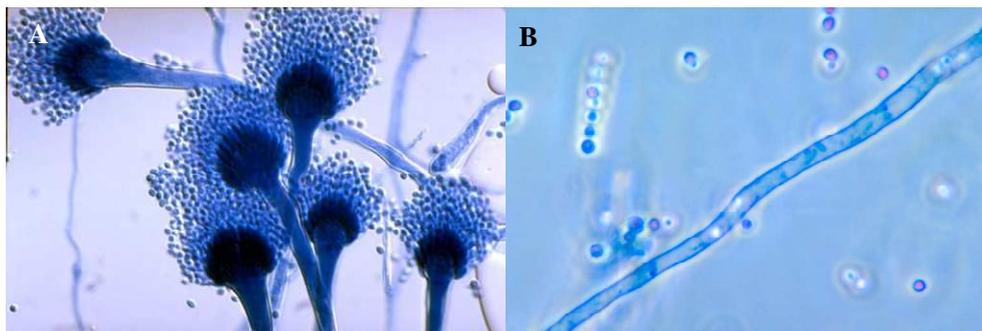


Figure 20 : Morphologie d'*A. fumigatus* (A) Tête aspergillaire (B) Filaments d'*A. fumigatus*

(<http://edupedia.jimdo.com/fran%C3%A7ais/champignons/> consulté le 15/09/2016)

A. fumigatus possède un métabolisme aérobie et participe au recyclage du carbone et de l'azote qui se trouvent dans son environnement. Ce champignon thermophile peut pousser jusqu'à 55°C (Pasanen et al., 1991).

2.2.2. Ecologie

Les champignons du genre *Aspergillus* disséminent dans l'environnement grâce à leurs conidies. En effet, la petite taille de ces structures ainsi que leur hydrophobicité, entraîne une mise en suspension facile dans l'air, permettant ainsi de les retrouver dans de nombreux environnements, allant des milieux naturels à des milieux artificiels comme les systèmes de climatisation, la concentration des spores atteignant de 1 à 100 spores/m³ d'air (Desoubeau and Chandener, 2010). On retrouve également les spores aspergillaires sur les plantes, que ce soit sur les feuilles, les fleurs ou les fruits, mais aussi dans la paille, dans les pots de fleurs et sur la surface des murs dans les locaux humides.

Les champignons du genre *Aspergillus* sont des champignons saprophytes et possèdent une grande résistance aux agents extérieurs. En effet, il n'y a que la dessiccation et la forte chaleur (100 °C) qui peuvent tuer les spores aspergillaires. Les champignons du genre *Aspergillus* sont ubiquitaires mais on les retrouve plus particulièrement à la fin de l'été, en automne et en hiver dans les régions tempérées (Latgé, 1999).

2.2.3. Cycle de vie et cycle infectieux

2.2.3.1. Cycle de vie

Les champignons du genre *Aspergillus* se multiplient principalement de façon asexuée (Figure 21). Pour cela, les conidies germent pour former les hyphes donnant ainsi un mycélium qui se couvre de têtes aspergillaires. Ces têtes produisent de très nombreuses conidies qui seront libérées dans l'air, pouvant recommencer alors un nouveau cycle asexué de développement (Adams, 1995 ; Adams et al., 1998).

Certaines espèces se reproduisent également de manière sexuée (Figure 21). Ce mode de reproduction fait suite à une méiose entraînant la formation d'asques contenant des spores appelées ascospores. Les asques sont regroupées dans une structure appelée ascocarpe (cléistothèce pour l'espèce *A. nidulans*) (O'Gorman et al., 2009).

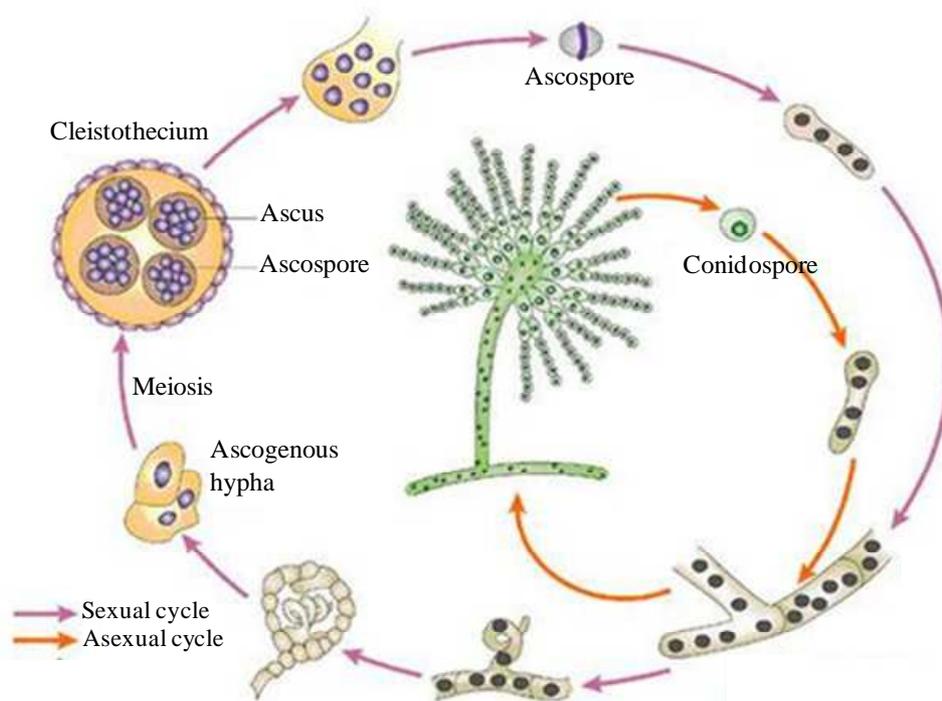


Figure 21 : Cycle de vie d'*Aspergillus*

(Casselton and Zolan, 2002)

2.2.3.2. Cycle infectieux

Le cycle infectieux d'*Aspergillus* commence par la production de conidies qui sont secondairement dispersées dans l'air. Les conidies peuvent ainsi être retrouvées aussi bien dans le milieu extérieur que dans le milieu intérieur. La principale voie d'infection de l'Homme est l'inhalation des conidies présentes dans l'air. Ces conidies vont ensuite parcourir l'arbre bronchique jusqu'aux bronchioles (Figure 22) (Morris et al., 2000).

Chez les individus sains, les conidies, qui ne sont pas évacuées par le mucus sécrété dans les poumons, vont rencontrer les cellules épithéliales ou les macrophages alvéolaires qui assureront leur phagocytose et de leur destruction. Les conidies échappant à la phagocytose par les macrophages peuvent germer, devenant ainsi la cible des polynucléaires neutrophiles. Cependant, lorsqu'il existe un dysfonctionnement des défenses immunitaires de l'hôte, une aspergillose invasive peut se développer (Dagenais and Keller, 2009).

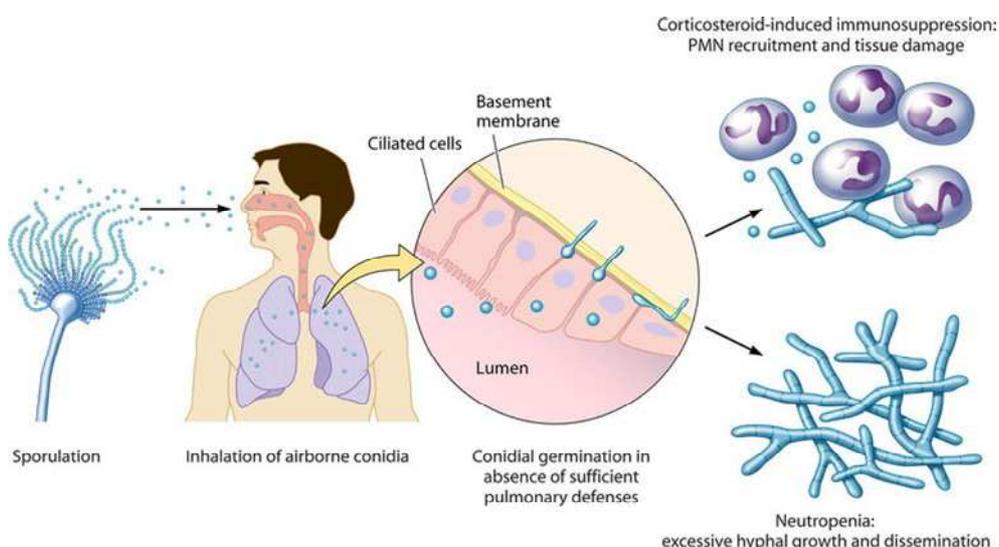


Figure 22 : Cycle infectieux d'*A. fumigatus*

(Dagenais and Keller, 2009)

2.2.4. Pathogénicité

2.2.4.1. Facteurs de virulence

Il existe de nombreux facteurs de virulence chez *A. fumigatus* (Abad et al., 2010) qui vont lui permettre de survivre et de se développer au niveau pulmonaire (Dagenais and Keller, 2009).

➤ La paroi : elle assure la protection du champignon. Il s'agit d'une paroi rigide qui intervient dans la virulence d'*A. fumigatus* en lui permettant de franchir les barrières anatomiques. De plus, la paroi est impliquée dans les principales interactions avec l'hôte et représente la cible première du système immunitaire. La paroi agit donc comme une armure pour le champignon, mais aussi comme une arme contre l'hôte (Latgé, 2007, 2010). Elle est constituée à 90% de polysaccharides comme les α -1,3-glucanes ou les (1 \rightarrow 3)- β -D glucanes mais également de protéines (Abad et al., 2010).

➤ Capacité d'adaptation : *A. fumigatus* a la capacité de croître jusqu'à 55 °C et de survivre à des températures allant jusqu'à 75°C. Cette thermotolérance lui permet d'infecter l'Homme et de s'y développer (Dagenais and Keller, 2009). *A. fumigatus* est également capable d'adaptations nutritionnelles. En effet, la disponibilité en nutriments est essentielle pour la survie et la croissance du champignon. Pour trouver les nutriments qui lui sont nécessaires, *Aspergillus* est capable de lyser les tissus grâce à des enzymes comme les phospholipases. Le champignon utilise également des sidérophores afin d'absorber le fer présent chez l'hôte et qui lui est nécessaire pour sa croissance (Abad et al., 2010 ; Moore, 2013).

➤ Echappement au système immunitaire : la paroi, la mélanine, les hydrophobines, mais aussi certaines enzymes favorisent l'échappement du champignon au système immunitaire. Les conidies ont, grâce à leur petite taille, la capacité d'atteindre directement les alvéoles pulmonaires (McCormick et al., 2010). De plus, les cellules épithéliales ne semblent pas pouvoir les détruire par phagocytose, créant un point de départ potentiel pour la dissémination (Abad et al., 2010). La mélanine est également importante dans la virulence. La pigmentation des conidies permet d'inhiber l'activation des polynucléaires neutrophiles et de protéger le champignon contre les ROS (Reactive Oxygen Species) (Abad et al., 2010). Les hydrophobines sont des protéines constituant une couche hydrophobe sur la paroi des conidies, protégeant le champignon du stress oxydant pouvant le détruire, principalement dans les macrophages alvéolaires (Paris et al., 2003).

➤ Capacité d'invasion : l'angiotropisme d'*A. fumigatus* est favorisé par un gradient en oxygène et en sucre existant entre le tissu pulmonaire et le sang et qui permet la stimulation de la croissance du champignon dans le sang (McCormick et al., 2010).

➤ Résistance aux antifongiques : *A. fumigatus* est un champignon capable de former des biofilms composés de structures fongiques entourées d'une matrice extracellulaire complexe. Cette structure peut conférer au champignon une résistance aux antifongiques participant ainsi à sa virulence (Seidler et al., 2008 ; Kaur and Singh, 2014).

➤ Propriétés allergisantes : *A. fumigatus* synthétise des protéines allergènes qui sont au nombre de 23 (Asp f-1 à Asp f-34), pouvant entraîner une réponse immunitaire de type allergique chez certains malades (Abad et al., 2010).

2.2.4.2. Pathogénicité

A. fumigatus peut être responsable de phénomènes immuno-allergiques, de formes chroniques, d'infections localisées ou d'infections disséminées selon le terrain (Tell, 2005).

Les voies respiratoires sont le premier site de colonisation et d'infection. Cependant, les infections aspergillaires sont peu fréquentes chez un individu sain, si l'on excepte les infections des sinus et plus rarement du conduit auditif (Saint germain and Summerbell, 1996; Kosalec and Pepeljnjak, 2005). On distingue :

➤ Les aspergilloses immuno-allergiques : elles comprennent l'aspergillose broncho-pulmonaire allergique ou ABPA, l'asthme aspergillaire, la rhinosinusite fongique et l'alvéolite allergique extrinsèque qui surviennent le plus souvent en cas de contacts répétés avec les spores aspergillaires (Latgé, 1999).

➤ Les aspergilloses pulmonaires chroniques :

○ L'aspergillome : *A. fumigatus* se développe dans une cavité pulmonaire pré-existante (tuberculose...). Les spores pénètrent alors dans la cavité et la tapissent formant secondairement une balle fongique. Cette forme est le plus souvent asymptomatique mais peut engendrer une toux, des expectorations et des hémoptysies (Riscili and Wood, 2009).

○ L'aspergillose pulmonaire chronique cavitaire est définie par la formation de cavités contenant ou non un aspergillome, responsable de symptômes pulmonaires mais aussi de fièvre et d'une altération de l'état général du patient (ANOFEL, 2016).

- L'aspergillose pulmonaire chronique fibrosante est une complication de l'aspergillose pulmonaire chronique caverneuse, entraînant une destruction fibrotique sévère et une perte de la fonctionnalité du poumon infecté (ANOFEL, 2016).

- L'aspergillose pulmonaire chronique nécrosante est une forme rare d'infection aspergillaire, entre la forme invasive et la forme chronique de l'aspergillose. Elle concerne les patients présentant une immunodépression modérée qui souffrent d'une pathologie pulmonaire sous-jacente. Il s'agit d'une invasion locale du parenchyme pulmonaire aboutissant à la destruction tissulaire, d'évolution lente sans invasion vasculaire ni dissémination. Les principaux symptômes sont une toux productive, des hémoptysies, de la fièvre, une asthénie et un amaigrissement (Yahyaoui et al., 2014).

➤ Les aspergilloses localisées :

- Les infections sinusiennes et les otomycoses peuvent être retrouvées ainsi que de rares localisations oculaires ou cutanées.

- L'aspergillose pulmonaire invasive est une pathologie grave et de mauvais pronostic, touchant les sujets immunodéprimés. Les patients atteints présentent une neutropénie profonde et prolongée ou une immunodépression thérapeutique (corticothérapie, anti-TNF, chimiothérapie anticancéreuse). La symptomatologie est peu spécifique, pouvant associer fièvre, toux et douleurs thoraciques. La mortalité malgré le traitement avoisine les 50%. L'évolution de la pathologie peut entraîner une dissémination fongique dans d'autres organes comme le cerveau ou la peau (Dagenais and Keller, 2009).

➤ Autres infections :

○ Les mycotoxicooses : elles sont dues aux mycotoxines produites par *A. fumigatus*. L'exposition par voie alimentaire ou par inhalation à ces mycotoxines peut engendrer des affections chroniques (allergies) ou des atteintes plus aiguës chez l'Homme ou chez les animaux, souvent plus touchés à cause de leur alimentation riche en céréales (Nieminen et al., 2002 ; Rejjula and Tuomi, 2003).

2.2.4.3. Epidémiologie

L'aspergillose est une maladie qui touche l'Homme mais aussi les animaux (principalement les oiseaux). Les pathologies déterminées par le champignon ne sont pas transmissibles. Chez l'Homme, il s'agit de la deuxième cause de maladie nosocomiale d'origine fongique après les candidoses (Guillot and Chermette, 2001). L'aspergillose est une maladie qui survient lors d'une contamination de l'environnement. En milieu hospitalier, le nombre d'aspergilloses invasives augmente lorsque des travaux de construction ou de rénovation ont lieu à proximité des services hébergeant des patients immunodéprimés (Vonberg and Gastmeier, 2006). Des spores aspergillaires ont également été retrouvés dans les réseaux d'eau hospitaliers (Anaissie et al., 2002).

2.3. Les adénovirus

2.3.1. Généralités

Le premier adénovirus (AdV) a été découvert en 1953 par Rowe à partir d'un prélèvement amygdalien et de sécrétions respiratoires (Rowe et al., 1953). Une cinquantaine

de sérotypes d'adénovirus humains ont été ensuite isolés et répartis en 6 sous-groupes (notés de A à F). La famille des *Adenoviridae*, définie en 1976, n'était composée à l'origine que de deux genres : les *Mastadenovirus* et les *Aviadenovirus* (Norrby et al., 1976). Le genre *Mastadenovirus* comprend les AdV qui infectent de nombreux mammifères, incluant l'Homme. Les virus du genre *Aviadenovirus* infectent uniquement des oiseaux. En 1998, Benko a mis en évidence un troisième genre du nom d'*Atadenovirus* possédant un fort taux de bases A et T dans son génome. Les hôtes de ce genre sont similaires à ceux des *Mastadenovirus* (Benkő and Harrach, 1998 ; Davison et al., 2003). Le quatrième genre de la famille appelé *Siadenovirus* décrit en 2003 n'est composé que de deux espèces isolées chez une grenouille et différents oiseaux (Davison et al., 2003).

2.3.2. Morphologie

Les adénovirus ont un diamètre de 60 à 110 nm. Ils sont non enveloppés et constitués d'une capsidie icosaédrique (Figure 23). La capsidie est composée de trois protéines de structure : l'hexon qui est le constituant des faces de l'icosaèdre, la base du penton et la fibre qui s'associe à la base du penton pour former un complexe à chacun des douze sommets (Russell, 2000).

Une particule virale comporte plus de 2700 polypeptides avec une masse molaire d'environ 150 MDa. Le génome viral est un ADN double brin linéaire d'environ 36000 paires de base (36 kpb) non segmenté et représente 13 % de la masse totale du virus (Roberts et al., 1984).

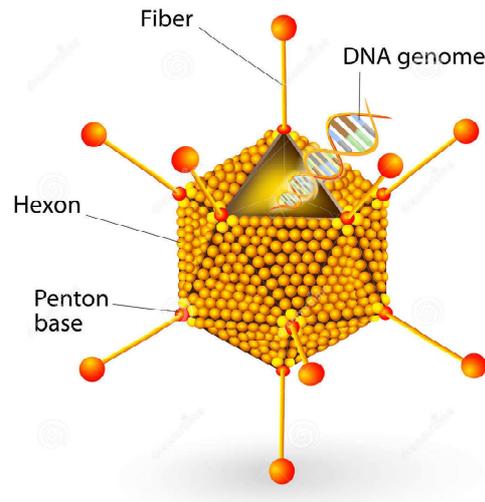


Figure 23 : Structure d'un adénovirus

(<https://fr.dreamstime.com/images-libres-de-droits-structure-d-adnovirus-diagramme-de-vecteur-image34731829>
consulté le 15/08/216)

2.3.2.1. Structure de la capside

La capside des adénovirus est composée de trois grandes parties : les protéines de capside, le core protéique et enfin les protéines mineures ou protéines ciment (Figure 24).

Les protéines de capside sont l'hexon, la base du penton et la fibre qui forment chacune des faces de la capside. Les différentes protéines mineures permettent la stabilisation de la capside. Les protéines du core protéique sont associées au génome viral.

La capside est composée de 20 faces et 12 sommets. Chaque face est formée par douze hexons à l'état trimérique. Les sommets sont formés par les bases du penton, sous forme de pentamère (Russell, 2000).

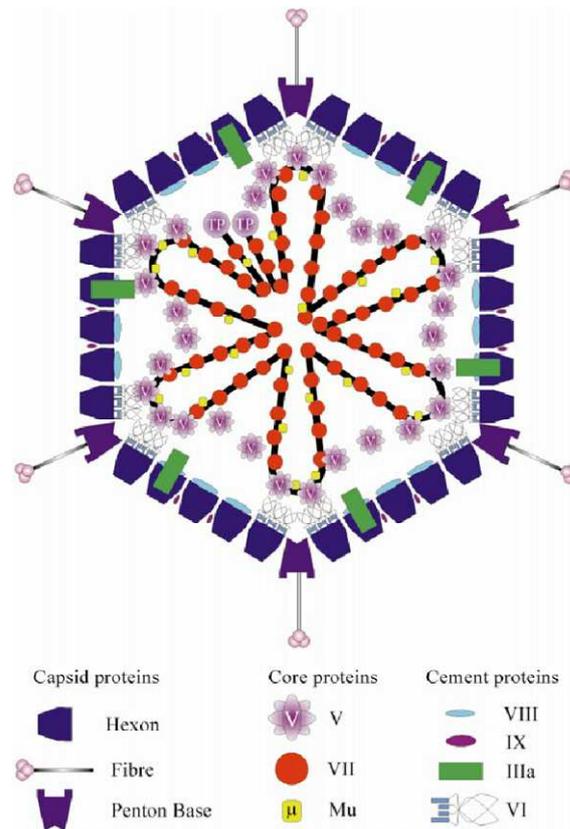


Figure 24 : Structure de la capsid d'un adénovirus

(Russell, 2000)

L'hexon formant les différentes faces de la capsid est aussi appelé protéine II. C'est la protéine la plus abondante des protéines structurales du virus, représentant 63% de la masse totale des protéines (Rux et al., 2003). Au cours de la réplication, l'hexon a un rôle important dans le transport du virus du cytoplasme vers le noyau (Suomalainen et al., 1999).

La base du penton ou protéine III est la deuxième protéine majeure de la capsid des adénovirus. Elle est présente en 60 copies mais toujours sous forme de pentamère. Elle permet une association avec la fibre qui se projette à partir du sommet vers l'extérieur du virus. Cette association représente le penton qui est responsable de l'attachement et de l'entrée du virus dans la cellule. La base du penton semble être impliquée dans la libération des particules virales des endosomes (Greber et al., 1993).

La fibre ou protéine IV est la dernière protéine majeure de la capsid. Il en existe 36 copies, assemblées en trimères au niveau des 12 sommets de la capsid. Cette protéine permet l'interaction avec le récepteur primaire lors de la reconnaissance de la cellule. La fibre est composé de trois parties : la queue N-terminale qui est flexible et permet l'interaction avec la base du penton, la tige qui est rigide et de longueur variable en fonction du sérotype, et enfin la tête C-terminale qui permet l'interaction avec le récepteur primaire (van Raaij et al., 1999).

Les protéines mineures sont des protéines ciment, qui permettent le maintien et l'étanchéité de la capsid. Elles jouent également un rôle pendant son assemblage et la décapsidation (Burnett, 1985). Les protéines mineures sont les protéines IIIa, IX, VI et VIII. La protéine IIIa se trouve en 60 exemplaires et à l'état monomérique dans la capsid (van Oostrum and Burnett, 1985). Cette protéine est associée à la base du penton du côté interne de la capsid et joue un rôle dans l'assemblage des particules virales (Chroboczek et al., 1986).

La protéine IX est la plus petite des protéines mineures et est spécifique des mastadénovirus. Il existe douze copies de cette protéine par face, réparties en quatre trimères (Colby and Shenk, 1981 ; Fabry et al., 2005). Cette protéine possède un rôle structural, en augmentant la stabilité du virus (Colby and Shenk, 1981). La protéine VI se trouve du côté interne de la capsid. Cette protéine permet de connecter la capsid avec la nucléocapsid du virion. En effet, elle est associée à l'hexon ainsi qu'à l'ADN du virus (Matthews and Russell, 1994, 1995). De plus, cette protéine joue un rôle dans les étapes de propagation et maturation du virus. La protéine VIII joue un rôle dans la stabilisation structurale du virion (Liu et al., 1985).

2.3.2.2. Structure du génome

Le génome des adénovirus est constitué d'un ADN double brin linéaire d'environ 36 kpb. Il est encadré par deux séquences utiles pour l'initiation de la réplication : les ITRs (Inverted Terminal Repeats). De plus, le génome est associé à quatre protéines qui sont les protéines du core (protéines V, VII, μ et la protéine TP [Terminal Protein]), formant ainsi le nucléoïde. Le génome est organisé en plusieurs unités transcriptionnelles, retrouvées dans les deux sens de lecture (Figure 25). Leur expression a lieu différemment en fonction du moment du cycle viral. On retrouve deux sortes de gènes : les gènes précoces (E pour early) transcrits avant la réplication virale et les gènes tardifs (L pour late) transcrits après la réplication virale (Russell, 2000).

La région E1A du génome code pour des protéines responsables d'une activité transcriptionnelle et d'une induction des cellules vers la phase S. La région E1B code pour des protéines inhibant l'apoptose, la région E2 pour des protéines impliquées dans la réplication de l'ADN viral : la polymérase, la protéine TP et la DBP (DNA Binding Protein). La région E3 permet de coder des protéines impliquées dans l'évasion du virus vis-à-vis de la réponse immunitaire, et la région E4 pour des protéines mises en jeu lors de la réplication, la transcription de l'ARNm, le transport membranaire, la traduction et la résistance à l'apoptose. Les gènes tardifs, eux, codent pour les protéines structurales, permettant la construction de la capsid (Russell, 2000).

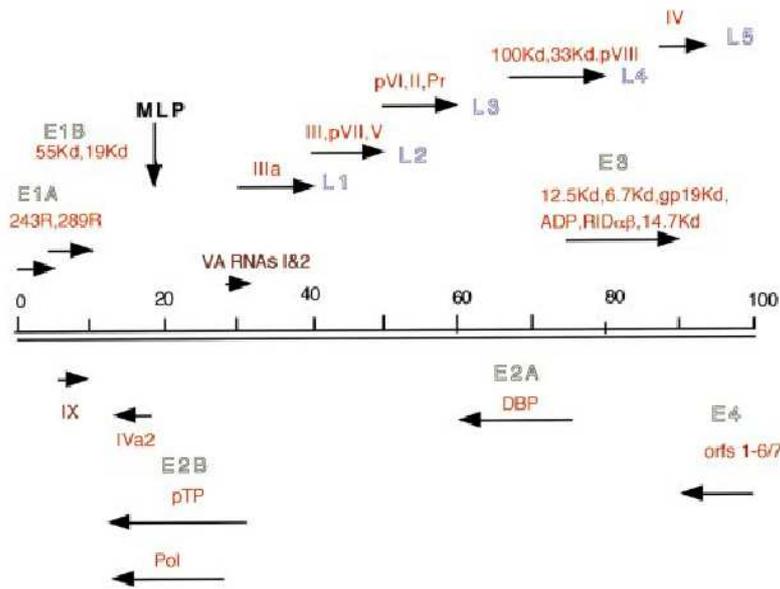


Figure 25 : Organisation du génome des adénovirus

(Russell, 2000)

La protéine TP est une protéine de 55 kDa associée aux extrémités 5' du génome viral, permettant sa circularisation par formation d'un dimère. Elle est impliquée dans la réplication initiale de l'ADN (Mysiak et al., 2004). La protéine V, de 42 kDa, interagit avec la base du penton, ainsi qu'avec des protéines mineures permettant la liaison entre la capsid e et le c oeur du virion (Chatterjee et al., 1985). Elle est également impliquée dans le transport de l'ADN viral vers le noyau cellulaire (Matthews and Russell, 1998).

La protéine VII d'environ 17 kDa est produite   des phases tardives de la maturation. La protéine VII se lie   l'ADN non encapsid e, puis ce complexe sera encapsid e dans la particule virale (Zhang and Arcos, 2005). Le rôle de la protéine μ , d'environ 5 kDa, n'est pas encore connu mais elle pourrait être impliquée dans l'encapsidation du génome viral (Chatterjee et al., 1986).

2.3.3. Pathogénicité

2.3.3.1. Cycle viral

Le cycle viral complet des adénovirus dure de 30 à 36 heures, produisant un grand nombre de nouveaux virions. Il se découpe en plusieurs grandes phases (Figure 26) :

- La reconnaissance et la fixation du virus à son récepteur
- L'internalisation
- La phase précoce d'infection
- La phase de réplication de l'ADN viral
- La phase tardive d'infection
- La lyse cellulaire et le relargage des virus néoformés

La reconnaissance et la fixation du virus ainsi que l'internalisation dans la cellule cible se font par l'intermédiaire de récepteurs primaires et secondaires se trouvant sur la cellule.

Cependant, trois types de cycles peuvent être réalisés par les adénovirus :

- Le cycle lytique entraînant la production de particules virales et la lyse de la cellule infectée,
- Le cycle abortif qui est un cycle lytique n'aboutissant pas, donc ne produisant pas de particule virale
- Le cycle transformant, qui se déroule lorsque le virus infecte une cellule non permissive, immortalisant ainsi la cellule infectée et déclenchant le développement de tumeurs cancéreuses.

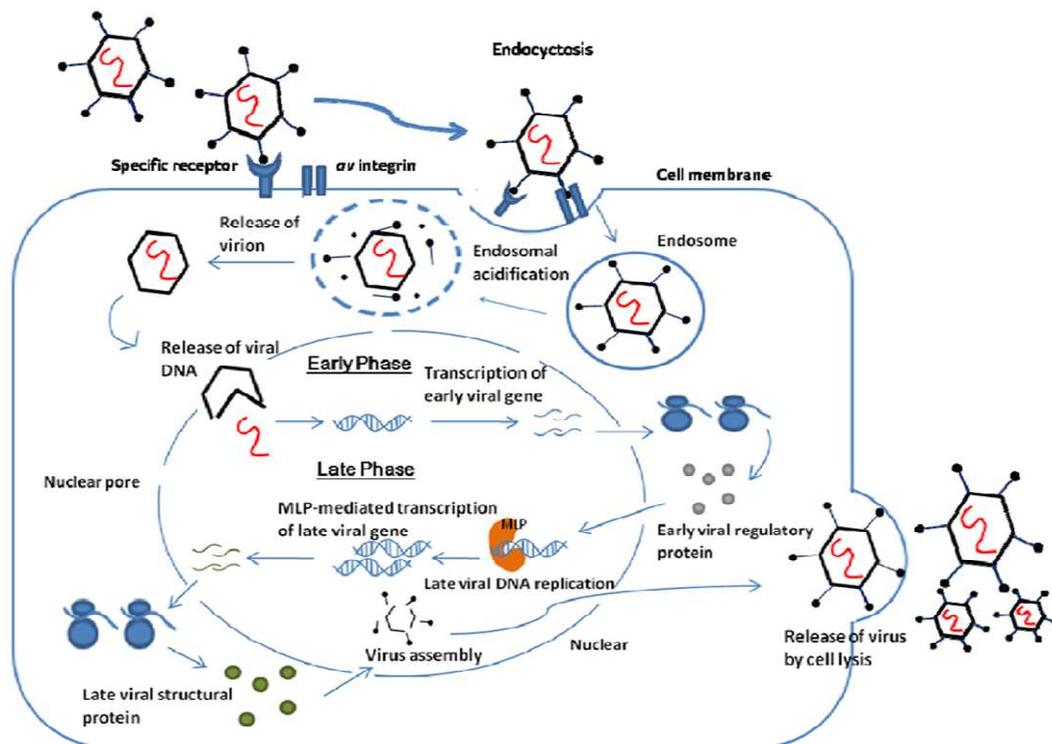


Figure 26 : Cycle d'infection et de multiplication des adénovirus

(Waye and Sing, 2010)

Entrée du virus dans la cellule

Le premier évènement du cycle viral est l'attachement du virus à la cellule cible, par l'intermédiaire de la tête de la fibre. En effet, celle-ci permet la liaison du virus à la membrane cellulaire par l'intermédiaire d'un récepteur primaire. Le récepteur primaire sera différent en fonction du sérotype du virus. Les principaux récepteurs identifiés sont le récepteur CAR (Coxsackie and Adenovirus Receptor) pour les sous-groupe A, C et F, tandis que le sous-groupe D utilise l'acide sialique, et le récepteur membranaire CD46 est utilisé pour les virus du sous-groupe B (Bergelson et al., 1997 ; Arnberg et al., 2000 ; Gaggar et al., 2003).

Ensuite, la base du penton interagit avec des intégrines. Les principales intégrines reconnues par les adénovirus sont les intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$ (Wickham et al., 1993). La base du penton interagit avec la sous-unité α de ces intégrines. Cette interaction permet l'entrée du virus dans la cellule par endocytose. Par la suite, l'endosome va fusionner avec un lysosome

entraînant une acidification de la vésicule. Cette acidification va ainsi permettre une déstabilisation de la structure de la capsid (Greber et al., 1993), suivie de l'action de la protéase virale permettant la libération du génome viral dans le cytoplasme (Wiethoff et al., 2005). Une fois dans le cytoplasme, ce génome sera transporté vers le noyau où il va pénétrer (Greber et al., 1997).

Phase précoce d'infection

Lorsque le génome viral est entré dans le noyau, les gènes précoces sont exprimés, permettant la préparation de la cellule à la réplication virale mais la protégeant également contre les mécanismes de défense immunitaire. Cette étape permet d'entraîner la cellule en phase S qui est la phase de synthèse de l'ADN. De plus, lors de cette étape, des protéines bloquant l'apoptose sont synthétisées, afin d'empêcher l'arrêt du cycle cellulaire (Berk, 1986 ; Chiou et al., 1994).

Réplication du génome viral

Le début de la réplication du génome viral est le début de la phase tardive d'infection. Cette réplication débute au niveau des ITRs et la polymérase virale utilise le précurseur de la protéine TP comme amorce. L'initiation de la réplication débute par la liaison entre la protéine TP et un nucléotide désoxycytidine monophosphate. La polymérase va ensuite copier le brin d'ADN pendant la phase d'élongation aidée de la protéine DBP qui permet le déroulement de la molécule d'ADN (Dekker et al., 1997).

Phase tardive d'infection

Les régions tardives du génome viral sont exprimées. Les protéines de la capsid sont produites et transportées dans le noyau. Les protéines de la capsid vont alors s'assembler

dans le noyau pour former des procapsides où le génome viral sera incorporé (Perez-Romero et al., 2006). Les capsides vont ensuite subir une maturation grâce à la protéase virale puis s'accumuler dans le noyau de la cellule infectée.

Lyse de la cellule infectée

La protéine ADP (Adenovirus Death Protein) va déclencher la lyse de la cellule infectée libérant ainsi les virus néoformés dans le milieu extracellulaire. Ces virus pourront alors infecter de nouvelles cellules et recommencer un nouveau cycle viral (Tollefson et al., 1996).

2.3.3.2. Pathogénicité

Les adénovirus se transmettent par contact direct ou féco-oral, par voie respiratoire, par les sécrétions conjonctivales et plus rarement par immersion dans une eau contaminée.

Ils sont responsables de maladies bénignes : infections respiratoires, gastroentérites, infections oculaires... Les principales pathologies sont répertoriées dans le tableau 1.

Les tableaux cliniques des atteintes respiratoires sont divers : rhinites, pneumopathies ou bronchopathies. Les patients immuno-déprimés peuvent souffrir de complications sévères.

La maladie associée à certains sérotypes dépend de la voie d'infection par le virus. En effet, l'inhalation de l'adénovirus de sérotype 7 est responsable d'une infection sévère des voies respiratoires inférieures, mais sa transmission orale n'entraîne qu'une maladie bénigne (Toth et al., 2008).

Tableau 1 : Principales pathologies classées en fonction des sous-groupes d'adénovirus

Pathologies	Sous-groupe (sérotipe)
Infections respiratoires	B - C
Maladies respiratoires aiguës	B (7, 21) - E (4)
Maladies des voies respiratoires inférieures	B (3, 7, 21) - E (4)
Fièvre pharyngoconjonctivale	B (3, 7) - E (4)
Conjonctivites et kératoconjonctivites épidémiques	D (8, 19a, 37)
Conjonctivite aiguë hémorragique	B (11)
Cystites hémorragiques	B (7, 11, 21, 35)
Gastroentérites	A (31) - C (2) - F (40, 41)

2.3.3.3. Epidémiologie

Les adénovirus résistent dans le milieu extérieur grâce à l'absence d'enveloppe. Les sérotypes les plus rencontrés dans les infections respiratoires sont les sérotypes 1, 2, 3, 5 et 7 tandis que les sérotypes 40 et 41 sont le plus souvent responsables de diarrhées.

Les adénovirus du sous-groupe A (sérotypes 12, 18 et 31) sont difficiles à isoler bien que les infections soient courantes. Ils sont retrouvés en majorité chez l'enfant où ils provoquent dans 60 % des cas des gastroentérites. Les adénovirus du sous-groupe B (sérotypes 3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 50 et 55) sont divisés en deux groupes : B1 qui provoque des maladies respiratoires et B2 qui est responsable d'infections des voies urinaires. Certains sérotypes du groupe B sont responsables d'infections rénales pouvant être fatales chez les patients immunodéprimés (Li et al., 1991 ; Leen and Rooney, 2005).

Plus de 80% de la population a déjà été infectée par les adénovirus du sous-groupe C (sérotypes 1, 2, 5, 6 et 57). Ils sont endémiques dans certaines parties du monde et la primo-infection remonte généralement à l'enfance (Garnett et al., 2002). Le sous-groupe D englobe la majeure partie des sérotypes (sérotypes 8 à 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22 à 30, 32, 33, 36 à 39, 42 à 49, 51, 53, 54 et 56). Les sérotypes 8, 19 et 37 sont les plus fréquemment rencontrés et responsables de kératoconjunctivites. Les autres sérotypes de ce sous-groupe sont de plus en plus fréquemment retrouvés chez des patients immunodéprimés (Hierholzer et al., 1988 ; De Jong et al., 1999).

Le sous-groupe E (sérotipe 4) est constitué d'un seul sérotipe, principalement responsable de maladies respiratoires aiguës. Enfin, le sous-groupe F (sérotipe 40 et 41) cause généralement des gastroentérites pouvant être fatales chez l'enfant (Aoki et al., 1982 ; Uhnoo et al., 1984). Le sous-groupe G n'est constitué que du sérotipe 52.

3. Interactions avec les micro-organismes et phagocytose

3.1. Interactions des amibes libres avec les micro-organismes

Comme nous l'avons déjà évoqué, les amibes libres se nourrissent par pinocytose ou par phagocytose, ingérant et digérant des micro-organismes retrouvés dans leur environnement (Bowers, 1977). Cependant, certains d'entre eux sont capables de résister à la phagocytose amibienne, et sont dénommés ARB (Amoeba-Resisting Bacteria). Environ 20 % des bactéries reconnues comme pathogènes pour l'Homme, sont capables de vivre et de se multiplier dans les amibes libres (Greub and Raoult, 2004 ; Thomas et al., 2010).

Il a été montré qu'*A. castellanii* se nourrit préférentiellement de bactéries Gram négatif (Weekers et al., 1993 ; Rosenberg et al., 2009), avec des préférences pour certaines d'entre elles (*E.coli* et *E. aerogenes*), sans que ce phénomène ne soit pour l'instant expliqué.

Schuster et Levandowsky (Schuster and Levandowsky, 1996) ont rapporté la présence, sur la membrane d'*A. castellanii*, de récepteurs membranaires lui permettant de détecter des chimioattractants. Cette espèce amibienne est capable de se diriger activement vers divers composants bactériens. La « mannose binding protein » est également impliquée dans la liaison entre les amibes et les bactéries en présence.

Des récepteurs ont également été identifiés chez l'amibe *Dictyostelium discoideum*, qui s'est montrée, quant à elle, attirée par de l'acide folique ou ses dérivés. Cependant, le comportement cellulaire semble différent chez *A. castellanii* et chez *D. discoideum* (Kuburich et al., 2016). Nous n'avons pas retrouvé dans la littérature d'études concernant la préférence trophique de *V. vermiformis*.

3.1.1. Les bactéries

Il existe plusieurs types d'interactions entre les amibes et les bactéries. L'amibe peut servir de réservoir où les bactéries pourront ou non se multiplier. Dans ce cas, l'amibe joue un rôle de vecteur et permet la dissémination bactérienne dans l'environnement. Elle peut également jouer un rôle protecteur pour les bactéries vis-à-vis de l'environnement extérieur et de potentielles agressions physiques ou chimiques (King et al., 1988 ; Kilvington and Price, 1990 ; Barker et al., 1992).

En 1956, Drozanski a découvert les endosymbiontes des amibes libres (Drozanski, 1956). L'intérêt des scientifiques pour les interactions entre les amibes libres et les bactéries n'est toutefois apparu qu'avec l'émergence de la bactérie *Legionella pneumophila*. En effet,

suite à de nombreuses épidémies de légionellose, des études ont permis de mettre en évidence des interactions entre *L. pneumophila* et les amibes libres, en particulier la possibilité pour la bactérie de se multiplier principalement dans les genres *Acanthamoeba*, *Vermamoeba* et *Naegleria* (Rowbotham, 1980 ; Fields, 1996 ; Philippe et al., 2006). Les amibes permettent également la survie et la dissémination de la bactérie dans l'environnement et la protègent des stress extérieurs comme les agressions chimiques ou physiques (Biddick et al., 1984 ; Greub and Raoult, 2004).

A la suite de ces travaux, d'autres interactions entre les bactéries et les amibes du genre *Acanthamoeba* ont été mises en évidence, montrant qu'environ 25 % des *Acanthamoeba* isolées dans l'environnement ou dans des réseaux d'eau sont infectées par un endosymbionte. Cependant, les amibes isolées de réseaux d'eau sembleraient plus souvent infectées par des bactéries (55%) que les amibes environnementales (7,5%) (Fritsche et al., 1993 ; Berk et al., 2006).

Des espèces comme *Listeria monocytogenes* sont également capables de se multiplier dans les amibes libres et de les lyser, les bactéries étant alors libérées dans l'environnement, permettant leur dissémination. Cependant, certaines amibes infectées par *L. monocytogenes* vont s'enkyster capturant ainsi les bactéries (Ly and Müller, 1990). Il existe néanmoins des bactéries capables de se multiplier dans les amibes sans les lyser comme la bactérie *Vibrio cholerae*, capable de survivre également lors du processus d'enkystement et retrouvée dans le cytoplasme ou entre les deux parois des kystes d' *Acanthamoeba* (Abd et al., 2005).

Les bactéries du genre *Mycobacterium* peuvent également survivre dans les amibes sous forme trophozoïte ou sous forme kystique. La première mycobactérie dont l'interaction avec les amibes libres a été décrite est *Mycobacterium leprae*, qui peut survivre à l'intérieur des amibes sans multiplication bactérienne ni lyse de l'hôte (Jadin, 1975). D'autres

mycobactéries ont, quant à elles, la capacité de se multiplier dans les amibes du genre *Acanthamoeba* sans altérer leur viabilité. Leur passage dans les amibes permettrait d'augmenter leur virulence (Cirillo et al., 1997) et impliquerait une meilleure résistance aux agents antimicrobiens et aux différents traitements de désinfection (Adékambi et al., 2006 ; Whan et al., 2006 ; Yu et al., 2007).

D'autres bactéries pathogènes pour l'Homme comme *Helicobacter pylori* ou les bactéries du genre *Pseudomonas* sont capables de se multiplier dans les amibes libres sans les lyser (Marciano-Cabral and Cabral, 2003 ; Greub and Raoult, 2004). Les *Chlamydia*-like, pathogènes émergents, interagissent également avec les amibes libres (Greub, 2009).

3.1.2. Les champignons

Peu d'études ont été réalisées sur les interactions entre les amibes libres et les champignons. Cependant, les principales études sur ce sujet ont porté principalement sur les levures.

En 2004, il a été montré que *Cryptococcus neoformans*, levure capsulée responsable d'atteintes neurologiques, est capable de se multiplier à l'intérieur d'*A. castellanii*, conduisant à la mort de l'hôte (Malliaris et al., 2004). Cependant, une souche de *C. neoformans* ne possédant pas de capsule ne peut pas survivre en présence d'amibes libres. De plus, comme de nombreux champignons, *C. neoformans* produit de la mélanine qui lui confère une protection contre les amibes (Steenbergen et al., 2001 ; Khan, 2009).

En 2006, Yli-Pirilä a montré que le champignon filamenteux *Penicillium spinulosum* se multiplie en présence d'amibes sans avoir d'effet sur leur viabilité. Il a également montré que le nombre de spores d'*Aspergillus versicolor*, autre champignon filamenteux, était augmenté en présence d'amibes (Yli-Pirilä et al., 2006).

Fusarium oxysporum, retrouvé dans le sol et l'eau, acquiert une croissance plus marquée en présence d'amibes libres. Cependant, comme *P. spinulosum*, *F. oxysporum* n'a pas d'influence sur la viabilité des amibes hôtes (Cateau et al., 2014a). Ces observations sont similaires à celles de Hobson en 2000 qui avait mis en évidence le fait qu'*A. fumigatus* n'a aucun effet sur la viabilité d'*A. castellanii* (Hobson, 2000).

3.1.3. Les virus

Le mimivirus est capable de se développer dans les amibes libres du genre *Acanthamoeba* (La Scola et al., 2008). Un autre virus encore plus gros a été retrouvé dans une souche d'*A. castellanii* isolée d'un système de climatisation : le mamavirus, lui-même infecté par un autre virus, le virus sputnik (La Scola et al., 2008). Cependant, d'autres virus géants ont été retrouvés dans les amibes libres comme les *Marseille* virus ou encore les *Lausanne* virus (Thomas et al., 2011).

D'autres virus comme le coxsachievirus B3 du genre *Enterovirus* peuvent persister dans les amibes, qu'elles soient sous forme trophozoïte ou sous forme kystique, mais aussi les utiliser comme vecteur de transmission. Ce virus a été retrouvé à la surface des amibes et des particules virales ont été retrouvées accumulées dans le cytoplasme amibien. Lors d'un contact entre des amibes libres contaminées et des macrophages, il a été montré que les virus pouvaient être libérés dans l'hôte contribuant ainsi à leur survie mais aussi à leur transmission à l'Homme (Mattana et al., 2006).

Lorenzo-Morales a démontré en 2007 par PCR (Polymérase Chain Reaction) la présence d'adénovirus dans des souches d'amibes libres. Là encore, ces résultats suggèrent que les amibes libres peuvent servir de réservoir pour les adénovirus, facilitant ainsi leur transmission à l'Homme (Lorenzo-Morales et al., 2007). En 2012, Scheid a confirmé que les

adénovirus sont ingérés par les amibes, et sont retrouvés dans des phagosomes. Néanmoins, il n'y aurait pas de réplication virale dans les amibes du genre *Acanthamoeba* (Scheid and Schwarzenberger, 2012).

D'autres virus ont la capacité d'utiliser la présence d'amibes libres. Les echovirus du genre *Enterovirus* se fixent à la surface des amibes ce qui leur permet de disséminer dans l'environnement. Cette capacité de fixation des entérovirus, leur permettait ainsi de persister plus facilement dans l'environnement, plus particulièrement lorsque les conditions leur sont défavorables (Baron et al., 1980 ; Greub and Raoult, 2004).

Néanmoins, d'autres entérovirus comme les poliovirus ou le virus de la stomatite vésiculeuse ne sont pas adsorbés par les trophozoïtes du genre *Acanthamoeba*. Ils ne semblent pas non plus s'accumuler ni en surface ni dans les *Acanthamoeba* même après une longue période de co-incubation (Baron et al., 1980 ; Danes and Cerva, 1981).

3.2. Résistance des micro-organismes à la phagocytose

3.2.1. Mécanisme de phagocytose

3.2.1.1. Définition et généralités

Définition : la phagocytose est un processus cellulaire par lequel les cellules phagocytaires ingèrent des particules solides. Elle se distingue d'autres formes d'internalisation (endocytose et pinocytose) par un contact physique entre la particule et le phagocyte ainsi que par la taille de la particule ingérée, supérieure à 0,5 μm .

La phagocytose a été découverte par Elie Metchnikoff à la fin du 19^{ème} siècle. Elle permet l'ingestion de particules comme des cellules apoptotiques ou des micro-organismes. La phagocytose est utilisée à des fins différentes en fonction de l'organisme qui l'utilise. Elle est reconnue comme une composante essentielle de la réponse immunitaire contre des agents pathogènes. En effet, la phagocytose permet la destruction des pathogènes ainsi que l'activation du système immunitaire (Jutras and Desjardins, 2005 ; Flannagan et al., 2012).

Pour les amibes libres, la phagocytose est le mode de nutrition principal dans l'environnement. En effet, elle leur permet de se nourrir de bactéries, d'algues, de champignons ou encore de virus (Bowers, 1977). Concernant les amibes du genre *Acanthamoeba*, la taille optimale de la particule pour l'ingestion est de l'ordre de 1 à 3 μm (Korn and Weisman, 1967). Ces amibes peuvent aussi ingérer des particules inertes comme des billes de latex. Cependant, elles sont capables de distinguer les particules digérables ou non (Bowers and Olszewski, 1983).

3.2.1.2. Processus de phagocytose

La phagocytose se décompose en trois grandes phases : la reconnaissance et l'adhérence, l'ingestion et enfin la digestion du pathogène (Figure 27).

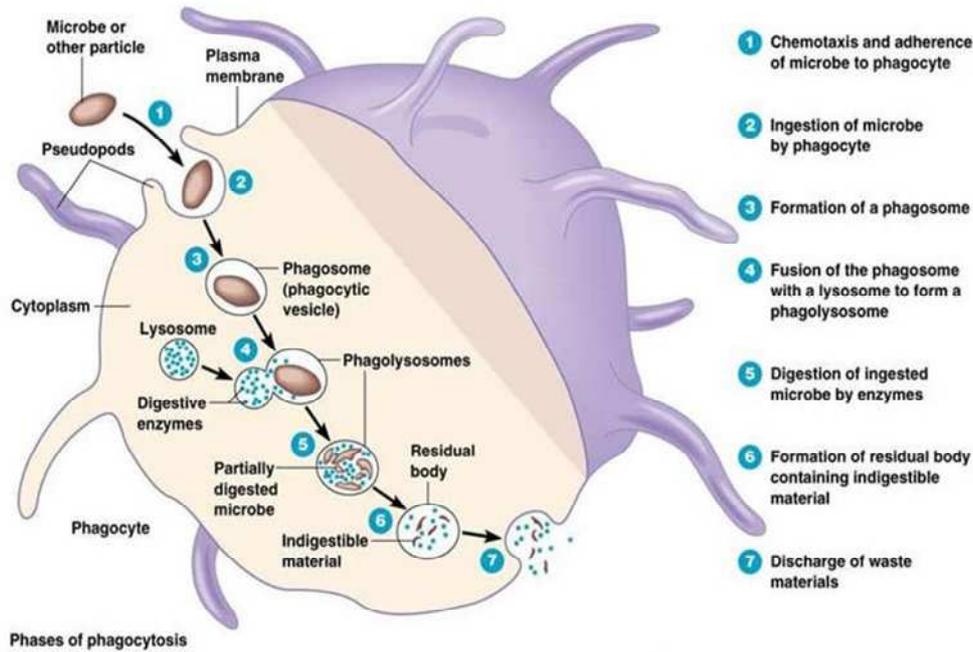


Figure 27 : Schéma de la phagocytose dans les macrophages

(©Benjamin Cummings)

➤ Reconnaissance et adhérence des pathogènes :

○ La reconnaissance des pathogènes : c'est la première étape de la phagocytose. Elle est réalisée grâce à des récepteurs situés à la surface des phagocytes, appelés PRR (Pattern Recognition Receptors), qui se lient aux PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns) qui sont des motifs moléculaires retrouvés à la surface des micro-organismes. L'activation des PRR permet l'amplification de la réponse inflammatoire (Aderem and Underhill, 1999 ; Underhill and Ozinsky, 2002). Chez l'Homme, on retrouve des TLR (Toll-Like Receptors) reconnaissant, en fonction de leur type, certains motifs des micro-organismes (TLR4 reconnaît le LPS des bactéries Gram négatif, TLR2 les peptidoglycanes des bactéries Gram positif). Les TLR vont permettre l'activation de facteurs de signalisation que sont les cytokines, induisant ainsi une inflammation (Kawai and Akira, 2005).

○ L'adhérence: les particules étrangères vont ensuite être fixées à la surface des cellules phagocytaires. L'accumulation des particules à la surface des phagocytes induit une polymérisation de l'actine au site de liaison pour aider à l'internalisation. La fixation va être facilitée par des opsonines et plus particulièrement par des immunoglobulines ainsi que par les protéines du complément. Les immunoglobulines se fixent de façon spécifique sur les épitopes des pathogènes par leur site anticorps et leur fragment Fc sur les récepteurs Fcγ. Les protéines issues de l'activation du complément vont se déposer à la surface du pathogène se liant ainsi à la surface des cellules phagocytaires (Aderem and Underhill, 1999 ; Ravetch and Bolland, 2001 ; Underhill and Ozinsky, 2002).

➤ L'ingestion des pathogènes : elle se produit grâce à la formation d'un phagosome contenant le pathogène. Le phagosome va alors pouvoir fusionner avec des lysosomes, formant un phagolysosome contenant des molécules lysosomales acides comme les cathepsines et des enzymes, l'ensemble permettant ainsi une digestion partielle des pathogènes (Tjelle et al., 2000).

➤ Digestion des pathogènes : les pathogènes vont être détruits par différents mécanismes : une dégranulation qui entraîne un déversement de substances bactéricides dans le phagolysosome, permettant la destruction de presque toutes les structures biologiques et la production de formes réactives toxiques de l'oxygène, qui altèrent la structure des protéines, des lipides mais aussi des acides nucléiques (Aderem and Underhill, 1999 ; Underhill and Ozinsky, 2002).

3.2.2. Mécanismes d'échappement à la phagocytose

Certains micro-organismes ont la capacité d'échapper à la phagocytose. Pour cela, ils ont mis en place des stratégies comme l'évitement du contact avec les phagocytes, l'inhibition de l'internalisation, la survie dans les phagocytes, mais aussi l'induction de l'apoptose de ces phagocytes.

3.2.2.1. Evitement de contact avec les phagocytes

Quatre stratégies principales sont mises en oeuvre par les micro-organismes. La première est d'envahir des régions inaccessibles aux phagocytes. En effet, certains tissus comme la vessie ou la peau intacte ne sont pas protégés par des cellules phagocytaires. La deuxième stratégie consiste à éviter de provoquer une réponse inflammatoire, ce qui empêche l'hôte infecté de mobiliser ses défenses sur le lieu de l'infection (<http://textbookofbacteriology.net/antiphago.htm> consulté le 20/11/2016).

D'autres bactéries, comme celles du genre *Streptococcus* ou leurs produits, la streptolysine par exemple, ont la capacité d'inhiber la chimiotaxie phagocytaire, même à de faibles concentrations. Les mycobactéries *M. tuberculosis* sont elles aussi des bactéries pouvant inhiber la migration des leucocytes. Enfin, la dernière stratégie mise en oeuvre afin d'éviter le contact avec les cellules phagocytaires est de masquer la surface antigénique de la bactérie. Pour cela, les bactéries pathogènes se recouvrent d'un composant considéré comme "soi" par les phagocytes de l'hôte, entraînant une non-reconnaissance bactérienne. C'est le cas des *Streptococcus* qui synthétisent une capsule composée d'acide hyaluronique, composant principal du tissu conjonctif (<http://textbookofbacteriology.net/antiphago.htm> consulté le 20/11/2016).

3.2.2.2. Inhibition de l'internalisation

Certaines bactéries qui n'évitent pas la reconnaissance par les phagocytes ont mis en place des stratégies d'échappement à la phagocytose par un mécanisme d'inhibition de l'internalisation par la cellule phagocytaire. Ces bactéries portent des substances antiphagocytaires à leur surface, capables d'inhiber leur internalisation par la cellule phagocytaire (<http://textbookofbacteriology.net/antiphago.htm> consulté le 20/11/2016). Ce sont :

- les capsules, retrouvées chez *Haemophilus influenzae*, *Treponema pallidum* ou encore *Streptococcus pneumoniae*
- la protéine M et les fimbriae des *Streptococcus* du groupe A
- les polysaccharides de surface, souvent produits sous forme de biofilm par *Pseudomonas aeruginosa*
- le polysaccharide O du LPS pour *Escherichia coli*, par exemple
- l'antigène K chez *E. coli* ou l'antigène Vi chez *Salmonella typhi*.

3.2.2.3. Survie dans les phagocytes

La survie dans les cellules phagocytaires constitue la stratégie d'échappement à la phagocytose la plus couramment utilisée par les micro-organismes. Plusieurs tactiques sont utilisées : l'inhibition de la maturation des phagosomes, la survie dans les phagolysosomes ou encore l'échappement du phagosome.

3.2.2.3.1. Inhibition de la maturation des phagosomes

De nombreux micro-organismes pathogènes ont développé des mécanismes pour interrompre, arrêter ou même réorienter la voie de maturation du phagosome. Les agents pathogènes vont alors être capables de rester en sommeil dans la cellule phagocytaire, protégés du système immunitaire. Les voies principalement utilisées pour inhiber la maturation des phagosomes sont : l'inhibition de la fusion phagosome / lysosome, le blocage de l'acidification et l'utilisation de vacuoles répliquatives (Figure 28).

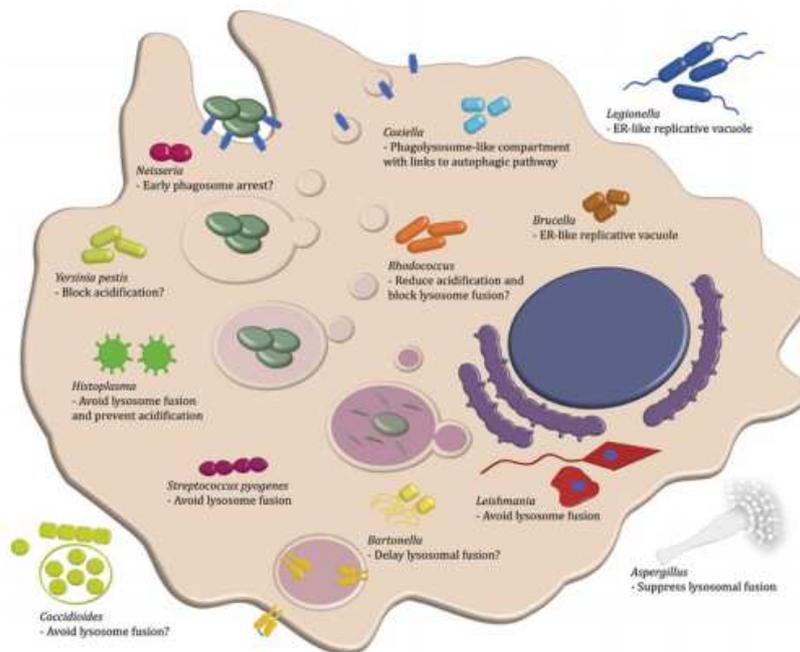


Figure 28 : Stratégies utilisées par différents micro-organismes pour inhiber la maturation des phagosomes

(Smith and May, 2013)

➤ Inhibition de la fusion phagosome / lysosome : il s'agit du mécanisme d'inhibition de la maturation du phagosome le plus utilisé par les micro-organismes pathogènes. Parmi ces derniers, il est possible de retrouver *Streptococcus pyogenes*,

Histoplasma capsulatum, *Leishmania spp.*, *Bartonella henselae*, *Rhodococcus*, *Coccidioides spp.* ou encore *Aspergillus spp.* (Smith and May, 2013).

S. pyogenes est une bactérie Gram positif. La protéine M1, un de ses facteurs de virulence, joue un rôle dans le contrôle du trafic des vésicules et prévient la fusion entre le phagosome et les lysosomes. Cette protéine est également connue pour jouer un rôle dans la suppression de la réponse inflammatoire des macrophages par la voie de signalisation de NF- κ B (Hertzén et al., 2010).

Les protozoaires du genre *Leishmania spp.* existent sous deux formes : promastigote et amastigote. Lors de l'internalisation, les promastigotes insèrent des lipophosphoglycanes dans la membrane du phagosome, inhibant la dépolymérisation de l'actine, ce qui bloque la fusion lysosomale et permet la transformation du protozoaire en amastigote qui possède la capacité de réplication dans le phagosome (Winberg et al., 2009 ; Rodríguez et al., 2011).

Il a récemment été montré qu'une minorité de conidies d'*A. fumigatus* ont la capacité de supprimer la fusion entre le phagosome et les lysosomes, permettant au champignon de germer et de lyser les macrophages. Cependant, le processus n'est pas encore parfaitement connu, bien que la mélanine semble jouer un rôle dans le détournement de la maturation des phagosomes ainsi que dans la fusion avec les lysosomes (Thywißen et al., 2011 ; Morton et al., 2012).

➤ Blocage de l'acidification : il s'agit du deuxième mécanisme d'inhibition de la maturation du phagosome le plus utilisé par les micro-organismes pathogènes comme *Yersinia pestis*, *Histoplasma capsulatum* ou encore *Rhodococcus* (Smith and May, 2013).

Lors de son ingestion, *Y. pestis* régule positivement un opéron induit par le stress. La délétion de cet opéron ou du gène *orfX* induit une régulation négative de la sécrétion de type III et une réplication intracellulaire plus élevée. Ensuite, les vacuoles contenant la bactérie

fusionnent avec les lysosomes, tandis que le pH reste neutre à l'intérieur des vacuoles. Les étapes de maturation qui sont interrompues restent cependant encore inconnues (Pujol et al., 2009 ; Fukuto et al., 2010).

H. capsulatum est un champignon retrouvé dans les phagosomes des macrophages lors d'une infection. Le champignon modifie la vacuole en maintenant son pH intérieur à 6,5 et en bloquant l'acidification de la V-ATPase, donc la fusion phagosome/lysosome (Strasser et al., 1999).

➤ Mise en place de vacuoles répliquatives : c'est le troisième mécanisme d'inhibition de la maturation du phagosome, mis en place par certains micro-organismes pathogènes comme *Legionella pneumophila* ou *Brucella spp.* (Smith and May, 2013).

L. pneumophila est connue pour sa capacité à se reproduire dans les macrophages alvéolaires humains. En 1983, Horwitz a montré que les phagosomes dans lesquels se trouvent les bactéries sont moins acides que les autres et ne fusionnent pas avec les lysosomes. De plus, les phagosomes contenant les légionnelles ont la capacité de s'associer aux mitochondries ainsi qu'au réticulum endoplasmique rugueux, ce qui permet au phagosome d'être recouvert de ribosomes (Horwitz, 1983a, 1983b). Plus récemment, il a été montré que le détournement de la maturation des phagosomes par *Legionella* se fait rapidement après l'ingestion, par l'intermédiaire de la protéine membranaire DotA. Cette protéine semble nécessaire à la formation d'un complexe macromoléculaire dirigeant le phagosome vers une forme de vacuole répliquative. Cette vacuole va alors être incapable de sécréter des facteurs de virulence, d'acquérir des marqueurs lysosomaux et se retrouver appauvrie en nutriments. Les cellules vont par la suite éclater. Cependant, la cause de ce phénomène n'est pas connue, il pourrait être dû à l'apoptose cellulaire ou aux limites physiques de la membrane du phagocyte (Roy et al., 1998 ; Swanson and Hammer, 2000).

3.2.2.3.2. Survie dans les phagosomes

La survie dans le phagosome est une méthode complexe d'échappement à la phagocytose nécessitant la mise en place de nombreux mécanismes par quelques micro-organismes. Les plus étudiés sont présentés dans la Figure 29 (Smith and May, 2013).

Streptococcus agalactiae est une bactérie Gram positif qui utilise de nombreux facteurs afin de mimer les molécules hôtes et d'interrompre la cascade du complément. Il a été montré que cette bactérie est capable de survivre dans les macrophages pendant une longue période. Pour cela, l'acidification du phagosome semble être nécessaire, agissant comme un signal de stress induisant les gènes de survie. D'autres facteurs sont nécessaires à la survie de la bactérie dans le phagosome. On retrouve notamment la superoxyde dismutase, mécanisme de défense contre l'éclatement oxydatif du phagosome. Cependant, *S. agalactiae* semble seulement persister dans les cellules phagocytaires, sans multiplication bactérienne (Valentin-Weigand et al., 1996 ; Maisey et al., 2008 ; Rajagopal, 2009).

Blastomyces dermatitidis est un champignon capable d'éviter la destruction par les macrophages alvéolaires. Le rôle du NO reste flou mais ce champignon est capable de réduire cette molécule dans le milieu, diminuant ainsi la quantité produite par les macrophages. Il existerait un mécanisme d'inhibition de l'enzyme iNOS (inducible nitric oxide synthase), mais encore mal connu (Brummer et al., 1981 ; Rocco et al., 2011).

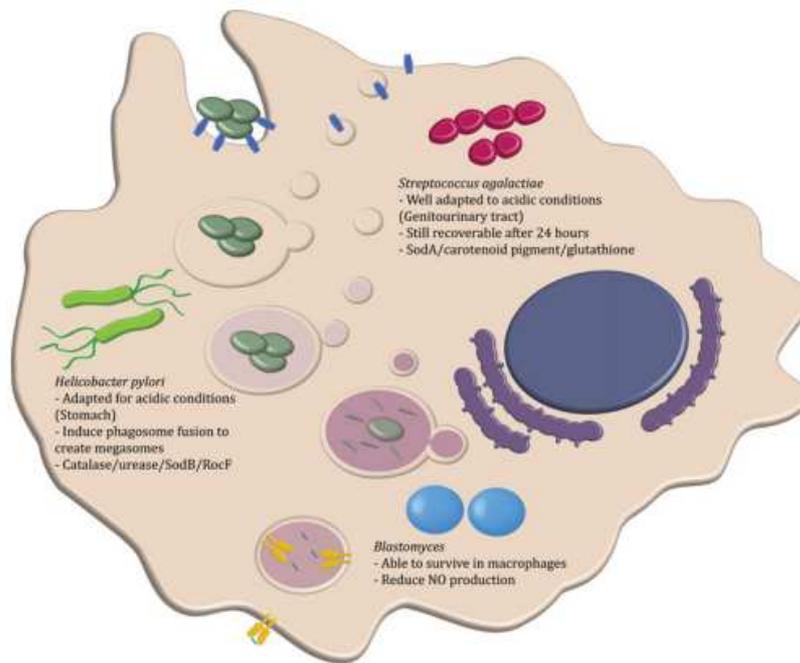


Figure 29 : Pathogènes persistant dans le phagosome

(Smith and May, 2013)

Helicobacter pylori est une bactérie Gram négatif capable de persister dans les macrophages, formant des “mégasomes” par fusion de nombreux phagosomes contenant la bactérie. L’uréase produite par *H. pylori* est nécessaire à la formation des mégasomes et la catalase également produite par la bactérie est responsable de sa longévité dans les macrophages. En effet, la catalase associée à la superoxyde dismutase transforme le superoxyde en eau et en oxygène. De plus, cette bactérie est capable de retarder la phagocytose par activation de la PKC ζ (Protéine Kinase C) régulant positivement les facteurs de virulence nécessaires à la survie dans les phagosomes (Allen and Allgood, 2002 ; Schwartz and Allen, 2006 ; Borlace et al., 2012).

3.2.2.3.3. Echappement du phagosome

De nombreuses méthodes ont été mises en place par les micro-organismes afin de s'échapper du phagosome, sans mécanisme spécifique en fonction des catégories de pathogènes. *C. neoformans* est capable d'échapper au phagosome par vomocytose qui est un phénomène d'extrusion active. Les bactéries Gram négatif comme *Shigella flexneri* ou les rickettsies ont la capacité de perméabiliser le phagosome et d'utiliser les queues d'actine présentes dans la cellule comme moyen d'échappement à la phagocytose. La bactérie *Francisella tularensis* peut s'échapper du cytosol mais aussi utiliser la voie de l'autophagie (Smith and May, 2013)(Figure 30). Les mécanismes mis en place pour échapper au phagosome par les bactéries *Listeria monocytogenes* et *Burkholderia pseudomallei*, les champignons du genre *Candida* ou encore le protozoaire *Trypanosoma cruzi* sont détaillés ci-après.

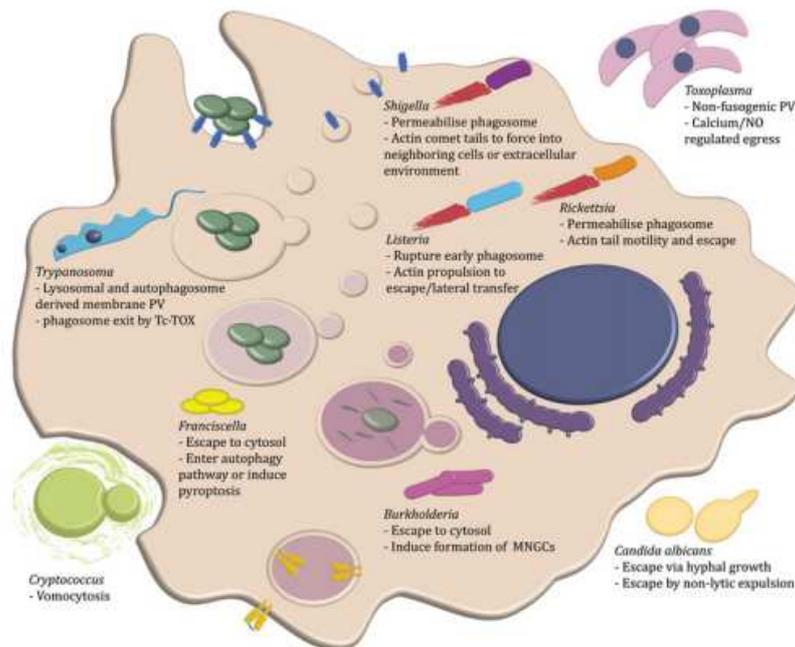


Figure 30 : Stratégies utilisées par différents micro-organismes pour échapper aux phagosomes

(Smith and May, 2013)

La bactérie Gram positif *L. monocytogenes* est capable de se multiplier dans les différentes cellules phagocytaires en s'échappant du phagosome. Ce phénomène comprend plusieurs étapes allant de la perméabilisation du phagosome à sa rupture. Pour cela, la bactérie produit une toxine, la listeriolysine O (LLO) qui forme des pores perméabilisant le phagosome. Des molécules produites par l'hôte comme le CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) ou le GILT (γ -inducible lysosomal thiol reductase) sont nécessaires à la régulation de la LLO qui, surexprimée, peut entraîner une lyse cellulaire, exposant ainsi la bactérie au système immunitaire. Une fois les pores formés dans la membrane du phagosome, une combinaison de phospholipases bactériennes associées à des molécules produites par l'hôte permet une dégradation complète de la membrane du phagosome libérant ainsi la bactérie dans le cytoplasme de la cellule phagocytaire (Portnoy et al., 2002 ; Singh et al., 2008 ; Radtke et al., 2011).

Burkholderia pseudomallei est une bactérie Gram négatif qui provoque elle-même son internalisation dans les cellules hôtes. Une fois internalisée, la bactérie se multiplie dans le cytoplasme de la cellule et induit la fusion cellule/cellule afin de former des cellules géantes multi-nucléées (MNGC). Le mécanisme de survie de la bactérie est encore mal connu, cependant, elle utilise le système Inv/Mxi-Spa comme système de sécrétion de type 3 qui ne joue qu'un faible rôle dans la perturbation de la maturation du phagosome. Une fois dans le cytosol, la bactérie produit et utilise le facteur RpoS pour induire des protrusions membranaires associées aux actines, une fois les MNGC formées (Stevens et al., 2002, 2005).

Trypanosoma cruzi est un protozoaire majoritairement tué dans les cellules hôtes humaines. Cependant, une faible proportion du parasite réussit à persister dans les cellules. Le protozoaire peut être phagocyté par les macrophages mais également être internalisé dans des cellules non phagocytaires. Contrairement aux autres micro-organismes, *T. cruzi* est internalisé de manière indépendante de l'actine. L'entrée dans la cellule implique également

la polymérisation de microtubules et de la membrane d'autophagosomes contribuant à la formation de vacuoles parasitaires. Une fois dans la vacuole, le protozoaire s'en échappe en utilisant une molécule formant des pores, Tc-TOX active à pH acide (Romano et al., 2009 ; Fernandes et al., 2011).

Les champignons du genre *Candida* une fois internalisés par la cellule phagocytaire filamentent rapidement avant d'induire une lyse éventuelle de la cellule hôte. Pour cela, au cours de sa croissance, le champignon est capable d'inhiber la production de ROS, le mécanisme d'action restant à ce jour inconnu. La levure est également capable de sortir du phagocyte de manière non lytique comme le champignon *C. neoformans* (Wellington et al., 2009 ; Bain et al., 2012).

3.2.2.4. Induction de l'apoptose des cellules phagocytaires

La quatrième stratégie d'échappement à la phagocytose est l'attaque des cellules phagocytaires par les pathogènes, avant ou après leur ingestion, par une induction de leur apoptose.

Avant l'ingestion, les pathogènes, particulièrement des bactéries Gram positif sont capables d'induire l'apoptose des cellules grâce à des molécules qui vont agir comme des enzymes en formant des pores entraînant la lyse de la membrane de la cellule phagocytaire. La streptolysine de *Streptococcus* se lie au cholestérol des membranes et provoque l'explosion des granules lysosomaux des neutrophiles, libérant ainsi leur contenu létal dans le cytoplasme cellulaire. La leucocide de *Staphylococcus* agit quant à elle sur la membrane des polynucléaires neutrophiles. D'autres protéines, comme l'exotoxine A de *Pseudomonas aeruginosa*, inhibent la phagocytose en tuant les macrophages, et des exotoxines comme celle de *Bordetella pertussis* diminuent l'activité phagocytaire en rompant l'équilibre cellulaire et

en consommant les réserves d'ATP (<http://textbookofbacteriology.net/antiphago.htm> consulté le 30/11/2016).

D'autres bactéries sont capables de tuer les cellules phagocytaires après leur ingestion. Pour cela, elles vont se développer dans la cellule phagocytaire avant de sécréter des molécules pouvant traverser la membrane des phagosomes, libérant ainsi les granules lysosomales. D'autres bactéries vont sécréter des molécules toxiques après leur croissance dans les phagocytes. Ces molécules toxiques vont alors passer à travers la membrane du phagolysosome pour se diriger vers d'autres cibles dans la cellule phagocytaire. Cependant, les mécanismes ne sont actuellement pas bien compris (<http://textbookofbacteriology.net/antiphago.htm> consulté le 30/11/2016).

Chapitre 2 : Objectifs de la thèse

Les amibes libres sont des protozoaires ubiquitaires, retrouvées dans de nombreux environnements où elles ingèrent par phagocytose des bactéries, des champignons, des virus ou d'autres protozoaires (Bowers, 1977). Cependant, certains de ces micro-organismes sont capables de résister à la phagocytose et acquièrent ainsi une meilleure résistance aux agents antimicrobiens (Greub and Raoult, 2004 ; Adékambi et al., 2006). Dans ce contexte, nous nous intéressons à la nutrition des amibes et à certains mécanismes pouvant s'y rapporter.

La première partie de la thèse concerne la préférence trophique des amibes. Pour y répondre, deux amibes libres *A. castellanii* et *V. vermiformis* sont mises en présence de différents micro-organismes, en particulier de bactéries Gram négatif et Gram positif. Après avoir déterminé lesquelles d'entre elles possèdent le meilleur pouvoir attractif, on explore le fait que cette attractivité puisse être liée à des molécules diffusibles. Les composants bactériens d'intérêt sont ensuite fractionnés grâce à différentes méthodes séparatives et leur nature moléculaire déterminée.

D'autre part, dans la littérature, les amibes et les macrophages sont régulièrement comparés, principalement pour leur capacité à phagocyter les micro-organismes (Siddiqui and Khan, 2012). Certains auteurs évoquent même la possibilité d'utiliser un modèle amibe pour étudier les interactions de différents pathogènes avec les macrophages, qui sont également des cellules phagocytaires (Cardas et al., 2012). La deuxième partie de la thèse concerne donc la comparaison des comportements d'*A. castellanii* et de la lignée macrophagique Thp-1 vis-à-vis de quatre micro-organismes pathogènes : les bactéries *Klebsiella pneumoniae* et *Staphylococcus aureus*, le champignon filamenteux *Aspergillus fumigatus* et un adénovirus humain de sérotype B3, à travers des expérimentations de co-culture, et des techniques microscopiques et/ou de biologie moléculaire.

Chapitre 3 : Matériel et méthodes

1. Cellules et conditions de culture

1.1. Micro-organismes

Dans cette étude, six souches bactériennes, deux souches fongiques ainsi qu'une souche virale sont utilisées. Ces micro-organismes sont répertoriés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Souches de micro-organismes utilisés dans l'étude

Micro-organismes pathogènes	Sources
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Laboratoire de Bactériologie (CHU de Poitiers)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Laboratoire de Bactériologie (CHU de Poitiers)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Laboratoire de Bactériologie (CHU de Poitiers)
<i>Escherichia coli</i>	Laboratoire de Bactériologie (CHU de Poitiers)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Laboratoire de Bactériologie (CHU de Poitiers)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Laboratoire de Bactériologie (CHU de Poitiers)
<i>Candida albicans</i>	Laboratoire de Parasitologie (CHU de Poitiers)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Institut Scientifique de Santé Publique (Belgique)
adénovirus sérotype B3	Laboratoire de Virologie (CHU de Poitiers)

Les souches bactériennes et la souche de *C. albicans* utilisées dans cette étude sont issues de prélèvements de patients et identifiées par spectrométrie de masse MALDI-TOF (VITEK MS, BioMérieux). Le virus correspond également à une souche clinique isolée d'un patient. Le sérotypage de la souche d'Adénovirus a été effectué par le Centre National de Référence des *Enterovirus/Parechovirus* (Laboratoire de virologie, hôpital de la Croix

Rousse, Hospices Civils de Lyon). Le champignon filamenteux *A. fumigatus* provient de l'environnement.

1.2. Lignées Cellulaires

Une lignée de monocytes ainsi qu'une lignée de cellules humaines sont utilisées dans ce travail. Les monocytes sont des Thp-1, lignée monocyttaire humaine dérivée de leucémie aiguë monocyttaire. Les cellules humaines utilisées sont des cellules Hep-2, lignée cellulaire issue d'un carcinome laryngé humain.

1.3. Souches amibiennes

Deux souches amibiennes sont utilisées dans cette étude : *Acanthamoeba castellanii* ATCC 30234 et *Vermamoeba vermiformis* ATCC 50256. Il s'agit d'amibes libres que l'on peut retrouver dans différents environnements et plus particulièrement dans l'eau.

1.4. Conditions de culture

1.4.1. Micro-organismes

1.4.1.1. Bactéries

Les six bactéries utilisées dans cette étude sont cultivées avant expérimentation sur milieu gélosé Mueller Hinton (MH) pendant 24 h à 37° C. Le milieu MH est composé pour 1L d'eau de 300 mL d'infusion de viande de bœuf, 17,5 g de caséine, 1,5 g d'amidon de maïs

et 17 g d'agar, à un pH = 7,4. Le milieu est ensuite autoclavé pendant 15 min à 121° C, puis coulé en boîtes de Pétri. Les bactéries sont ensuite récoltées dans le milieu d'expérimentation.

Pour certaines études, les bactéries sont également cultivées en milieu liquide lysogeny broth (LB) pendant 24 h à 37° C sous agitation à 180 rpm. Le milieu LB est composé pour 1 litre de milieu de 10 g de peptone, 5 g d'extrait de levures et 10 g de NaCl. Il est ensuite autoclavé pendant 15 min à 121° C.

1.4.1.2. Surnageant de culture bactérienne

Après incubation des bactéries en milieu liquide LB pendant 24 h à 37° C sous agitation à 180 rpm, la culture est centrifugée pendant 10 min à 10000 g. Le surnageant ainsi obtenu est récupéré puis filtré (porosité de 0,22 µm) afin d'éliminer les bactéries potentiellement restantes. Ce surnageant est utilisé pour certaines expérimentations.

1.4.1.3. Souches fongiques

C. albicans est cultivé sur milieu gélosé Sabouraud pendant 48h à 37°C. *A. fumigatus* est cultivé sur le même milieu, mais pendant 5 jours à 27°C. Les levures ou les conodies aspergillaires sont ensuite récoltées dans du PBS, lavées deux fois puis remises en suspension dans le milieu d'expérimentation. Dans le cas d'*A. fumigatus*, une filtration (70 µm) permet d'éliminer les hyphes. Le milieu Sabouraud est composé pour 1 L de milieu de 10 g de peptone, 35 g de glucose, 15 g d'agar à un pH = 6. Il est ensuite autoclavé pendant 15 min à 121°C et coulé en boîtes de Pétri.

1.4.1.4. Virus

La souche d'adénovirus de sérotype B3 a été isolée sur cellules Hep-2 et conservée au congélateur à -80°C. Après décongélation, le virus est cultivé sur cellules Hep-2 pendant 5 jours à 37 °C sous 5 % de CO₂, afin de permettre sa multiplication, puis sa titration.

1.4.1.5. Amibes

A. castellanii est cultivé en flasques de 150 cm² dans du milieu PYG (Proteose peptone, Yeast extract, Glucose) à 27°C. Le PYG est composé de : 2 % de protéose peptone, 0,1 % d'extrait de levure et 0,1 % de glucose supplémentés avec MgSO₄·7H₂O 4 mmol.L⁻¹, CaCl₂·2H₂O 0,4 mmol.L⁻¹, citrate de sodium dihydraté 3,4 mmol.L⁻¹, Na₂HPO₃·2H₂O 2,5 mmol.L⁻¹, KH₂PO₄ 2,5 mmol.L⁻¹ et Fe(NH₄)₂(SO₄)₂·6H₂O à 0,5 mmol.L⁻¹ à un pH = 6,5.

V. vermiformis est cultivé en flasques de 150 cm² dans du milieu PYNFH (Peptone - Yeast extract- Nucelic acid - Folic acid – Hemin) à 27°C. Le PYNFH est composé pour 1 L d'eau de : 10 g de proteose peptone, 10 g d'extrait de levure supplémentés avec 1 g d'acide ribonucléique, 15 mg d'acide folique, 1 mg d'hémine, 0,2 g Na₂HPO₄·2H₂O, 0,36 g KH₂PO₄ et 100 mL SVF (Sérum de Veau Foetal) inactivé par la chaleur, à un pH = 6,5

Pour certaines expérimentations, les deux souches amibiennes sont également incubées dans de l'eau provenant du réseau hospitalier et filtrée à 0,22 µm (cette partie concernant les relations *A. fumigatus* et amibes libres) ou dans du PAS (Page's modified Neff's amoeba saline). Le PAS est composé pour 1 L d'eau de 120 mg NaCl, 4 mg MgSO₄·7H₂O, 4 mg CaCl₂·2H₂O, 142 mg Na₂HPO₄ et 36 mg KH₂PO₄.

1.4.2. Lignées cellulaires

1.4.2.1. Macrophages

Les monocytes Thp-1 sont cultivés en flasques de 150 cm² dans du RPMI-1640 supplémenté avec 10 % de SVF inactivé par la chaleur, 1% de streptomycine et 1 % de pénicilline, à 37°C en présence de 5 % de CO₂. Les monocytes Thp-1 sont différenciés en macrophages pendant 72 h dans du milieu RPMI-1640, avec 50 ng/mL de phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA). Avant utilisation, les macrophages sont lavés deux fois avec du RPMI-1640 afin d'éliminer le PMA.

1.4.2.2. Cellules Hep-2

Les cellules Hep-2 sont cultivées en flasques de 150 cm² dans du milieu DMEM supplémenté avec 10 % de SVF inactivé par la chaleur, 1 % de streptomycine et 1 % pénicilline, à 37°C en présence de 5 % de CO₂ pendant 5 jours.

2. Méthodes de microbiologie

2.1. Tests de préférence trophique

Les tests de préférence trophique sont réalisés sur des géloses non nutritives NNA (milieu composé pour 1 L d'eau distillée de 20 g d'agar, autoclavé pendant 15 min à 121° C, puis coulé en boîte de Pétri). Pour cela, un panel de micro-organismes est utilisé (voir tableau 2). Une goutte de 10 µL de suspension d'*A. castellanii* contenant 10³ trophozoïtes est déposée

au centre de la gélose. Chaque micro-organisme testé est alors déposé en une goutte de 10 μ L (contenant 10^5 bactéries ou levures) placée à 2 cm de chaque côté des amibes (Figure 31). Les géloses sont ensuite incubées à 37° C pendant 72 h et observées toutes les 24 h au microscope optique inversé, afin d'observer le déplacement des amibes sur la gélose.

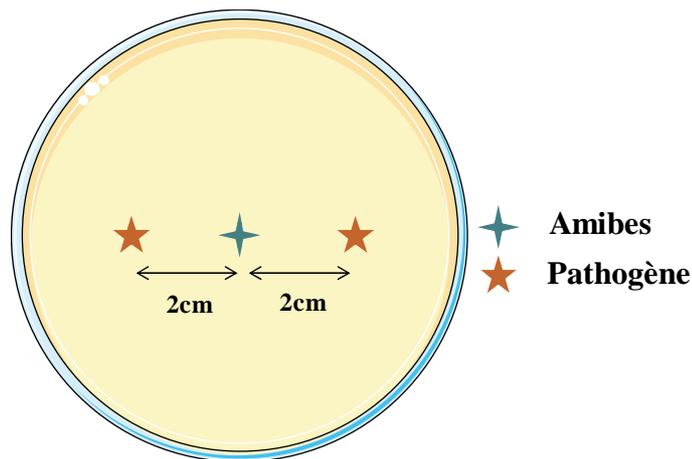


Figure 31 : Schéma du test de préférence trophique

Les pathogènes sont placés à deux cm de chaque côté des amibes

Les mêmes tests sont réalisés avec les bactéries tuées ainsi qu'avec leur surnageant de culture, obtenu dans du milieu LB. Ces tests permettent de déterminer si l'attraction des amibes est due aux micro-organismes eux-mêmes ou à des molécules qu'ils produiraient.

2.2. Tests de diffusibilité

Les tests de diffusibilité des molécules sont réalisés afin de déterminer si les molécules produites par les micro-organismes testés sont diffusibles ou volatiles. Pour cela, une petite boîte de Pétri contenant du milieu gélosé LB est disposée dans une gélose NNA. Une goutte de 10 μ L de suspension de trophozoïtes d'*A. castellanii* (contenant 10^3 amibes) est déposée sur cette même gélose NNA à 2 cm de la gélose LB. Les différents micro-organismes testés,

vivants, morts ainsi que leur surnageant sont déposés en une goutte de 10 μ L (contenant 10^5 micro-organismes) sur la gélose LB (Figure 32). Les boîtes intérieures sont fermées ou non et les géloses sont ensuite incubées à 37° C pendant 72 h et observées toutes les 24 h au microscope optique inversé, afin d'observer le déplacement ou non des amibes sur la gélose NNA.

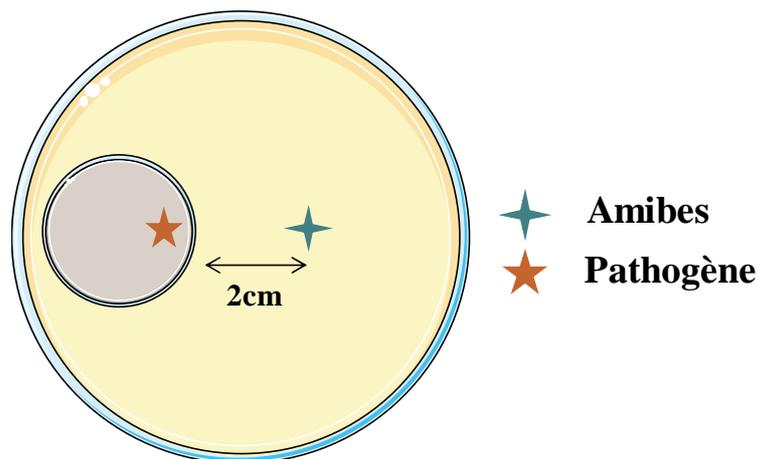


Figure 32 : Schéma du test de diffusibilité

Les pathogènes ou leur surnageant sont placés à 2 cm des amibes

2.3. Tests de co-culture

2.3.1. Co-culture cellules phagocytaires et bactéries

Les co-cultures sont réalisées dans des microplaques de 96 puits. Pour cela, 100 μ L d'une suspension de trophozoïtes d'amibes ou de macrophages (contenant 10^5 cellules) réalisée dans du PAS contenant 10% de RPMI (PAS-RPMI) sont distribués dans chacun des puits de la microplaque. Les microplaques sont incubées pendant 2 h à 27° C pour les amibes et à 37° C sous 5% de CO₂ pour les macrophages, afin de permettre aux cellules d'adhérer au fond des puits. Les bactéries sont, quant à elles, récoltées dans ce même milieu PAS-RPMI,

puis 100 μL de la suspension contenant 10^4 bactéries (soit une multiplicité d'infection (MOI) de 0,1) sont ajoutés dans les puits. Les co-cultures sont ensuite incubées pendant 3, 6, 24 et 48 h à 27° C pour les amibes ou à 37° C sous 5% de CO_2 pour les macrophages. Après incubation, 20 μL de la co-culture sont prélevés dans chaque puits et des dilutions en séries réalisées dans du PBS. Ces suspensions sont ensuiteensemencées sur des géloses MH et incubées à 37° C pendant 24 h avant dénombrement des colonies. Les témoins sont réalisés en incubant des bactéries dans du PAS-RPMI sans amibe ni macrophage. Chaque expérience est reproduite trois fois, en triplicate.

2.3.2. Co-culture cellules phagocytaires et *A. fumigatus*

Les co-cultures sont réalisées dans des microplaques 96 puits. Pour cela, 100 μL de suspension de trophozoïtes amibiens ou de macrophages (contenant 10^5 cellules) réalisée soit dans du PAS-RPMI soit dans de l'eau du réseau hospitalier sont distribués dans chacun des puits de la microplaque. Les microplaques sont incubées pendant 2 h à 27° C pour les amibes et à 37°C sous 5% de CO_2 pour les macrophages, afin de permettre aux cellules d'adhérer au fond des puits. Les conidies d'*A. fumigatus* sont récoltées dans le milieu PAS-RPMI ou dans de l'eau du réseau hospitalier, puis 100 μL de la suspension fongique contenant 10^5 conidies (MOI = 1) sont ajoutés dans les puits. Les co-cultures sont ensuite incubées pendant 48 et 96 h à 27° C pour les amibes ou à 37° C sous 5% de CO_2 pour les macrophages. Après incubation, 20 μL de la co-culture sont prélevés dans chaque puits et des dilutions en séries sont réalisées dans du PBS. Les suspensions sont ensuiteensemencées sur des géloses Sabouraud et incubées à 37° C pendant 72 à 96 h avant dénombrement des colonies. Les témoins sont réalisés en incubant *A. fumigatus* dans du PAS-RPMI ou de l'eau du réseau

hospitalier sans amibe ni macrophage. Chaque expérience est reproduite trois fois, en triplicate.

2.3.3. Co-culture cellules phagocytaires et virus

Les co-cultures sont réalisées dans des microplaques 24 puits. Pour cela, 1 mL de suspension de trophozoïtes amibiens ou de macrophages (contenant 5.10^5 cellules) réalisée dans du RPMI est distribué dans chacun des puits de la microplaque. Les microplaques sont incubées pendant 2 h à 27° C pour les amibes et à 37°C sous 5% de CO₂ pour les macrophages afin de permettre aux cellules d'adhérer au fond des puits. 100 µL d'une suspension d'adénovirus réalisée en RPMI contenant 5.10^4 doses infectieuses (DICT50), soit une multiplicité d'infection (MOI) de 0,1, sont ensuite ajoutés dans les puits. Les co-cultures sont ensuite incubées pendant 1, 24, 48 et 72 h à 27° C pour les amibes ou à 37° C sous 5% de CO₂ pour les macrophages. Chaque expérience est reproduite trois fois, en triplicate.

2.4. Tests de co-incubation

2.4.1. Co-incubation de *K. pneumoniae* avec le surnageant amibien

Des trophozoïtes (5.10^5 / mL) d'*A. castellanii* sont incubés à 27 ° C pendant 72 h dans du PAS. La suspension amibienne est ensuite centrifugée (1500 t/min pendant 7 min) et le surnageant récupéré. 100 µL de ce surnageant de culture amibienne vont alors être distribués dans les puits d'une microplaque 96 puits et 100 µL d'une suspension de *K. pneumoniae* (contenant 5.10^4 bactéries) réalisée en PAS sont ajoutés au surnageant ou dans du PAS en tant que témoin. On réalise alors une incubation à 27 ° C pendant 3, 6, 24 et 48 h. Pour estimer la

viabilité bactérienne, 20 μL de la co-incubation sont ensuite prélevés dans chaque puits et des dilutions en séries sont réalisées dans du PBS. Les suspensions sont ensuite ensemencées sur des géloses MH et incubées à 37° C pendant 24 h avant dénombrement des colonies. Chaque expérience est reproduite trois fois, en triplicate.

2.4.2. Co-incubation d'*A. fumigatus* avec le surnageant amibien

Des trophozoïtes (5.10^5 / mL) de chaque souche d'amibes libres ont été incubés à 27° C pendant 72 h dans du PAS ou dans l'eau du réseau hospitalier filtrée. Les suspensions amibiennes sont ensuite centrifugées (1500 t/min pendant 7 min) et le surnageant récupéré. 100 μL de ces surnageants sont distribués dans les puits d'une microplaque 96 puits et 100 μL de suspension d'*A. fumigatus* (contenant 5.10^4 conidies) réalisée en PAS ou dans de l'eau du réseau hospitalier sont ajoutés au surnageant amibien, au PAS ou à l'eau de l'hôpital, puis incubés à 27° C pendant 48 et 96 h. Après incubation, 20 μL sont prélevés dans chaque puits et des dilutions en séries sont réalisées dans du PBS. Les suspensions sont ensuite ensemencées sur des géloses Sabouraud et incubées à 37° C pendant 72 à 96 h avant dénombrement des colonies. Chaque expérience est reproduite trois fois, en triplicate.

2.5. Effet de la gentamicine sur la croissance bactérienne en présence ou non de cellules phagocytaires

100 μL d'une suspension de cellules phagocytaires en PAS-RPMI (contenant 10^5 cellules) sont déposés dans chaque puits d'une microplaque de 96 puits. Puis, 100 μL de PAS-RPMI contenant 10^4 bactéries (MOI = 0,1) sont ajoutés. Après 3 ou 24 h d'incubation, 50 μg / mL de gentamicine sont ajoutés et les co-cultures sont incubées 2 h à température ambiante

(Akya et al., 2009). Chaque puits est ensuite lavé trois fois avec du PAS pour éliminer l'antibiotique, puis son contenu est remis en suspension dans 100 μ L de PAS-RPMI et les plaques sont incubées 24 ou 48 h à 27 ° C pour les amibes ou à 37 ° C sous 5% pour les macrophages Thp-1. Les témoins sont réalisés en incubant des bactéries dans du PAS-RPMI sans cellule phagocytaire et sans gentamicine.

Après cette incubation, 20 μ L de la co-culture sont prélevés dans chaque puits et des dilutions en séries sont réalisées dans du PAS-RPMI. Les suspensions sont ensuite étalées sur des géloses MH et incubées à 37° C pendant 24 h avant dénombrement des colonies. Chaque expérience est reproduite trois fois, en triplicate.

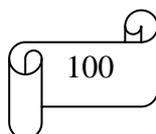
2.6. Dénombrement des micro-organismes

2.6.1. Par densité optique

La concentration bactérienne d'une suspension peut être estimée par spectrophotométrie (longueur d'onde : 600 nm). Cette méthode est utilisée pour la préparation des suspensions bactériennes utilisées dans les différentes expérimentations. Une densité optique (DO) égale à 1 correspond à une concentration de 10^9 bactéries / mL.

2.6.2. Par numération des unités formant colonies (UFC)

La numération bactérienne ou fongique après les expérimentations est réalisée par dénombrement des UFC. Pour cela, un volume de 10 μ L des dilutions des différents échantillons estensemencé sur milieu gélosé adéquat, puis incubé pendant 24 h à 37° C pour les bactéries et pendant 72 à 96 h à 27°C pour *A. fumigatus*. Le nombre de colonies est



ensuite compté, correspondant au nombre de micro-organismes cultivables présents dans l'échantillon.

2.6.3. Par numération sur cellule de comptage

La numération des amibes, des monocytes mais aussi des conidies est réalisée sur des cellules de comptage Kova d'un volume global estimé à 1 μL . Après remplissage, la cellule est observée au microscope optique, à l'objectif x20 pour permettre le dénombrement des cellules

2.7. Viabilité des cellules

La viabilité des amibes ou des macrophages est déterminée par ajout de bleu de trypan 0,4% aux cultures ou co-cultures. Puis les suspensions de cellules phagocytaires sont déposées dans une cellule de Kova observée ensuite au microscope optique. Les cellules vivantes apparaissent sans coloration alors que les cellules mortes sont visualisées en bleu.

2.8. Titrage des virus

Le titrage est réalisé en plaque 96 puits. Les solutions de virus à titrer sont diluées en DMEM supplémenté en SVF et antibiotiques en séries de raison 10, de 10^{-1} à 10^{-9} . Chacune des dilutions est distribuée en colonne dans la plaque à hauteur de 25 μL par puits. 100 μL d'une suspension de cellules Hep-2 à 100 000 cellules / mL en DMEM supplémenté en SVF et antibiotiques sont ajoutés dans les puits. La plaque est ensuite agitée pour assurer une répartition harmonieuse des cellules dans le puits et incubée pendant 4 jours à 37° C sous 5 %

de CO₂ avec une observation quotidienne de la nappe cellulaire au microscope optique inversé. Les puits montrant un effet cytopathique (ECP) constitué de cellules chutées sont considérés comme positifs tandis que les puits où la nappe cellulaire est intacte sont négatifs. Lorsque l'ECP a cessé de progresser, on calcule le titre infectieux des adénovirus par la méthode de Reed et Muench (Reed and Muench, 1938) permettant de déterminer la dilution théorique de suspension virale produisant un ECP chez 50% des puits inoculés et qui correspond à une TCID₅₀ (Tissue Culture Infective Dose).

En pratique, le calcul est réalisé de la façon suivante (Tableau 3) :

Tableau 3 : Exemple de calcul du titre des virus

Dilutions virales	Nombre de puits ECP+	Nombre de puits intacts	Réponses cumulées ECP+	Réponses cumulées intacts	% de réponses + cumulées
10 ^{-a}	8	0	17	0	17/17=100 %
10 ^{-b}	6	2	9	2	9/11 = 82 %
10 ^{-c}	3	5	3	7	3/10 = 30 %
10 ^{-d}	0	8	0	15	0/15 = 0 %

Dans ce cas, la dilution pour laquelle on retrouve 50 % de puits avec un ECP se trouve entre 10^{-b} et 10^{-c}. La formule alors appliquée pour obtenir le titre du virus est :

$$\frac{\% \text{ supérieur à } 50 \% - 50}{\% \text{ supérieur à } 50 \% - \% \text{ inférieur à } 50 \%}$$

Soit ici, la TCID₅₀ correspond à une dilution de la suspension virale de 10^{-b,6}. Le titre de la suspension virale est donc de 10^{b,6} TCID₅₀ dans 25µl de virus soit 40x10^{b,6} TCID₅₀ / mL.

2.9. Inhibition de l'adhérence

Ces tests sont réalisés suivant le protocole de Medina et al. (Medina et al., 2014). Des monocouches de trophozoïtes d'amibes ou des cellules THP-1 réalisées dans des microplaques 24 puits sont traitées pendant 90 min avec du PAS-RPMI contenant 100 mM de glucose, de galactose, de mannose, de rhamnose, de fructose ou de mannane, à 27 ° C pour les amibes ou à 37 ° C sous 5% de CO₂ pour les macrophages. Après trois lavages avec du PAS-RPMI les pathogènes (*A. fumigatus*, *K. pneumoniae* et *S. aureus*) sont ajoutés à une MOI de 5 aux cellules prétraitées par les sucres ou non puis les microplaques sont incubées à 27 ° C (pour les amibes) ou à 37 ° C sous 5% de CO₂ (pour les macrophages) pendant 1 h. Les puits sont ensuite lavés trois fois avec du PBS, pour éliminer les pathogènes non adhérents aux cellules. Afin d'estimer le nombre de pathogènes restants, donc ayant adhéré aux cellules phagocytaires, le contenu des puits est dilué en série et les dilutions ensemencées sur des géloses Sabouraud à 27° C pendant 72 à 96 h pour *A. fumigatus* et des géloses MH pendant 24 h à 37° C avant dénombrement des colonies. Les témoins sont réalisés dans le même milieu en absence de sucres. Chaque expérience est reproduite trois fois, en triplicate.

2.10. Test d'adhérence et d'internalisation

Les tests d'adhérence et d'internalisation sont réalisés uniquement avec *A. fumigatus*. Des monocouches de trophozoïtes d'amibes ou de macrophages sont réalisées dans du PAS (amibes) ou du PAS-RPMI (macrophages). Une suspension de conidies d'*A. fumigatus* réalisée soit en PAS soit en PAS-RPMI leur est ajoutée à une MOI de 5. Ces co-cultures sont ensuite incubées pendant 15 min, 30 min, 1 h, 2 h et 4 h à 27 ° C pour les amibes ou à 37 ° C sous 5% de CO₂ pour les macrophages. A chaque temps d'incubation, le surnageant de culture est

éliminé, et les puits lavés deux fois avec du PAS afin d'éliminer les conidies non adhérentes. Le contenu des puits est ensuite fixé à froid avec du méthanol puis coloré au Giemsa. Deux cents cellules par puits sont alors observées afin de déterminer le pourcentage de (i) conidies adhérentes et (ii) de conidies internalisées.

Le marquage des conidies avec 5 μg / mL de CalcoFluor White (CFW) pendant 30 min à 27 ° C permet une meilleure visualisation des conidies internalisées. Après trois lavages avec du PAS, les conidies marquées sont ajoutées aux cellules phagocytaires (trophozoïtes et macrophages) à une MOI de 5. Après 15 min, 30 min, 1 h, 2 h et 4 h d'incubation, le surnageant de culture est éliminé et les puits sont lavés deux fois avec du PAS afin d'éliminer les conidies non adhérentes. Pour déterminer le taux de conidies internalisées, on ajoute du bleu de trypan, qui va permettre d'éteindre la fluorescence des conidies non internalisées, facilitant le repérage des conidies internalisées (Scott and Woods, 2000 ; Dementhon et al., 2012). Chaque expérience est reproduite trois fois, en triplicate.

3. Méthodes de biologie moléculaire

3.1. Extraction d'ADN

Les co-cultures cellules phagocytaires-virus sont centrifugées à 1500 rpm pendant 7 min pour les amibes et 250 rpm pendant 5 min pour les macrophages. L'ADN total contenu dans les co-cultures est extrait de 200 μl de surnageant et de la totalité du culot cellulaire grâce à la trousse QIAamp® DNA mini de Qiagen, selon les instructions du fabricant. A la fin de l'extraction, l'ADN est élué dans 200 μL de tampon d'extraction et stocké à -20°C avant analyse.

3.2. PCR quantitative (qPCR)

La trousse ADENOVIRUS ELITE MGB™ de BioSystems permet la détection et la quantification par PCR en temps réel de l'ADN des adénovirus. 20µl de la solution d'ADN extrait du surnageant ou du culot cellulaire sont ajoutés au mélange réactionnel de PCR fourni dans la trousse, contenant deux amorces et une sonde hybridant la totalité des sérotypes du genre *Adenovirus*, puis soumis à amplification génique selon la technologie TaqMan™ sur le thermocycleur ABI Prism 7500 (Applied Biosystems). Une gamme de dilution, de $2 \cdot 10^7$ à $2 \cdot 10^3$ copies/ml, d'une solution d'ADN viral de concentration connue est utilisée pour concevoir une droite d'étalonnage permettant la quantification absolue du virus dans les échantillons testés.

Un programme d'amplification de 45 cycles est réalisé sur le thermocycleur suivant le protocole décrit ci-dessous :

2 minutes	50°C					
2 minutes	95°C					
15 secondes	95°C	45 secondes	60°C	15 secondes	72°C	45 cycles

Dans la technologie TaqMan™, la sonde porte en 5' un fluorophore donneur appelé reporter et en 3' le fluorophore accepteur appelé également quencher. Lorsque cette sonde d'hybridation est intacte, le quencher absorbe l'énergie qui lui est transmise suite à l'excitation du reporter mais n'émet aucune fluorescence.

Au cours de la phase d'élongation, l'activité exonucléasique de la Taq polymérase entraîne une hydrolyse de la sonde. L'éloignement des 2 fluorophores libère alors le donneur du quenching, et le photon d'émission qu'il émet peut alors être détecté. L'intensité de la fluorescence proportionnelle à la quantité de sonde hydrolysée est mesurée à la fin de chaque cycle d'amplification et est fonction de la quantité d'ADN amplifiée.

4. Méthodes biochimiques

4.1. Extraction en phase solide

Cette étape va permettre le fractionnement des molécules présentes dans les surnageants de culture de *K. pneumoniae* et *S. aureus* sur une cartouche C18 d'extraction en phase solide (Sep-Pak plus Cartridges, Waters). La cartouche est fixée sur une seringue en verre, lavée avec 10 mL d'éthanol puis conditionnée par 5 mL d'acétonitrile (ACN) et 10 mL d'eau. 10 mL de surnageant de culture non filtré sont alors chargés sur cette cartouche. Pour cela, le surnageant est placé dans la seringue puis élué en goutte à goutte permettant ainsi la fixation des molécules présentes dans le surnageant sur la silice se trouvant dans la cartouche.

L'éluion des molécules fixées sur la cartouche est ensuite réalisée avec 10 mL d'un mélange (v:v) d'acétate d'ammonium 20 mM et d'ACN à différentes concentrations (0 %, 10 %, 20 %, 40 %, 60 %, 80 %, et 100 %). Cette étape permet le fractionnement des molécules contenues dans le surnageant de culture en fonction de leur polarité. Les différentes fractions récoltées sont ensuite lyophilisées puis reprises dans 1 mL d'un mélange eau / acétonitrile (90:10) afin de les concentrer dix fois.

4.2. Chromatographie liquide haute performance en phase inverse (HPLC)

Les molécules contenues dans les fractions d'intérêt attirant les amibes et obtenues par extraction en phase solide sont séparées par HPLC en phase inverse avec une colonne analytique C18 Acclaim® 120 (5 µm, 120 Å, 4,6x150 mm). L'éluion est réalisée avec un gradient eau-TFA (0,1%) / ACN-TFA (0,1%) et un débit de 0,8 mL / minute. La détection des

molécules est réalisée à 205, 220 et 280 nm. Deux gradients sont utilisés : un pour *K. pneumoniae* et un pour *S. aureus*. Les fractions récoltées sont ensuite lyophilisées puis reprises dans un mélange eau / acétonitrile (90:10) afin de les concentrer dix fois et de tester leur activité.

Le gradient utilisé pour *K. pneumoniae* débute à 20 % d'ACN pendant 5 min puis augmente jusqu'à 40 % de façon linéaire pendant 60 min, enfin, il atteint en 5 min un plateau à 80 % où il reste constant pendant 5 min.

Le gradient utilisé pour *S. aureus* débute à 15 % d'ACN pendant 5 min puis augmente jusqu'à 45 % de façon linéaire pendant 45 min, enfin, il atteint en 5 min un plateau à 60 % où il reste constant pendant 5 min.

4.3. Spectrométrie de masse

Les molécules purifiées par HPLC en phase inverse sont analysées par spectrométrie de masse en électrospray (ESI-MS), sur un appareil Xevo Q-TOF (Waters). L'analyse se fait en injection directe dans un mélange eau-acide formique (0,1%) / ACN-acide formique (0,1%). L'analyse est effectuée pendant 5 min à 50 % d'ACN. L'acquisition en masse a été réalisée avec les paramètres suivants : mode positif ou négatif, voltage du cône = 30 V, détection entre 100 et 3000 Da.

4.4. Détermination de la nature des molécules d'intérêt

4.4.1. Détection des sucres

La détection des sucres se fait à l'aide d'une solution d'anthrone. Cette méthode est basée sur la déshydratation intramoléculaire des oses en milieu acide à chaud. Des différences de couleurs sont observables (bleu-vert pour les hexoses et brun-rouge pour les pentoses) rendant la technique assez spécifique.

Une solution d'anthrone à 0,2 % est préparée dans un mélange eau / acide sulfurique dans un rapport 1 : 3. Un volume de 10 μL d'échantillon à tester est déposé sur une plaque de silice (TLC Silica gel 60 F254, Merck) pour chromatographie sur couche mince. Lorsque le dépôt est sec, la plaque est plongée dans la solution d'anthrone puis chauffée à 80°C pendant 2 min. En présence de sucre, l'échantillon deviendra bleu ou rouge.

4.4.2. Détection des lipides

La détection des lipides se fait à l'aide d'une solution de primuline. La primuline se lie de façon non covalente à des structures lipidiques et permet leur visualisation sous UV. Une solution de primuline à 5% est préparée dans un mélange acétone/eau dans un rapport 8 : 2 (v/v). Un volume de 10 μL d'échantillon à tester est déposé sur une plaque de silice pour chromatographie sur couche mince. Lorsque le dépôt est sec, la plaque est plongée dans la solution de primuline puis séchée avant d'être visualisée sous UV. En présence de lipides, l'échantillon formera une tache brune.

4.4.3. Détection des peptides

La détection des peptides se fait à l'aide d'une solution de ninhydrine. La ninhydrine réagit avec les acides aminés selon une suite de réactions aboutissant à la formation d'imes. Une solution de ninhydrine à 0,2% est préparée dans de l'éthanol absolu. Un volume de 10 µL d'échantillon à tester est déposé sur une plaque de silice pour chromatographie sur couche mince. Lorsque le dépôt est sec, la plaque est plongée dans la solution de ninhydrine puis chauffée à 80°C pendant 2 min. En présence de peptides, l'échantillon prendra une couleur rose.

5. Microscopie

5.1. Microscopie optique inversée

L'observation au microscope optique inversé est réalisée lors des tests de préférence trophique ainsi que de diffusibilité afin de visualiser le déplacement des amibes sur les géloses.

5.2. Microscopie électronique à transmission

Les expérimentations de microscopie électronique à transmission (MET) sont réalisées au laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologiques du CHU de Poitiers.

Les co-cultures sont réalisées dans des flacons de culture cellulaire puis détachées par grattage avant d'être centrifugées 7 min à 1500 g. Le surnageant est alors éliminé et le culot remis en suspension dans du glutaraldéhyde à 3% (concentration de 0,1 mol/L et pH = 7,2).

L'échantillon est alors placé à 4°C au minimum 2 h, avant d'être lavé trois fois avec du tampon phosphate. Il est ensuite fixé une nouvelle fois dans le tétr oxyde d'osmium à 1% pendant 1 h à 4°C, puis lavé trois fois dans du tampon phosphate.

Après fixation des cellules, un pré-enrobage en agar est nécessaire afin de pouvoir déshydrater et inclure plus facilement les échantillons. Pour cela, l'échantillon est centrifugé 7 min à 500 g puis le surnageant est éliminé et remplacé par de l'agar liquide réchauffé (HistoGel™). Les cellules sont homogénéisées puis centrifugées 10 min à 1000 g et recouvertes de tampon phosphate. L'échantillon est ensuite placé à 4°C afin d'obtenir un bloc de gélose solidifié contenant le culot cellulaire. Le bloc de gélose est déshydraté dans des bains successifs de concentration croissante en acétone : deux fois 1 min dans un bain d'acétone à 50%, 5 min dans un bain d'acétone à 70% et 15 min dans un bain d'acétone à 90% et enfin quatre bains de 15 min dans de l'acétone pur.

L'échantillon est ensuite inclus dans l'araldite, résine époxy et hydrophobe. Pour cela, l'échantillon est placé 3 h dans un mélange acétone / résine (v/v) puis dans de la résine pure au minimum 12 h. L'échantillon est ensuite coulé dans des gélules en gélatine, enrobé de résine et polymérisé à 60°C pendant 24 h.

Lorsque les blocs sont polymérisés, des coupes semi-fines sont obtenues grâce à un microtome, déposées sur des lames de verres et colorées au bleu de toluidine puis fixées à 80°C sur une plaque chauffante. Les lames sont ensuite observées en microscopie photonique afin de sélectionner les zones à examiner en MET. Par la suite, des coupes ultra-fines sont réalisées grâce à un ultramicrotome, placées sur des grilles et contrastées avec de l'acétate d'uranyle et des sels de plomb. L'observation des coupes est réalisée avec un microscope électronique à transmission JEOL 1010 équipé d'une caméra.

5.3. Immunofluorescence

A la suite des co-cultures amibes-adénovirus ou macrophages-adénovirus, les échantillons sont lavés trois fois dans du PBS puis le surnageant est éliminé. Le culot est remis en suspension dans ce même tampon et déposé sur une lame qui sera séchée. Les cellules sont ensuite fixées : les macrophages dans de l'acétone froid pendant 10 min ce qui permet également de les perméabiliser, et les trophozoïtes d'*A. castellanii* dans du méthanol froid pendant 15 min puis 10 min dans du triton à 0,2 % afin de les perméabiliser. La lame est ensuite lavée avec du PBS et séchée avant d'ajouter sur les dépôts l'anticorps monoclonal anti-adénovirus FITC (Argène, BioMérieux). La lame est incubée pendant 15 min à 37°C dans une chambre humide. Enfin, elle est lavée avec du PBS puis de l'eau distillée et séchée avant d'être montée sous lamelle et observée au microscope à fluorescence à l'objectif 40x avec de l'huile à immersion. Il s'agit d'un microscope au mercure permettant un spectre d'émission bleu, révélant ainsi la fluorescence verte des adénovirus sur la contre-coloration rouge des cellules phagocytaires.

Chapitre 4 : Résultats

1. Préférence trophique des amibes

1.1. Etude de la préférence trophique

Les amibes se nourrissent dans l'environnement de micro-organismes comme les bactéries et les champignons. Afin de déterminer s'il existe une préférence trophique chez *A. castellanii* et *V. vermiformis*, ces deux amibes ont été mises en présence des micro-organismes répertoriés dans le tableau 2.

Pour cela, un spot de 10 µL d'une suspension de chacun de ces micro-organismes a été déposé sur gélose NNA, à deux centimètres de chaque côté d'un spot de 10 µL contenant une suspension de chaque amibe. L'ensemble est incubé pendant 72 h afin de permettre et de mesurer quotidiennement le déplacement amibien sur la gélose.

Les résultats montrent que *V. vermiformis* n'est attirée par aucun des micro-organismes testés, que ce soit après 24 h, 48 h ou 72 h d'incubation. *A. castellanii*, quant à elle, n'atteint aucun pathogène dans les premières 24 h. Cependant, après 48 h d'incubation, l'amibe atteint trois pathogènes : *S. maltophilia*, *S. aureus* et *K. pneumoniae*. Après 72 h d'incubation, *A. castellanii* atteint également *E. coli* et *C. albicans* (Tableau 4). Les observations ont également montré que la quantité d'amibes se déplaçant vers les pathogènes jusqu'à 72 h d'incubation est plus importante avec *S. maltophilia*, *S. aureus* et *K. pneumoniae*.

Suite à ces premiers résultats, la poursuite de l'étude s'est effectuée avec l'amibe *A. castellanii* et les bactéries *S. aureus* et *K. pneumoniae*, ces deux bactéries permettant dans chaque groupe (Gram positif ou Gram négatif) la meilleure attractivité amibienne. Elles ont également été étudiées dans une autre partie de l'étude pour leurs interactions en co-culture avec les amibes.

Tableau 4 : Résultats de la préférence trophique des amibes *A. castellanii* et *V. vermiformis*.

(-) les amibes n'ont pas atteint le micro-organisme, (+) au moins une amibe a atteint le micro-organisme, (++) de nombreuses amibes ont atteint le micro-organisme, (+++) de très nombreuses amibes ont atteint le micro-organisme.

	<i>A. castellanii</i>			<i>V. vermiformis</i>		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
<i>S. maltophilia</i>	-	+	++	-	-	-
<i>S. aureus</i>	-	+	++	-	-	-
<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	-	-	+	-	-	-
<i>S. pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	-	++	+++	-	-	-
<i>C. albicans</i>	-	-	+	-	-	-

1.2. Sécrétion de molécules par les pathogènes sélectionnés

A la suite des premiers résultats, la question posée a été de savoir si les amibes *A. castellanii* étaient attirées par les bactéries *K. pneumoniae* et *S. aureus* elles-mêmes, ou bien par des molécules sécrétées par ces bactéries. Afin de répondre à cette interrogation, le même test d'attractivité que précédemment a été réalisé avec les bactéries tuées ainsi qu'avec leur surnageant de culture. Le milieu de culture des bactéries (milieu LB) a été incubé dans les mêmes conditions et utilisé comme témoin.

Les observations après 24 h, 48 h et 72 h d'incubation montrent les mêmes résultats que pour les bactéries vivantes. Les amibes *A. castellanii* sont également attirées par le milieu de culture LB mais seulement après 72 h d'incubation et de manière moindre (Tableau 5).

Tableau 5 : Résultats de l'attractivité des bactéries tuées ou de leur surnageant sur *A. castellanii*.

(-) les amibes n'ont pas atteint le pathogène, (+) au moins une amibe a atteint le pathogène, (++) de nombreuses amibes ont atteint le pathogène, (+++) de très nombreuses amibes ont atteint le pathogène.

	<i>A. castellanii</i>		
	24 h	48 h	72 h
Milieu LB	-	-	+
<i>S. aureus</i> tuées	-	+	++
Surnageant <i>S. aureus</i>	-	+	++
<i>K. pneumoniae</i> tuées	-	++	+++
Surnageant <i>K. pneumoniae</i>	-	++	+++

Ces résultats suggèrent que les bactéries *S. aureus* et *K. pneumoniae* produisent une ou plusieurs molécules possédant un pouvoir attractif sur les amibes de l'espèce *A. castellanii*.

1.3. Etude de la diffusibilité ou non des molécules sécrétées

A la suite de ces résultats, l'hypothèse selon laquelle les molécules sécrétées par les bactéries *K. pneumoniae* et *S. aureus* étaient des molécules diffusibles a été posée. Un test de diffusibilité a alors été réalisé, permettant de déterminer si les molécules sécrétées étaient diffusibles ou volatiles.

Pour cela, les bactéries *K. pneumoniae* et *S. aureus*, ou leur surnageant de culture ont été déposés en un spot de 10 µL sur une gélose LB incluse dans une gélose NNA sur laquelle était également déposé un spot de 10 µL d'une suspension d'*A. castellanii*. Les géloses ont ensuite été incubées pendant 72 h afin de permettre le déplacement des amibes.

Les résultats n'ont montré aucun déplacement amibien, que ce soit vers les bactéries vivantes *K. pneumoniae* et *S. aureus* ou vers leur surnageant de culture, déposés dans la boîte de Petri contenant le milieu gélosé LB, qu'elle soit ouverte ou non. La (les) molécule(s) produite(s) par chacune bactérie est (sont) donc diffusible(s) dans la gélose et non volatile(s).

1.4. Fractionnement des surnageants de culture

Les résultats montrant une préférence trophique des amibes *A. castellanii* pour certaines bactéries, et suite au fait que l'attraction des amibes soit due à la sécrétion, par ces bactéries, de molécules diffusibles, l'étape suivante a consisté en un essai de caractérisation de ces molécules.

Dans un premier temps, les molécules contenues dans les surnageants de cultures de *K. pneumoniae* et de *S. aureus* en phase stationnaire de croissance ont été fractionnées par extraction en phase solide sur cartouche de phase inverse. L'activité de chaque fraction obtenue a été testée de la même manière que pour la détermination de la préférence trophique. Les molécules contenues dans le milieu LB ont également été fractionnées de la même manière afin de servir de contrôle négatif.

Cette expérimentation a permis d'identifier une seule fraction attractive pour *A. castellanii* et ce pour chaque condition testée (milieu de culture seul, surnageant de *S. aureus*, surnageant de *K. pneumoniae*) (Tableau 6).

Pour le milieu de culture LB, la fraction active correspond à la fraction obtenue lors du lavage de la cartouche avec 100 % d'acétate d'ammonium 20 mM. Pour le surnageant de culture de *K. pneumoniae*, la fraction active correspond à la fraction éluée avec 40 % d'ACN. Pour le surnageant de culture de *S. aureus*, la fraction active correspond à la fraction éluée avec 20 % d'ACN. Ces résultats confirment que l'attraction des amibes *A. castellanii* par les

bactéries *K. pneumoniae* et *S. aureus* n'est pas due à des composés présents dans le milieu de culture. De plus, la fraction active pour chaque bactérie étant éluee à des pourcentages différents d'ACN, on peut émettre l'hypothèse que les molécules sécrétées par les deux bactéries sont différentes.

Tableau 6 : Résultats des tests d'attraction d'*A. castellanii* par les différentes fractions des surnageants de culture.

(-) les amibes n'ont pas atteint la fraction testée, (+) les amibes ont atteint la fraction testée.

	0 % ACN	10 % ACN	20 % ACN	40 % ACN	60 % ACN	80 % ACN	100 % ACN
Milieu LB	+	-	-	-	-	-	-
Surnageant <i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	+	-	-	-
Surnageant <i>S. aureus</i>	-	-	+	-	-	-	-

1.5. Purification des surnageants de culture par HPLC

Les fractions obtenues par extraction en phase solide et possédant une activité attractive sur les amibes *A. castellanii* ont été analysées par HPLC en phase inverse après lyophilisation et resuspension dans un mélange eau/ACN (90:10).

1.5.1. *Klebsiella pneumoniae*

Pour la bactérie *K. pneumoniae*, la fraction active testée est celle éluee avec 40 % d'ACN. Le chromatogramme obtenu est présenté dans la figure 33.

Toutes les fractions visibles (correspondant à chacun des pics) ont été récoltées et testées en activité. Seules les cinq fractions indiquées par des flèches correspondent aux fractions actives.

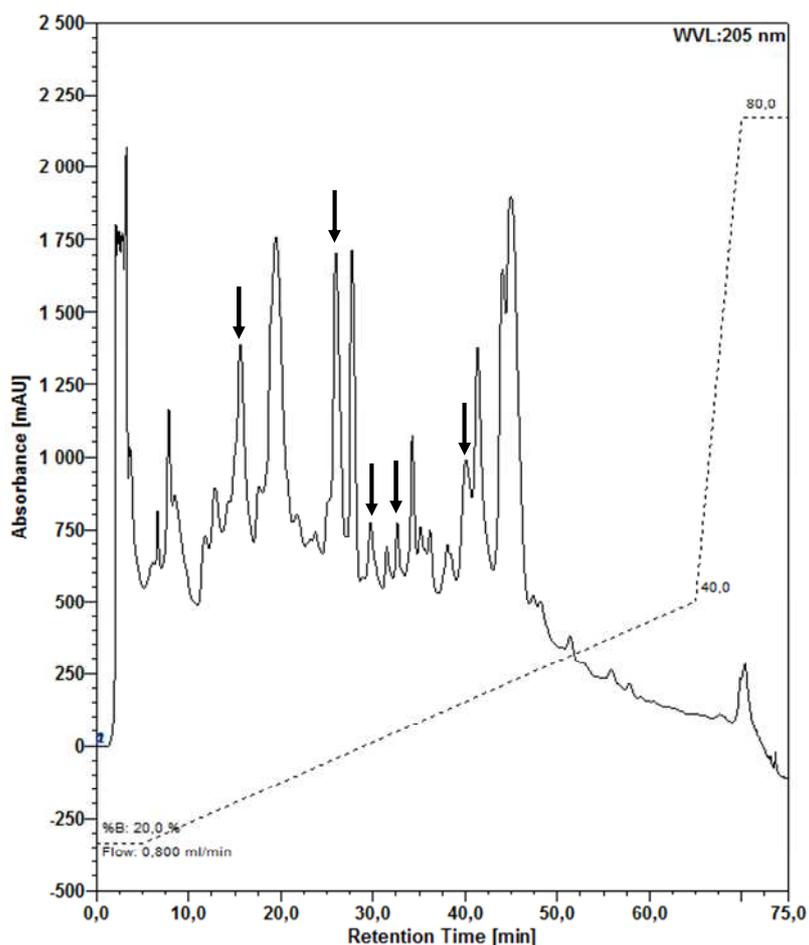


Figure 33 : Chromatogramme de la fraction éluée à 40 % d'ACN du surnageant de culture de *K. pneumoniae*, obtenu par HPLC en phase inverse.

Détection à 205 nm. Les pointillés représentent le gradient d'élution exprimé en pourcentage d'ACN. Les flèches indiquent les fractions pour lesquelles une activité attractive sur *A. castellanii* est mise en évidence.

De plus, les mêmes extraits ont été analysés à la longueur d'onde 220 nm et les résultats obtenus étaient identiques à ceux observés à longueur d'onde 205 nm. Cependant, lorsque les extraits sont analysés à la longueur d'onde 280 nm, on ne détecte aucune

molécule. Ces résultats suggèrent la présence de molécule de nature protéique (dû à l'absorbance à 220 nm), mais sans acide aminé aromatique (dû à l'absorbance à 280 nm).

1.5.2. *Staphylococcus aureus*

Pour la bactérie *S. aureus*, la fraction active testée est celle éluée avec 20 % d'ACN. Le chromatogramme obtenu est présenté dans la figure 34.

Toutes les fractions visibles (correspondant à chacun des pics) ont été récoltées et testées en activité. Seules les trois fractions indiquées par des flèches correspondent aux fractions actives.

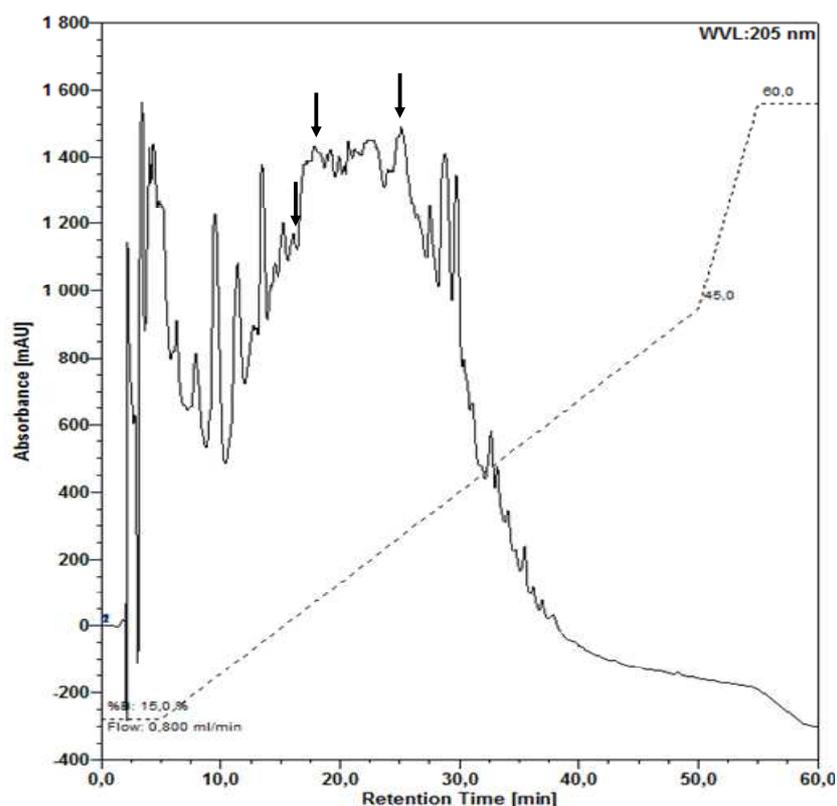


Figure 34 : Chromatogramme de la fraction éluée à 20 % d'ACN du surnageant culture de *S. aureus* obtenu par HPLC en phase inverse.

Détection à 205 nm. Les pointillés représentent le gradient d'élution exprimé en pourcentage d'ACN. Les flèches indiquent les fractions pour lesquels une activité attractive sur *A. castellanii* est mise en évidence.

De plus, les mêmes extraits ont été analysés à la longueur d'onde 220 nm et les résultats obtenus étaient identiques à ceux observés à longueur d'onde 205 nm. Cependant, lorsque les extraits sont analysés à la longueur d'onde 280 nm, on ne détecte aucune molécule. Ces résultats suggèrent la présence de molécule de nature protéique (dû à l'absorbance à 220 nm), mais sans acide aminé aromatique (dû à l'absorbance à 280 nm).

1.6. Détermination de la nature des molécules actives

Chacune des fractions récoltées en HPLC et possédant une activité attractive sur les amibes a été testée afin d'en déterminer la nature. Pour cela, 10 µL de chacune des huit fractions d'intérêt obtenues par HPLC en phase inverse a été déposée sur une plaque de CCM (chromatographie sur couche mince) en trois séries. La première série a été plongée 10 sec dans une solution de primuline, séchée puis visualisée sous UV. La deuxième série a été plongée 10 sec dans une solution de ninhydrine et chauffée à 80° C pendant 2 min. Enfin, la troisième série a été plongée dans une solution d'anthrone puis chauffée à 80° C pendant 2 min. La primuline permet la visualisation des lipides, la ninhydrine des peptides et l'anthrone des glucides.

Les résultats obtenus pour toutes les fractions sont identiques (Tableau 7). En effet, aucun des pics testés n'est positif au test à la primuline ni à l'anthrone, mais tous sont positifs au test à la ninhydrine, suggérant que la ou les molécule(s) sécrétée(s) par les bactéries *K. pneumoniae* et *S. aureus* ne sont ni de nature glucidique ni lipidique, mais uniquement de nature protéique ou peptidique, confirmant les résultats obtenus par HPLC en phase inverse.

Tableau 7 : Résultats de la détermination de la nature des molécules actives

	Primuline	Ninhydrine	Anthrone
<i>K. pneumoniae</i> pic 1	-	+	-
<i>K. pneumoniae</i> pic 2	-	+	-
<i>K. pneumoniae</i> pic 3	-	+	-
<i>K. pneumoniae</i> pic 4	-	+	-
<i>K. pneumoniae</i> pic 5	-	+	-
<i>S. aureus</i> pic 1	-	+	-
<i>S. aureus</i> pic 2	-	+	-
<i>S. aureus</i> pic 3	-	+	-

1.7. Analyse par spectrométrie de masse

Une analyse par spectrométrie de masse des fractions actives obtenues par HPLC en phase inverse a été réalisée afin d'identifier les composés présents. Pour une visualisation complète de chaque spectre, se rapporter aux annexes.

1.7.1. *Klebsiella pneumoniae*

1.7.1.1. Analyse de la fraction A

Dans la première fraction analysée, deux molécules ont été sélectionnées (Figure 35), la première ayant une masse $[M+H]^+$ de 530,2128 Da et la seconde avec une masse $[M+H]^+$ de 622,2624 Da. L'analyse du spectre a également montré la présence de massifs isotopiques. Ces massifs isotopiques montrent une différence de masse de + 1 Da, due à la présence de ^{13}C . Ces résultats confirment la présence deux molécules mono-chargées dans l'échantillon.

La présence d'adduits sodium $[M + Na]^+$ et potassium $[M + K]^+$ pour chacune des deux molécules est également visible avec un écart de masse de 22 Da et 38 Da, respectivement. Les différentes masses expérimentales (m/z) visualisées sur le spectre sont répertoriées dans le tableau 8.

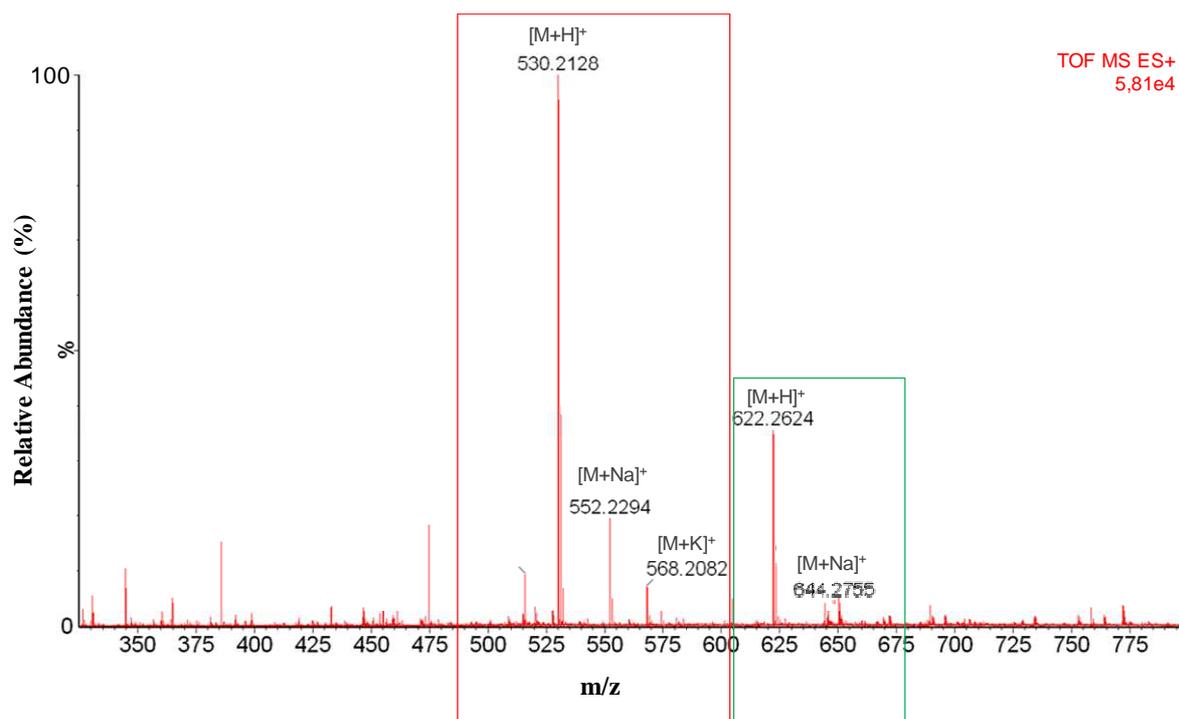


Figure 35 : Spectre ESI-MS de faible énergie de la fraction A pour *K. pneumoniae*.
Molécule de masse $[M+H]^+$ de 530,2128 Da (Rouge) ; Molécule de masse $[M+H]^+$ de 622,2624 Da (Vert).

1.7.1.2. Analyse de la fraction B

Dans la deuxième fraction analysée, nous avons mis en évidence sept pics (Figure 36), avec des masses $[M+H]^+$ de 445,2329 Da ; 562,7814 Da ; 607,2997 Da ; 671,3441 Da ; 889,3790 Da ; 1124,5491 Da et de 1213,5930 Da.

Les molécules de masse 889,3790 Da ; 1124,5491 Da et de 1213,5930 Da ont été identifiées grâce à la présence de pics mono et di-chargés et de l'adduit sodium correspondant.

L'analyse du spectre a également montré la présence de massif isotopique due à la présence de ^{13}C , avec une différence de masse de + 1 Da pour les mono-chargées, ou + 0,5 Da pour les di-chargées. La présence d'adduits sodium $[\text{M} + \text{Na}]^+$ sur chacune des molécules est également visible avec un écart de masse de 22 Da ou de 11 Da pour les molécules di-chargées. Les différentes masses expérimentales (m/z) visualisées sur le spectre sont répertoriées dans le tableau 8. Ces résultats confirment la présence de trois molécules di-chargées et d'une molécule mono-chargée dans l'échantillon, dans les conditions de l'expérimentation.

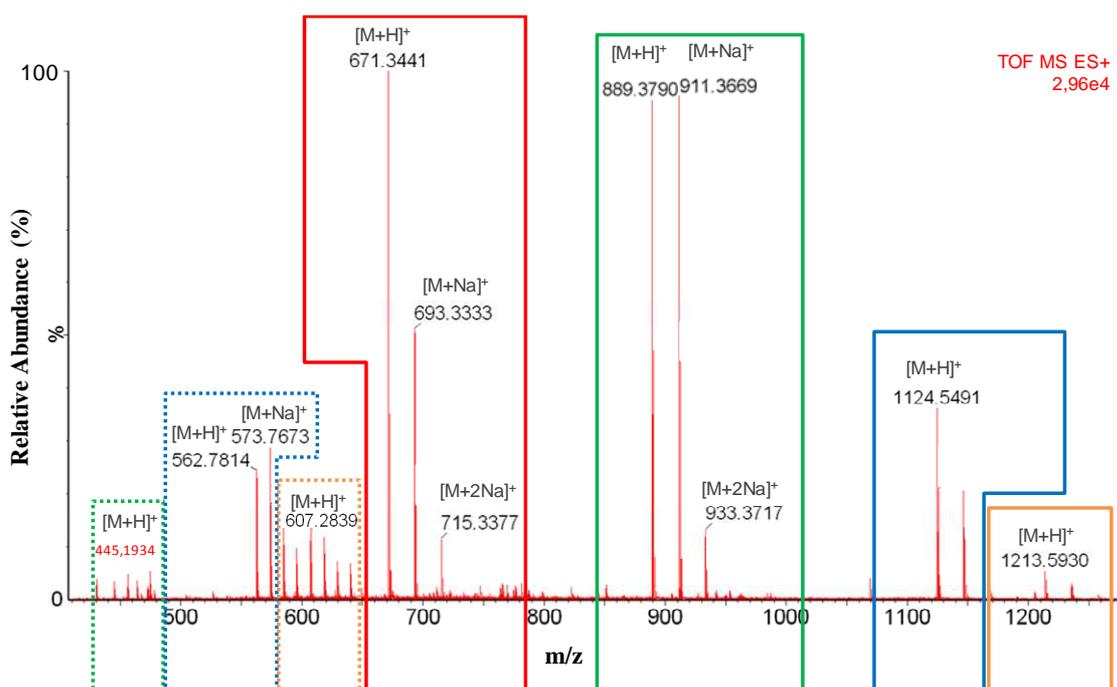


Figure 36 : Spectre ESI-MS de faible énergie de la fraction B pour *K. pneumoniae*.

Molécule mono-chargée de masse $[\text{M}+\text{H}]^+$ de 671,3441 Da (Rouge) ; Molécule mono-chargée de masse $[\text{M}+\text{H}]^+$ de 889,3790 Da (Vert) et en pointillé vert la molécule di-chargée ;

Molécule mono-chargée de masse $[\text{M}+\text{H}]^+$ de 1124,5491 Da (Bleu) et en pointillé bleu la molécule di-chargée ; Molécule mono-chargée de masse $[\text{M}+\text{H}]^+$ de 1213,5930 Da (Orange), et en pointillé orange la molécule di-chargée.

1.7.1.3. Analyse de la fraction C

Dans la troisième fraction analysée, nous avons montré six pics (Figure 37), avec des masses $[M+H]^+$ de 413,2456 Da ; 611,3209 Da ; 661,8516 Da ; 776,0052 Da ; 1221,6224 Da et de 1322,6680 Da.

La molécule de masse $[M+H]^+$ 1221,6224 Da a été identifiée grâce à la présence de pics mono, di et tri-chargés et des adduits sodium et potassium correspondants. La molécule de masse 1322,6680 Da a été identifiée grâce à la présence de pics mono et di-chargés et des adduits sodium et potassium correspondants. De plus, la molécule de masse $[M+H]^+$ 776,0052 Da correspond à la molécule di-chargée, la molécule mono-chargée correspondante n'apparaît pas sur le spectre, les adduits sodium et potassium correspondant sont également visibles.

L'analyse du spectre a également montré la présence de massif isotopique car une différence de masse (+ 1 Da, + 0.5 Da ou + 0,33 Da) était visible, due à la présence de ^{13}C . La présence d'adduits sodium $[M + \text{Na}]^+$ sur chacune des molécules est également visible avec un écart de masse de 22 Da ou de 11 Da pour les molécules di-chargées et 7,3 Da pour la molécule tri-chargée. La présence d'adduits potassium $[M + \text{K}]^+$ est également visible sur les molécules avec un écart de masse 19 Da pour les molécules di-chargées et 12,67 Da pour la molécule tri-chargée.

Les différentes masses expérimentales (m/z) visualisées sur le spectre sont répertoriées dans le tableau 8. Ces résultats confirment la présence d'une molécule tri-chargée, d'une molécule di-chargée et d'une molécule mono-chargée dans l'échantillon dans les conditions de l'expérimentation.

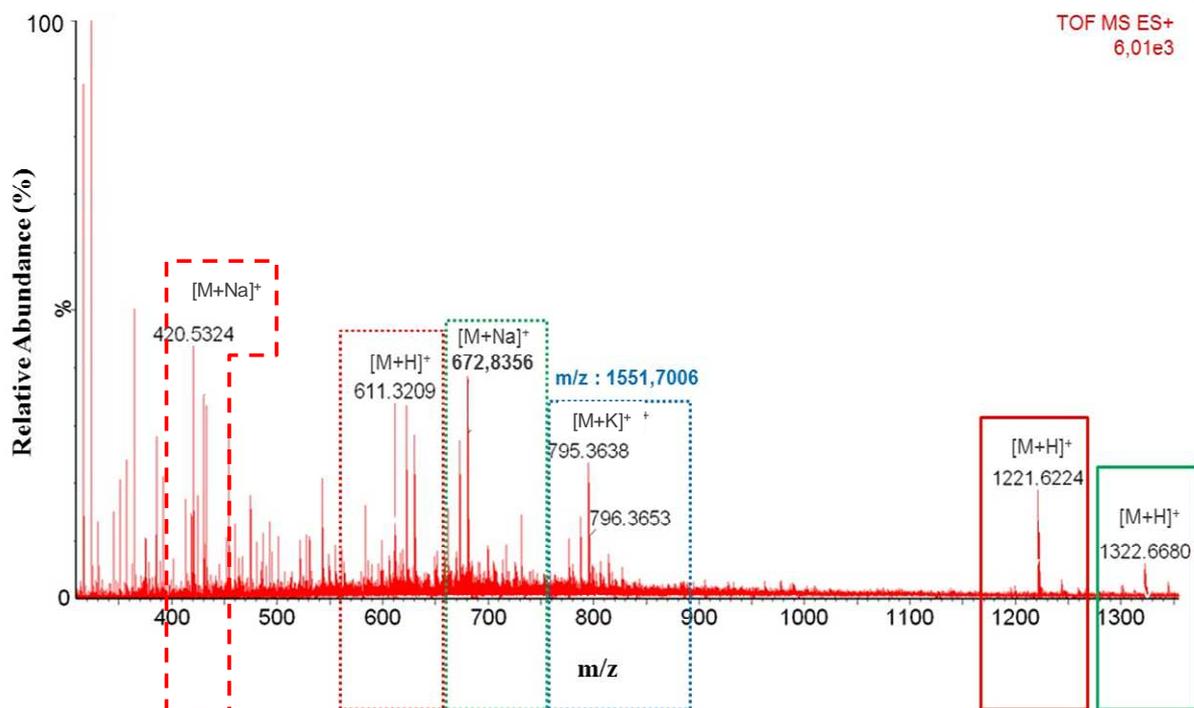


Figure 37 : Spectre ESI-MS de faible énergie de la fraction C pour *K. pneumoniae*.

Molécule mono-chargée de masse $[M+H]^+$ de 1221,6224 Da (Rouge) en pointillé rouge la molécule di-chargée et en tiret rouge la molécule tri-chargée ; Molécule mono-chargée de masse $[M+H]^+$ de 1322,6680 Da (Vert) et en pointillé vert la molécule di-chargée ; Molécule di-chargée de masse $[M+H]^+$ de 776,0052 Da (Pointillés bleu).

1.7.1.4. Analyse de la fraction D

Dans la quatrième fraction analysée, nous avons mis en évidence sept pics (Figure 38), avec des masses $[M+H]^+$ de 430,2202 Da ; 545,2800 Da ; 646,2399 Da ; 717,3397 Da ; 825,9001 ; 1089,5173 Da et de 1269,4742 Da.

La molécule de masse $[M+H]^+$ 1089,5173 Da a été identifiée grâce à la présence de pics mono et di-chargés et de l'adduit sodium correspondant. La molécule de masse $[M+H]^+$ 1269,4742 Da a été identifiée grâce à la présence de pics mono, di et tri-chargés et de l'adduit sodium correspondant. De plus, les molécules de masse $[M+H]^+$ 717,3397 Da et 825,9001 Da

correspondent aux molécules di-chargées, les molécules mono-chargées correspondantes n'apparaissent pas sur le spectre, les adduits sodium correspondants sont également visibles.

L'analyse du spectre a également montré la présence de massif isotopique sur chacun des sept pics mis en évidence. La présence d'adduits sodium $[M + Na]^+$ sur les molécules est également visible avec un écart de masse de 22 Da ou de 11 Da pour la molécule di-chargée.

Les différentes masses expérimentales (m/z) visualisées sur le spectre sont répertoriées dans le tableau 8. Ces résultats confirment la présence d'une molécule tri-chargée et de trois molécules di-chargées dans les conditions de l'expérimentation.

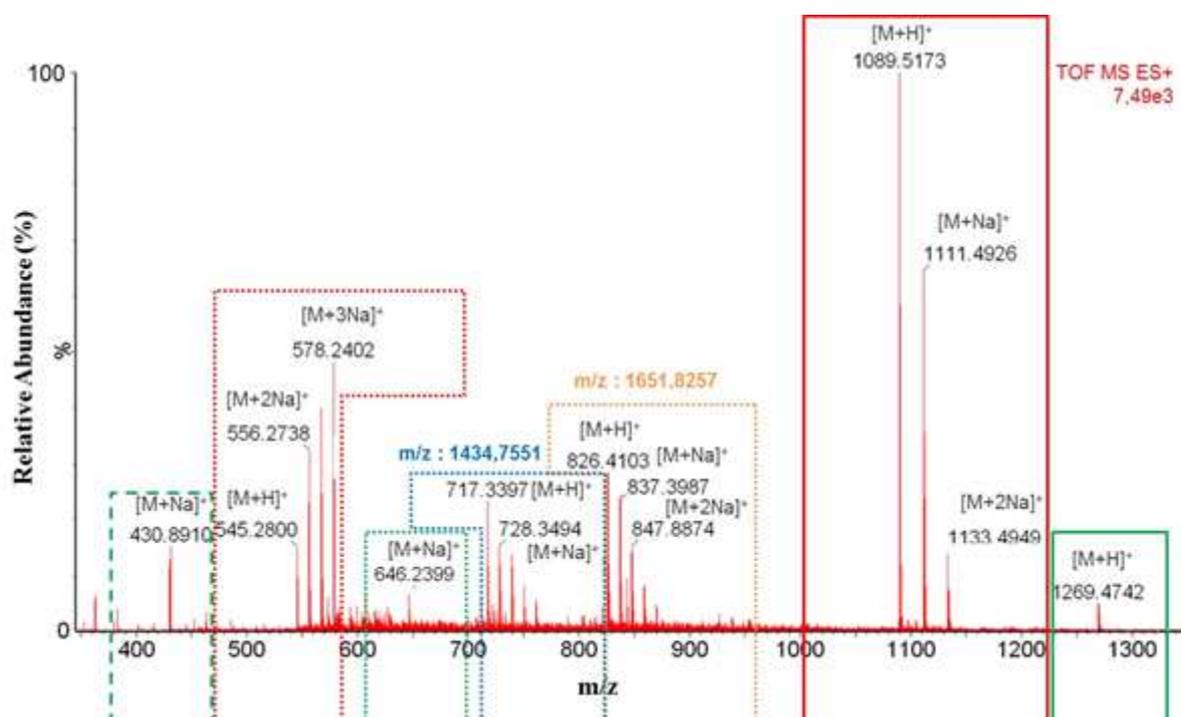


Figure 38 : Spectre ESI-MS de faible énergie de la fraction D pour *K. pneumoniae*.

Molécule de mono-chargée de masse $[M+H]^+$ de 1089,5173 D (Rouge) en pointillé rouge la molécule di-chargée et en tiret rouge la molécule tri-chargée ; Molécule mono-chargée de masse $[M+H]^+$ de 1269,4742 Da (Vert) et en pointillé vert la molécule di-chargée ; Molécule di-chargée de masse $[M+H]^+$ de 717,3397 Da (Pointillé bleu) ; Molécule di-chargée de masse $[M+H]^+$ de 826,4103 Da (Pointillé orange)

1.7.1.5. Analyse de la fraction E

Dans la cinquième fraction analysée, deux molécules ont été mises en évidence avec des masses de $[M+H]^+$ 838,0592 Da et de 1256,1160 Da (Figure 39). Ces deux molécules correspondent à la même molécule, sous sa forme di et tri-chargée. Cette molécule présente un massif isotopique dans ses deux formes visualisées sur le spectre ainsi que l'adduit sodium correspondant.

La présence d'adduits sodium $[M + Na]^+$ sur chacune des deux formes de la molécule est également visible avec un écart de masse de 11 Da pour la forme di-chargée et 7,3 Da pour la forme tri-chargée. Les différentes masses expérimentales (m/z) visualisées sur le spectre sont répertoriées dans le tableau 8. Ces résultats confirment la présence d'une molécule tri-chargée dans l'échantillon dans les conditions de l'expérimentation.

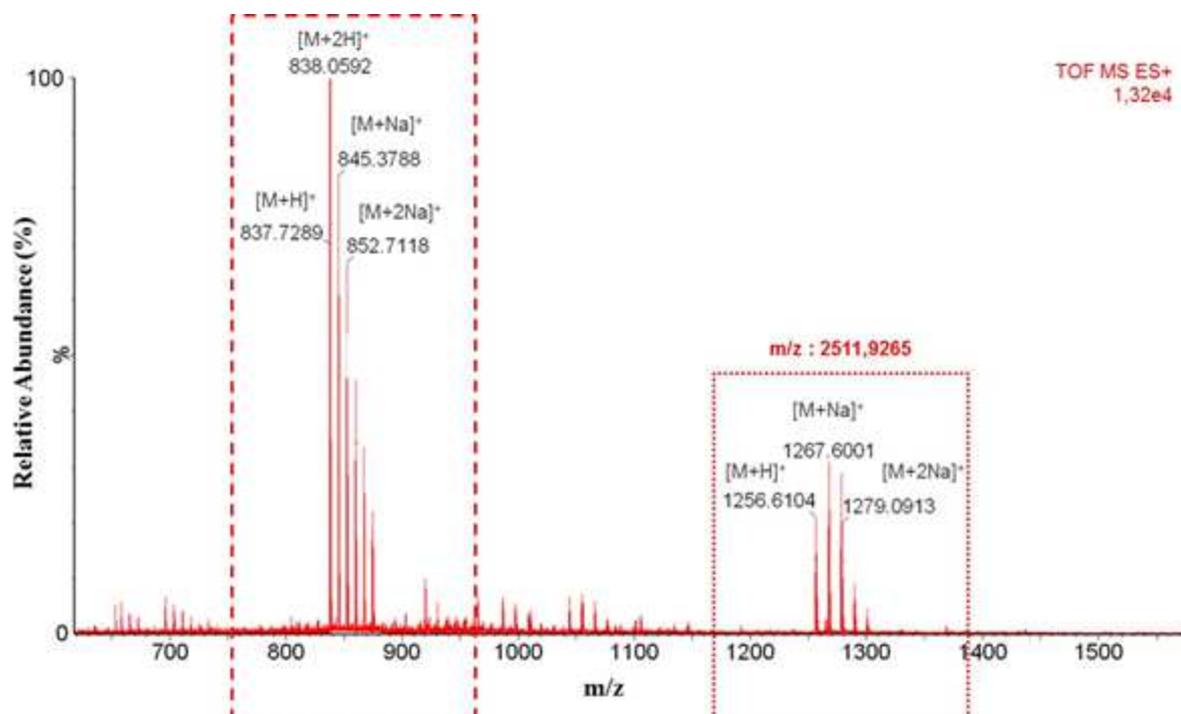


Figure 39 : Spectre ESI-MS de faible énergie la fraction E pour *K. pneumoniae*.

(Rouge) Molécule di-chargée de masse $[M+H]^+$ de 1256,6104 Da (Pointillés rouge) et en tiret rouge la molécule tri-chargée.

1.7.1.6. Récapitulatif des fractions analysées pour *K. pneumoniae*

Ces premiers résultats confirment, dans les échantillons analysés, la présence de petites molécules avec des masses comprises entre $[M + H]^+$ 530,2128 Da et 1322,6680 Da, qui seraient, d'après les tests précédents, des molécules de nature peptidique. Afin de déterminer les séquences des différents peptides présents dans les échantillons, une analyse en MS-MS (Spectrométrie de masse couplée à la spectrométrie de masse) est actuellement en cours.

Tableau 8 : Tableau récapitulatif des masses expérimentales (m/z) des molécules identifiées et de leurs différentes formes pour le surnageant de *K. pneumoniae*

		Masses expérimentales (m/z)														
		Molécules mono-chargées					Molécules di-chargées					Molécules tri-chargées				
		[M+H] ⁺	[M+Na] ⁺	[M+2Na] ⁺	[M+3Na] ⁺	[M+K] ⁺	[M+H] ⁺	[M+Na] ⁺	[M+2Na] ⁺	[M+3Na] ⁺	[M+K] ⁺	[M+H] ⁺	[M+Na] ⁺	[M+2Na] ⁺	[M+3Na] ⁺	[M+K] ⁺
Fraction A	1	530,2128	552,2294	-	-	568,2082	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	622,2824	644,2766	-	-	650,3235	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fraction B	1	671,3441	693,3333	714,3377	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	889,3978	911,3669	933,3717	-	-	445,2329	456,2144	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	1124,5491	1146,5297	-	-	-	562,7832	573,7673	584,7674	595,7686	-	-	-	-	-	-
	4	1213,5930	-	-	-	-	607,2996	618,2997	629,2872	640,2752	-	-	-	-	-	-
Fraction C	1	1221,6224	-	-	-	-	611,3209	622,3098	-	-	630,2894	413,2456	420,5324	-	-	424,8354
	2	1322,6680	-	-	-	-	661,8516	672,8396	-	-	680,8050	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	776,0052	787,3748	-	-	795,3459	-	-	-	-	-
Fraction D	1	1089,5173	1111,4928	1133,4949	-	-	545,2800	556,2738	567,2567	578,2402	-	-	-	-	-	-
	2	1269,4515	-	-	-	-	646,2390	-	-	-	-	430,2202	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	717,3397	728,3323	739,3395	750,3252	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	825,9001	837,0987	847,9048	859,0073	-	-	-	-	-	-
Fraction E	1	-	-	-	-	-	1256,6104	1267,6001	1278,5699	1289,5642	-	838,0409	845,8788	852,7110	860,0579	-

1.7.2. *Staphylococcus aureus*

1.7.2.1. Analyse de la fraction A

Dans la première fraction analysée, nous avons identifié une seule molécule dont la masse $[M+H]^+$ est de 576,2450 Da. Cette molécule a été identifiée grâce à la présence de pics mono et di-chargés et des adduits sodium et potassium correspondants (Figure 40).

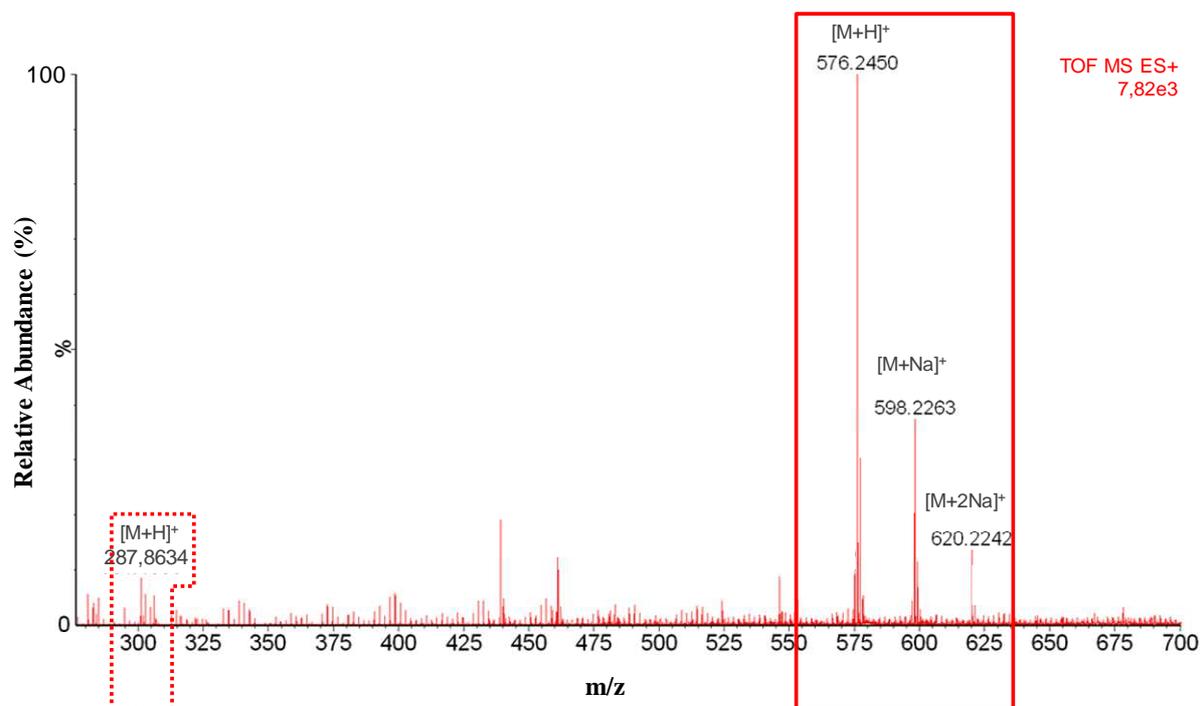


Figure 40 : Spectre ESI-MS de faible énergie de la fraction A pour *S. aureus*.

Molécule mono-chargée de masse $[M+H]^+$ de 576,2450 Da (Rouge) et en pointillé rouge la molécule di-chargée.

L'analyse du spectre a également montré la présence de massif isotopique car une différence de masse (+ 1 Da ou + 0.5 Da) était visible, due à la présence de ^{13}C . La présence d'adduits sodium $[M + \text{Na}]^+$ sur chacune des molécules est également visible avec un écart de

masse de 22 Da ou de 11 Da pour la molécule di-chargée. La présence d'adduits potassium $[M + K]^+$ est également visible avec un écart de masse 19 Da pour la molécule di-chargée.

Les différentes masses expérimentales (m/z) visualisées sur le spectre sont répertoriées dans le tableau 9. Ces résultats confirment la présence d'une molécule di-chargée dans l'échantillon.

1.7.2.2. Analyse de la fraction B

Dans la deuxième fraction analysée, nous avons identifié trois molécules (Figure 41), avec des masses $[M+H]^+$ de 576,2450 Da ; 730,2496 Da et de 860,2996 Da. Les molécules de masse $[M+H]^+$ 576,2450 Da et 860,2996 Da ont été identifiées grâce à la présence de pics mono- et di-chargés et des adduits sodium et potassium correspondants.

L'analyse du spectre a également montré la présence de massif isotopique car une différence de masse (+ 1 Da ou + 0.5 Da) était visible, due à la présence de ^{13}C . La présence d'adduits sodium $[M + \text{Na}]^+$ sur chacune des molécules est également visible avec un écart de masse de 22 Da ou de 11 Da pour les molécules di-chargées. La présence d'adduits potassium $[M + K]^+$ est également visibles sur les molécules avec un écart de masse 19 Da pour les molécules di-chargées.

Les différentes masses expérimentales (m/z) visualisées sur le spectre sont répertoriées dans le tableau 9. Ces résultats confirment, dans les conditions de l'expérimentation, la présence de deux molécules di-chargées et d'une molécule mono-chargée dans l'échantillon.

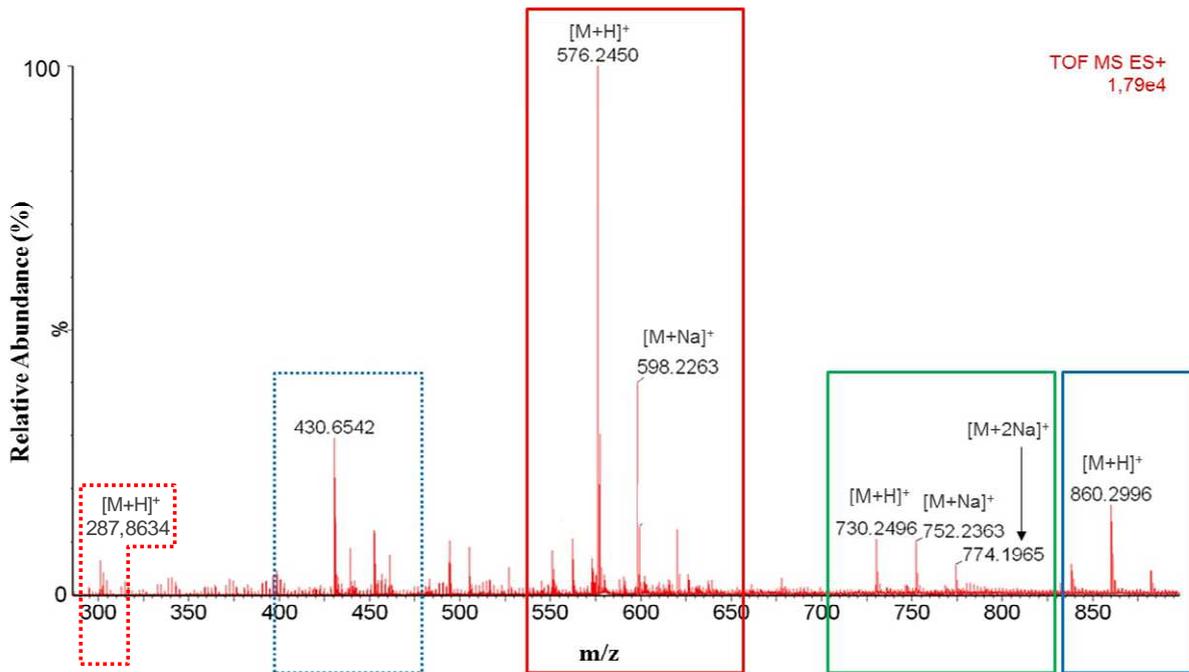


Figure 41 : Spectre ESI-MS de faible énergie de la fraction B pour *S. aureus*.

Molécule mono-chargée de masse $[M+H]^+$ de 576,2450 Da (Rouge) et en pointillé rouge la molécule di-chargée ; Molécule mono-chargée de masse $[M+H]^+$ de 730,2496 Da (Vert) ; Molécule mono-chargée de masse $[M+H]^+$ de 860,2996 Da (Bleu) et en pointillé bleu la molécule di-chargée.

1.7.2.3. Analyse de la fraction C

Dans la troisième fraction analysée, nous avons identifié trois molécules avec des masses $[M+H]^+$ de 530,2128 Da ; 622,2308 Da et de 758,2990 Da (Figure 42). Les molécules de masse 622,2308 Da et 758,2990 Da ont été identifiées grâce à la présence de pics mono et di-chargés et des adduits sodium et potassium correspondants.

L'analyse du spectre a également montré la présence de massif isotopique car une différence de masse (+ 1 Da ou + 0.5 Da) était visible, due à la présence de ^{13}C . La présence d'adduits sodium $[M + \text{Na}]^+$ sur chacune des molécules est également visible avec un écart de masse de 22 Da ou de 11 Da pour les molécules di-chargées. La présence d'adduits potassium $[M + \text{K}]^+$ est également visible sur les molécules avec un écart de masse 19 Da pour les molécules di-chargées.

Les différentes masses expérimentales (m/z) visualisées sur le spectre sont répertoriées dans le tableau 9. Ces résultats confirment, dans les conditions de l'expérimentation, la présence d'une molécule di-chargée et deux molécules mono-chargées dans l'échantillon.

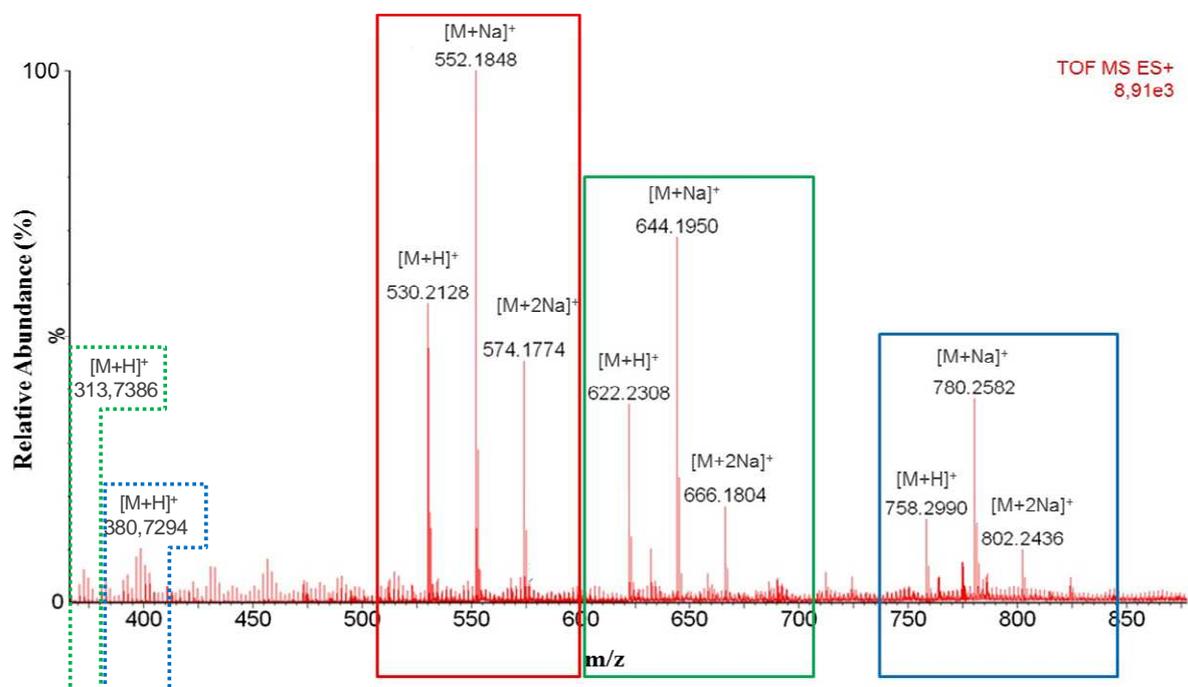


Figure 42 : Spectre ESI-MS de faible énergie de la fraction C pour *S. aureus*.

Molécule mono-chargée de masse $[M+H]^+$ de 530,2128 Da (Rouge) ; Molécule mono-chargée de masse $[M+H]^+$ de 622,2308 Da (Vert) et en pointillé vert la molécule di-chargée ; Molécule mono-chargée de masse $[M+H]^+$ de 758,2990 Da (Bleu) et en pointillé bleu la molécule di-chargée.

1.7.2.4. Récapitulatif des fractions analysées pour *S. aureus*

Ces premiers résultats confirment la présence dans les échantillons analysés de petites molécules avec des masses comprises entre $[M + H]^+$ 530,2128 Da et 838,3162 Da qui seraient d'après les tests précédents des molécules de nature peptidique. Afin de déterminer les séquences des différents peptides présents dans les échantillons, une analyse en MS-MS (spectrométrie de masse couplée à la spectrométrie de masse) est actuellement en cours.

Tableau 9 : Tableau récapitulatif des masses expérimentales (m/z) des molécules identifiées et de leurs différentes formes pour le surnageant de *S. aureus*

		Masses expérimentales (m/z)									
		Molécules mono-chargées					Molécules di-chargées				
		[M+H] ⁺	[M+Na] ⁺	[M+2Na] ⁺	[M+3Na] ⁺	[M+K] ⁺	[M+H] ⁺	[M+Na] ⁺	[M+2Na] ⁺	[M+3Na] ⁺	[M+K] ⁺
Fraction A	1	576,2450	598,2230	620,2242	-	-	287,8634	298,7841	-	-	306,0819
Fraction B	1	576,2299	598,2263	620,2083	-	-	287,8741	298,7622	-	-	306,8365
	2	730,2496	752,2190	774,1965	-	-	-	-	-	-	-
	3	838,3162	860,2809	882,2850	-	-	419,7192	430,6542	441,6420	452,6334	439,2341
Fraction C	1	530,2128	552,1848	574,1622	-	-	-	-	-	-	-
	2	622,2308	644,1950	666,1804	-	-	313,7386	324,7612	-	-	332,8030
	3	758,2816	780,2582	802,2436	824,2250	-	380,7294	391,7515	402,7718	413,7030	398,6984

2. Interaction des pathogènes avec des amibes libres et des macrophages

2.1. Etude des interactions entre *K. pneumoniae* et les cellules phagocytaires

2.1.1. Article 1 : An observational study of phagocytes and *Klebsiella pneumoniae* relationships: different behaviors

L'article 1 présenté ci-dessous a été publié dans la revue "Microbes and infection".

K. pneumoniae est une bactérie pathogène responsable, entre autres, de pneumopathies et de différentes infections nosocomiales. Ces bactéries sont retrouvées de manière ubiquitaire dans l'environnement, plus particulièrement dans le sol et dans l'eau où elles peuvent être en relation avec des amibes libres.

Nous avons souhaité, dans cette étude, explorer les interactions entre *K pneumoniae* et *A. castellanii*, amibe libre potentiellement retrouvée dans le même environnement. Des premières expériences de co-culture ont ainsi été réalisées, montrant une augmentation de la croissance bactérienne en présence des amibes, dont la viabilité n'était pas affectée. Les mêmes effets sur la prolifération bactérienne ont été, par ailleurs, retrouvés en incubant *K. pneumoniae* avec du surnageant amibien. L'utilisation de gentamicine, capable de tuer les bactéries présentes dans le milieu de co-culture, a permis de montrer que *K. pneumoniae* n'est pas internalisée dans l'amibe. Ces résultats ont été confirmés par les images de microscopie électronique à transmission.

Dans la littérature, on retrouve des articles évoquant les similarités entre les amibes libres, dont *A. castellanii*, et les macrophages, en particulier pour leur capacité de

phagocytose. Nous avons donc voulu explorer le devenir de la même bactérie *K. pneumoniae*, cette fois en présence de la lignée macrophagique Thp-1, afin de déterminer s'il était possible d'extrapoler les relations "amibes-bactéries" aux relations "macrophages-bactéries". Des expérimentations similaires à celles réalisées avec les amibes libres ont ainsi été réalisées, mettant en contact *K. pneumoniae* et des macrophages. Là encore, une croissance bactérienne a été mise en évidence mais l'utilisation de la gentamicine a permis de suspecter l'internalisation de la bactérie par les macrophages, résultat confirmé, là encore, par la microscopie électronique. Il est à noter que la viabilité des macrophages, à la différence de celle des amibes, a été diminuée en présence des bactéries.

Nous avons également souhaité explorer l'adhérence bactérienne aux deux cellules phagocytaires. Des tests d'inhibition de l'adhérence bactérienne en présence de différents sucres ont ainsi été réalisés, dont les résultats ont permis d'évoquer le rôle d'un récepteur au mannose sur la membrane amibienne, sans influence de ce sucre sur l'adhérence bactérienne aux macrophages.

En conclusion, ce travail a permis de mettre en évidence des différences de comportements de l'amibe *A. castellanii* par rapport aux macrophages vis-à-vis de *K. pneumoniae*. Dans certains cas, il n'est donc pas possible d'extrapoler les résultats d'études "amibes-bactéries" aux relations "macrophages-bactéries".

ARTICLE 1

An observational study of phagocytes and *Klebsiella pneumoniae* relationships: different behaviors

“Microbes and infection”



Original article

An observational study of phagocytes and *Klebsiella pneumoniae* relationships: different behaviors

Elodie Maisonneuve^{a,*}, Estelle Cateau^{a,b}, Marion Delouche^b, Nathalie Quellard^c,
Marie-Helene Rodier^{a,b}

^a Laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions, Equipe Microbiologie de l'Eau, Université de Poitiers, UMR CNRS 7267, F-86073 Poitiers, France

^b Laboratoire de parasitologie et mycologie médicale, Faculté de médecine et de pharmacie, 6, Rue de la Milétrie, 86034 Poitiers Cedex, France

^c Unité de pathologie ultrastructurale et expérimentale, Laboratoire d'anatomie et cytologie pathologiques, CHU la Milétrie, 2, Rue de la Milétrie, BP 577, 86021 Poitiers Cedex, France

Received 16 May 2016; accepted 21 December 2016

Available online ■ ■ ■

Abstract

Klebsiella pneumoniae is a bacterium that can be in relation with free living amoebae like *Acanthamoeba castellanii* in natural environments such as soil and water. This pathogen, which is responsible for community-acquired pneumonia and for nosocomial infections, also has interactions with host defense mechanisms like macrophages. As it has been shown that *A. castellanii* shares some traits with macrophages, in particular the ability to phagocyte bacteria, we have studied the uptake and the fate of the bacteria after contact with the two phagocytic cells. In our conditions, *K. pneumoniae* growth was increased in coculture in presence of *A. castellanii* or Thp-1 macrophagic cells and bacterial development was also increased by *A. castellanii* supernatant. In addition, we showed that the presence of the bacteria had a negative effect on the macrophages whereas it does not affect amoeba viability. Using gentamicin, which kills bacteria outside cells, we showed that only macrophages were able to internalize *K. pneumoniae*. This result was confirmed by electron microscopy. We have consequently reported some differences in bacterial uptake and internalization between a free living amoeba and macrophagic cells, highlighting the fact that results obtained with this amoebal model should not be extrapolated to the relationships between *K. pneumoniae* and macrophages.

© 2017 Published by Elsevier Masson SAS on behalf of Institut Pasteur.

Keywords: *Acanthamoeba castellanii*; *Klebsiella pneumoniae*; Macrophages; Interactions

1. Introduction

Bacteria of the genus *Klebsiella* spp are members of the Enterobacteriaceae family and ubiquitous in nature. Their habitats include the gastrointestinal tract of mammals as well as environmental sources such as soil, waters and plants, which can represent potential reservoirs for the growth and spread of these Gram-negative bacteria [1,2]. 53% of surface water samples are positive for *Klebsiella* spp, the most common species being *Klebsiella pneumoniae* [1]. Clinically, this

species is responsible for human community-acquired pneumonia and for healthcare-related infections, most commonly involving the urinary and respiratory tracts, and for animal diseases such as mastitis in dairy cows [3]. This bacterium possesses surface saccharides in the form of LPS and capsule, both of which have been linked to its virulence in humans [4]. Interestingly, environmental isolates have been described as being indistinguishable from human clinical isolates with respect to their biochemical reactions and virulence [5].

Free living amoebae (FLA) are ubiquitous in the same environments and have been isolated from soil and water [6]. Their life cycle consists of two stages: an actively dividing trophozoite (feeding on bacteria, fungi, algae) and a dormant

* Corresponding author. Fax: +33 549443908.

E-mail address: elodie.maisonneuve@univ-poitiers.fr (E. Maisonneuve).

cyst. The FLA, including amoebae of the *Acanthamoeba* genus, may support bacterial growth in environmental ecosystems [7,8], the bacteria that can resist the amoebae microbicidal ability being named amoebae-resisting bacteria (ARB). These protozoa can also serve as reservoirs and/or vehicles for some microorganisms [9]. FLA have been also reported as a tool to isolate new bacterial species and to study host–pathogens interactions [10]. The relationships between FLA and *Legionella pneumophila* have been extensively studied, but numerous other bacteria also interact with these protozoa [11]. Some previous studies have reported links between *Klebsiella* spp and FLA [12,13] but without focusing on bacterial growth.

On the other hand, FLA have been considered by some authors as a training field for bacterial resistance to macrophages [14]. For Santic et al. [15], the phenotypic modulations of amoeba-grown *L. pneumophila* may contribute to bacterial survival in hostile environmental conditions and to its invasion and replication within human phagocytic cells. In the same way, Steenbergen et al. suggest that the virulence of the *Cryptococcus neoformans* yeast for mammalian cells is a consequence of evolution of protection against environmental predators such as amoebae [16]. Other authors have drawn parallels between the interactions of pathogen-FLA and pathogen-macrophages [17,18].

As it has been reported that *Acanthamoeba* and macrophages have similarities at physiological and phagocytic levels [18], the aim of this study was first to observe the interactions of *K. pneumoniae* with *Acanthamoeba castellanii*, and then to compare them with the bacterial interactions with Thp-1 macrophage-like cells.

2. Materials and methods

2.1. Strains and growth conditions

The *K. pneumoniae* strain used in this study was recovered from our hospital water and identified by MALDI-TOF mass spectrometry (VITEK MS, BioMérieux). Before experiments, the bacterium was grown on Mueller Hinton agar medium at 37 °C for 24 h.

A. castellanii ATCC 30234 was grown in 150 cm² tissue culture flasks in PYG broth at 27 °C [19]. When cells formed a monolayer, the trophozoites were harvested by tapping the flasks and washed three times in Page's modified Neff's amoeba saline (PAS, containing in 1 L of distilled water, 120 mg NaCl, 4 mg MgSO₄·7H₂O, 4 mg CaCl₂·2H₂O, 142 mg Na₂HPO₄ and 36 mg KH₂PO₄).

Thp-1 macrophage cell line was maintained in RPMI-1640 supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 1% streptomycin and 1% penicillin at 37 °C in the presence of 5% CO₂. Thp-1 cells were differentiated for 72 h with 50 ng/mL of phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) in fresh RPMI 1640 medium with 10% FBS. Before use, the macrophages were washed twice with RPMI 1640 medium in order to remove PMA.

2.2. Coculture

2.2.1. *K. pneumoniae* and phagocytes

A hundred µL of the amoebic trophozoite or macrophage suspension (containing 1·10⁵ cells) in PAS containing 10% RPMI (PAS-RPMI) was distributed into each well of a 96 well microplate. The cells were allowed to adhere to the wells for 2 h at 27 °C (amoeba) or at 37 °C under 5% CO₂ (macrophages). The bacteria were harvested in PAS-RPMI medium and a hundred µL of this medium containing 1·10⁴ bacteria (Multiplicity Of Infection of 0.1) were added in the wells. Incubation was carried out during 3, 6, 24 and 48 h at 27 °C for amoebae or at 37 °C under 5% CO₂ for macrophages. Dilutions of the coculture lysates were then plated on Mueller Hinton agar and incubated at 37 °C during 24 h to count colony-forming units (CFU). Controls were carried out by incubating bacteria in PAS-RPMI without amoebae or macrophages.

After 24 and 48 h of incubation, a microscopical examination of the culture using trypan blue staining was also carried out in order to determine the viability of amoebae or macrophages.

All experiments have been reproduced three times, each time in triplicate.

2.2.2. *K. pneumoniae* and amoeba supernatant

Trophozoites (5·10⁵/mL) of *A. castellanii* were incubated at 27 °C during 72 h in PAS. The amoebae were then pelleted by centrifugation and *K. pneumoniae* (5·10⁵/mL) were incubated in the resultant supernatant and in PAS as a control, at 27 °C during 3, 6, 24 and 48 h. Samples of wells corresponding to each incubation time were plated on Mueller Hinton agar and incubated at 37 °C during 24 h in order to count bacterial CFU.

2.3. Effect of gentamicin on *K. pneumoniae* growth in presence or not of phagocytic cells

A hundred µL of a phagocytic cell suspension (containing 1·10⁵ cells) were distributed into each well of a 96 well microplate. The cells were allowed to adhere to the wells for 2 h at 27 °C (amoeba) or at 37 °C under 5% CO₂ (macrophages). A hundred µL of PAS-RPMI containing 1·10⁴ bacteria (Multiplicity Of Infection of 0.1) were added in the wells. After 3 or 24 h of incubation, 50 µg/mL of gentamicin were added and the cultures were incubated 2 h at room temperature [20]. Each well was washed three times with PAS in order to remove the antibiotic, then its content was resuspended in 100 µL of PAS-RPMI and the plates were incubated 24 or 48 h at 27 °C for amoebae or at 37 °C under 5% CO₂ for macrophages. Controls were carried out by incubating bacteria in PAS-RPMI without phagocytic cells and without gentamicin. After incubation, dilutions of the cultures lysates were plated on Mueller Hinton agar and incubated at 37 °C during 24 h to number bacterial colony-forming units (CFU).

2.4. Electron microscopy

The potential internalization of the bacteria by phagocytic cells was investigated by electron microscopy. Samples of 6, 24 or 48 h co-culture were fixed for 1 h in phosphate buffer 0.1 M, containing 4% glutaraldehyde at 4 °C. Cells were washed four times in PBS and post-fixed with 1% OsO₄ in phosphate buffer 0.1 M for 1 h at 4 °C. The samples were dehydrated in an acetone series and embedded in araldite resin. Sections were stained with uranyl acetate and lead nitrate before examination with a Jeol 1010 transmission electron microscope.

2.5. Attachment inhibitory assays

The assay was performed according to Medina et al. [21]. Monolayers of amoebae trophozoites or macrophages were pretreated with 100 mM glucose, galactose, mannose, rhamnose or fructose in PAS-RPMI at a concentration of 100 mM for 90 min at 27 °C for amoebae or at 37 °C under 5% CO₂ for macrophages. Then, *K. pneumoniae* (MOI = 0,1) were added to the different monolayers and incubated at 27 °C (FLA) or at 37 °C under 5% CO₂ (macrophages) during 1 h. Wells were then washed three times with the appropriate buffer to remove unattached bacteria and the content of the wells was plated on Mueller Hinton agar to number bacterial CFU. Controls were performed in the same media without sugars.

2.6. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the *t* test. $P < 0.05$ was considered statistically significant. The analysis was performed using Prism5 for PC (GraphPad Software).

3. Results

3.1. Coculture assays

Coculture of *K. pneumoniae* with phagocytic cells for 48 h had a positive effect on bacterial growth. Indeed, a significant increase of growth of *K. pneumoniae* was observed in the presence of *A. castellanii*, from 3 h of cocultivation and was found throughout the 48 h of experimentation (Fig. 1A). Similar results were observed with macrophagic cells (Fig. 1B).

3.2. Co-incubation of *A. castellanii* supernatant with *K. pneumoniae*

After incubation of *K. pneumoniae* with *A. castellanii* supernatant aged 72 h, obtained in PAS, it was observed that bacterial growth was favored in comparison to the control, and that this increase was maintained after 48 h of contact (Fig. 1C).

3.3. Effect of gentamicin on bacterial growth in coculture assays

As *K. pneumoniae* is sensitive to gentamicin, the addition of this antibiotic in coculture medium is liable to kill bacteria present in the medium outside cells.

The presence of *A. castellanii* without gentamicin in the medium allowed an increase of *K. pneumoniae* growth according to our first results. However, when gentamicin was added in the medium after 3 h (Fig. 2A) or 24 h (Fig. 2B) of coculture, no cultivable *K. pneumoniae* was detected, suggesting an absence of bacterial internalization by *A. castellanii*. On the other hand, the same experiments conducted with macrophages showed that viable *K. pneumoniae* were

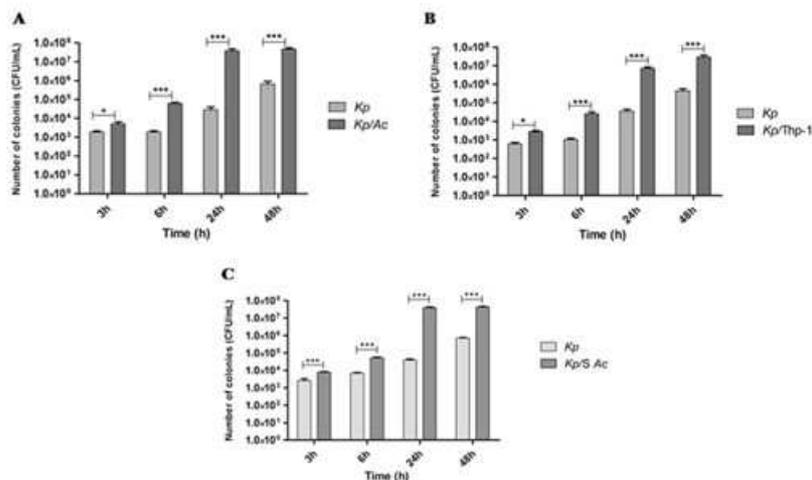


Fig. 1. Viable counts at 3 h, 6 h, 24 h or 48 h of *K. pneumoniae* alone (*Kp*) or in coculture with (A) *A. castellanii* (*Kp/Ac*), (B) Macrophages (*Kp/Thp-1*) or supernatant of *A. castellanii* (*Kp/S Ac*). All values correspond to mean of nine replicates. Values with stars are significantly different ($p < 0.05$ for * and $p < 0.001$ for ***).

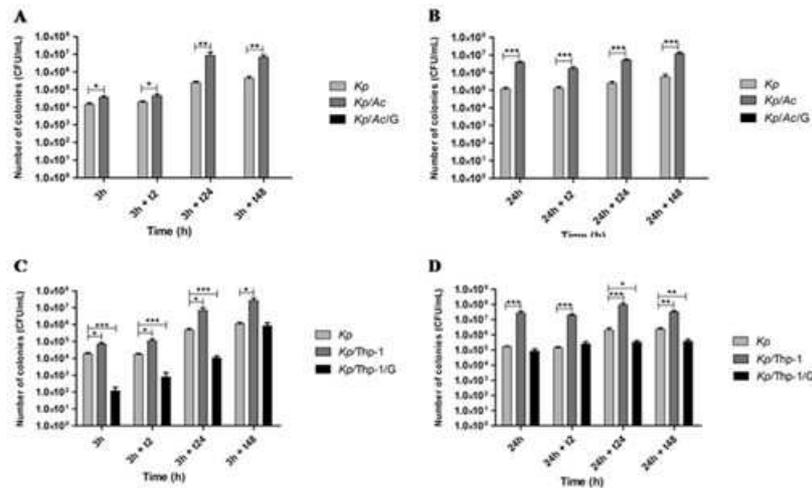


Fig. 2. Viable counts at 2 h (t2), 24 h (t24) or 48 h (t48) of *K. pneumoniae* alone (*Kp*), in coculture with *A. castellanii* (A, B), or with macrophages (C, D). A and C concern the addition of gentamicin after 3 h of coculture and B and D the addition of gentamicin after 24 h of coculture. *Kp/Ac*: Coincubation *A. castellanii*/*K. pneumoniae*, *Kp/Thp-1*: Coincubation Thp-1/*K. pneumoniae*, *Kp/Ac/G*: Coincubation *A. castellanii*/*K. pneumoniae*/Gentamicin, *Kp/Thp-1/G*: Coincubation Thp-1/*K. pneumoniae*/Gentamicin. All values correspond to mean of nine replicates. Values with stars are significantly different ($p < 0.05$ for *, $p < 0.01$ for **, and $p < 0.001$ for ***).

recovered. When gentamicin was added after 3 h of coculture with macrophages, increased bacterial multiplication was observed during the following 48 h (Fig. 2C). In contrast, when the antibiotic was added after 24 h of coculture, no additional growth of *K. pneumoniae* was visible whatever the duration of incubation (Fig. 2D). These results suggest an internalization of *K. pneumoniae* by Thp-1 cells, which is most pronounced after 24 h of coculture.

3.4. Viability of phagocytic cells

The viability of phagocytic cells was evaluated by using trypan blue. Concerning *A. castellanii*, the presence of *K. pneumoniae* did not influence the viability of the protozoa, as similar numbers of viable cells were recovered whatever the coculture duration (Fig. 3A). In the same conditions, *K. pneumoniae* caused significant reduction of the viability of macrophages after 48 h in comparison with Thp-1 cells without bacteria (Fig. 3B). In presence of gentamicin, the

number of viable cells remained stable over time for *A. castellanii* and macrophages (Fig. 4), showing that the presence of the antibiotic did not affect phagocyte viability.

3.5. Electron microscopy

The results obtained by electron microscopy after 6 h of coculture showed the absence of *K. pneumoniae* inside the phagocytic cells: FLA or macrophages (Fig. 5A and D). After 24 h and 48 h of coculture with *A. castellanii*, no *K. pneumoniae* was recovered inside the amoebae, but the bacteria were present in the medium (Fig. 5B and C). On the other hand, after 24 h and 48 h of coculture with Thp-1 cells, internalization of *K. pneumoniae* can be observed in these phagocytic cells (Fig. 5E and F) and it was confirmed that, after 48 h of our coculture conditions, the population of macrophages decreased (Fig. 5F). These observations were quite in agreement with the coculture results carried out with or without gentamicin addition.

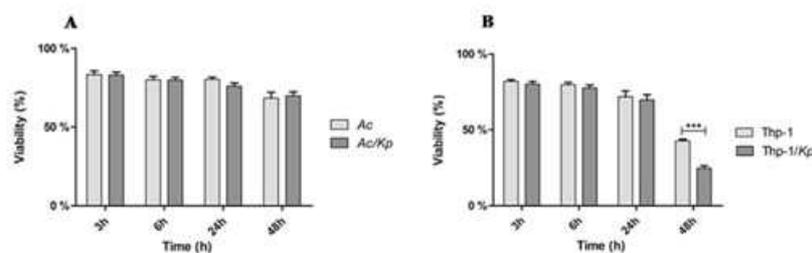


Fig. 3. Influence of *K. pneumoniae* on phagocytic cell viability after 3 h, 6 h, 24 h and 48 h of coculture: (A) *A. castellanii* (Ac) or (B) macrophages (Thp-1). Ac: *A. castellanii* control, Ac/Kp: Coincubation *A. castellanii*/*K. pneumoniae*, Thp-1: Thp-1 control, Thp-1/Kp: Coincubation Thp-1/*K. pneumoniae*. All values correspond to mean of nine replicates. Values with stars are significantly different ($p < 0.001$ for ***).

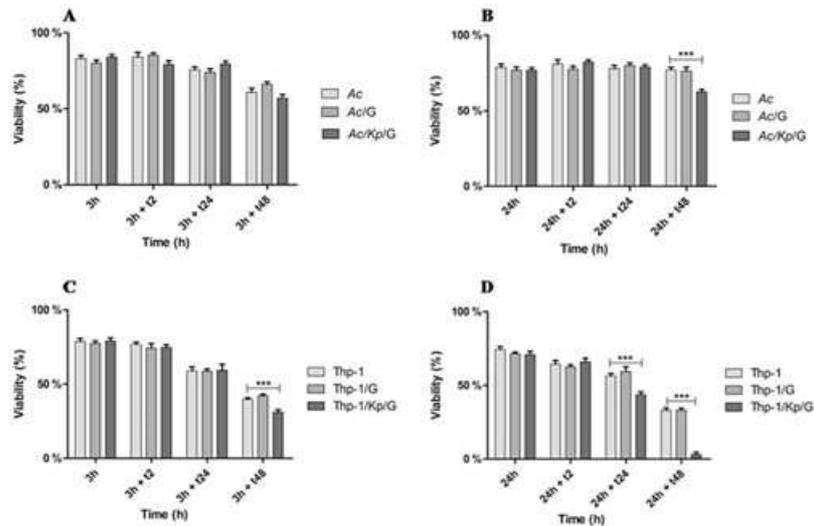


Fig. 4. Influence of *K. pneumoniae*, after 2 h, 24 h or 48 h of coculture, on phagocytic cell viability: (A, B) *A. castellanii* (Ac) or (C, D) macrophages (Thp-1) and with the addition of gentamicin after 3 h (A, C) or 24 h (B, D) of coculture. Ac/G: Coincubation *A. castellanii*/Gentamicin, Thp-1/G: Coincubation Thp-1/Gentamicin, Ac/Kp/G: Coincubation *A. castellanii*/*K. pneumoniae*/Gentamicin, Thp-1/Kp/G: Coincubation Thp-1/*K. pneumoniae*/Gentamicin. All values correspond to mean of nine replicates. Values with stars are significantly different ($p < 0.05$ for *, $p < 0.01$ for ** and $p < 0.001$ for ***).

3.6. Inhibition of attachment assays

Our results showed that only the presence of mannose decreased attachment of *K. pneumoniae* to *A. castellanii* (Fig. 6). These results were different concerning the macrophages for which no sugar affects the decrease of the bacterial attachment (data not shown).

4. Discussion

K. pneumoniae can be isolated from different environmental sources, including rural water reservoirs [22], samples from farms [23], raw and treated water [1,24], hospital effluents and municipal wastewater [25], or drinking water distribution systems [26] and has also been recovered in recreational waters [27], highlighting the role of aquatic environments as bacterial reservoirs and vectors. *K. pneumoniae* is considered to be an emerging pathogen that can resist hostile conditions, and is thereby able to spread throughout a community [28].

Moreover, FLA have also been frequently isolated from the same environments. They colonize domestic and institutional water systems such as domestic tap water, hospital water networks, swimming pools, dental unit waterlines, cooling towers ... [29–31]. It has been recognized that FLA can interact with a great variety of microorganisms [9].

In this study we have investigated the relationships between *K. pneumoniae* and *A. castellanii*. In the cocultures carried out, the presence of *A. castellanii* induced an increase in *K. pneumoniae* growth, compared to bacterial growth without amoebae. Moreover, we have shown that the bacteria can grow in amoeba supernatant, where the protozoa

presumably released nutrients that can sustain bacterial replication. In parallel, as shown by the use of trypan blue exclusion experiments, the viability of *A. castellanii* was not affected by the conditions of coculture with the bacteria. In order to obtain information on bacterial location (within amoebae and/or medium), we have added gentamicin, an antibiotic able to kill extracellular bacteria, after 3 or 24 h of coculture. In both cases, no viable bacteria were recovered, suggesting that *K. pneumoniae* were not internalized. This fact was confirmed by electron microscopy pictures produced after 6, 24 or 48 h, where bacteria were not seen within amoebae but in extracellular positions. It has previously been proved that *A. castellanii* enhances growth of some microorganisms [9] that can adapt to the protozoan niche. Most of the studies have concerned *L. pneumophila* that replicates into FLA, which act as vectors to colonize other environments and to transmit the bacteria to susceptible hosts. In addition, it has been shown that *A. castellanii* can decrease the *K. pneumoniae* population in biofilm communities [32] and that this protozoa is able to protect the bacteria during chlorination in a coculture assay [12]. In our study, *K. pneumoniae* is not internalized and is thereby not protected within the amoeba. March et al. have shown that the richness of the medium can affect the *K. pneumoniae* predation by amoebae such as *Dictyostelium discoideum* [33]. We can hypothesize that the same phenomenon occurs with *A. castellanii*. The bacterial growth could be explained in this case by the release of amoebal metabolites used as nutrients by the bacteria, as shown by the results of bacterial counts when *K. pneumoniae* was incubated in supernatants of amoebae. In addition, we showed that *K. pneumoniae* seemed able to attach to amoeba with the implication of mannose-binding proteins, as it has

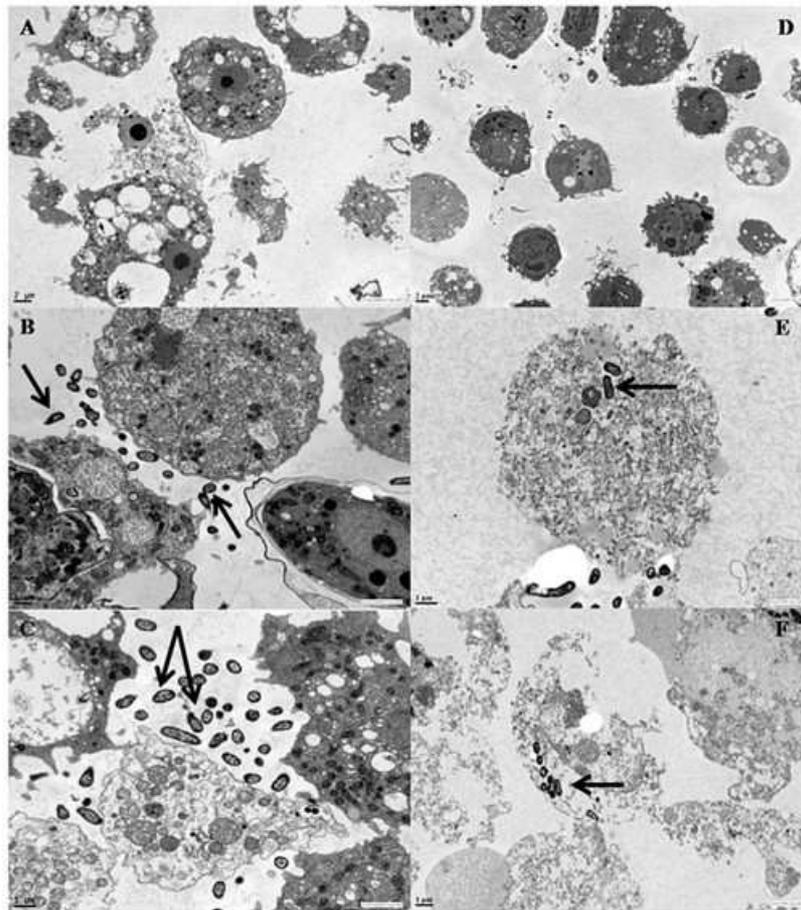


Fig. 5. Transmission electron-microscopy images of *A. castellanii* amoebae (A, B, C) or Macrophages (D, E, F) in coculture with *K. pneumoniae* after 6 h (A, D), 24 h (B, E) or 48 h of coculture (C, F). Bacterial elements are indicated by arrows.

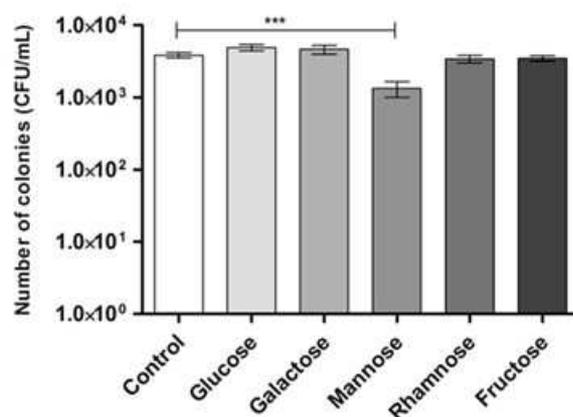


Fig. 6. Numeration of adhered *K. pneumoniae* to *A. castellanii* without or with saccharides (glucose, galactose, mannose, rhamnose or fructose). All values correspond to mean of nine replicates. Values with stars are significantly different ($p < 0.001$ for ***).

been previously described for some other bacteria [34]. Surprisingly, the uptake process remained incomplete, because no bacteria were found within the amoeba. The presence of *A. castellanii* could thereby favor in certain conditions the *K. pneumoniae* growth if these microorganisms are present in the same environments, but without necessarily requiring close relationships.

Acanthamoeba can be compared to human macrophages in some structures or behavior, like surface receptors or phagocytic activity [35] and some pathogens are able to multiply inside macrophages and amoebae in an analogous way [36,37]. For that reason, our first results were compared with those achieved concerning the relationships between *K. pneumoniae* and macrophagic cells. The bacterial counts after coculture assays conducted without gentamicin were comparable to those obtained with *A. castellanii*. Here again, compounds released by Thp-1 cells could be used by the bacteria for their growth. However, when the assays were carried out with gentamicin, a residual bacterial population was recovered, showing that *K. pneumoniae* was internalized within

these macrophagic cells, and consequently protected from the antibiotic action. This location was confirmed by electron microscopy. The bacterial attachment to Thp-1 cells did not involve the same receptors as the attachment to amoebae and no inhibition was recovered whatever the tested saccharides. In addition, the presence of *K. pneumoniae* had a negative effect on the macrophages' viability.

In many cases, after the internalization of a pathogen by a macrophage, a fusion between phagosome and lysosome(s) and then the destruction of the pathogen occur [38]. On the contrary, we demonstrated, as some authors previously had [39], that *K. pneumoniae* is not killed and is able to persist intracellularly in macrophages.

In conclusion, we show here that the presence of *K. pneumoniae* and *A. castellanii* in the same environmental conditions could lead to bacterial growth, without negative impact on amoebae viability. The bacteria is not internalized and therefore not protected from hostile conditions. On the other hand, although some authors have shown similarities between FLA and macrophages in their relations with microorganisms, we have shown here that *A. castellanii* is probably not of the ideal model organism to explore and understand the macrophages-*K. pneumoniae* interactions.

Conflict of interest

None of the authors have conflict of interest.

Acknowledgments

The authors are grateful to Jeffrey Arsham for revising the English text.

References

- [1] Podschun R, Pietsch S, Höller C, Ullmann U. Incidence of *Klebsiella* species in surface waters and their expression of virulence factors. *Appl Environ Microbiol* 2001;67:3325–7.
- [2] Kim S-H, Wei C-I, Tzou Y-M, An H. Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated from farm environments and retail products in Oklahoma. *J Food Prot* 2005;68:2022–9.
- [3] Manoz MA, Welcome FL, Schukken YH, Zadoks RN. Molecular epidemiology of two *Klebsiella pneumoniae* mastitis outbreaks on a dairy farm in New York State. *J Clin Microbiol* 2007;45:3964–71.
- [4] Clements A, Gaboriaud F, Duval JFL, Farn JL, Jenney AW, Lithgow T, et al. The major surface-associated saccharides of *Klebsiella pneumoniae* contribute to host cell association. *PLoS One* 2008;3:e3817.
- [5] Matsen JM, Spindler JA, Blosser RO. Characterization of *Klebsiella* isolates from natural receiving waters and comparison with human isolates. *Appl Microbiol* 1974;28:672–8.
- [6] Rodríguez-Zaragoza S. Ecology of free-living amoebae. *Crit Rev Microbiol* 1994;20:225–41.
- [7] Anacarso I, Guerrieri E, Bondi M, de Niederhäusern S, Iseppi R, Sabia C, et al. Influence of *Legionella pneumophila* and other water bacteria on the survival and growth of *Acanthamoeba polyphaga*. *Arch Microbiol* 2010;192:877–82.
- [8] Steinert M. Pathogen-host interactions in *Dicystostelium*, *Legionella*, *Mycobacterium* and other pathogens. *Semin Cell Dev Biol* 2011;22:70–6.
- [9] Greub G, Raoult D. Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin Microbiol Rev* 2004;17:413–33.
- [10] Tosetti N, Croxatto A, Greub G. Amoebae as a tool to isolate new bacterial species, to discover new virulence factors and to study the host-pathogen interactions. *Microb Pathog* 2014;77:125–30.
- [11] Thomas V, McDonnell G, Denyer SP, Maillard J-Y. Free-living amoebae and their intracellular pathogenic microorganisms: risks for water quality. *FEMS Microbiol Rev* 2010;34:231–59.
- [12] King CH, Shotts EB, Wooley RE, Porter KG. Survival of coliforms and bacterial pathogens within protozoa during chlorination. *Appl Environ Microbiol* 1988;54:3023–33.
- [13] Pagnier I, Raoult D, La Scola B. Isolation and identification of amoeba-resisting bacteria from water in human environment by using an *Acanthamoeba polyphaga* co-culture procedure. *Environ Microbiol* 2008;10:1135–44.
- [14] Salah IB, Ghigo E, Drancourt M. Free-living amoebae, a training field for macrophage resistance of *mycobacteria*. *Clin Microbiol Infect* 2009;15:894–905.
- [15] Santic M, Molmeret M, Abu Kwaik Y. Maturation of the *Legionella pneumophila*-containing phagosome into a phagolysosome within gamma interferon-activated macrophages. *Infect Immun* 2005;73:3166–71.
- [16] Steenbergen JN, Shuman HA, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:15245–50.
- [17] Van Waeyenbergh L, Baré J, Pasmans F, Claeys M, Bert W, Haesebrouck F, et al. Interaction of *Aspergillus fumigatus* conidia with *Acanthamoeba castellanii* parallels macrophage-fungus interactions. *Environ Microbiol Rep* 2013;5:819–24.
- [18] Cardas M, Khan NA, Alsam S. *Staphylococcus aureus* exhibit similarities in their interactions with *Acanthamoeba* and ThP1 macrophage-like cells. *Exp Parasitol* 2012;132:513–8.
- [19] Schuster FL. Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amoebae. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:342–54.
- [20] Akya A, Pointon A, Thomas C. Viability of *Listeria monocytogenes* in co-culture with *Acanthamoeba* spp. *FEMS Microbiol Ecol* 2009;70:20–9.
- [21] Medina G, Flores-Martin S, Fonseca B, Oth C, Fernandez H. Mechanisms associated with phagocytosis of *Arcobacter butzleri* by *Acanthamoeba castellanii*. *Parasitol Res* 2014;113:1933–42.
- [22] Zhang H, Zhou Y, Guo S, Chang W. High prevalence and risk factors of fecal carriage of CTX-M type extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* from healthy rural residents of Taian, China. *Front Microbiol* 2015;6:239.
- [23] Ben Said L, Jouini A, Klibi N, Dziri R, Alonso CA, Boudabous A, et al. Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* in vegetables, soil and water of the farm environment in Tunisia. *Int J Food Microbiol* 2015;203:86–92.
- [24] Alouache S, Estepa V, Messai Y, Ruiz E, Torres C, Bakour R. Characterization of ESBLs and associated quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from an urban wastewater treatment plant in Algeria. *Microb Drug Resist* 2014;20:30–8.
- [25] Korzeniewska E, Harnisz M. Culture-dependent and culture-independent methods in evaluation of emission of *Enterobacteriaceae* from sewage to the air and surface water. *Water Air Soil Pollut* 2012;223:4039–46.
- [26] Bai X, Wu F, Zhou B, Zhi X. Biofilm bacterial communities and abundance in a full-scale drinking water distribution system in Shanghai. *J Water Health* 2010;8:593–600.
- [27] Montezzi LF, Campana EH, Corrêa LL, Justo LH, Paschoal RP, da Silva ILVD, et al. Occurrence of carbapenemase-producing bacteria in coastal recreational waters. *Int J Antimicrob Agents* 2015;45:174–7.
- [28] Venieri D, Fraggadaki A, Binas V, Zachopoulos A, Kiriakidis G, Mantzavinos D. Study of the generated genetic polymorphisms during the photocatalytic elimination of *Klebsiella pneumoniae* in water. *Photochem Photobiol Sci* 2015;14:506–13.
- [29] Sanden GN, Morrill WE, Fields BS, Breiman RF, Barbaree JM. Incubation of water samples containing amoebae improves detection of

- Legionellae* by the culture method, *Appl Environ Microbiol* 1992;58:2001–4.
- [30] Rohr U, Weber S, Michel R, Selenka F, Wilhelm M. Comparison of free-living amoebae in hot water systems of hospitals with isolates from moist sanitary areas by identifying genera and determining temperature tolerance. *Appl Environ Microbiol* 1998;64:1822–4.
- [31] Thomas V, Loret J-F, Jousset M, Greub G. Biodiversity of amoebae and amoebae-resisting bacteria in a drinking water treatment plant. *Environ Microbiol* 2008;10:2728–45.
- [32] Huws SA, McBain AJ, Gilbert P. Protozoan grazing and its impact upon population dynamics in biofilm communities. *J Appl Microbiol* 2005;98:238–44.
- [33] March C, Cano V, Moranta D, Llobet E, Pérez-Gutiérrez C, Tomás JM, et al. Role of bacterial surface structures on the interaction of *Klebsiella pneumoniae* with phagocytes. *PLoS One* 2013;8:e56847.
- [34] Alsam S, Sissons J, Dudley R, Khan NA. Mechanisms associated with *Acanthamoeba castellanii* (T4) phagocytosis. *Parasitol Res* 2005;96:402–9.
- [35] Yan L, Cerny RL, Cirillo JD. Evidence that hsp90 is involved in the altered interactions of *Acanthamoeba castellanii* variants with bacteria. *Eukaryot Cell* 2004;3:567–78.
- [36] Siddiqui R, Khan NA. *Acanthamoeba* is an evolutionary ancestor of macrophages: a myth or reality? *Exp Parasitol* 2012;130:95–7.
- [37] Cosson P, Lima WC. Intracellular killing of bacteria: is *Dictyostelium* a model macrophage or an alien? *Cell Microbiol* 2014;16:816–23.
- [38] Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* 2011;11:723–37.
- [39] Cano V, March C, Insua JL, Aguiló N, Llobet E, Moranta D, et al. *Klebsiella pneumoniae* survives within macrophages by avoiding delivery to lysosomes. *Cell Microbiol* 2015;17:1537–60.

2.1.2. Résultats complémentaires

2.1.2.1. Co-culture *K. pneumoniae* - *V. vermiformis*

A la suite des résultats obtenus en présence d'*A. castellanii* et des macrophages Thp-1, nous avons voulu explorer le comportement des bactéries *K. pneumoniae* en présence des amibes *V. vermiformis*, retrouvées dans les mêmes environnements hydriques. Les bactéries ont ainsi été mises en présence de *V. vermiformis*, puis la croissance bactérienne évaluée par dénombrement des UFC.

Les résultats montrent que la présence de *V. vermiformis* a un effet positif sur la croissance bactérienne. En effet, une augmentation significative de la croissance de *K. pneumoniae* est observée, à partir de 6 h de co-culture et maintenue pendant toute l'expérimentation (Figure 43).

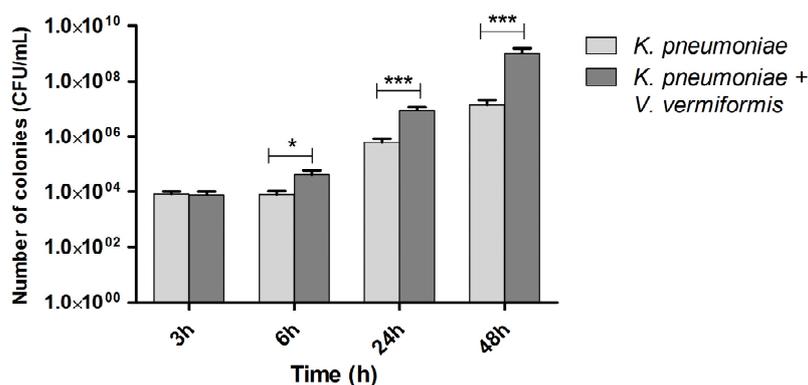


Figure 43 : Numération des UFC de *K. pneumoniae* à 3 h, 6 h, 24 h ou 48 h en co-culture avec *V. vermiformis*.

Toutes les valeurs correspondent à la moyenne de neuf répétitions. Les valeurs avec les étoiles sont significativement différentes ($p < 0,05$ pour * et $p < 0,001$ pour ***).

Ces premiers résultats suggèrent que *K. pneumoniae* résiste à une phagocytose potentielle par *V. vermiformis* et que la présence de l'amibe stimule la croissance bactérienne.

2.1.2.2. Effet de la gentamicine sur la croissance de *K. pneumoniae* en présence de *V. vermiformis*

Nous avons ensuite souhaité savoir si *K. pneumoniae* était internalisée ou non par *V. vermiformis*. L'expérience de co-culture a donc été de nouveau réalisée, mais avec ajout ou non après 3 h ou 24 h de co-culture de gentamicine, capable de tuer les bactéries non internalisées.

Lorsque la gentamicine est ajoutée après 3 h de co-culture *K. pneumoniae* - *V. vermiformis*, une multiplication bactérienne est retrouvée au cours des 48h suivantes (Figure 44 A). Cependant, lorsque la gentamicine est ajoutée après 24 h de co-culture, aucune multiplication bactérienne n'est visible après 24 ou 48h d'incubation post-traitement antibiotique malgré une persistance de la viabilité bactérienne tout au long de l'expérimentation. (Figure 44 B).

Ces résultats nous permettent de suspecter une internalisation de *K. pneumoniae* par *V. vermiformis*, débutant dans les 3 premières heures de contact avec l'amibe avec un maximum d'internalisation après 24 h de contact. Ces résultats semblent également confirmer que les bactéries *K. pneumoniae* résistent à la phagocytose par *V. vermiformis*.

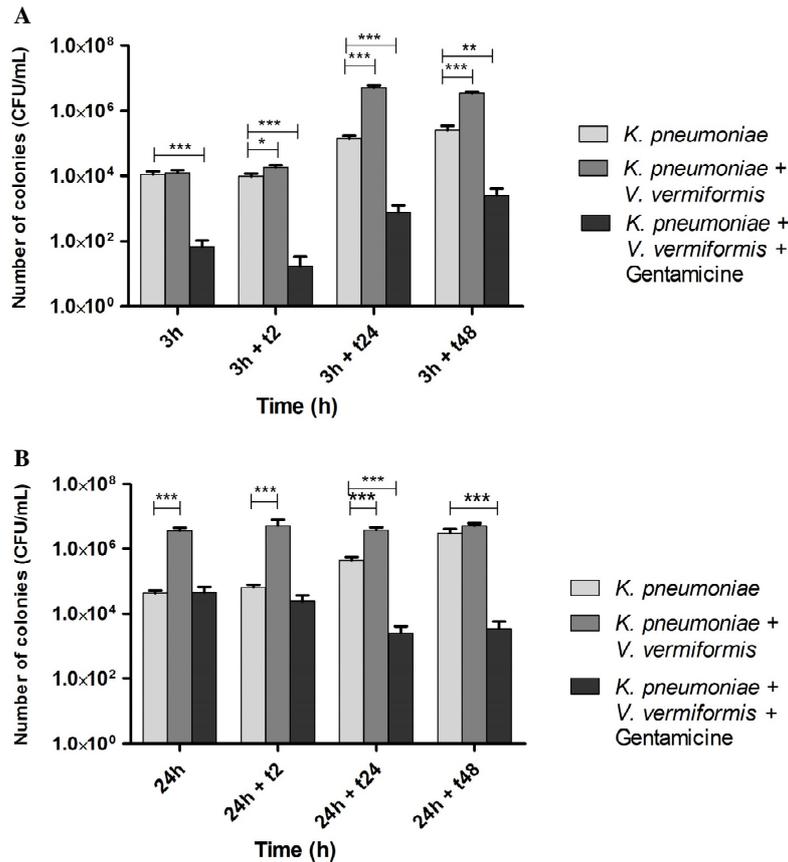


Figure 44 : Numération des UFC de *K. pneumoniae* en co-culture avec *V. vermiformis* après ajout de gentamicine à 3h et 24h de co-culture.

t2, t24 et t48 représentent la durée de la co-culture après ajout de gentamicine (A) Ajout de gentamicine après 3 h de co-culture (B) Ajout de gentamicine après 24 h de co-culture. Toutes les valeurs correspondent à la moyenne de neuf répétitions. Les valeurs avec les étoiles sont significativement différentes ($p < 0,05$ pour *, $p < 0,01$ pour ** et $p < 0,001$ pour ***).

2.1.2.3. Inhibition de l'attachement de *K. pneumoniae* à *V. vermiformis*

Nous avons également voulu savoir si, en présence de certains sucres, l'adhérence de *K. pneumoniae* à *V. vermiformis* était modifiée, pouvant ainsi révéler la présence de récepteurs à certains saccharides sur la surface amibienne. Pour cela, les amibes *V. vermiformis* ont été pré-traitées avec les sucres testés, avant l'ajout de *K. pneumoniae*. Après 1 h d'incubation, les co-cultures ont été lavées afin d'éliminer les bactéries non adhérentes

aux amibes, puis un dénombrement des UFC après ensemencement des co-cultures a permis d'évaluer le nombre de bactéries ayant adhéré.

Les résultats montrent que la présence de glucose, de rhamnose ou de fructose diminue l'attachement de *K. pneumoniae* à *V. vermiformis* (Figure 45), suggérant la présence chez *V. vermiformis* de récepteurs différents du récepteur au mannose retrouvé chez *A. castellanii* pour l'adhérence de *K. pneumoniae*.

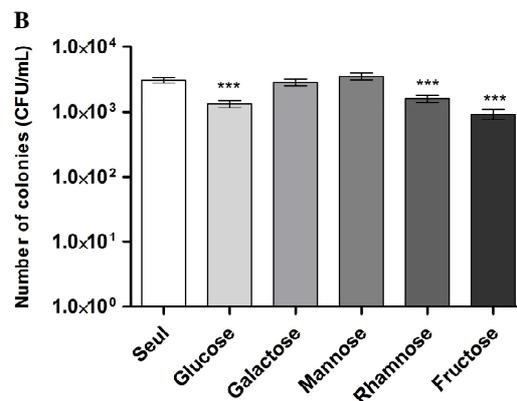


Figure 45 : Numération de *K. pneumoniae* ayant adhéré à *V. vermiformis* en présence des sucres (glucose, galactose, mannose, rhamnose ou fructose).

Toutes les valeurs correspondent à la moyenne de neuf répétitions. Les valeurs avec les étoiles sont significativement différentes ($p < 0,001$ pour ***).

2.1.2.4. Fractionnement du surnageant d'*A. castellanii*

Les résultats de l'exploration des interactions entre *K. pneumoniae* et *A. castellanii* ayant montré que l'augmentation de la croissance bactérienne pouvait être obtenue par le surnageant de culture amibien, nous avons tenté de purifier les molécules provenant de l'amibe et pouvant jouer un rôle dans la croissance bactérienne.

Le surnageant provenant de l'incubation de *A. castellanii* dans du PAS a ainsi été fractionné par extraction en phase solide sur cartouche de Sep-Pak C18 avec un gradient

d'ACN pour l'élution des molécules retenues sur la cartouche. Les fractions obtenues ont, par la suite, été testées sur la croissance de *K. pneumoniae*

Les premiers résultats montrent qu'une seule fraction, retrouvée à 0 % d'ACN, permet une augmentation de la croissance bactérienne (Tableau 10), suggérant qu'*A. castellanii* sécrète une ou plusieurs molécules hydrophiles stimulant cette croissance.

Tableau 10 : Effet des fractions du surnageant d'*A. castellanii* obtenues par Sep-Pak sur la croissance de *K. pneumoniae*.

(-) pas d'effet sur la croissance de *K. pneumoniae*, (+) augmentation de la croissance de *K. pneumoniae*.

	0 % ACN	10 % ACN	20 % ACN	40 % ACN	60 % ACN	80 % ACN	100 % ACN
Surnageant <i>A. castellanii</i>	+	-	-	-	-	-	-

2.2. Etude des interactions entre *S. aureus* et les cellules phagocytaires

2.2.1. Expérience de co-culture

A la suite des résultats obtenus avec *K. pneumoniae*, nous avons voulu savoir si la bactérie *S. aureus*, bactérie Gram positif avait le même devenir en présence des cellules phagocytaires *A. castellanii*, *V. vermiformis* ou les macrophages Thp-1. Pour cela, comme pour *K. pneumoniae*, des co-cultures ont été réalisées, mettant en présence les bactéries et les cellules phagocytaires.

2.2.1.1. Co-culture *S. aureus* - *A. castellanii*

La co-culture de *S. aureus* en présence d'*A. castellanii* induit un effet positif sur la croissance bactérienne, retrouvé dès la 6^{ème} heure de co-culture et maintenu jusqu'à la fin de l'expérimentation (Figure 46).

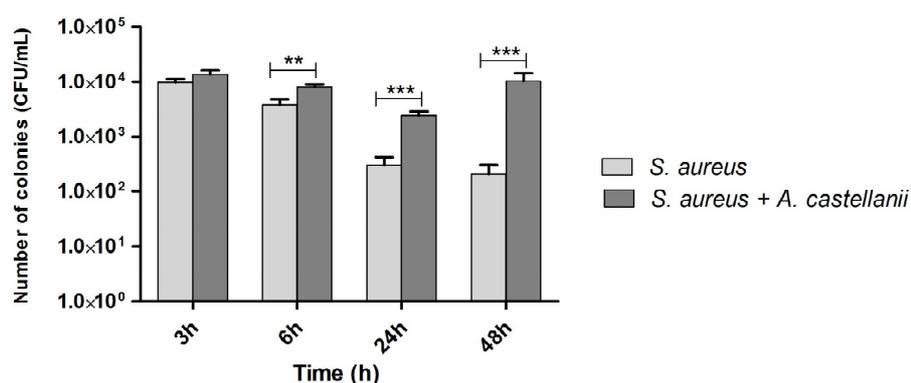


Figure 46 : Numération des UFC de *S. aureus* en co-culture avec *A. castellanii*

Toutes les valeurs correspondent à la moyenne de neuf répétitions. Les valeurs avec les étoiles sont significativement différentes ($p < 0,01$ pour ** et $p < 0,001$ pour ***).

2.2.1.2. Co-culture *S. aureus* - *V. vermiformis*

La co-culture de *S. aureus* avec *V. vermiformis* montre également un effet positif sur la croissance bactérienne, plus précoce que lors de la co-culture avec *A. castellanii*. En effet, une augmentation significative de la croissance de *S. aureus* est observée, à partir de 3 h de co-culture. Cette augmentation de la croissance bactérienne par rapport au témoin est maintenue pendant les 48h de la co-culture. (Figure 47).

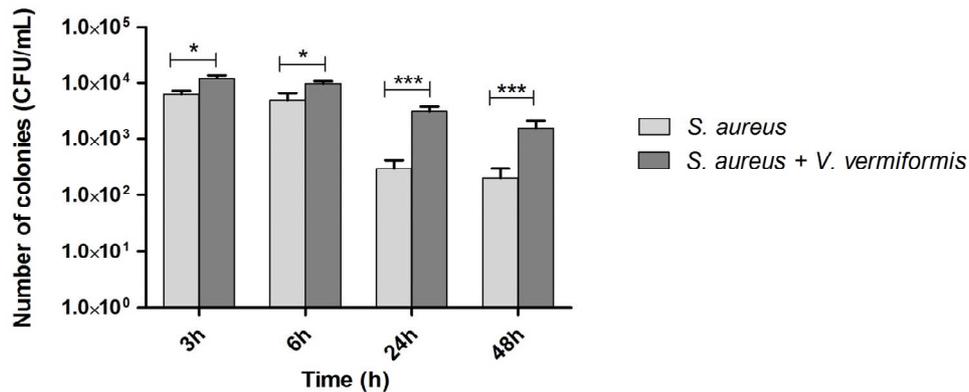


Figure 47 : Numération des UFC de *S. aureus* en co-culture avec *V. vermiformis*.

Toutes les valeurs correspondent à la moyenne de neuf répétitions. Les valeurs avec les étoiles sont significativement différentes ($p < 0,05$ pour * et $p < 0,001$ pour ***).

Ces résultats suggèrent que *S. aureus* pourrait résister à la phagocytose par les amibes *A. castellanii* et *V. vermiformis* et que la présence de ces amibes stimule la croissance bactérienne.

2.2.1.3. Co-culture *S. aureus* - Thp-1

La co-culture de *S. aureus* avec les macrophages Thp-1 induit là encore un effet positif sur la croissance bactérienne, par ailleurs uniquement à partir de la 24^{ème} heure de co-culture et maintenue pendant les 48 h de co-culture. (Figure 48).

Ces résultats suggèrent que *S. aureus* résiste à la phagocytose par les macrophages Thp-1 et que la présence des macrophages peut stimuler la croissance bactérienne.

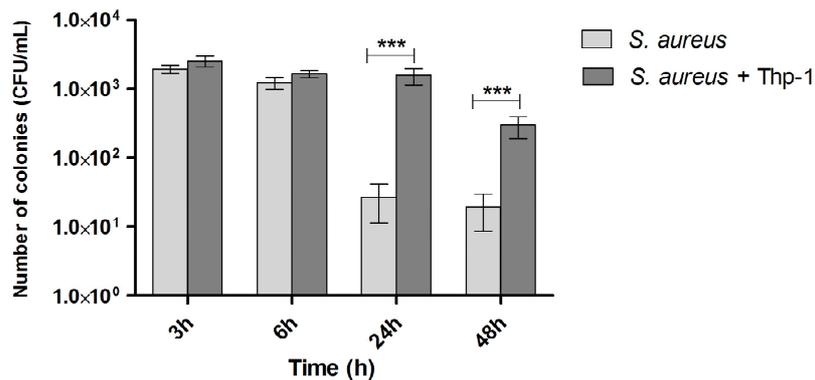


Figure 48 : Numération des UFC de *S. aureus* en co-culture avec les cellules Thp-1.

Toutes les valeurs correspondent à la moyenne de neuf répétitions. Les valeurs avec les étoiles sont significativement différentes ($p < 0,001$ pour ***)

2.2.2. Co-culture de *S. aureus* et des cellules phagocytaires en présence de gentamicine

Suite aux résultats de co-culture, nous avons voulu explorer l'internalisation potentielle de la bactérie dans les cellules phagocytaires *A. castellanii*, *V. vermiformis* et les macrophages. *S. aureus* étant sensible à la gentamicine (comme *K. pneumoniae*), son ajout lors des co-cultures va permettre de tuer les bactéries présentes dans le milieu à l'extérieur des cellules. L'expérience de co-culture a donc été de nouveau réalisée, mais avec ajout ou non de gentamicine après 3 h ou 24 h de co-culture.

2.2.2.1. Co-culture *S. aureus* - *A. castellanii* en présence de gentamicine

Nous avons déterminé que la présence de *A. castellanii* induit une augmentation de la croissance de *S. aureus*. Lorsque la gentamicine est ajoutée après 3 h de co-culture, aucune bactérie n'est retrouvée quel que soit le temps d'incubation après l'ajout de l'antibiotique.

(Figure 49A). De la même manière, quand la gentamicine est ajoutée après 24 h de co-culture, aucune croissance bactérienne n'est visible, là encore, quel que soit le temps d'incubation après le traitement à la gentamicine (Figure 49B).

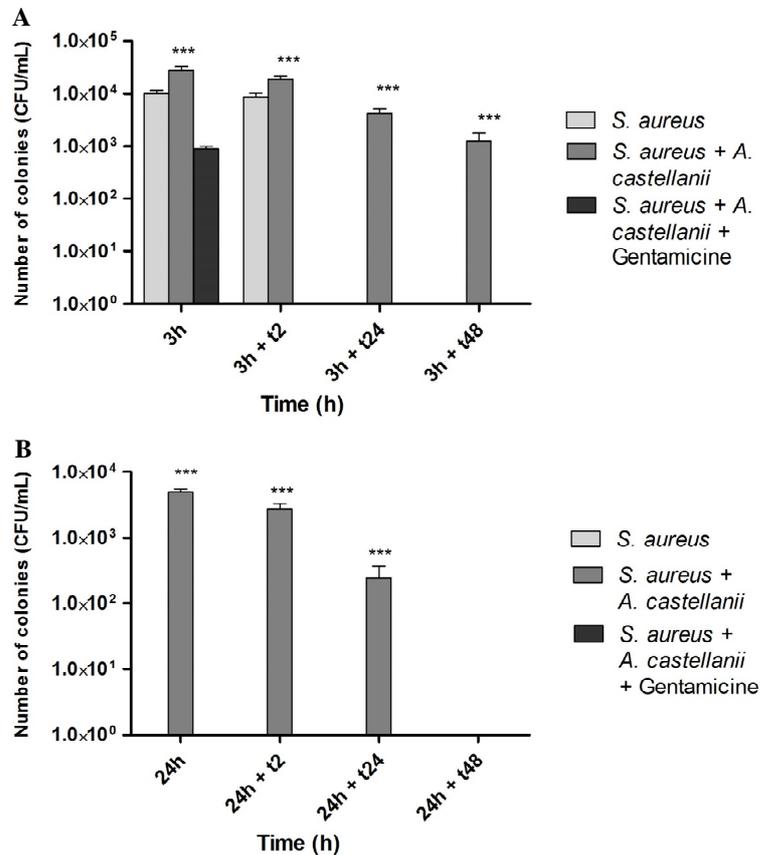


Figure 49 : Numération des UFC de *S. aureus* en co-culture avec *A. castellanii* après ajout de gentamicine à 3h et 24h de co-culture.

t2, t24 et t48 représentent la durée de la co-culture après ajout de l'antibiotique. (A) Ajout de gentamicine après 3 h de co-culture (B) Ajout de gentamicine après 24 h de co-culture. Toutes les valeurs correspondent à la moyenne de neuf répétitions. Les valeurs avec les étoiles sont significativement différentes ($p < 0,001$ pour ***).

Ces résultats suggèrent qu'il n'y a pas d'internalisation de *S. aureus* par *A. castellanii* et que la croissance bactérienne semble stimulée par des produits de sécrétion amibiens, comme nous l'avons précédemment évoqué dans le cas de *K. pneumoniae*

2.2.2.2. Co-culture *S. aureus* – *V. vermiformis* en présence de gentamicine

Lorsque la gentamicine est ajoutée après 3 h de co-culture *S. aureus*- *V. vermiformis*, aucune bactérie viable n'est retrouvée en culture dans les 48h suivant l'ajout de l'antibiotique. (Figure 50A). Lorsque la gentamicine est ajoutée après 24 h de co-culture, les résultats sont identiques (Figure 50B), suggérant qu'il n'y a pas d'internalisation de *S. aureus* par *V. vermiformis* et que le développement bactérien pourrait être dû à des molécules ambiennes sécrétées dans le milieu.

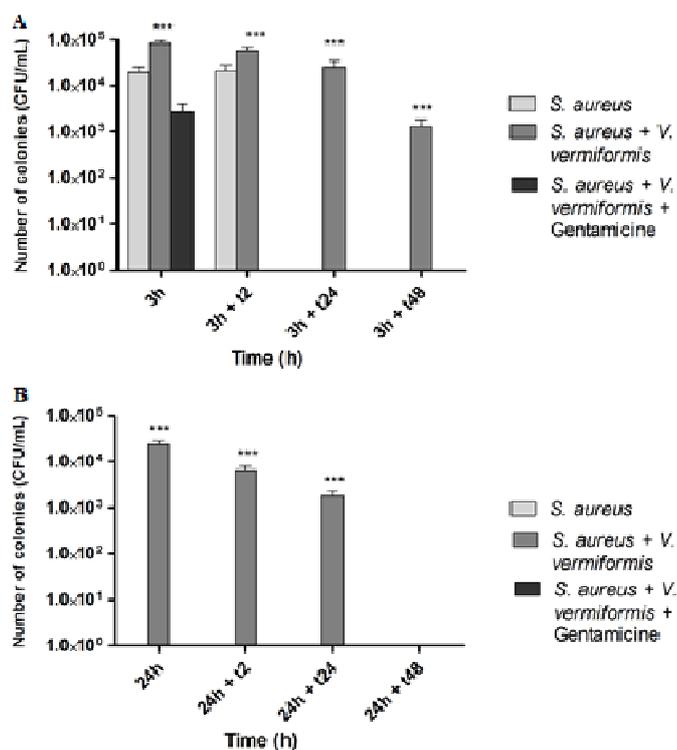


Figure 50 : Numération des UFC de *S. aureus* en co-culture avec *V. vermiformis* après ajout de gentamicine à 3h et 24h de co-culture.

t2, t24 et t48 représentent la durée de la co-culture après ajout de l'antibiotique. (A) Ajout de gentamicine après 3 h de co-culture (B) Ajout de gentamicine après 24 h de co-culture. Toutes les valeurs correspondent à la moyenne de neuf répétitions. Les valeurs avec les étoiles sont significativement différentes ($p < 0,001$ pour ***).

2.2.2.3. Co-culture *S. aureus* – Thp-1 en présence de gentamicine

Lorsque la gentamicine est ajoutée après 3 h de co-culture *S. aureus*-Thp-1, une persistance de la viabilité bactérienne est retrouvée dans les 24 h suivant l'ajout de l'antibiotique (Figure 51A). Lorsque la gentamicine est ajoutée après 24 h de co-culture aucune croissance bactérienne n'est visible quel que soit le temps d'incubation suivant le traitement à la gentamicine (Figure 51B).

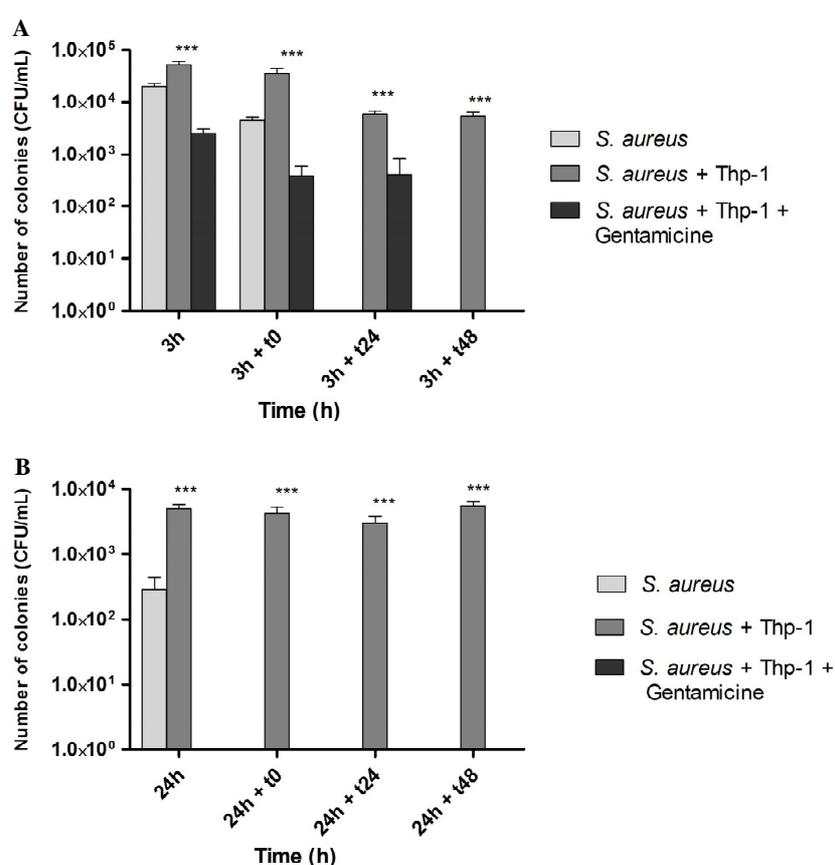


Figure 51 : Numération des UFC de *S. aureus* en co-culture avec les macrophages Thp-1 après ajout de gentamicine à 3h et 24h de co-culture.

t2, t24 et t48 représentent la durée de la co-culture après ajout de l'antibiotique. (A) Ajout de gentamicine après 3 h de co-culture (B) Ajout de gentamicine après 24 h de co-culture. Toutes les valeurs correspondent à la moyenne de neuf répétitions. Les valeurs avec les étoiles sont significativement différentes ($p < 0,001$ pour ***).

Ces résultats suggèrent une internalisation précoce de *S. aureus* par les macrophages, protégeant ainsi les bactéries de l'action de l'antibiotique. Cependant, après 24h de co-culture, nos résultats montrent qu'aucune bactérie n'est présente à l'intérieur des cellules. Leur croissance serait alors favorisée par la présence dans le milieu de composés cellulaires.

2.2.3. Inhibition de l'attachement aux cellules phagocytaires

Des tests d'inhibition de l'adhérence de *S. aureus* à *A. castellanii*, *V. vermiformis* et Thp-1 ont également été réalisés. Pour cela, les cellules phagocytaires ont été pré-traitées par différents sucres avant la mise en contact avec les bactéries. Le nombre de bactéries adhérentes aux amibes a été ensuite évalué par dénombrement des UFC.

2.2.3.1. Inhibition de l'attachement de *S. aureus* à *A. castellanii*

Les résultats montrent que la présence de glucose, de mannose ou de fructose diminue l'attachement de *S. aureus* à *A. castellanii*. (Figure 52).

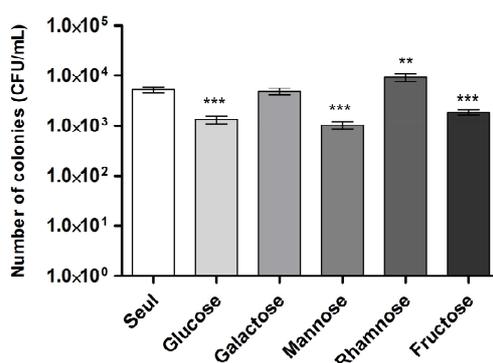


Figure 52 : Numération des *S. aureus* ayant adhéré à *A. castellanii* en fonction ou non de la présence de glucose, galactose, mannose, rhamnose ou fructose.

Toutes les valeurs correspondent à la moyenne de neuf répétitions. Les valeurs avec les étoiles sont significativement différentes ($p < 0,01$ pour ** et $p < 0,001$ pour ***).

Ces résultats suggèrent la présence de récepteurs dont des récepteurs au mannose faisant intervenir ces différents sucres dans le processus d'adhérence de *S. aureus* à l'amibe.

2.2.3.2. Inhibition de l'attachement de *S. aureus* à *V. vermiformis*

Les résultats montrent que la présence de mannose ou de rhamnose augmente l'attachement de *S. aureus* à *V. vermiformis* (Figure 53).

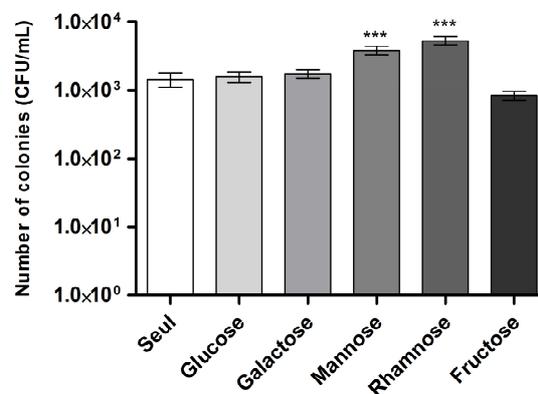


Figure 53 : Numération des *S. aureus* ayant adhéré à *V. vermiformis* en fonction ou non de la présence de glucose, galactose, mannose, rhamnose ou fructose.

Toutes les valeurs correspondent à la moyenne de neuf répétitions. Les valeurs avec les étoiles sont significativement différentes ($p < 0,001$ pour ***).

Ces résultats suggèrent l'absence de récepteurs au mannose ou au rhamnose sur *V. vermiformis*.

2.2.3.3. Inhibition de l'attachement de *S. aureus* aux Thp-1

Les résultats montrent que, quel que soit le sucre testé, à l'exception du fructose, l'adhérence de *S. aureus* aux cellules Thp-1 est augmentée (Figure 54).

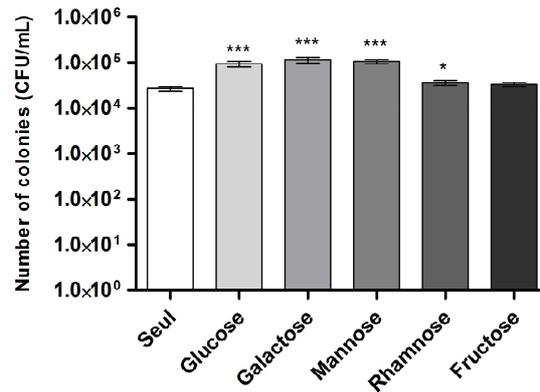


Figure 54 : Numération des *S. aureus* ayant adhéré aux cellules Thp-1 en fonction ou non de la présence de glucose, galactose, mannose, rhamnose ou fructose.

Toutes les valeurs correspondent à la moyenne de neuf répétitions. Les valeurs avec les étoiles sont significativement différentes ($p < 0,05$ pour * et $p < 0,001$ pour ***).

2.3. Etudes des interactions entre *A. fumigatus* et les cellules phagocytaires

2.3.1. Article 2 : *Vermamoeba vermiformis-Aspergillus fumigatus* relationships and comparison with other phagocytic cells

L'article 2 présenté ci-dessous a été publié dans la revue "Parasitology Research".

A. fumigatus est une moisissure retrouvée dans l'environnement comme l'eau ou le sol, et potentiellement responsable d'infections profondes chez l'immunodéprimé. Ce champignon filamenteux peut se trouver en relation avec des amibes libres comme *A. castellanii* ou *V. vermiformis*. L'objectif de l'article a été l'étude des relations entre *A. fumigatus* et *V. vermiformis*, très représentées dans les réseaux d'eau hospitaliers, afin de déterminer l'impact de la présence de cette amibe, très représentée dans l'eau, sur le développement fongique. Dans un second temps, nous avons comparé les interactions précédemment mises en évidence, avec les interactions existant entre ce même champignon et *A. castellanii* ou les cellules Thp-1, autres modèles de cellules phagocytaires, afin de déterminer s'il était possible d'extrapoler les relations "amibes-champignons" aux relations "macrophages-champignon".

Des expériences de co-culture ont ainsi été réalisées en présence de *V. vermiformis*, *A. castellanii* ou des macrophages Thp-1. Les résultats ont montré que *V. vermiformis* favorisait la filamentation et la croissance d'*A. fumigatus*. De la même manière, *A. castellanii* s'est révélé capable d'influer positivement sur les deux caractéristiques étudiées. En revanche, la présence des macrophages Thp-1 n'a pas eu d'influence sur la croissance ou sur la filamentation fongique. Les mêmes tests ont permis la mise en évidence de l'effet négatif du

champignon sur la viabilité des macrophages et de *V. vermiformis*, mais n'ont montré aucun effet sur *A. castellanii*.

Nous avons également pu rapporter une influence positive des deux surnageants amibiens sur la croissance fongique après 48h d'incubation, maintenue à 96h uniquement avec le surnageant de *V. vermiformis*. L'évolution de la germination des conidies aspergillaires est similaire en présence des deux surnageants, débutant après 5h d'incubation pour atteindre 100% de conidies germées après 13h d'incubation.

L'adhérence des conidies aux trois cellules phagocytaires a aussi été étudiée. Les résultats ont montré que le pourcentage de conidies adhérentes était similaire dans tous les cas, malgré la différence de récepteurs présents à la surface des différentes cellules. Cependant, les tests explorant l'internalisation des conidies ont montré des résultats différents suivant les cellules : alors que pour les deux genres étudiés 100% des amibes ont internalisé des conidies, le phénomène n'est retrouvé que chez 40 % des cellules Thp-1.

Cette étude a montré d'une part que *V. vermiformis*, était capable de favoriser la croissance fongique au sein des environnements hydriques, justifiant ainsi les étapes de filtration au sein des services abritant des sujets à risque. D'autre part, si des similitudes entre les interactions *A. fumigatus* et cellules phagocytaires ont été mises en évidence, les différences qui subsistent ne permettent pas d'une manière plus générale d'utiliser un modèle amibien pour l'extrapolation des résultats obtenus aux interactions de ce champignon avec les macrophages.

ARTICLE 2

Vermamoeba vermiformis-Aspergillus fumigatus
**relationships and comparison with other
phagocytic cells**

“Parasitology research”

Vermamoeba vermiformis-*Aspergillus fumigatus* relationships and comparison with other phagocytic cells

Elodie Maisonneuve¹ · Estelle Cateau^{1,2} · Sihem Kaaki³ · Marie-Hélène Rodier^{1,2} 

Received: 21 March 2016 / Accepted: 23 June 2016
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

Abstract Free living amoebae (FLA) are protists ubiquitously present in the environment. *Aspergillus fumigatus* is a mould responsible for severe deep-seated infections, and that can be recovered in the same habitats as the FLA. By conducting coculture experiments and fungal incubation with amoebal supernatants, we report herein that *Vermamoeba vermiformis*, a FLA present in hospital water systems, promotes filamentation and growth of *A. fumigatus*. This finding is of particular importance to institutions whose water systems might harbor FLA and could potentially be used by immunocompromised patients. Also, the relationships between *V. vermiformis* and *A. fumigatus* were compared to those between this fungus and two other phagocytic cells: *Acanthamoeba castellanii*, another FLA, and macrophage-like THP-1 cells. After 4 h of cocubation, the percentages of the three phagocytic cell types with adhered conidia were similar, even though the types of receptors between FLA and macrophagic cell seemed different. However, the percentage of THP-1 with internalized conidia was considerably lower (40 %) in comparison with the two other cell types (100 %). Thus, this study revealed that interactions between *A. fumigatus* and these three phagocytic cell types show similarities, even though it is premature to extrapolate these results to interpret relationships between *A. fumigatus* and macrophages.

Keywords *Aspergillus fumigatus* · *Vermamoeba vermiformis* · Free-living amoebae · Macrophages

Introduction

Aspergillus species are saprophytic moulds widely distributed in soil, decaying vegetation, dust, bioaerosols and different aquatic environments, in which they are expected to contribute to the degradation of pollutants (Sammon et al. 2010; Pereira et al. 2013; Pearson et al. 2015; Ma et al. 2015; Oliveira et al. 2015). *Aspergillus fumigatus*, which is responsible for severe pathologies in humans and birds (Van Waeyenberghe et al. 2013), has been isolated from hospital water systems and plumbing drains (Hayette et al. 2010). Showering and other water-related activities appear to be an efficient means of conidial dispersion and transmission to immunocompromised patients, and nosocomial aspergillosis can be airborne from a hospital water source (Anaissie et al. 2003).

Besides fungi, other microorganisms, such as mobile free-living amoebae (FLA), have been found in water and prey on bacteria, algae, fungi, protozoa or other organic particles (Marciano-Cabral and Cabral 2003; Greub and Raoult 2004). *Vermamoeba vermiformis* is one of the most common FLA to have been isolated from different water systems (Rhoads et al. 2015; Montalbano Di Filippo et al. 2015; Lu et al. 2015; Armand et al. 2016). It is also frequently recovered from hospital water networks as shown by several authors (Rohr et al. 1998; Thomas et al. 2006; Ovrutsky et al. 2013; Pagnier et al. 2015). *Acanthamoeba*, another genus of FLA commonly found in soil and water, has, as *V. vermiformis*, a two-staged life cycle: an actively feeding, dividing trophozoite form corresponding to the period of metabolic activity of the amoeba and a dormant cyst that can resist hostile environmental conditions such as nutrient depletion, osmotic stress, temperature changes, pH

✉ Marie-Hélène Rodier
m.h.rodier@chu-poitiers.fr

¹ Ecologie et Biologie des Interactions, UMR CNRS 7267, Equipe Microbiologie de l'Eau, Université de Poitiers, 1 rue Georges Bonnet, 86022 Poitiers Cedex, France
² Laboratoire de parasitologie et mycologie, CHU La Milètrie, 86021 Poitiers Cedex, France
³ Laboratoire d'Anatomic et Cytologie Pathologiques, CHU La Milètrie, 86021 Poitiers Cedex, France

variations and water disinfection (Critchley and Bentham 2009; Fouque et al. 2012). Besides digestion by trophozoites and use of the obtained nutrients, an adaptation to the protistan niche has been described for some bacteria, with survival and sometimes multiplication of ingested microorganisms with or without lysis of amoeba, leading to bacterial protection and colonization of other environments (Thomas and Ashbolt 2011; Cateau et al. 2014a). FLA have also been described as training grounds for pathogenic bacteria, since resistance to FLA would entail resistance to other phagocytes, such as macrophages (Molmeret et al. 2005). Moreover, some pathogens are able to analogously multiply inside macrophages and amoebae (Siddiqui and Khan 2012; Cosson and Lima 2014). Macrophages are described as “professional” phagocytic cells expressing a multitude of receptors (PRRs: Pattern Recognition Receptors, Scavenger receptors) on their surface that are able to detect signals not usually found in healthy tissues. Residing in every tissue of the body, these cells engulf and clear pathogens and have a central role in protecting the host. Concerning *A. fumigatus*, conidia released in the environment are inhaled and reach alveoli where they can be phagocytosed and killed by resident macrophages (Margalit and Kavanagh 2015). This phenomenon may be similar to the one leading to the destruction of some pathogen species by FLA. *Acanthamoeba* has therefore been compared to human macrophages in some structures or behavior, such as surface receptors or phagocytic activity (Yan et al. 2004).

The relationships between FLA and filamentous fungi are not well-known. Yli-Pirilä et al. (2006) have studied FLA and *Penicillium* or *Aspergillus*, in the context of microorganisms isolated from moisture-damaged buildings. Our team has published a study showing that the presence of FLA trophozoites increased the growth of *Fusarium oxysporum*, a filamentous fungus found in soil and water (Cateau et al. 2014b). Recently, Van Waeyenberghe et al. (2013) studied the relationships between *A. fumigatus* and phagocytic cells including *A. castellanii*.

In the current study, we first intended to examine the relationships between *A. fumigatus* and *V. vermiformis* in order to explore the potential effect of these interactions on fungal development. Van Waeyenberghe et al. (2013) have shown that interactions between *A. castellanii* and *A. fumigatus* parallel macrophage-fungus interactions. The second aim was to compare the relationships between this fungus and *V. vermiformis* or other phagocytic cells: *A. castellanii* or THP-1, in order to explore phagocytic cell behaviour in the presence of *A. fumigatus*.

Materials and methods

Organisms and culture media

A. castellanii ATCC 30234 was grown axenically at 27 °C for 5 days in 150-cm² tissue culture flasks containing 25 mL of antibiotic-free peptone-yeast extract-glucose (PYG) broth

(Schuster 2002). *V. vermiformis* ATCC 50256 was grown at 27 °C in cell culture flasks containing 25 mL of PYNFH broth (in 1 L of distilled water: 10 g proteose peptone, 10 g yeast extract, 1 g ribonucleic acid, 15 mg folic acid, 1 mg hemin, 0.2 g Na₂HPO₄·2H₂O, 0.36 g KH₂PO₄ and 100 mL FCS). When cells formed a monolayer, the trophozoites were harvested by tapping the flask sharply to bring them into suspension, and then centrifuged and washed three times in Page’s modified Neff’s amoeba saline (PAS, containing in 1 L of distilled water, 120 mg NaCl, 4 mg MgSO₄·7H₂O, 4 mg CaCl₂·2H₂O, 142 mg Na₂HPO₄ and 36 mg KH₂PO₄) or in hospital tap water.

The human monocytic leukemia cell line, THP-1, was obtained from the American Type Culture Collection and maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 20 U/mL penicillin, 20 µg/mL streptomycin and 10 % (v/v) heat-inactivated FCS. THP-1 monocytes were treated for 24 h with phorbol myristate acetate (PMA) in fresh RPMI 1640 medium with 10 % FCS to induce the differentiation of monocytes into macrophages. Before use, the macrophages were washed twice with RPMI 1640 medium in order to remove PMA.

The *A. fumigatus* strain, isolated from the environment, purchased by the Institut Scientifique de Santé Publique (Brussels, Belgium), was grown on Sabouraud agar medium at 27 °C for 5 days. Blastospores were then harvested in PAS or in hospital tap water, washed twice and suspended in the same medium, after a filtration (70 µm), to remove hyphae.

Coculture experiments

The cocultivation assays of amoebae and *A. fumigatus* were carried out in 24-well microtiter plates in PAS or in hospital tap water as described previously (Cateau et al. 2009). In brief, each amoeba was seeded into plates at a concentration of 5×10^5 trophozoites per well and allowed to adhere to the wells for 2 h at 27 °C. Conidia of *A. fumigatus* were added to amoebae trophozoites at a multiplicity of infection (MOI) of 1 (5×10^5 conidia were added in each well). Incubation was carried out at 27 °C for 48 and 96 h. For experiments carried out with macrophages, RPMI 1640 diluted in PAS (v/v) was used as cocultivation medium (MOI = 1), and incubation took place at 37 °C under 5 % CO₂. For electronic microscopic examination, cocultures were carried out in flasks, using the same concentrations as in wells.

After 48 or 96 h of coculture, the mixture was resuspended, and dilutions of the suspension were plated onto Sabouraud agar plates and incubated at 37 °C during 72 h to count fungal colony-forming units (CFU). Controls were performed by incubating the fungus in PAS or in hospital tap water without amoebae or macrophages. The viability of amoebae and macrophages was determined by evaluation of cell death with trypan blue (0.1 mg/mL) staining. Controls were carried out by incubating amoebae alone in PAS or in hospital tap water.

All the experiments were reproduced three times, each time in triplicate.

Electronic microscopy

Potential internalization of the fungus by *V. vermiformis* was investigated by electron microscopy. After 2 or 48 h, a sample of the coculture was fixed for 1 h in phosphate buffer 0.1 M, containing 4 % glutaraldehyde at 4 °C. Cells were washed four times in PBS and post-fixed with 1 % OsO₄ in phosphate buffer 0.1 M for 1 h at 4 °C. The sample was dehydrated in an acetone series and embedded in araldite resin. Sections were stained with uranyl acetate and lead nitrate before examination with a Jeol 1010 transmission electron microscope.

A. fumigatus and amoebae supernatants

Trophozoites (5×10^5 /mL) of each strain of free-living amoebae were incubated at 27 °C during 72 h in PAS or in hospital tap water. The amoebae were pelleted by centrifugation and conidia of *A. fumigatus* (5×10^5 /mL) were then incubated in the resultant supernatant and in PAS or in hospital water as controls, at 27 °C during 48 and 96 h. Samples of wells corresponding to each incubation time were plated on Sabouraud agar and incubated at 37 °C during 72 h in order to count fungal CFU. The germinative potential of the conidia was also microscopically determined during 24 h of incubation with these supernatants.

Attachment and internalization assays

The assay was similar to the first step of cocultivation experiments. Monolayers of amoebae trophozoites or macrophages were prepared in PAS or in PAS-RPMI 1640 (v/v), respectively. *A. fumigatus* conidia were added with a MOI = 5. These cocultures were then incubated for 15 min, 30 min, 1 h, 2 h and 4 h at 27 °C for amoebae or at 37 °C under 5 % CO₂ for macrophages. Each time, the culture supernatant was discarded, and the wells were washed twice in PAS in order to remove non-adherent conidia. The contents of the wells were then fixed with cold methanol and stained with Giemsa. Two hundred cells by well were observed in order to determine the percentage of (i) adherent conidia and (ii) internalized conidia.

Conidia were also stained with 5 µg/mL CalcoFluor White (CFW) for 30 min at 27 °C. After three washes with PAS, conidia were added to the cells at a MOI = 5. At 15 min, 30 min, 1 h, 2 h and 4 h of incubation, the culture supernatant was discarded, and the wells were washed twice in PAS in order to remove non-adherent conidia. To determine the rate of internalized conidia, we added trypan blue, which is unable to penetrate viable phagocytes, to quench the fluorescence of the non-internalized conidia (Scott and Woods 2000; Dementhon et al. 2012). Each assay was repeated three times.

Attachment inhibitory assays

According to the methods of Medina et al. (2014), monolayers of amoebae trophozoites or THP-1 cells were pretreated with 100 mM glucose, galactose, mannose, or mannane dissolved in PAS for amoebae (or PAS-RPMI 1640 v/v for THP-1 cells) for 90 min at 27 °C for amoebae or at 37 °C under 5 % CO₂ for macrophages. After washing with PAS or PAS-RPMI 1640, *A. fumigatus* conidia at a MOI = 5 were added to the different monolayers and incubated at 27 °C (FLA) or at 37 °C under 5 % CO₂ (macrophages) during 1 h. Wells were washed three times with the appropriate buffer (to remove unattached conidia), and the contents of the wells were plated on Sabouraud agar plates to number fungal CFU. Controls were performed in the same media without sugars.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the non-parametric Wilcoxon test to determine statistical differences between groups.

Results

Coculture of phagocytic cells with *A. fumigatus*

Co-incubation of *A. fumigatus* with *A. castellanii* during 48 or 96 h in PAS or in hospital tap water seemed to have no influence on fungal growth, whereas its co-incubation with *V. vermiformis* led to an increase in *A. fumigatus* growth after 48 h of contact and most of all after 96 h of contact (Fig. 1). Similar results were obtained in hospital tap water (data not shown). In our conditions, the presence of macrophages had no influence on *A. fumigatus* growth (data not shown).

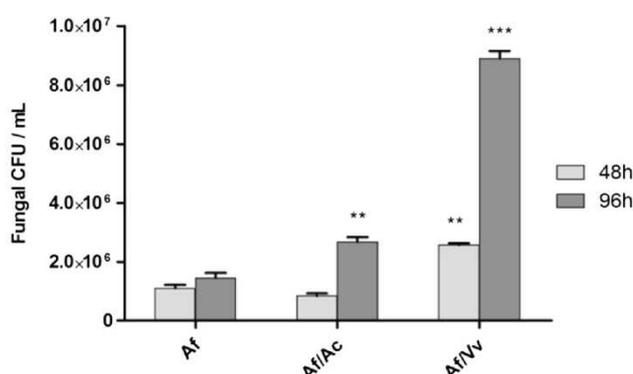


Fig. 1 Viable counts at 48 or 96 h of *A. fumigatus* alone (Af) or in cocultivation with *A. castellanii* (Af/Ac) or *V. vermiformis* (Af/Vv) in PAS. Results obtained in hospital water were similar. All values correspond to mean of nine replicates. Values with stars are significantly different ($p < 0.01$ for ** and $p < 0.001$ for ***)

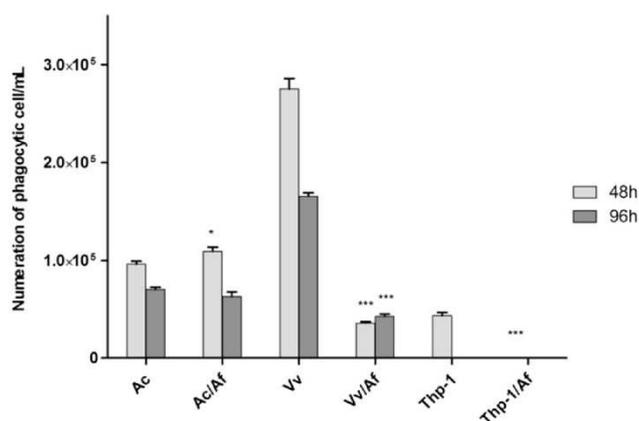
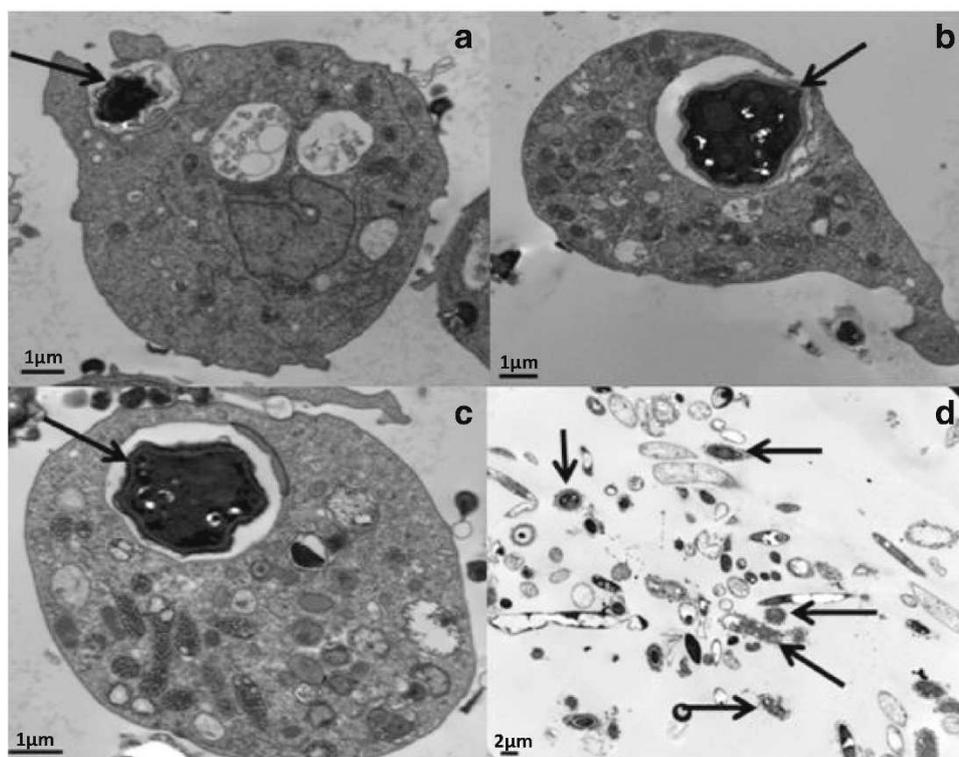


Fig. 2 Influence of *A. fumigatus* (Af) presence, after 48 and 96 h of cocubation in PAS, on phagocytic cell viability: *A. castellanii* (Ac), *V. vermiformis* (Vv) or macrophages (THP1). Similar results were obtained in hospital water. Ac: *A. castellanii* control, Ac/Af: Cocubation *A. castellanii*/*A. fumigatus*, Vv: *V. vermiformis* control, Vv/Af: cocubation *V. vermiformis*/*A. fumigatus*, THP1: THP-1 control, THP1/Af: cocubation THP-1/*A. fumigatus*. All values correspond to mean of nine replicates. Values with stars are significantly different ($p < 0.05$ for * and $p < 0.001$ for ***)

The viability of phagocytic cells was evaluated using trypan blue staining. Concerning *A. castellanii*, after 48 or 96 h of incubation in PAS, with or without *A. fumigatus* conidia, a similar number of viable protozoa were recovered (Fig. 2). Similar results were obtained in hospital tap water (data not shown). On the other hand, in our conditions, the presence of fungal conidia caused a major reduction of the viability of *V. vermiformis*, whatever the duration of incubation.

Fig. 3 Transmission electron microscopy images of *V. vermiformis* amoebae infected by *A. fumigatus*: trophozoite after 2 h of coculture in PAS with internalized conidia (a, b, c) and after 48 h of coculture in PAS: conidia are outside amoebae (d). Fungal elements are indicated by arrows. Scalebar 1 μm a, b, c et 2 μm d



A. fumigatus also had a deleterious effect on macrophage viability after 48 h of cocubation; indeed, no viable macrophages were found after this incubation period. As these cells are fragile, the assay conditions do not allow for persistence of THP-1 cell viability at 96 h, with or without the fungal presence.

Electron microscopy

After 2 h of coculture, results obtained by electron microscopy showed that conidia were internalized in *V. vermiformis* trophozoites (Fig. 3). After 48 h of co-incubation, there was a dramatic decrease in trophozoites, and numerous extracellular fungal elements were noted.

Co-incubation of free-living amoebae supernatant with *A. fumigatus* and influence on fungal germination

After incubation of *A. fumigatus* conidia with FLA supernatant aged 72 h, obtained in PAS or in hospital tap water, it was observed that after 48 h of contact between the fungus and *A. castellanii* supernatant, fungal growth increased compared to the control, whereas it was not maintained after 96 h of contact (Fig. 4). Concerning *V. vermiformis*, it has been shown that *A. fumigatus* growth increased by contact of conidia with trophozoite supernatant during 48 h as well as 96 h, compared to the control (Fig. 4).

Influence of FLA supernatants on conidial germination was studied during the first 24 h of contact. Results were similar for

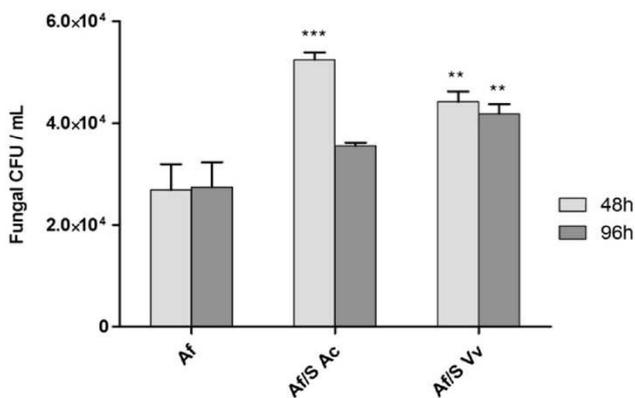


Fig. 4 Influence of 72 h amoebae supernatants obtained from *A. castellanii* (S Ac) or *V. vermiformis* (S Vv) on *A. fumigatus* (Af) growth after 48 or 96 h of incubation in PAS. Similar results were obtained using supernatants obtained in hospital water. Af: *A. fumigatus* control in PAS alone, Af/S Ac: incubation of *A. fumigatus* in *A. castellanii* supernatant, Af/S Vv: incubation of *A. fumigatus* in *V. vermiformis* supernatant. All values correspond to mean of nine replicates. Values with stars are significantly different ($p < 0.01$ for ** and $p < 0.001$ for ***)

both FLA supernatants. Fungal germination started at about 5.5 h, reached 50 % at 6 h and was complete at 13 h (Fig. 5).

Attachment inhibitory assays

The results showed that the presence of glucose, galactose, mannose and mannan had no effect on the fungal attachment to the two FLA studied (data not shown), whereas pre-incubation with mannose and mannan significantly decreased conidial attachment to the macrophagic strain THP-1, thereby indicating the active role of these saccharide receptors in the attachment process (Fig. 6).

Attachment and internalization assays

Fungal attachment to phagocytic cells and fungal internalization were evaluated by Giemsa and CFW staining assays after

Fig. 5 Influence of 72 h amoebae supernatants obtained in PAS from *A. castellanii* (S Ac) or *V. vermiformis* (S Vv) on *A. fumigatus* (Af) germination. Control was carried out in PAS. Similar results were obtained using supernatants obtained in hospital water. Af: *A. fumigatus* control in PAS alone, Af/S Ac: incubation of *A. fumigatus* in *A. castellanii* supernatant, Af/S Vv: incubation of *A. fumigatus* in *V. vermiformis* supernatant. All values correspond to mean of nine replicates

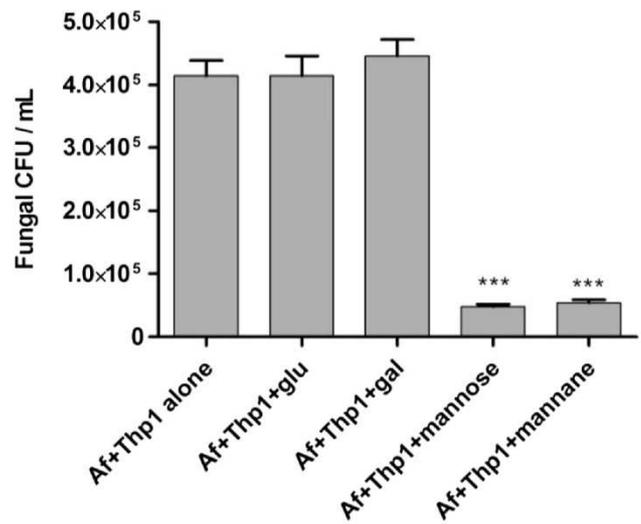
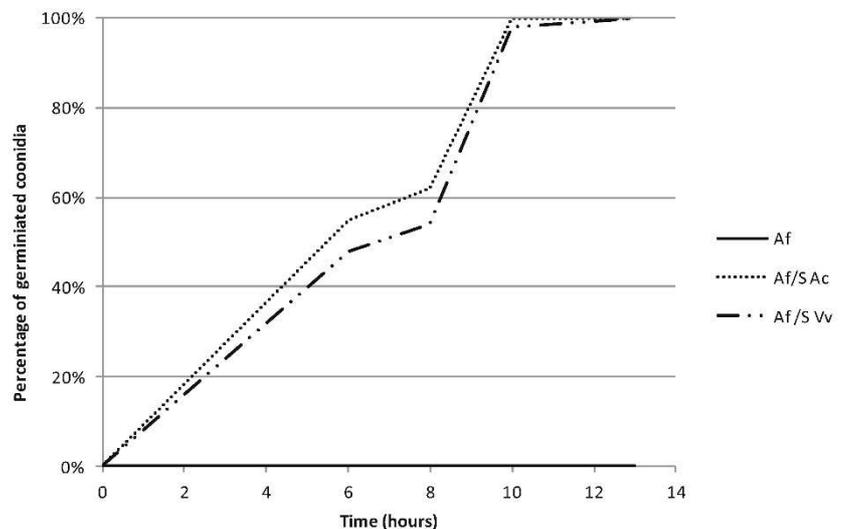


Fig. 6 Numeration of adhered *A. fumigatus* to THP-1 cells without (Af/THP1) or with saccharides (Af/THP1+glucose, Af/THP1+galactose, Af/THP1+mannose, Af/THP1+mannan). All values correspond to mean of nine replicates. Values with stars are significantly different ($p < 0.001$ for ***)

15 min, 30 min, 1 h, 2 h and 4 h of contact. The results of these two stainings were comparable. During the first hour, the adhesion percentage of *A. fumigatus* conidia was higher with *A. castellanii* than with *V. vermiformis* or THP-1 cells. Nevertheless, after 4 h of co-incubation, the percentages of cells with conidia adhering to their surface were similar and involved almost all the cells (Figs. 7 and 8).

Discussion

Most of the studies concerning the relationships between FLA and fungi have involved yeasts. For example, Steenbergen et al. (2001) demonstrated that incubation of *Cryptococcus neoformans* with amoebae results in phagocytosis and

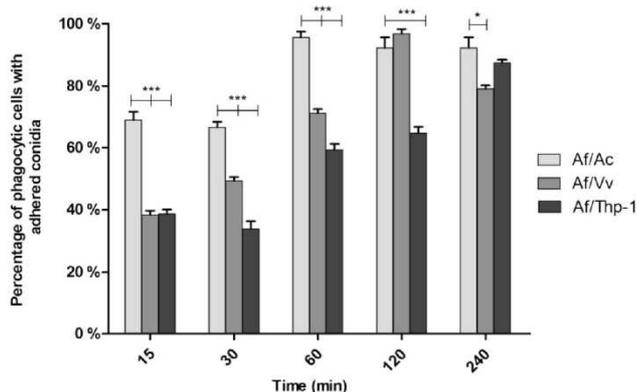


Fig. 7 Percentage of phagocytic cells on which *A. fumigatus* conidia adhered, studied during 4 h. *Ac/Af*: coinubation *A. castellanii*/*A. fumigatus*, *Vv/Af*: Coinubation *V. vermiformis*/*A. fumigatus*, *THP1/Af*: coinubation THP-1/*A. fumigatus*. All values correspond to mean of nine replicates. Values with stars are significantly different ($p < 0.05$ for * and $p < 0.001$ for ***)

replication of fungal cells. In a study with dimorphic fungi, exposure of yeasts to *A. castellanii* resulted in an increase in fungal cells (Steenbergen et al. 2004). More recently, it was shown that unlike *A. castellanii*, *V. vermiformis* enhances *C. albicans* growth (Vanessa et al. 2012). The same conclusions can be made in our study which showed increased growth of *A. fumigatus*, influenced only by the presence of *V. vermiformis*. The positive effect of *V. vermiformis* on *A. fumigatus* growth is in accordance with studies concerning the influence of FLA on bacterial growth, some of these known as Amoeba Resisting Bacteria (Greub and Raoult 2004). As a result, the simultaneous presence of *V. vermiformis* and *A. fumigatus* in the same environments can lead to increased fungal population. Some authors have reported that *V. vermiformis* is frequently recovered

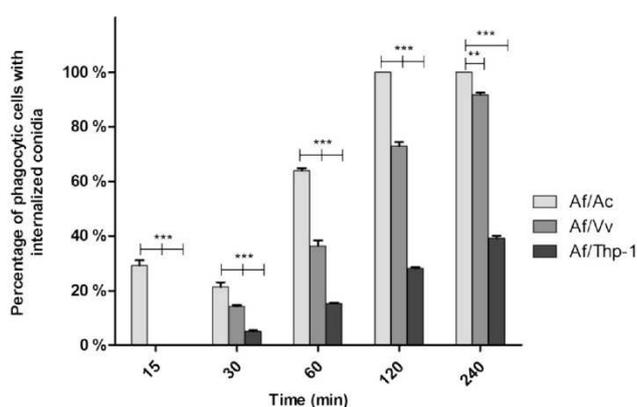


Fig. 8 Percentage of phagocytic cells in which *A. fumigatus* conidia were internalized, studied during 4 h. *Ac/Af*: coinubation *A. castellanii*/*A. fumigatus*, *Vv/Af*: coinubation *V. vermiformis*/*A. fumigatus*, *THP1/Af*: coinubation THP-1/*A. fumigatus*. All values correspond to mean of nine replicates. Values with stars are significantly different ($p < 0.01$ for ** and $p < 0.001$ for ***)

from drinking water or hospital water (Rohr et al. 1998; Thomas et al. 2006; Loret and Greub 2010; Pagnier et al. 2015). In an Australian report on microfungal contaminants in municipal water, *Aspergillus* was the third genus recovered in the water samples (Sammon et al. 2010). Moreover, the *A. fumigatus* species has been found in hospital water samples (Araujo et al. 2010; Hayette et al. 2010). Consequently, as water-related activities could be a route of fungal transmission to the immunocompromised host (Anaissie et al. 2002; Sammon et al. 2011), the presence of *V. vermiformis* and *A. fumigatus* in hospital water could lead to an increase of nosocomial infections by this fungus.

From an ecological point of view, FLA and *A. fumigatus* have been found together in the rhizosphere of plants (Gugnani 2003; Rosenberg et al. 2009; Koller et al. 2013), and their interactions in the same habitat could promote fungal development and mycotoxin production with a potential impact on animal food contamination (Lee and Ryu 2015). These relations could also be compared to the mycorrhizosphere of ericaceous plants in which amoebae may be exploited by mycorrhizal fungi as a nutrient source (Vohník et al. 2009).

Some studies have shown that the ingestion of microorganisms, such as yeasts or bacteria by *A. castellanii*, could cause the lysis of amoebae (Steenbergen et al. 2001; Anacarso et al. 2010). In a previous work, we found that FLA viability was not influenced by the presence of *Fusarium oxysporum*, another filamentous fungus (Cateau et al. 2014b). Our results are similar to those of Hobson et al. (2000) who reported no effect of *A. fumigatus* diffusates on *A. castellanii*. However, they are not in accordance with those of Van Waeyenberghe et al. (2013), who used a rich medium and a high temperature for their cocultivation test. Our results concerning *V. vermiformis* viability, in accordance with the data of electronic microscopy, could be compared with those of Steenbergen et al. (2001) in which *C. neoformans* growth was associated with killing of amoebae, which presumably released nutrients that can sustain fungal replication. Viability of *V. vermiformis* or THP-1 cells is thereby decreased by the presence of *A. fumigatus*. After incubation with *A. fumigatus*, the discrepancies between viabilities of *A. castellanii* and the two other phagocytic strains used in this study could be explained by differences in the composition of their cell wall.

Van Waeyenberghe et al. (2012) have reported damage to avian macrophages by a gliotoxin potentially elicited by *A. fumigatus*. This toxin has also been described as responsible for cell death in murine macrophages (Watanabe et al. 2004). More recently, Hillmann et al. (2015) confirmed that gliotoxin is the major *A. fumigatus* factor able to kill the amoeba *Dictyostelium discoideum*, both found in the soil, allowing for fungal protection against amoeba predation. Other immunoevasive *A. fumigatus* mechanisms and mycotoxins have also been described (Chotirmall et al. 2014), such as tryptacidin, which interferes with the active process of phagocytosis in

macrophages and amoebae (Mattern et al. 2015). Our results have to be completed in further studies to know which components could be involved in the fungal toxicity against *V. vermiformis*.

During co-incubation of *A. fumigatus* with FLA supernatants, both were able to increase germination and fungal growth during the first hours of contact. We speculated that in PAS or in water, FLA could release compounds that may be consumed by the fungus for enhanced germination and growth. This implies that when *A. fumigatus* cohabits with FLA, no matter that there is no nutrient in this environment, as in water for example, FLA release compounds able to enhance *Aspergillus* growth. Besides being a Trojan horse for numbers of microorganisms (Cateau et al. 2014a) and a training ground for *Aspergillus* (Van Waeyenberghe et al. 2013), FLA could play a role in the persistence of this filamentous fungus in a common environment, perhaps through production of metabolites used as nutrients by the fungus.

In the attachment inhibitory assays, we show that mannose plays a role in attachment to THP-1 cells, but not to FLA. However, some authors have reported the implication of mannose-binding proteins (Alsam et al. 2005) and/or membrane-associated receptors of glucose or galactose in the attachment of bacteria or yeasts to *A. castellanii* (Declercq et al. 2007; Medina et al. 2014). Under the conditions in the current study, the addition of mannose or mannan had an effect on conidial uptake by the macrophagic cells only, indicating the active role of these saccharide receptors in the attachment process. In contrast with some studies concerning bacterial uptake by *A. castellanii* (Alsam et al. 2005), exogenous mannose did not block fungal phagocytosis. It can therefore be hypothesized that other receptors are involved in the fungal uptake by the tested FLA. Indeed, it is known that in amoebae, several receptors can be involved in microorganism uptake: carbohydrate binding protein(s), potential scavenger receptors and other putative membrane proteins (Salvatore Bozzaro 2008) and that uptake is a complex process with two distinct pathways to ingest particles, a non-specific and a specific receptor-mediated mechanism (Alsam et al. 2005).

The fact that during the first hour of the attachment assay, the percentage of adhered conidia was higher with *A. castellanii* could be explained by the presence of different cell receptors or a different kinetic adhesion between this FLA and *V. vermiformis* or THP-1 cells. Furthermore, after 4 h, our results indicated the potential saturation of the different cell receptors implicated in the uptake of *A. fumigatus*.

Concerning internalization, during the first hour of the assay, the percentage of *V. vermiformis* that internalized conidia, lower than that of *A. castellanii*, is in agreement with the results of attachment assays, but after 4 h of incubation, the percentages for the two FLA strains are comparable (between 90 and 100 %). However, a major difference can be noted with the conidial internalization by the THP-1 cells which reaches

only 40 % after 4 h of co-incubation. Kraibooj et al. (2015) have reported that phagocytosis of *A. fumigatus* by macrophagic cells could reach 40 % after 1 h of co-incubation, but these authors used a MOI > 5 and a rich medium. Phagocytosis could even reach 100 % after 3 h of incubation when the assay is carried out in medium with serum containing components that can enhance the cell response toward the fungus (Slesiona et al. 2012). On the other hand, Van Waeyenberghe et al. (2013) have shown that pigeon respiratory macrophages exhibited a moderate phagocytic capacity in the first post-incubation hours.

Indeed, internalization seems to depend on the different conditions used in the studies: media, strains or MOI. In the current study, the tested phagocytic strains were all able to internalize *A. fumigatus* conidia to varying degrees.

In conclusion, this study has demonstrated for the first time that the presence of *V. vermiformis* or its released compounds could enhance *A. fumigatus* growth in aquatic environments. Regarding the high mortality linked to *A. fumigatus* infections in immunocompromised patients (Pagano et al. 2011), these data could be relevant to control FLA presence in hospital water networks. We also reported fungal toxicity for *V. vermiformis*, and metabolites responsible for this toxicity need to be highlighted in complementary studies. Other habitats, such as soil, could be affected by amoebal behaviour in contact with *A. fumigatus*.

We have also studied the behavior of macrophagic strains with *A. fumigatus*: conidia are able to adhere to the three cell types used, with almost the same percentages, even if it seems that they do not use the same receptors. The percentages of internalization are similar for the two FLA, but the lower percentage of internalization in THP-1 cells could be explained by the insufficient quality of the medium used in the study. Van Waeyenberghe et al. (2013) have published that the interaction of *A. fumigatus* with *A. castellanii* parallels macrophage-fungus interactions. However, the differences in conidial uptake and internalization between FLA and macrophagic cells found in our study show that the results of studies using amoeboid model systems should be interpreted with caution regarding their extrapolation to pathogen-macrophage relationships.

Acknowledgments The authors are grateful to Jeffrey Arsham for revising the English text.

References

- Alsam S, Sissons J, Dudley R, Khan NA (2005) Mechanisms associated with *Acanthamoeba castellanii* (T4) phagocytosis. Parasitol Res 96: 402–409. doi:10.1007/s00436-005-1401-z
- Anacarso I, Guerrieri E, Bondi M, de Niederhäusern S, Iseppi R, Sabia C, Contri M, Borella P, Messi P (2010) Influence of *Legionella pneumophila* and other water bacteria on the survival and growth

- of *Acanthamoeba polyphaga*. Arch Microbiol 192:877–882. doi:10.1007/s00203-010-0618-0
- Anaissie EJ, Stratton SL, Dignani MC, Lee CK, Mahfouz TH, Rex JH, Summerbell RC, Walsh TJ (2002) Cleaning patient shower facilities: a novel approach to reducing patient exposure to aerosolized *Aspergillus* species and other opportunistic molds. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am 35:E86–E88. doi:10.1086/342305
- Anaissie EJ, Stratton SL, Dignani MC, Lee CK, Summerbell RC, Rex JH, Monson TP, Walsh TJ (2003) Pathogenic molds (including *Aspergillus* species) in hospital water distribution systems: a 3-year prospective study and clinical implications for patients with hematologic malignancies. Blood 101:2542–2546. doi:10.1182/blood-2002-02-0530
- Araujo R, Amorim A, Gusmão L (2010) Genetic diversity of *Aspergillus fumigatus* in indoor hospital environments. Med Mycol 48:832–838. doi:10.3109/13693780903575360
- Armand B, Motazedian MH, Asgari Q (2016) Isolation and identification of pathogenic free-living amoeba from surface and tap water of Shiraz City using morphological and molecular methods. Parasitol Res 115:63–68. doi:10.1007/s00436-015-4721-7
- Cateau E, Mergey T, Kauffmann-Lacroix C, Rodier MH (2009) Relationships between free living amoebae and *Exophiala dermatitidis*: a preliminary study. Med Mycol 47:115–118
- Cateau E, Delafont V, Hechard Y, Rodier MH (2014a) Free-living amoebae: what part do they play in healthcare-associated infections? J Hosp Infect 87:131–140. doi:10.1016/j.jhin.2014.05.001
- Cateau E, Hechard Y, Fernandez B, Rodier MH (2014b) Free living amoebae could enhance *Fusarium oxysporum* growth. Fungal Ecol 8:12–17. doi:10.1016/j.funeco.2013.12.006
- Chotirmall SH, Mirkovic B, Lavelle GM, McElvancy NG (2014) Immunoevasive *Aspergillus* virulence factors. Mycopathologia 178:363–370. doi:10.1007/s11046-014-9768-y
- Cosson P, Lima WC (2014) Intracellular killing of bacteria: is *Dictyostelium* a model macrophage or an alien? Cell Microbiol 16:816–823. doi:10.1111/cmi.12291
- Critchley M, Bentham R (2009) The efficacy of biocides and other chemical additives in cooling water systems in the control of amoebae. J Appl Microbiol 106:784–789. doi:10.1111/j.1365-2672.2008.04044.x
- Declercq P, Behets J, De Keersmaecker B, Ollevier F (2007) Receptor-mediated uptake of *Legionella pneumophila* by *Acanthamoeba castellanii* and *Naegleria lovaniensis*. J Appl Microbiol 103:2697–2703. doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03530.x
- Dementhon K, El-Kirat-Chatel S, Noël T (2012) Development of an in vitro model for the multi-parametric quantification of the cellular interactions between *Candida* yeasts and phagocytes. PLoS One 7:e32621. doi:10.1371/journal.pone.0032621
- Fouque E, Trouille M-C, Thomas V, Hartemann P, Rodier MH, Héchard Y (2012) Cellular, Biochemical, and Molecular Changes during Encystment of Free-Living Amoebae. Eukaryot Cell 11:382–387. doi:10.1128/EC.05301-11
- Greub G, Raoult D (2004) Microorganisms resistant to free-living amoebae. Clin Microbiol Rev 17:413–433
- Gugnani HC (2003) Ecology and taxonomy of pathogenic aspergilli. Front Biosci J Virtual Libr 8:s346–s357
- Hayette M-P, Christiaens G, Mutsers J, Barbier C, Huynen P, Melin P, de Mol P (2010) Filamentous fungi recovered from the water distribution system of a Belgian university hospital. Med Mycol 48:969–974. doi:10.3109/13693781003639601
- Hillmann F, Novohradská S, Mattern DJ, Forberger T, Heinekamp T, Westermann M, Winckler T, Brakhage AA (2015) Virulence determinants of the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* protect against soil amoeba predation. Environ Microbiol 17:2858–2869. doi:10.1111/1462-2920.12808
- Hobson RP (2000) The effects of diffusates from the spores of *Aspergillus fumigatus* and *A. terreus* on human neutrophils, *Naegleria gruberi* and *Acanthamoeba castellanii*. Med Mycol 38:133–141
- Koller R, Robin C, Bonkowski M, Ruess L, Scheu S (2013) Litter quality as driving factor for plant nutrition via grazing of protozoa on soil microorganisms. FEMS Microbiol Ecol 85:241–250. doi:10.1111/1574-6941.12113
- Kraibooj K, Schoeler H, Svensson C-M, Brakhage AA, Fligge MT (2015) Automated quantification of the phagocytosis of *Aspergillus fumigatus* conidia by a novel image analysis algorithm. Front Microbiol 6:549. doi:10.3389/fmicb.2015.00549
- Lee HJ, Ryu D (2015) Advances in Mycotoxin Research: Public Health Perspectives. J Food Sci. doi:10.1111/1750-3841.13156
- Loret J-F, Greub G (2010) Free-living amoebae: Biological by-passes in water treatment. Int J Hyg Environ Health 213:167–175. doi:10.1016/j.ijheh.2010.03.004
- Lu J, Strucwing I, Vrcen E, Kirby AE, Levy K, Moc C, Ashbolt N (2015) Molecular Detection of *Legionella* spp. and their associations with *Mycobacterium* spp., *Pseudomonas aeruginosa* and amoeba hosts in a drinking water distribution system. J Appl Microbiol. doi: 10.1111/jam.12996
- Ma X, Baron JL, Vikram A, Stout JE, Bibby K (2015) Fungal diversity and presence of potentially pathogenic fungi in a hospital hot water system treated with on-site monochloramine. Water Res 71:197–206. doi:10.1016/j.watres.2014.12.052
- Marciano-Cabral F, Cabral G (2003) *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. Clin Microbiol Rev 16:273–307
- Margalit A, Kavanagh K (2015) The innate immune response to *Aspergillus fumigatus* at the alveolar surface. FEMS Microbiol Rev 39:670–687. doi:10.1093/femsr/ufv018
- Mattern DJ, Schoeler H, Weber J, Novohradská S, Kraibooj K, Dahse HM, Hillmann F, Valiante V, Figge MT, Brakhage AA (2015) Identification of the antiphagocytic tryptacidin gene cluster in the human-pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. Appl Microbiol Biotechnol 99:10151–10161. doi:10.1007/s00253-015-6898-1
- Medina G, Flores-Martin S, Fonseca B, Oth C, Fernandez H (2014) Mechanisms associated with phagocytosis of *Arcobacter butzleri* by *Acanthamoeba castellanii*. Parasitol Res 113:1933–1942. doi:10.1007/s00436-014-3842-8
- Molmeret M, Horn M, Wagner M, Santic M, Abu Kwaik Y (2005) Amoebae as training grounds for intracellular bacterial pathogens. Appl Environ Microbiol 71:20–28
- Montalbano Di Filippo M, Santoro M, Lovreglio P, Monno R, Capolongo C, Calia C, Fumarola L, D'Alfonso R, Berrilli F, Di Cave D (2015) Isolation and molecular characterization of free-living amoebae from different water sources in Italy. Int J Environ Res Public Health 12:3417–3427. doi:10.3390/ijerph120403417
- Oliveira BR, Penetra A, Cardoso VV, Benoliel MJ, Barreto Crespo MT, Samson RA, Pereira VJ (2015) Biodegradation of pesticides using fungi species found in the aquatic environment. Environ Sci Pollut Res Int 22:11781–11791. doi:10.1007/s11356-015-4472-0
- Ovrutsky AR, Chan ED, Kartalija M, Bai X, Jackson M, Gibbs S, Falkinham JO 3rd, Iseman MD, Reynolds PR, McDonnell G, Thomas V (2013) Co-occurrence of free-living amoebae and nontuberculous Mycobacteria in hospital water networks, and preferential growth of *Mycobacterium avium* in *Acanthamoeba lenticulata*. Appl Environ Microbiol 79:3185–3192. doi:10.1128/AEM.03823-12
- Pagano L, Akova M, Dimopoulos G, Herbrecht R, Drgona L, Blijlvens N (2011) Risk assessment and prognostic factors for mould-related diseases in immunocompromised patients. J Antimicrob Chemother 66(Suppl 1):i5–i14. doi:10.1093/jac/dkq437
- Pagnier I, Valles C, Raoult D, La Scola B (2015) Isolation of *Vermamoeba vermiformis* and associated bacteria in hospital water. Microb Pathog 80:14–20. doi:10.1016/j.micpath.2015.02.006
- Pearson C, Littlewood E, Douglas P, Robertson S, Gant TW, Hansell AL (2015) Exposures and health outcomes in relation to bioaerosol emissions from composting facilities: a systematic review of occupational and community studies. J Toxicol Environ Health B Crit Rev 18:43–69. doi:10.1080/10937404.2015.1009961

- Pereira VJ, Marques R, Marques M, Benoliel MJ, Barreto Crespo MT (2013) Free chlorine inactivation of fungi in drinking water sources. *Water Res* 47:517–523. doi:10.1016/j.watres.2012.09.052
- Rhoads WJ, Ji P, Pruden A, Edwards MA (2015) Water heater temperature set point and water use patterns influence *Legionella pneumophila* and associated microorganisms at the tap. *Microbiome* 3:67. doi:10.1186/s40168-015-0134-1
- Rohr U, Weber S, Michel R, Selenka F, Wilhelm M (1998) Comparison of free-living amoebae in hot water systems of hospitals with isolates from moist sanitary areas by identifying genera and determining temperature tolerance. *Appl Environ Microbiol* 64:1822–1824
- Rosenberg K, Bertaux J, Kromc K, Hartmann A, Scheu S, Bonkowski M (2009) Soil amoebae rapidly change bacterial community composition in the rhizosphere of *Arabidopsis thaliana*. *ISME J* 3:675–684. doi:10.1038/ismej.2009.11
- Salvatore Bozzaro CB (2008) Chapter 6 Phagocytosis and Host-Pathogen Interactions in *Dictyostelium* with a Look at Macrophages. *Int Rev Cell Mol Biol* 271:253–300. doi:10.1016/S1937-6448(08)01206-9
- Sammon NB, Harrower KM, Fabbro LD, Reed RH (2010) Incidence and distribution of microfungi in a treated municipal water supply system in sub-tropical Australia. *Int J Environ Res Public Health* 7:1597–1611. doi:10.3390/ijerph7041597
- Sammon NB, Harrower KM, Fabbro LD, Reed RH (2011) Three potential sources of microfungi in a treated municipal water supply system in sub-tropical Australia. *Int J Environ Res Public Health* 8:713–732. doi:10.3390/ijerph8030713
- Schuster FL (2002) Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amoebae. *Clin Microbiol Rev* 15:342–354
- Scott AJ, Woods JP (2000) Monitoring internalization of *Histoplasma capsulatum* by mammalian cell lines using a fluorometric microplate assay. *Med Mycol* 38:15–22
- Siddiqui R, Khan NA (2012) *Acanthamoeba* is an evolutionary ancestor of macrophages: a myth or reality? *Exp Parasitol* 130:95–97. doi:10.1016/j.exppara.2011.11.005
- Slesiona S, Gressler M, Mihlan M, Zachle C, Schaller M, Barz D, Hube B, Jacobsen ID, Brock M (2012) Persistence versus escape: *Aspergillus terreus* and *Aspergillus fumigatus* employ different strategies during interactions with macrophages. *PLoS One* 7:e31223. doi:10.1371/journal.pone.0031223
- Steenbergen JN, Shuman HA, Casadevall A (2001) *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:15245–15250
- Steenbergen JN, Nosanchuk JD, Malliaris SD, Casadevall A (2004) Interaction of *Blastomyces dermatitidis*, *Sporothrix schenckii*, and *Histoplasma capsulatum* with *Acanthamoeba castellanii*. *Infect Immun* 72:3478–3488. doi:10.1128/IAI.72.6.3478-3488.2004
- Thomas JM, Ashbolt NJ (2011) Do free-living amoebae in treated drinking water systems present an emerging health risk? *Environ Sci Technol* 45:860–869. doi:10.1021/es102876y
- Thomas V, Herrera-Rimann K, Blanc DS, Greub G (2006) Biodiversity of amoebae and amoeba-resisting bacteria in a hospital water network. *Appl Environ Microbiol* 72:2428–2438
- Van Wacyenberghe L, Pasmans F, D'Herde K, Ducatelle R, Favoreel H, Li SJ, Haesebrouck F, Martel A (2012) Germination of *Aspergillus fumigatus* inside avian respiratory macrophages is associated with cytotoxicity. *Vet Res* 43:32. doi:10.1186/1297-9716-43-32
- Van Waeyenberghe L, Baré J, Pasmans F, Claeys M, Bert W, Haesebrouck F, Houf K, Martel A (2013) Interaction of *Aspergillus fumigatus* conidia with *Acanthamoeba castellanii* parallels macrophage–fungus interactions. *Environ Microbiol Rep* 5:819–824. doi:10.1111/1758-2229.12082
- Vanessa B, Virginie M, Nathalie Q, Marie-Hélène R, Christine I (2012) *Hartmannella vermiformis* can promote proliferation of *Candida spp.* in tap-water. *Water Res* 46:5707–5714. doi:10.1016/j.watres.2012.07.054
- Vohnik M, Burdiková Z, Albrechtová J, Vosátka M (2009) Testate amoebae (*Arcellinida* and *Euglyphida*) vs. *Ericoid mycorrhizal* and DSE fungi: a possible novel interaction in the mycorrhizosphere of cricaceous plants? *Microb Ecol* 57:203–214. doi:10.1007/s00248-008-9402-y
- Watanabe A, Kamei K, Sekine T, Higurashi H, Hashimoto Y, Ochiai E, Nishimura K (2004) Cytotoxic substances from *Aspergillus fumigatus* in oxygenated or poorly oxygenated environment. *Mycopathologia* 158:1–7
- Yan L, Cerny RL, Cirillo JD (2004) Evidence that hsp90 is involved in the altered interactions of *Acanthamoeba castellanii* variants with bacteria. *Eukaryot Cell* 3:567–578. doi:10.1128/EC.3.3.567-578.2004
- Yli-Pirilä T, Kusnetsov J, Hirvonen M-R, Seuri M, Nevalainen A (2006) Effects of amoebae on the growth of microbes isolated from moisture-damaged buildings. *Can J Microbiol* 52:383–390. doi:10.1139/w05-131

2.4. Etude des interactions entre adénovirus et cellules phagocytaires

2.4.1. Article 3 : Comparative study of human adenovirus replication in *Acanthamoeba castellanii* and Thp-1 macrophagic cells

L'article 3 présenté ci-dessous a été soumis à la revue "Cellular Microbiology".

Les adénovirus sont des virus principalement responsables d'infections respiratoires et de gastroentérites. Ce sont des virus non enveloppés ce qui leur permet de survivre dans l'environnement, où ils peuvent être en contact avec des amibes libres. Lors d'une infection, ces virus peuvent interagir également avec les macrophages. Le but de cette étude a été d'étudier et de comparer les relations entre les adénovirus et les cellules phagocytaires *A. castellanii* et les macrophages Thp-1.

La quantification de l'ADN viral par PCR quantitative a été réalisée après des cocultures *A. castellanii* / adénovirus. En présence d'*A. castellanii*, la quantité d'ADN viral est resté stable au cours du temps. A l'inverse, en présence des macrophages, la quantité d'ADN a augmenté au cours des 72 h de co-culture. Ces premiers résultats suggèrent une multiplication du virus dans les macrophages, mais pas dans les amibes *A. castellanii*. En outre, lors de ces co-cultures, la présence du virus a provoqué une lyse des macrophages, mais n'a pas affecté pas la viabilité amibienne.

L'immunofluorescence nous a permis de visualiser les adénovirus dans les cellules phagocytaires. Une augmentation du nombre de virus dans les macrophages a été rapportée à partir de 24 h de co-culture. En présence d'*A. castellanii*, les virus sont également internalisés, mais sans augmentation de la fluorescence au cours du temps. Les images de microscopie

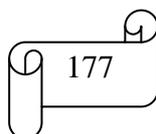
électronique à transmission confirment ces résultats et ceux de la qPCR en montrant une multiplication des adénovirus uniquement dans les cellules Thp-1, mais pas dans les amibes.

Cette étude a ainsi montré des différences dans l'internalisation, la multiplication du virus et leur conséquence pour la cellule, entre *A. castellanii* et les macrophages Thp-1, démontrant que les résultats d'expérimentations obtenus avec les amibes ne devraient pas être extrapolés aux relations entre les adénovirus et les macrophages.

ARTICLE 3

Comparative study of human adenovirus replication in *Acanthamoeba castellanii* and Thp-1 macrophagic cells

“Cellular microbiology”



**Comparative study of human adenovirus replication in *Acanthamoeba castellanii* and
Thp-1 macrophagic cells**

Elodie Maisonneuve,¹ Estelle Cateau,^{1,2} Nicolas Leveque,^{3,4} Sihem Kaaki,⁵ Agnes Beby-Defaux,³ Marie-Helene Rodier^{1,2}

1 Laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions, Equipe Microbiologie de l'Eau, UMR CNRS 7267, Université de Poitiers, 86000 Poitiers, France

2 Laboratoire de parasitologie et mycologie médicale, CHU La Milètrie, 2, rue de la Milètrie, BP 577, 86021 Poitiers Cedex, France

3 Laboratoire de virologie et mycobactériologie, CHU La Milètrie, 2, rue de la Milètrie, BP 577, 86021 Poitiers Cedex, France

4 Laboratoire Inflammation, Tissus Epithéliaux et Cytokines, EA 4331, Université de Poitiers, 86000 Poitiers, France

5 Unité de pathologie ultrastructurale et expérimentale, Laboratoire d'anatomie et cytologie pathologiques, CHU la Milètrie, 2, rue de la Milètrie, BP 577, 86021 Poitiers Cedex, France

* Corresponding author: Laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions, Equipe Microbiologie de l'Eau, Université de Poitiers, UMR CNRS 7267, F-86073 Poitiers, France.
Tel: +33549444769 , Fax: +33549443908 E-mail adress : elodie.maisonneuve@univ-poitiers.fr (E. Maisonneuve)

Summary

Free living amoebae (FLA) including *Acanthamoeba castellanii*, are protozoae that feed on different microorganisms including viruses. These cells show remarkable similarities with macrophages in cellular structures, physiology or ability to phagocyte preys, and some authors have therefore wondered whether *Acanthamoeba* and macrophages are evolutionary related. It has been considered that this amoeba may be an *in vitro* model to investigate relationships between pathogens and macrophagic cells. So, we intended in this study to compare the interactions between a human adenovirus strain and *A. castellanii* or Thp-1 macrophagic cells. The results of molecular and microscopical techniques following co-cultures experiments have shown that the presence of the adenovirus decreased the viability of macrophages, while it has no effect on amoebic viability. On another hand, the viral replication occurred only in macrophages. These results showed that this amoebal model is not relevant to explore the relationships between adenoviruses and macrophages in *in vitro* experiments.

Keywords: *Acanthamoeba castellanii*, Adenovirus, macrophages, interactions

Introduction

Adenovirus are viruses infecting a broad range of hosts from birds to fish. Human adenovirus (HAdV) have been isolated for the first time by Rowe in 1953, in a sample of amygdala and respiratory secretions (Rowe et al., 1953). They are nonenveloped viruses, constituted of an icosahedral capsid enclosing a double-stranded DNA genome of approximately 36,000 base pairs (Russell, 2000). Resistant in external environment due to the absence of envelope, HAdV can be transmitted via the feco-oral route with a direct or indirect transmission, when the water is contaminated (Waye and Sing, 2010). HAdV can thus be used to monitor the foecal contamination, so the virological quality of water (Rames et al., 2016). They are also responsible for a wide range of human pathologies according to their serotype. For example, HAdV41 detected in wastewater and surface water is a leading cause of childhood gastroenteritis (Rames et al., 2016). Pathologies also commonly encountered are respiratory infections as well as eye infections (Toth et al., 2008; Jhanji et al., 2015; Tan et al., 2016). In order to replicate, HAdV need a host cell in which the viral cycle may occur, generally leading to cell lysis.

In hydric environment, HAdV are mixed with other microorganisms as Free-Living Amoebae (FLA). FLA are ubiquitous protozoa, capable of feeding and prey bacteria, fungi, viruses or protozoa (Bowers, 1977 ; Marciano-Cabral and Cabral, 2003 ; Greub and Raoult, 2004 ; Delafont et al., 2013). Among the environmental FLA, the genus *Acanthamoeba* is particularly represented. These amoebae are known for their capacity to serve as a reservoir for multiplication but also for the dissemination of some pathogenic bacteria and viruses (Greub and Raoult, 2004). Among amoeba-resistant viruses, Mimivirus is a giant virus that causes respiratory infections and is able to develop and multiply in FLA of the genus *Acanthamoeba* (La Scola et al., 2008).

However, the relationships between FLA and HAdV are not well known. In 2007, Lorenzo-Morales showed the presence of HAdV in *Acanthamoeba* strains genotype T3, T4, et T7 (Lorenzo-Morales et al., 2007). More recently, it has been shown that HAdV do not replicate in *Acanthamoeba* despite their presence in the amoeba cytoplasm (Scheid and Schwarzenberger, 2012). Overall, the role of FLA in HAdV persistence in hydric environment should be further clarified.

Given their ability to phagocyte microorganisms and the fact that some pathogens can resist to destruction by FLA, these protozoa have been regularly compared to macrophages (Siddiqui and Khan, 2012; Cosson and Lima, 2014) which are professional phagocytic cells participating in innate immunity and whose main role is to phagocyte microorganisms as well as cellular debris. Some authors have therefore wondered whether this amoeba may represent an in vitro model to investigate relationships between pathogens and macrophagic cells.

In this context, the first objective of this study was to assess permissivity of *A. castellanii* to entry and replication of a HAdV strain isolated from a clinical sample. The second objective of our work was then to compare the biology of HAdV in *A. castellanii* with that in Thp-1 macrophagic cells to investigate the use of *Acanthamoeba castellanii* as a relevant model of study of interplay between pathogens and macrophagic cells.

Materials and methods

Organisms and culture media

The Adenovirus serotype B3 strain used in this study has been isolated from an eye swab of a patient suffering from keratitis and serotyped by serum neutralization assay (French National Reference Center for enterovirus and parechovirus, Lyon, France). The virus was propagated and titrated with the TCID50 assay protocol on Hep2 cells in DMEM medium supplemented

with 10 % heat-inactivated fetal bovine serum, 1% streptomycin and 1% penicillin at 37°C in the presence of 5% CO₂ for 5 days.

A. castellanii ATCC 30234 was grown in 150 cm² tissue culture flasks in PYG broth at 27°C (Schuster, 2002). When cells formed a monolayer, the trophozoites were harvested by tapping the flasks and washed three times in Page's modified Neff's amoeba saline (PAS, containing in 1 L of distilled water, 120 mg NaCl, 4 mg MgSO₄.7H₂O, 4 mg CaCl₂.2H₂O, 142 mg Na₂HPO₄ and 36 mg KH₂PO₄).

Thp-1 macrophage cell line was maintained in RPMI-1640 supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 1% streptomycin and 1% penicillin at 37°C in the presence of 5% CO₂. Thp-1 cells were differentiated for 72h with 50 ng/mL of phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) in fresh RPMI 1640 medium with 10% FBS. Before use, the macrophages were washed twice with RPMI 1640 medium in order to remove PMA.

Co-culture experiments

Twentyfour-well plates were seeded with one µL of the amoebic trophozoite or macrophage suspension (containing 1.10⁵ cells) in PAS containing 10% RPMI (PAS-RPMI). The amoebic trophozoites and the macrophages were allowed to adhere to the wells for 2 hours at 27°C for amoebae or at 37°C under 5% CO₂ for macrophages. A hundred µL of the viral suspension at 1.10⁵ TCID₅₀/mL were added in each well (Multiplicity Of Infection of 0.1). Incubation was then carried out during 24, 48, 72 and 96 h at 27°C for amoebae or at 37°C under 5% CO₂ for macrophages. Controls were realised with viruses alone, without amoebae or macrophages. Microscopical examination of the co-cultures using trypan blue (0.1mg/mL) staining was also carried out in order to determine the viability of the phagocytic cells.

All experiments have been reproduced three times, each time in triplicate.

qPCR assays

Replication of viral DNA was monitored in each co-culture experiment and in each control at 24, 48, 72 and 96 h post-infection by real-time quantitative PCR assay. Total DNA was extracted separately from 200 μ L of the cell supernatant and from the cell pellet obtained after centrifugation at 500g during 7 min of the amoebic trophozoite or macrophage suspension. Extraction was performed with the Qiagen kit QIAamp® DNA mini and extracted DNA was recovered in 50 μ L of elution buffer. One hundred nanograms of DNA were then subjected to the real-time qPCR using the ADENOVIRUS ELITE MGBTM kit according to the manufacturer's instructions. The viral load was expressed as the number of virus genome copies either per mL of cell supernatant or per microgram of extracted DNA if measured in the cell pellet.

Immunofluorescence experiments

At each point of the time course of amoebic trophozoite or macrophage infection, the intracellular synthesis of viral antigens was monitored by immunofluorescence. Co-cultures were washed three times in PAS and the supernatant was finally removed. The obtained pellet was then seeded onto slides that were dried. Macrophages cells were fixed in cold acetone for 10 min and amoebic trophozoites in cold methanol for 15 min, then 10 min in triton 0,2% to permeabilize the membrane cells. After drying, the slides were treated for 15 min at 37°C in wet room with a monoclonal anti-adenovirus group FITC antibody (Argene, bioMerieux). After washing by PBS, samples were monted in oil and examined with a fluorescence microscope with a 40x lens objective.

Electron microscopy

The potential internalization of adenovirus by phagocytic cells was also investigated by electron microscopy. Samples after 24 or 72 h of co-cultures were fixed for 1 h in phosphate buffer 0.1 M, containing 4% glutaraldehyde at 4°C. Cells were washed four times in PBS and post-fixed with 1% OsO₄ in phosphate buffer 0.1 M for 1 h at 4°C. The samples were dehydrated in an acetone series and embedded in araldite resin. Sections were stained with uranyl acetate and lead nitrate before examination with a Jeol 1010 transmission electron microscope.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the Mann-Whitney test. $P < 0.05$ was considered statistically significant. The analysis was performed using Prism5 for PC (GraphPad Software).

Results

Viability of phagocytes in co-culture with HAdV B3

The viability of amoebae and macrophages was checked using trypan blue after incubation with HAdV B3. The results showed that the viability of the Thp-1 cells incubated with the virus began to decrease after 48h of co-culture, in comparison with Thp-1 alone (Fig.1A). At the opposite, there was no effect of the virus on *A. Acastellanii* viability during the time of experimentation (Fig. 1B).

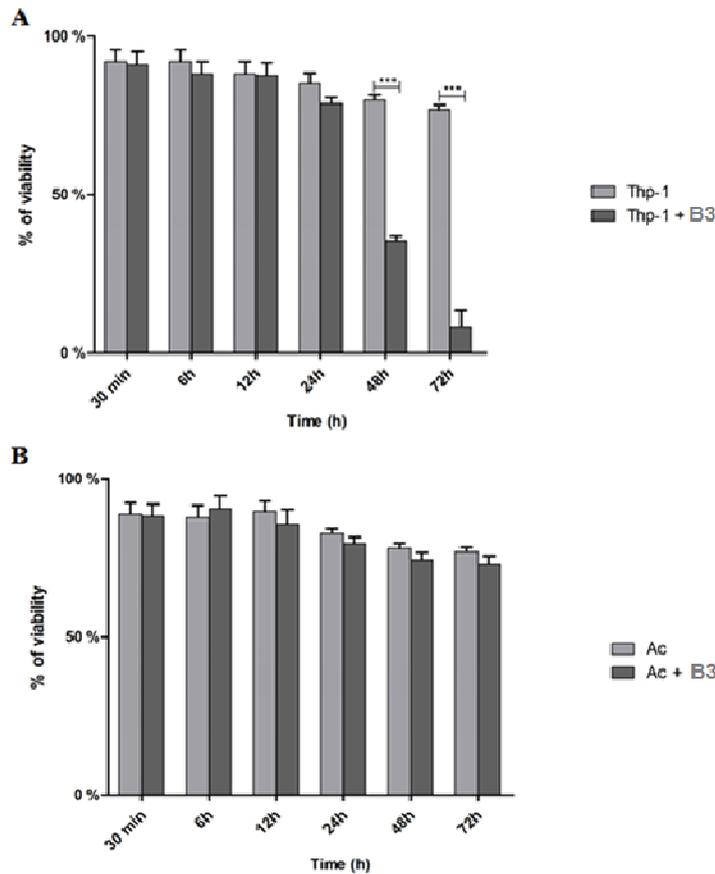


Fig. 1. Influence of Adenovirus on phagocytic cell viability after 3h, 6h, 24h, 48h and 72h of coculture: (A) macrophages or (B) *A. castellanii*. Ac: *A. castellanii* control, Ac + B3: Coincubation *A. castellanii*/adenovirus B3, Thp-1: Thp-1 control, Thp-1 + B3: Coincubation Thp-1/Adenovirus B3. All values correspond to mean of nine replicates. Values with stars are significantly different ($p < 0.001$ for ***)

Quantitative evaluation of viral DNA

The supernatants and the pellets of the viral co-cultures conducted with the two phagocytic cells were recovered after the different times of incubation. The viral DNA was then extracted and quantified by qPCR. The results obtained from the viral co-culture with macrophages Thp-1 showed that the amount of HAdV B3 DNA increased during the 72h of the experiment, in the culture supernatant as well as in the pellet of macrophagic cells (Fig. 2A). On the contrary, the presence of the amoeba *A. castellanii* had no effect on the viral load. Indeed, the

amount of viral DNA remained stable during the 72h of the assay, either in the co-culture supernatant or in the amoebae pellet (Fig. 2B).

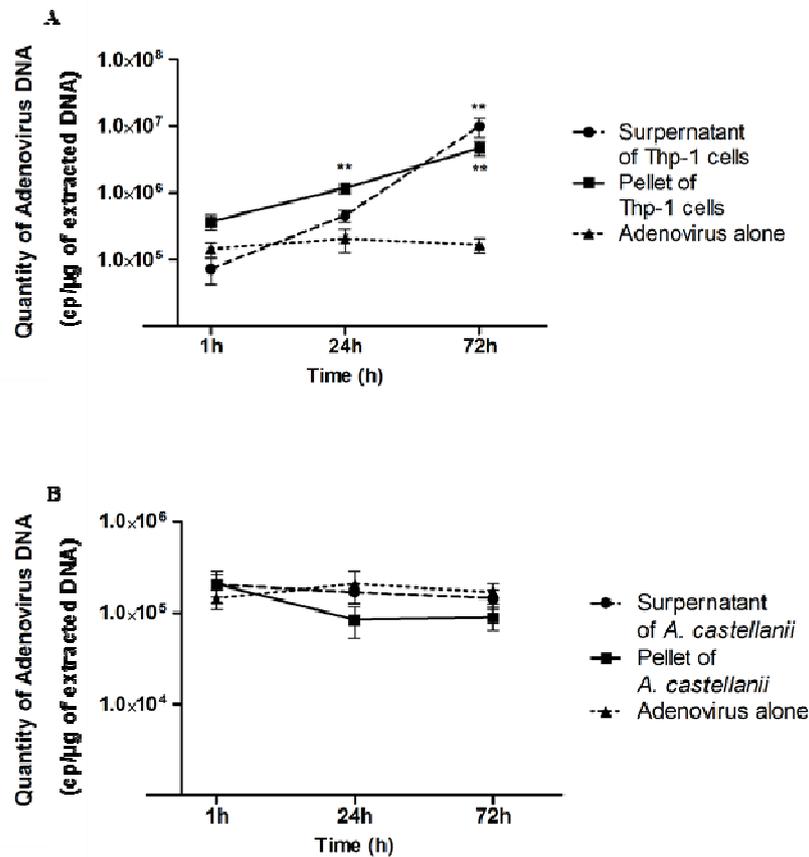


Fig. 2. Quantification of adenovirus serotype B3 in supernatant or pellet of Macrophage Thp-1 (A) or *A. castellanii* (B). All values correspond to mean of six replicates. Values with stars are significantly different ($p < 0.05$ for * and $p < 0.01$ for ** Mann-Whitney test)

Immunofluorescence observation

The presence of HAdV B3 into the two phagocytic cells was tested by an immunofluorescence assay. The microscopic observations showed an increase of virus antigens in macrophages over the time at 24, 48 and 72 h (Fig. 3C to Fig. 3E), whereas no virus antigen was visible in the cells at the beginning of the experiment (Fig. 3B). However, during co-culture assays with *A. castellanii*, a few viruses were internalized as early as 24

hours, but afterthat, there was no increase in fluorescence over time (Figure 3G to 3J). These results suggest that HAdV B3 is internalized by Thp-1 cell as well as by *A. castellanii*, but only multiply in Thp-1 cells. These results are quite in agreement with qPCR results that also showed the multiplication of HAdV B3 only in macrophages Thp-1.

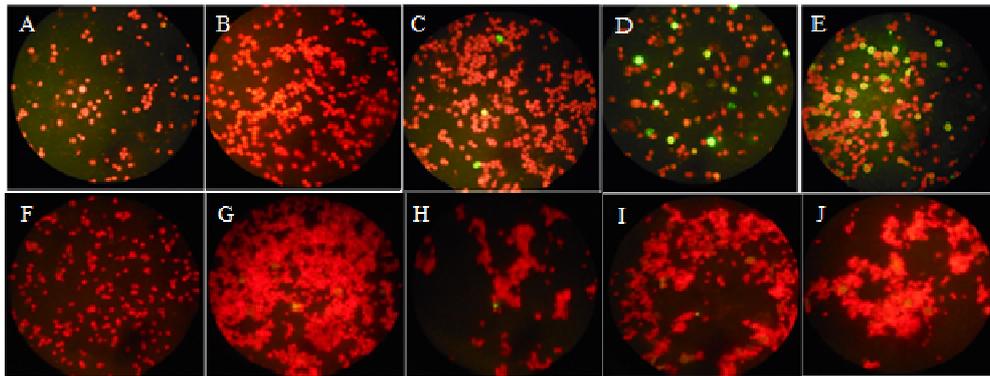


Fig. 3. Immunofluorescence results (A-E) Macrophages Thp-1, (F-J) *A. castellanii*, (A, F) Negative control, (B, G) 1h, (C, H)24h, (D, I) 48h, (E, J) 72h. Phagocytics cells are colored in red, adenovirus are visible in green.

Electron microscopy

The first observation of the co-cultures by electron microscopy after 24 h showed the absence of adenovirus inside the two phagocytic cells: *A. castellanii* or macrophages (data not shown). However, after 72 h of co-culture, viral particles were observed inside Thp-1 cells likely reflecting virus replication (Fig. 4A and 4B). Conversely, after 72 h of co-culture with *A. castellanii*, no virion was found inside the amoebae (Fig. 4C). These observations were also in agreement with the molecular data and immunofluorescence observations.

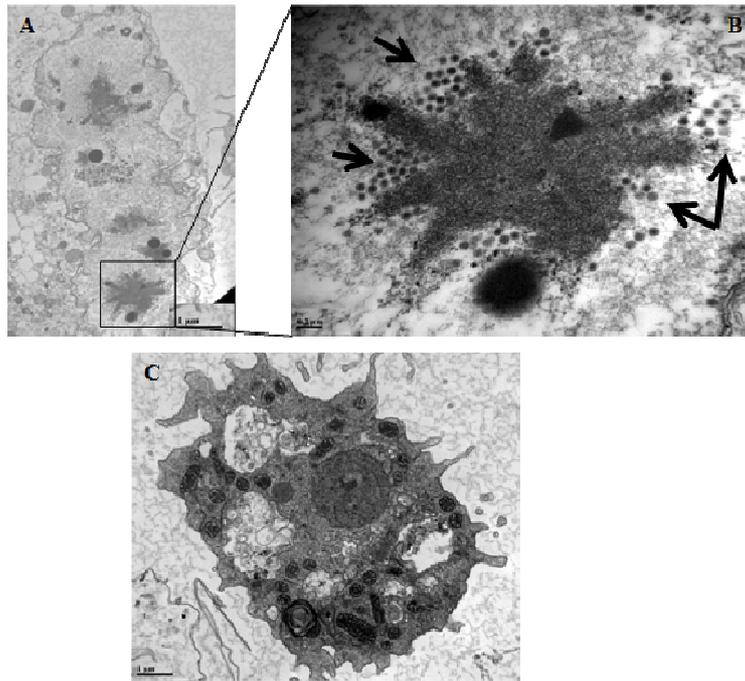


Fig. 4. Transmission electron microscopy images of (A, B) Macrophages Thp-1 and (C) *A. castellanii* trophozoïtes infected by Adenovirus serotype B3 after 72 h of co-culture. Adenovirus elements are indicated by arrows. Scalebar 1 µm A, C and 0,2 µm B

Discussion

Acanthamoeba is a genus found in the biosphere, frequently in soil and natural or man made aquatic environments (Trabelsi et al., 2012 ; Ashbolt, 2015). These FLA feed on bacteria, algae, fungi, protozoa, viruses or other organic particles (Marciano-Cabral and Cabral, 2003 ; Greub and Raoult, 2004). It has been described, for some bacteria, an adaptation to the protozoan niche with survival and sometimes multiplication of ingested bacteria with or without amoeba lysis, leading to bacterial protection and colonization of other environments (Thomas et al., 2011 ; Cateau et al., 2014). Since FLA and viruses can be found in the same environments, some authors have also investigated the potential interactions between these microorganisms in order to determine if FLA could play a role in the viral multiplication and spread. Most of the studies have recently concerned the so called “giant viruses” like Mimiviruses or Pandoraviruses which are endocytobionts within FLA (Scheid, 2015). Besides

the giant viruses, a few studies have been conducted with other viruses, in particular those infecting humans. As Human Noroviruses (HuNoVs) are involved in virus-related waterborne disease outbreaks, Huesh et al have studied their interactions with *Acanthamoeba spp.* and demonstrated that *A. castellanii* is able to interact with these enteric viruses (Hsueh and Gibson, 2015). After adhesion, HuNoV is internalized in *A. castellanii* trophozoites that could therefore play the role of viral reservoir in water systems. HAdV, for their part, are responsible for 24% of the virus-related waterborne outbreaks (Sinclair et al., 2009). They have been detected in various water environment worldwide (Mena and Gerba, 2009) where they can survive longer than other nonenveloped viruses such as Enteroviruses (Enriquez et al., 1995). HAdVs were found to be one of the most promising human specific viral markers in microbial source tracking (Wong et al., 2010). Lorenzo-Morales et al. have reported that four different HAdV serotypes (HAdV-1, 2, 8, and 37) have been detected in *Acanthamoeba* strains from water sources in the Canary islands reflecting human contamination (Lorenzo-Morales et al., 2007). More recently, HadV genome has also been detected and quantified in 62% of *Acanthamoeba* isolates from brasilian swimming pools. In this study, Scheid et al. demonstrated the intake of HAdV serotypes 11 and 41 by different *Acanthamoeba* strains, which can therefore act as carriers or vectors of HAdV in the same environment (Scheid and Schwarzenberger, 2012). Moreover, according to Verani et al, *Acanthamoeba polyphaga* can even protect HAdVs from sodium hypochlorite water disinfection treatment (Verani et al., 2016). In all these studies, even it can be proved that HAdVs can survive inside FLA, no viral replication within these protozoa has been demonstrated. This is also the case in the present work where we demonstrated by molecular methods that HAdV DNA can persist in or attached to *A. castellanii* during co-culture experiments, but without increase of the viral DNA load and thus without viral replication. Moreover, immunofluorescence assay using specific anti-HAdV antibodies allowed us to find rare viral antigen expression in amoebae,

which do not influence the viability of their host. However, only not “infected” *A. castellanii* trophozoite has been observed using electronic microscopy, probably because of the low sensitivity of this method. Finally, from our experiments and those of others, we can conclude that if *A. castellanii* can internalize HadV by expressing yet-unknown receptors on its membrane able to interact with viral capsid, this protozoa does not have the cellular machinery necessary for HAdV replication. *A. castellanii* can consequently act only as a carrier but not as a booster of the viral load in the environment.

Macrophages are described as “professional” phagocytic cells which express receptors on their surfaces that detect signals normally not found in healthy tissues. They have a central role in protecting the host by destroying the pathogens after their internalisation through the merger between phagosomes and lysosomes (Murray and Wynn, 2011). Macrophages play a significant role in the innate immune response to HAdV *in vivo*, although the mechanism by which they might internalise these viruses are not well known (Zaiss et al., 2009). Given that phagocytosis is specified for particles typically larger than 0.5–1 μm , viruses smaller than 0.5 μm are internalised by endocytosis rather than phagocytosis. HAdV are quickly taken up and internalised into macrophages but 100-1000-fold less than into epithelial cells that express the cell surface receptor CAR (coxsackievirus adenovirus receptor). The internalisation of HAdV in macrophages could require a cell surface integrin and be modulated by the availability of low-affinity, high avidity receptors, such as scavenger receptors (Zsengellér et al., 2000; Mercer and Greber, 2013). Moreover, macrophages have been shown to be permissive to HAdV replication *in vitro* (Mastroeni et al., 1985). Some data also reported that HAdV can persistently infect monocytes *in vivo*, providing a reservoir for latent infection (Chu et al., 1992). Finally, Di paolo et al. presented data demonstrating that, after interaction of the virus, Küpffer cells undergo rapid death (Di Paolo et al., 2013). In this report, we showed by

molecular and microscopical methods that HAdVs are internalized and replicate in Thp-1 cells, leading to the cell lysis.

Some authors have previously compared *Acanthamoeba* to human macrophages in some structures or behavior, like surface receptors or phagocytic activity (Yan et al., 2004 ; Khan, 2009). However, we demonstrated that, in our experimental conditions, interactions between HAdV and macrophages are quite different from interactions between HAdV and *A. castellanii*. In conclusion, the *A. castellanii* model do not seem to be relevant to explore the relationships between HAdV and immune cells like macrophages in in vitro experiments.

Acknowledgments

The authors are grateful to technicians of Laboratoire de Virologie et de Mycobactériologie for preparing the cell and viral cultures.

Conflict of interest

None of the authors have conflict of interest

References

- Ashbolt, N.J. (2015)** Microbial Contamination of Drinking Water and Human Health from Community Water Systems. *Curr Environ Health Rep* **2**: 95–106.
- Bowers, B. (1977)** Comparison of pinocytosis and phagocytosis in *Acanthamoeba castellanii*. *Exp Cell Res* **110**: 409–417.
- Cateau, E., Delafont, V., Hechard, Y., and Rodier, M.H. (2014)** Free-living amoebae: what part do they play in healthcare-associated infections? *J Hosp Infect* **87**: 131–140.
- Chu, Y., Sperber, K., Mayer, L., and Hsu, M.T. (1992)** Persistent infection of human adenovirus type 5 in human monocyte cell lines. *Virology* **188**: 793–800.
- Cosson, P., and Lima, W.C. (2014)** Intracellular killing of bacteria: is *Dictyostelium* a model macrophage or an alien? *Cell Microbiol* **16**: 816–823.
- Delafont, V., Brouke, A., Bouchon, D., Moulin, L., and Héchard, Y. (2013)** Microbiome of free-living amoebae isolated from drinking water. *Water Res* **47**: 6958–6965.
- Di Paolo, N.C., Doronin, K., Baldwin, L.K., Papayannopoulou, T., and Shayakhmetov, D.M. (2013)** The transcription factor IRF3 triggers “defensive suicide” necrosis in response to viral and bacterial pathogens. *Cell Rep* **3**: 1840–1846.
- Enriquez, P.M., Jung, C., Josephson, L., and Tennant, B.C. (1995)** Conjugation of adenine arabinoside 5'-monophosphate to arabinogalactan: synthesis, characterization, and antiviral activity. *Bioconjug Chem* **6**: 195–202.
- Greub, G., and Raoult, D. (2004)** Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin Microbiol Rev* **17**: 413–433.
- Hsueh, T.-Y., and Gibson, K.E. (2015)** Interactions between Human Norovirus Surrogates and *Acanthamoeba spp.* *Appl Environ Microbiol* **81**: 4005–4013.
- Jhanji, V., Chan, T.C.Y., Li, E.Y.M., Agarwal, K., and Vajpayee, R.B. (2015)** Adenoviral keratoconjunctivitis. *Surv Ophthalmol* **60**: 435–443.
- Khan, N.A. (2009)** *Acanthamoeba*: Biology and Pathogenesis. Horizon Scientific Press.

La Scola, B., Desnues, C., Pagnier, I., Robert, C., Barrassi, L., Fournous, G., et al. (2008) The virophage as a unique parasite of the giant mimivirus. *Nature* **455**: 100–104.

Lorenzo-Morales, J., Coronado-Alvarez, N., Martínez-Carretero, E., Maciver, S.K., and Valladares, B. (2007) Detection of four adenovirus serotypes within water-isolated strains of *Acanthamoeba* in the Canary Islands, Spain. *Am J Trop Med Hyg* **77**: 753–756.

Marciano-Cabral, F., and Cabral, G. (2003) *Acanthamoeba spp.* as agents of disease in humans. *Clin Microbiol Rev* **16**: 273–307.

Mastroeni, P., Merendino, R.A., Bonina, L., Arena, A., Liberto, M.C., and Gazzara, D. (1985) “In vitro” study on human mononuclear phagocytic cells behaviour versus DNA and RNA viruses. *G Bacteriol Virol Immunol* **78**: 262–273.

Mena, K.D., and Gerba, C.P. (2009) Waterborne adenovirus. *Rev Environ Contam Toxicol* **198**: 133–167.

Mercer, J., and Greber, U.F. (2013) Virus interactions with endocytic pathways in macrophages and dendritic cells. *Trends Microbiol* **21**: 380–388.

Murray, P.J., and Wynn, T.A. (2011) Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* **11**: 723–737.

Rames, E., Roiko, A., Stratton, H., and Macdonald, J. (2016) Technical aspects of using human adenovirus as a viral water quality indicator. *Water Res* **96**: 308–326.

Rowe, W.P., Huebner, R.J., Gilmore, L.K., Parrott, R.H., and Ward, T.G. (1953) Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med Soc Exp Biol Med N Y N* **84**: 570–573.

Russell, W.C. (2000) Update on adenovirus and its vectors. *J Gen Virol* **81**: 2573–604.

Scheid, P. (2015) Viruses in close associations with free-living amoebae. *Parasitol Res* **114**: 3959–3967.

Scheid, P., and Schwarzenberger, R. (2012) *Acanthamoeba spp.* as vehicle and reservoir of adenoviruses. *Parasitol Res* **111**: 479–485.

Schuster, F.L. (2002) Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amoebae. *Clin Microbiol Rev* **15**: 342–354.

Siddiqui, R., and Khan, N.A. (2012) *Acanthamoeba* is an evolutionary ancestor of macrophages: a myth or reality? *Exp Parasitol* **130**: 95–97.

Sinclair, R.G., Jones, E.L., and Gerba, C.P. (2009) Viruses in recreational water-borne disease outbreaks: a review. *J Appl Microbiol* **107**: 1769–1780.

Tan, D., Zhu, H., Fu, Y., Tong, F., Yao, D., Walline, J., et al. (2016) Severe Community-Acquired Pneumonia Caused by Human Adenovirus in Immunocompetent Adults: A Multicenter Case Series. *PloS One* **11**: e0151199.

Thomas, V., Bertelli, C., Collyn, F., Casson, N., Telenti, A., Goesmann, A., et al. (2011) Lausannevirus, a giant amoebal virus encoding histone doublets. *Environ Microbiol* **13**: 1454–1466.

Toth, K., Spencer, J.F., Dhar, D., Sagartz, J.E., Buller, R.M.L., Painter, G.R., and Wold, W.S.M. (2008) Hexadecyloxypropyl-cidofovir, CMX001, prevents adenovirus-induced mortality in a permissive, immunosuppressed animal model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 7293–7297.

Trabelsi, H., Dendana, F., Sellami, A., Sellami, H., Cheikhrouhou, F., Neji, S., et al. (2012) Pathogenic free-living amoebae: epidemiology and clinical review. *Pathol Biol (Paris)* **60**: 399–405.

Verani, M., Di Giuseppe, G., Tammaro, C., and Carducci, A. (2016) Investigating the role of *Acanthamoeba polyphaga* in protecting Human Adenovirus from water disinfection treatment. *Eur J Protistol* **54**: 11–18.

Waye, M.M.Y., and Sing, C.W. (2010) Anti-Viral Drugs for Human Adenoviruses. *Pharmaceuticals* **3**: 3343–3354.

Wong, K., Onan, B.M., and Xagorarakis, I. (2010) Quantification of enteric viruses, pathogen indicators, and *Salmonella* bacteria in class B anaerobically digested biosolids by culture and molecular methods. *Appl Environ Microbiol* **76**: 6441–6448.

Yan, L., Cerny, R.L., and Cirillo, J.D. (2004) Evidence that hsp90 is involved in the altered interactions of *Acanthamoeba castellanii* variants with bacteria. *Eukaryot Cell* **3**: 567–578.

Zaiss, A.K., Vilaysane, A., Cotter, M.J., Clark, S.A., Meijndert, H.C., Colarusso, P., et al. (2009) Antiviral antibodies target adenovirus to phagolysosomes and amplify the innate immune response. *J Immunol Baltim Md 1950* **182**: 7058–7068.

Zsengellér, Z., Otake, K., Hossain, S.A., Berclaz, P.Y., and Trapnell, B.C. (2000) Internalization of adenovirus by alveolar macrophages initiates early proinflammatory signaling during acute respiratory tract infection. *J Virol* **74**: 9655–9667.

Chapitre 5 : Discussion

Le premier objectif de cette étude a été de déterminer si les amibes libres ont une préférence trophique et d'essayer d'en comprendre les mécanismes. Pour cela, un panel de micro-organismes (six bactéries et un champignon) a tout d'abord été mis en présence des amibes *A. castellanii* et *V. vermiformis*.

Les premiers résultats ont montré que l'amibe *V. vermiformis* ne s'est déplacée vers aucun des micro-organismes testés. L'amibe *A. castellanii* s'est déplacée préférentiellement vers trois bactéries : deux bactéries Gram négatif, *K. pneumoniae* et *S. maltophilia* et une bactérie Gram positif *S. aureus*. L'étude de la préférence trophique s'est ensuite poursuivie en ne conservant qu'une bactérie Gram négatif. Notre choix s'est porté sur *K. pneumoniae*, d'utilisation plus facile, puisqu'elle présente une meilleure sensibilité aux antibiotiques. Les mêmes résultats ont ensuite été observés lorsque les surnageants de culture bactérienne ont été testés en présence d'*A. castellanii*, suggérant ainsi la sécrétion, par les bactéries *K. pneumoniae* et *S. aureus*, de molécules ayant un pouvoir chimioattractant, impliquées dans la communication inter-cellulaire. Il est à noter que, contrairement à certaines études, l'amibe *A. castellanii* n'a pas été attirée ici préférentiellement par *E. coli* (Weekers et al., 1993 ; Rosenberg et al., 2009).

Les surnageants de culture des bactéries sélectionnées ont ensuite été purifiés par deux étapes successives : un fractionnement par extraction en phase solide puis une purification par HPLC. Cinq fractions attractives ont été ainsi mises en évidence pour *K. pneumoniae* et trois pour *S. aureus*, différentes les unes des autres, mais toutes de nature peptidique.

Des études antérieures ont montré la présence de récepteurs membranaires sur *A. castellanii* permettant de détecter des chimioattractants bactériens. En effet, le traitement de l'amibe par la trypsine ayant eu pour conséquence la diminution de sa réponse à la présence

bactérienne, a suggéré la présence de récepteurs sensibles aux chimioattractants, différents par ailleurs de la « mannose binding protein », impliquée à la fois dans la phagocytose et dans la liaison aux cellules hôtes (Schuster and Levandowsky, 1996).

Kuburich *et al.* ont rapporté que *Dictyostelium discoideum*, autre amibe attirée par l'acide folique ou les composés apparentés, et *A. castellanii* présentaient des comportements différents quant à leur déplacement dans le milieu mais aussi concernant leurs réactions en présence de molécules chimioattractives (Milne and Coukell, 1991 ; Kuburich et al., 2016). *D. discoideum* est capable de distinction entre différentes espèces de bactéries, mais répond également différemment à des bactéries Gram positif ou Gram négatif, faisant émettre l'hypothèse d'une activation différentielle de gènes. Chez cette amibe, l'exposition aux bactéries régule l'expression de gènes potentiellement impliqués dans la reconnaissance et la destruction des bactéries. C'est le cas du gène codant le TIR Toll/Interleukine- 1 receptor, qui joue un rôle dans l'interaction avec les MAMPs bactériens (Kuburich et al., 2016).

Nasser *et al.* ont ainsi étudié le transcriptome de mutants amibiens incapables de se nourrir soit de bactéries Gram positif, soit de bactéries Gram négatif. Deux mécanismes distincts ont été décrits : i) en présence de bactéries Gram négatif vivantes, les amibes *D. discoideum* sont stimulées par la protéine TirA et ii) la réponse aux bactéries Gram positif est stimulée par Swp1, enzyme impliquée dans la glycosylation et par deux autres enzymes, NagB1 et Gpi impliquées dans le métabolisme du peptidoglycane (Nasser et al., 2013).

Nous avons déjà signalé qu'*A. castellanii* se nourrit préférentiellement de bactéries Gram négatif (Weekers et al., 1993 ; Rosenberg et al., 2009) et qu'elle est capable de se diriger vers des composants bactériens comme le LPS, le lipide A, l'acide lipoteichoïque ou le N-acétyl glucosamine (Schuster and Levandowsky, 1996). Cette amibe montre une préférence nutritive si elle a le choix. Si elle ne l'a pas, elle se nourrira de n'importe quelle bactérie disponible. Actuellement, s'il est établi qu'il existe un phénomène permettant à *A. castellanii*

de localiser sa proie et de se diriger vers elle, les mécanismes précis n'en sont pas encore élucidés. Des hypothèses ont cependant été émises : présence de terpènes ou de phéromones produites par les bactéries qui attireraient ou repousseraient l'amibe, présence ou absence de chimiorécepteurs sur la surface extracellulaire de la bactérie, taille et caractéristiques morphologiques des bactéries, caractéristiques biochimiques des éléments de surface de l'amibe (LPS, capsule...), absence ou présence d'enzymes lytiques chez l'amibe capables de dégrader telle ou telle proie (Khan, 2009).

La recherche de bactéries pour leur nourriture est différente chez *D. discoideum* et *A. castellanii*. *D. discoideum* se dirige directement vers les folates ou les bactéries même s'il existe quelques déviations de parcours, alors qu'*A. castellanii* se dirige dans toutes les directions, avec un mouvement de plus faible intensité vers la source bactérienne, suggérant que le mécanisme de recherche bactérien est plus représenté par un mouvement aléatoire que par un réel chimiotactisme. Ce mécanisme existe également chez *D. discoideum* en l'absence de signal chimiotactique (Kuburich et al., 2016).

Le plus souvent, les cellules eucaryotes perçoivent la présence des stimuli chimiotactiques *via* des récepteurs de 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G. Ces récepteurs, capables de reconnaître la cAMP, peuvent aussi être stimulés par des peptides formylés d'origine bactérienne. La N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine a par exemple un effet chimioattractant sur les polynucléaires neutrophiles et les monocytes (Cavicchioni et al., 2006).

Quatre récepteurs ont ainsi été identifiés chez *D. discoideum* dont CAR1, couplé aux protéines G hétérotrimériques (Pan et al., 2016). L'activation des protéines G va conduire à la polymérisation de l'actine, impliquée dans l'extension des pseudopodes. Ces récepteurs sont ainsi capables de traduire en signal intracellulaire un signal externe, comme par exemple un chimioattractant. La majorité de ces molécules sont des peptides formylés et des chimiokines.

Nos résultats ont également mis en évidence la nature peptidique des fractions attirants *A. castellanii*.

La seconde grande partie de la thèse a été consacrée à l'étude des interactions de pathogènes avec les amibes libres et la comparaison des interactions existant entre ces mêmes pathogènes et une lignée macrophagique. Quatre pathogènes ont ainsi été étudiés : *K. pneumoniae*, une bactérie Gram négatif, *S. aureus*, une bactérie Gram positif, *A. fumigatus*, un champignon filamenteux et un adénovirus humain de sérotype B3.

Les bactéries *K. pneumoniae* sont ubiquitaires dans différents environnements comme les sols, les réservoirs d'eau naturels et artificiels comme les réseaux d'eau hospitaliers ou les réseaux de distribution d'eau potable (Podschun et al., 2001). Ces bactéries, capables de résister à des conditions hostiles, sont des pathogènes opportunistes pouvant induire des pathologies graves, en particulier chez les immunodéprimés (Venieri et al., 2015). Les amibes libres étant également retrouvées dans les mêmes environnements, nous avons réalisé des co-cultures afin d'explorer les interactions pouvant exister entre *A. castellanii* et *K. pneumoniae*. Nous avons ainsi montré que la présence des amibes induisait une augmentation de la croissance bactérienne. Des résultats similaires ont été retrouvés en utilisant le surnageant amibien. L'utilisation de gentamicine dans les co-cultures, puis les images obtenues en MET ont montré que *K. pneumoniae* n'était pas internalisée et se multipliait en dehors des amibes. Des expérimentations identiques ont été menées avec *S. aureus*, bactérie Gram positif, commensale chez l'Homme (Best et al., 2011), ubiquitaire, et elle aussi en contact potentiel avec les amibes libres dans certains réseaux d'eau. Là encore, la présence des amibes a engendré une augmentation de la concentration bactérienne. L'ajout de gentamicine nous a permis de conclure à la non internalisation de la bactérie par les amibes. Il a déjà été prouvé qu'*A. castellanii* favorise la croissance de certains micro-organismes (Greub and Raoult,

2004) ainsi que leur protection dans des conditions hostiles (King et al., 1988). Cependant, les relations entre bactéries et amibes dépendent des conditions dans lesquelles elles se déroulent. En effet, la présence d'*A. castellanii* peut induire une diminution de la concentration de *K. pneumoniae* dans les biofilms (Huws et al., 2005). Il a également été démontré par March que la richesse du milieu peut affecter la prédation de *K. pneumoniae* par des amibes comme *D. discoideum* (March et al., 2013). Concernant *S. aureus*, certains auteurs ont rapporté que la présence d'*A. castellanii* permettait une faible croissance bactérienne dans des co-cultures, en utilisant un milieu riche (RPMI) et une concentration élevée de bactéries (10^8 CFU/mL), sans qu'une MOI précise soit indiquée. La survie et la multiplication bactérienne était par ailleurs plus importante avec les bactéries MSSA (Methicillin-sensitive *S. aureus*) plutôt qu'avec les MRSA (Methicillin-resistant *S. aureus*). La même étude a montré que les MRSA et MSSA étaient internalisés par *A. castellanii* et pouvaient y survivre (Cardas et al., 2012).

Les résultats obtenus dans nos conditions expérimentales nous permettent d'émettre l'hypothèse que la croissance de *K. pneumoniae* et de *S. aureus* pourrait être due à la libération de métabolites amibiens utilisés comme nutriments par les bactéries. Nous n'avons pas mis en évidence d'internalisation des bactéries. Cependant, la phagocytose semble dépendre des différentes conditions utilisées dans les études : milieux, souches bactériennes ou amibiennes, ou MOI. La capsule d'*Escherichia coli* K1, par exemple, semble impliquée dans l'internalisation et la survie de la bactérie dans des amibes du genre *Acanthamoeba* (Jung et al., 2007). Même si la plupart d'entre eux rapportent des bénéfices pour les bactéries dans leur relation avec les amibes, il reste difficile de comparer précisément les résultats des différentes études menées sur les interactions amibes-pathogènes. Nous pouvons cependant affirmer que la présence d'*A. castellanii* favorise dans certaines conditions la croissance de *K. pneumoniae* et de *S. aureus* si elles sont présentes dans les mêmes environnements, sans pour autant nécessiter de relation étroite.

Les amibes du genre *Acanthamoeba* sont régulièrement comparées aux macrophages, en particulier par leur capacité à la phagocytose (Yan et al., 2004), et certains pathogènes sont capables de se multiplier dans les macrophages et les amibes de la même manière (Siddiqui and Khan, 2012 ; Cosson and Lima, 2014). Si nos résultats de co-culture *K. pneumoniae*/*A. castellanii* et *K. pneumoniae*/macrophages Thp-1 ont été comparables au niveau de l'augmentation de croissance bactérienne, nous avons cependant montré une internalisation de *K. pneumoniae* par les macrophages. Dans de nombreux cas, après internalisation d'un pathogène, il y a fusion entre phagosome et lysosomes entraînant la destruction de ce pathogène (Murray and Wynn, 2011). Nous confirmons quant à nous que *K. pneumoniae* est capable de survivre dans les macrophages, comme l'ont déjà décrit certains auteurs (Cano et al., 2015). En ce qui concerne *S. aureus*, les résultats des co-cultures de cette bactérie avec *A. castellanii* et Thp-1 suggèrent une internalisation précoce de *S. aureus* par les macrophages. Cependant, les bactéries sont incapables de survivre et de se multiplier dans ces cellules après 24 h de co-culture. Ces résultats sont toutefois en contradiction avec ceux de Cardas *et al.* qui ont rapporté une survie et une multiplication bactérienne dans les macrophages Thp-1 (Cardas et al., 2012). Là encore, cette différence de résultats pourrait être expliquée par des différences de conditions utilisées dans les études. Si l'on s'intéresse au phénomène d'adhérence des bactéries aux différentes cellules, nous avons montré que *K. pneumoniae* était capable de se fixer à l'amibe grâce à des récepteurs au mannose comme cela a déjà été décrit pour d'autres bactéries (Alsam et al., 2005), même si le processus reste incomplet dans notre étude car il n'y a pas d'internalisation de la bactérie. Dans les mêmes conditions expérimentales, ces récepteurs ne sont pas impliqués dans l'adhérence de la bactérie aux cellules Thp-1. *S. aureus* est, quant à elle, capable de se fixer à *A. castellanii* grâce à des récepteurs au glucose, au fructose ainsi qu'au mannose, confirmant une adhérence de *S. aureus* à *A. castellanii* précédemment visualisée en MET par Bottone *et al.* (Bottone et al.,

1994). Ces récepteurs ne semblent cependant pas impliqués dans l'adhérence de la bactérie aux cellules Thp-1.

Si l'on considère que i), dans les mêmes conditions expérimentales, nous n'avons pas mis en évidence d'internalisation de *K. pneumoniae* ou de *S. aureus* dans les amibes et qu'au contraire les macrophages étaient capables de phagocyter les deux espèces, et que ii), que ce soit pour l'adhérence ou pour l'internalisation des bactéries, les résultats retrouvés dans notre étude diffèrent entre les amibes *A. castellanii* et les macrophages, nous pouvons conclure qu'un modèle utilisant cette espèce amibienne ne permettrait pas d'en extrapoler les résultats à l'étude des interactions entre certaines bactéries et les macrophages.

Nous nous sommes intéressés également au règne fongique dans l'étude pathogènes-cellules phagocytaires, en nous focalisant sur *A. fumigatus*. Les *Aspergillus* sont des moisissures saprophytes très répandues dans le sol, la végétation en décomposition, la poussière, les bioaérosols et différents milieux aquatiques (Pearson et al., 2015). *A. fumigatus* est responsable de pathologies sévères chez les humains et les oiseaux (Van Waeyenberghe et al., 2013) et a été retrouvé dans les réseaux d'eau hospitaliers (Hayette et al., 2010). Les résultats des co-cultures *A. fumigatus* / amibes libres ont montré que la présence d'*A. castellanii* n'influe pas sur la croissance fongique à la différence de son surnageant qui l'augmente après 48 h de co-incubation. En outre, la présence de conidies d'*A. fumigatus* dans le milieu n'a pas d'influence sur la viabilité d'*A. castellanii*.

Quelques études ont déjà concerné les relations entre les amibes libres et les champignons, mais leur grande majorité a impliqué des levures. L'incubation de *C. neoformans* avec des amibes entraîne une phagocytose des levures et une augmentation du nombre de cellules fongiques (Steenbergen et al., 2001). Notre équipe a rapporté que la présence d'*A. castellanii* n'influe pas sur la croissance de *C. albicans* (Vanessa et al., 2012).

Ces observations sont similaires à celles faites dans cette étude. Concernant la viabilité amibienne, Steenbergen *et al.* ont montré que l'ingestion de levures provoquait la lyse des amibes (Steenbergen *et al.*, 2001). Cependant, les résultats sont différents avec les champignons filamenteux, que ce soit *Fusarium oxysporum* (Cateau *et al.*, 2014b) ou *A. fumigatus* pour lequel nous confirmons les résultats de Hobson *et al.*, qui ne retrouvaient pas d'effet sur la viabilité d'*A. castellanii* (Hobson, 2000).

Dans les essais d'inhibition de l'adhérence, nous avons montré que le mannose joue un rôle dans l'attachement aux cellules Thp-1, mais pas à *A. castellanii*. Certains auteurs ont déjà rapporté l'implication de protéines de liaison au mannose (Alsam *et al.*, 2005) et/ou des récepteurs membranaires du glucose ou du galactose dans l'attachement de levures à *A. castellanii* (Declerck *et al.*, 2007 ; Medina *et al.*, 2014). Dans nos conditions, l'ajout de mannose ou de mannane n'a eu un effet que sur l'adhérence des conidies aux cellules macrophagiques. Contrairement à certaines études déjà citées concernant l'adhérence bactérienne à *A. castellanii* (Alsam *et al.*, 2005), le mannose exogène n'a pas bloqué la phagocytose fongique. D'autres récepteurs doivent donc être mis en jeu dans l'adhérence fongique à *A. castellanii*. On sait en effet que plusieurs récepteurs peuvent être impliqués dans l'adhérence des micro-organismes aux amibes, comme des protéines de liaison aux carbohydrates, des récepteurs scavengers ou d'autres protéines membranaires (Bozzaro *et al.*, 2008) et que l'absorption est un processus complexe avec deux voies distinctes pour ingérer les particules, un mécanisme non spécifique et un mécanisme spécifique médié par des récepteurs (Alsam *et al.*, 2005). Ceci pourrait expliquer que, pendant la première heure de l'essai de fixation, le pourcentage de conidies ayant adhéré était plus élevé avec *A. castellanii* qu'avec les cellules Thp-1. Après 4 h, nos résultats indiquent la saturation potentielle des différents récepteurs cellulaires impliqués dans le phénomène.

En ce qui concerne l'internalisation, le pourcentage de trophozoïtes d'*A. castellanii* ayant phagocyté les conidies est de l'ordre de 100%. Une différence majeure peut être notée avec l'internalisation des conidies par les cellules Thp-1 qui n'atteint que 40% après 4 h de co-incubation. Kraibooj *et al.* ont par ailleurs rapporté que la phagocytose de *A. fumigatus* par les cellules macrophagiques pouvait atteindre 40% après 1 h de co-incubation, mais ces auteurs ont utilisé une MOI supérieure à 5 et un milieu riche (Kraibooj *et al.*, 2015). D'autre part, Van Waeyenberghe *et al.* ont montré que les macrophages alvéolaires des pigeons présentaient une capacité phagocytaire modérée dans les premières heures post-incubation (Van Waeyenberghe *et al.*, 2013). Ainsi, l'internalisation des champignons semble dépendre des différentes conditions utilisées dans les études : milieux, souches ou MOI. Dans la présente étude, les souches phagocytaires testées étaient toutes capables d'internaliser les conidies d'*A. fumigatus* à des degrés divers.

Ce travail, impliquant cette fois un champignon filamenteux, a également montré des différences importantes dans les relations d'*A. fumigatus* avec *A. castellanii* ou avec les cellules Thp-1.

Le dernier pathogène dont les interactions avec les cellules phagocytaires ont été testées est un adénovirus. Les adénovirus sont retrouvés dans l'environnement où ils peuvent être en contact avec des amibes libres comme *A. castellanii*. Ils entraînent principalement des infections respiratoires et des gastroentérites, mais également des infections oculaires. D'une manière générale, certains virus sont capables de s'adapter à l'ingestion par les amibes, permettant ainsi leur survie ainsi que leur multiplication intracellulaire. Certains auteurs ont ainsi étudié les interactions potentielles entre virus et amibes libres afin de déterminer si ces protozoaires pouvaient jouer un rôle dans la transmission virale. La plupart des études ont récemment concerné les virus géants comme les

mimivirus ou les pandoravirus (Scheid, 2015). Quelques autres ont été menées avec certains virus pouvant infecter l'Homme. C'est le cas des Norovirus, capables d'interagir avec *A. castellanii* (Hsueh and Gibson, 2015). Les coxsackievirus peuvent également survivre dans les amibes mais aussi les utiliser comme vecteur de transmission (Mattana et al., 2006). Concernant les adénovirus, Lorenzo-Morales a détecté par PCR leur présence dans des souches d'amibes libres, suggérant que ces amibes, en servant de réservoir aux adénovirus, faciliteraient leur transmission à l'Homme (Lorenzo-Morales et al., 2007). En 2012, Scheid et Schwarzenberger ont confirmé que des adénovirus appartenant aux sérotypes 11 et 41 sont ingérés par les amibes, et retrouvés dans leur cytoplasme, plus particulièrement dans des phagosomes (Scheid and Schwarzenberger, 2012). Verani *et al.* ont quant à eux, montré que *A. polyphaga* peut protéger les adénovirus des traitements de désinfection de l'eau. (Verani et al., 2016). Dans toutes ces études, on ne note pas de réplication du virus dans les amibes. Les résultats de co-culture amibes / adénovirus dans notre étude ont montré que la présence d'*A. castellanii* dans la co-culture n'avait aucun effet sur la multiplication ou sur la survie du virus. Ces résultats, montrant une internalisation des adénovirus par *A. castellanii* avec persistance du virus mais sans multiplication virale, sont donc en adéquation avec les études précédemment publiées. De notre étude et de celles d'autres auteurs, nous pouvons conclure que si *A. castellanii* internalise les adénovirus, cette amibe ne possède pas la machinerie cellulaire nécessaire à la réplication virale. Au contraire, la présence de macrophages dans la co-culture a permis une augmentation de la quantité de virus, résultats confirmés par immunofluorescence, puis par MET, permettant de visualiser les adénovirus dans les cellules phagocytaires. Les macrophages jouent un rôle dans l'immunité innée contre les adénovirus *in vivo*, bien que le mécanisme d'internalisation virale ne soit pas bien connu (Zaiss et al., 2009). Les adénovirus sont internalisés dans les macrophages, mais 100 à 1000 fois moins que dans les cellules épithéliales, qui expriment des récepteurs spécifiques (Zsengellér et al., 2000 ;

Mercer and Greber, 2013). Certains auteurs ont préalablement rapporté la permissivité des macrophages et des monocytes pour la réplication des adénovirus *in vitro* (Mastroeni et al., 1985; Chu et al., 1992). Di paolo *et al.* (Di Paolo et al., 2013) ont présenté des données démontrant que les cellules de Küpffer infectées par les adénovirus mouraient rapidement. Nous présentons ici également des résultats montrant la lyse des macrophages infectés. Dans ce troisième modèle, nous démontrons une nouvelle fois des différences de comportement entre *A. castellanii* et la lignée Thp-1, infectées par un adénovirus dans les mêmes conditions expérimentales.

Enfin, au cours de ces différentes expérimentations, nous nous sommes intéressés de façon parallèle à une autre amibe libre, *V. vermiformis*. Kuiper *et al.* (Kuiper et al., 2006) ont montré que cette amibe était fréquemment retrouvée dans les eaux de surface. Elle peut aussi proliférer dans des environnements lié à l'Homme, comme les systèmes de distribution d'eau, l'eau du robinet, ou les piscines (Valster et al., 2009 ; Coşkun et al., 2013 ; Delafont et al., 2013 ; Armand et al., 2016).

Nous nous sommes particulièrement intéressés à *V. vermiformis*, puisqu'elle est l'espèce dominante dans les réseaux d'eau hospitaliers (Pagnier et al., 2015), surtout dans les réseaux d'eau chaude, (Thomas et al., 2006; Ovrutsky et al., 2013) car il s'agit d'une espèce thermotolérante (Rhoads et al., 2015).

Ainsi, nous avons exploré les interactions existant entre cette amibe et trois des pathogènes de l'étude : *K. pneumoniae*, *S. aureus* et *A. fumigatus*. *V. vermiformis* est capable de favoriser la croissance de *K. pneumoniae*, à l'instar des deux autres cellules phagocytaires étudiées, mais aussi de les internaliser. Nos résultats se rapprochent de ceux de Pickup *et al.* en 2007 obtenus avec d'autres espèces de *Klebsiella*, montrant que *V. vermiformis* se nourrit de ces bactéries (Pickup et al., 2007). La croissance de *S. aureus* est, elle aussi, favorisée par

la présence de *V. vermiformis* mais sans internalisation. Il est possible de supposer que la croissance bactérienne peut être due à la libération de métabolites amibiens utilisés comme nutriments par les bactéries. D'autre part, la présence de *V. vermiformis* ainsi que son surnageant induisent une augmentation de la croissance d'*A. fumigatus*, comparée à la croissance fongique sans amibe. Il est à noter que, si la présence de conidies d'*A. fumigatus* dans le milieu n'a pas d'influence sur la viabilité d'*A. castellanii*, elle diminue fortement celle de *V. vermiformis*, résultats se rapprochant de ceux de Steenbergen *et al.* montrant que la croissance de *C. neoformans* avait un effet négatif sur la viabilité amibienne (Steenbergen *et al.*, 2001). *V. vermiformis* pourrait être sensible, comme *D. discoideum*, à certaines toxines sécrétées par *A. fumigatus*, comme la gliotoxine ou la tryptacidine (Hillmann *et al.*, 2015; Chotirmall *et al.*, 2014).

Nos résultats démontrent que la présence de *V. vermiformis* ou d'*A. castellanii* dans les réseaux d'eau hospitaliers peut représenter un risque de développement d'infections associées aux soins et que la surveillance régulière de ces réseaux pourrait inclure la recherche et la détection des amibes libres.

Chapitre 6 : Conclusion et perspectives

Les principaux objectifs de notre étude ont été de déterminer si les amibes libres avaient une préférence trophique et si elles pouvaient servir de modèle expérimental pour l'exploration des interactions macrophages / micro-organismes.

Nos résultats montrent qu'il existe bien une préférence trophique des amibes libres *A. castellanii* pour certaines bactéries qui sécrètent des composés diffusibles permettant l'attraction des amibes. Différentes molécules de nature peptidique et de petite taille ont été isolées, allant de six à une vingtaine d'acides aminés, dont la caractérisation doit se poursuivre, en particulier par la détermination de leur séquence peptidique. De plus, une analyse du sécrétome des bactéries *K. pneumoniae* et *S. aureus* permettrait de déterminer si les molécules purifiées sont connues pour leur action. Cette étude doit toutefois être complétée. En effet, les tests ayant été réalisés en présence d'un seul micro-organisme, ils devront être reproduits en plaçant *A. castellanii* en présence de plusieurs micro-organismes simultanément, afin de permettre aux amibes un choix nutritionnel et confirmer ou non nos résultats. Le désenkystement amibien en présence de ces bactéries devrait également être exploré. D'autre part, il conviendra de purifier et de caractériser les molécules présentes dans les surnageants de culture d'amibes et capables d'induire une augmentation de la croissance bactérienne. Ces premiers résultats sont donc en faveur d'une communication inter-cellulaire entre les bactéries *K. pneumoniae* et *S. aureus* et *A. castellanii*.

Dans la seconde partie de l'étude, nous avons exploré le rôle des amibes dans la croissance de micro-organismes, confirmant l'intérêt de leur surveillance et de leur contrôle au sein des réseaux d'eau. Ces résultats devraient être confirmés par des co-cultures amibes/bactéries dans des dispositifs se rapprochant des conditions environnementales. En effet, mieux connaître les interactions micro-organismes / amibes pourrait permettre une

optimisation du traitement des réseaux d'eau, particulièrement dans les hôpitaux. D'autre part, nous avons mis en évidence des mécanismes d'adhérence, d'internalisation et de survie différents entre les micro-organismes étudiés, en présence d'*A. castellanii*, mais aussi en présence des cellules macrophagiques. S'il existe bien des similitudes entre les interactions micro-organismes/amibes libres et les interactions micro-organismes/macrophages, des différences importantes subsistent, ne permettant pas d'utiliser ce modèle *A. castellanii* pour l'extrapolation aux interactions avec les macrophages des résultats obtenus avec l'amibe.

Chapitre 7 : Bibliographie

Abad, A., Fernández-Molina, J.V., Bikandi, J., Ramírez, A., Margareto, J., Sendino, J., Hernando, F.L., Pontón, J., Garaizar, J., Rementeria, A., 2010. What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. *Rev. Iberoam. Micol.* **27**, 155–182.

Abbott, S.L., 2011. *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Plesiomonas, and Other Enterobacteriaceae* 639–657.

Abd, H., Weintraub, A., Sandström, G., 2005. Intracellular survival and replication of *Vibrio cholerae* O139 in aquatic free-living amoebae. *Environ. Microbiol.* **7**, 1003–1008.

Adams, T.H., 1995. Asexual Sporulation in Higher Fungi 367–382.

Adams, T.H., Wieser, J.K., Yu, J.H., 1998. Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 35–54.

Adékambi, T., Ben Salah, S., Khlif, M., Raoult, D., Drancourt, M., 2006. Survival of environmental *mycobacteria* in *Acanthamoeba polyphaga*. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 5974–5981.

Aderem, A., Underhill, D.M., 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* **17**, 593–623.

Adl, S.M., Simpson, A.G.B., Farmer, M.A., Andersen, R.A., Anderson, O.R., Barta, J.R., Bowser, S.S., Brugerolle, G., Fensome, R.A., Fredericq, S., James, T.Y., Karpov, S., Kugrens, P., Krug, J., Lane, C.E., Lewis, L.A., Lodge, J., Lynn, D.H., Mann, D.G., McCourt, R.M., Mendoza, L., Moestrup, O., Mozley-Standridge, S.E., Nerad, T.A., Shearer, C.A., Smirnov, A.V., Spiegel, F.W., Taylor, M.F.J.R., 2005. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J. Eukaryot. Microbiol.* **52**, 399–451.

Adl, S.M., Simpson, A.G.B., Lane, C.E., Lukeš, J., Bass, D., Bowser, S.S., Brown, M.W., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenrath, M., Lara, E., Le Gall, L., Lynn, D.H., McManus, H., Mitchell, E.A.D., Mozley-Stanridge, S.E., Parfrey, L.W., Pawlowski, J., Rueckert, S., Shadwick, L., Schoch, C.L., Smirnov, A., Spiegel, F.W., 2012. The revised classification of eukaryotes. *J. Eukaryot. Microbiol.* **59**, 429–493.

Akya, A., Pointon, A., Thomas, C., 2009. Viability of *Listeria monocytogenes* in co-culture with *Acanthamoeba spp.* *FEMS Microbiol. Ecol.* **70**, 20–29.

Allen, L.A.H., Allgood, J.A., 2002. Atypical protein kinase C-zeta is essential for delayed phagocytosis of *Helicobacter pylori*. *Curr. Biol.* **12**, 1762–1766.

Alsam, S., Sissons, J., Dudley, R., Khan, N.A., 2005. Mechanisms associated with *Acanthamoeba castellanii* (T4) phagocytosis. *Parasitol. Res.* **96**, 402–409.

Anaissie, E.J., Stratton, S.L., Dignani, M.C., Lee, C.-K., Mahfouz, T.H., Rex, J.H., Summerbell, R.C., Walsh, T.J., 2002. Cleaning patient shower facilities: a novel approach to reducing patient exposure to aerosolized *Aspergillus* species and other opportunistic molds. *Clin. Infect.* **35**, E86-88.

ANOFEL, 2016. Parasitoses et mycoses : des régions tempérées et tropicales. Elsevier Masson.

Aoki, K., Kato, M., Ohtsuka, H., Ishii, K., Nakazono, N., Sawada, H., 1982. Clinical and aetiological study of adenoviral conjunctivitis, with special reference to adenovirus types 4 and 19 infections. *Br. J. Ophthalmol.* **66**, 776–780.

Armand, B., Motazedian, M.H., Asgari, Q., 2016. Isolation and identification of pathogenic free-living amoeba from surface and tap water of Shiraz City using morphological and molecular methods. *Parasitol. Res.* **115**, 63–68.

Arnberg, N., Edlund, K., Kidd, A.H., Wadell, G., 2000. Adenovirus type 37 uses sialic acid as a cellular receptor. *J. Virol.* **74**, 42–48.

Auger, M.J., Ross, J.A., 1992. The biology of the macrophage, in: *The Macrophage: The Natural Immune System*. In Lewis, C.E. and McGee, J.O.D., pp. 3–74.

- Bagley, S.T., Seidler, R.J., Talbot, H.W., Morrow, J.E., 1978.** Isolation of *Klebsiella* from within living wood. *Appl. Environ. Microbiol.* **36**, 178–185.
- Bain, J.M., Lewis, L.E., Okai, B., Quinn, J., Gow, N.A.R., Erwig, L.-P., 2012.** Non-lytic expulsion/exocytosis of *Candida albicans* from macrophages. *Fungal Genet. Biol.* **49**, 677–678.
- Bantel, H., Sinha, B., Domschke, W., Peters, G., Schulze-Osthoff, K., Jänicke, R.U., 2001.** alpha-Toxin is a mediator of *Staphylococcus aureus*-induced cell death and activates caspases via the intrinsic death pathway independently of death receptor signaling. *J. Cell Biol.* **155**, 637–648.
- Barbeau, J., Buhler, T., 2001.** Biofilms augment the number of free-living amoebae in dental unit waterlines. *Res. Microbiol.* **152**, 753–760.
- Barker, J., Brown, M.R., Collier, P.J., Farrell, I., Gilbert, P., 1992.** Relationship between *Legionella pneumophila* and *Acanthamoeba polyphaga*: physiological status and susceptibility to chemical inactivation. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 2420–2425.
- Baron, D., Danglot, C., Vilaginés, R., 1980.** [Role of a free-living amoeba from water, *Acanthamoeba castellanii*, in the transport of naked or enveloped animal viruses]. *C. R. Seances Acad. Sci. D.* **291**, 629–632.
- Batard, é., El Kouri, D., Potel, G., 2007.** Infections à *staphylocoques* : aspects cliniques et bactériologiques. *EMC - Mal. Infect.* **4**, 1–8.
- Benkő, M., Harrach, B., 1998.** A proposal for a new (third) genus within the family Adenoviridae. *Arch. Virol.* **143**, 829–837.
- Bennet, R., Eriksson, M., Melen, B., Zetterström, R., 1985.** Changes in the incidence and spectrum of neonatal septicemia during a fifteen-year period. *Acta Paediatr. Scand.* **74**, 687–690.
- Bennett, M., 2010.** An overview of the genus *Aspergillus*, in: *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics*. Horizon Scientific Press.

Bergelson, J.M., Cunningham, J.A., Droguett, G., Kurt-Jones, E.A., Krithivas, A., Hong, J.S., Horwitz, M.S., Crowell, R.L., Finberg, R.W., 1997. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* **275**, 1320–1323.

Berk, A.J., 1986. Functions of adenovirus E1A. *Cancer Surv.* **5**, 367–387.

Berk, S.G., Gunderson, J.H., Newsome, A.L., Farone, A.L., Hayes, B.J., Redding, K.S., Uddin, N., Williams, E.L., Johnson, R.A., Farsian, M., Reid, A., Skimmyhorn, J., Farone, M.B., 2006. Occurrence of infected amoebae in cooling towers compared with natural aquatic environments: implications for emerging pathogens. *Environ. Sci. Technol.* **40**, 7440–7444.

Bes, M., Brun, Y., 2002. *Staphylococcus*: actualites taxonomiques et identification. *Rev. Francaise Lab.* **343**, 23–30.

Best, N., Fraser, J.D., Rainey, P.B., Roberts, S.A., Thomas, M.G., Ritchie, S.R., 2011. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in healthy Aucklanders. *N. Z. Med. J.* **124**, 31–39.

Biddick, C.J., Rogers, L.H., Brown, T.J., 1984. Viability of pathogenic and nonpathogenic free-living amoebae in long-term storage at a range of temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 859–860.

Birbrair, A., Frenette, P.S., 2016. Niche heterogeneity in the bone marrow. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1370**, 82–96.

Borlace, G.N., Keep, S.J., Prodoehl, M.J.R., Jones, H.F., Butler, R.N., Brooks, D.A., 2012. A role for altered phagosome maturation in the long-term persistence of *Helicobacter pylori* infection. *Am. J. Physiol. Gastrointest.* **303**, G169-179.

Bosisio, D., Polentarutti, N., Sironi, M., Bernasconi, S., Miyake, K., Webb, G.R., Martin, M.U., Mantovani, A., Muzio, M., 2002. Stimulation of toll-like receptor 4 expression in human mononuclear phagocytes by interferon-gamma: a molecular basis for priming and synergism with bacterial lipopolysaccharide. *Blood* **99**, 3427–3431.

Bosque, F., Belkaid, Y., Briend, E., Hevin, B., Lebastard, M., Soussi, N., Milon, G., 1997. The biology of macrophages. *Pathol. Biol. (Paris)* **45**, 103–109.

- Bottone, E.J., Perez, A.A., Gordon, R.E., Qureshi, M.N., 1994.** Differential binding capacity and internalisation of bacterial substrates as factors in growth rate of *Acanthamoeba* spp. *J. Med. Microbiol.* **40**, 148–154.
- Boucher, H.W., Corey, G.R., 2008.** Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin. Infect. Dis.* **46 Suppl 5**, S344-349. 0
- Bowers, B., 1977.** Comparison of pinocytosis and phagocytosis in *Acanthamoeba castellanii*. *Exp. Cell Res.* **110**, 409–417.
- Bowers, B., Korn, E.D., 1969.** The fine structure of *Acanthamoeba castellanii* (Neff strain). II. Encystment. *J. Cell Biol.* **41**, 786–805.
- Bowers, B., Korn, E.D., 1968.** The fine structure of *Acanthamoeba castellanii*. I. The trophozoite. *J. Cell Biol.* **39**, 95–111.
- Bowers, B., Olszewski, T.E., 1983.** *Acanthamoeba* discriminates internally between digestible and indigestible particles. *J. Cell Biol.* **97**, 317–322.
- Bozzaro, S., Bucci, C., Steinert, M., 2008.** Phagocytosis and host-pathogen interactions in *Dictyostelium* with a look at macrophages. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **271**, 253–300.
- Bronner, S., Monteil, H., Prévost, G., 2004.** Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*: complexity and applications. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**, 183–200.
- Brummer, E., Morozumi, P.A., Philpott, D.E., Stevens, D.A., 1981.** Virulence of fungi: correlation of virulence of *Blastomyces dermatitidis* in vivo with escape from macrophage inhibition of replication in vitro. *Infect. Immun.* **32**, 864–871.
- Burnett, R.M., 1985.** The structure of the adenovirus capsid. II. The packing symmetry of hexon and its implications for viral architecture. *J. Mol. Biol.* **185**, 125–143.
- Caby, F., Bismuth, R., Bossi, P., 2009.** Infections à *staphylocoques*. Datatraitestmtm-45389.
- Cano, V., March, C., Insua, J.L., Aguiló, N., Llobet, E., Moranta, D., Regueiro, V., Brennan, G.P., Millán-Lou, M.I., Martín, C., Garmendia, J., Bengoechea, J.A., 2015.** *Klebsiella pneumoniae* survives within macrophages by avoiding delivery to lysosomes. *Cell. Microbiol.* **17**, 1537–1560.

Cardas, M., Khan, N.A., Alsam, S., 2012. *Staphylococcus aureus* exhibit similarities in their interactions with *Acanthamoeba* and ThP1 macrophage-like cells. *Exp. Parasitol.* **132**, 513–518.

Casselton, L., Zolan, M., 2002. The art and design of genetic screens: filamentous fungi. *Nat. Rev. Genet.* **3**, 683–697.

Cateau, E., Delafont, V., Hechard, Y., Rodier, M.H., 2014a. Free-living amoebae: what part do they play in healthcare-associated infections? *J. Hosp. Infect.* **87**, 131–140.

Cateau, E., Hechard, Y., Fernandez, B., Rodier, M.H., 2014b. Free living amoebae could enhance *Fusarium oxysporum* growth. *Fungal Ecol.* **8**, 12–17.

Cavalier-Smith, T., Fiore-Donno, A.M., Chao, E., Kudryavtsev, A., Berney, C., Snell, E.A., Lewis, R., 2015. Multigene phylogeny resolves deep branching of *Amoebozoa*. *Mol. Phylogenet. Evol.* **83**, 293–304.

Cavicchioni, G., Fraulini, A., Falzarano, S., Spisani, S., 2006. Structure-activity relationship of for-L-Met L-Leu-L-Phe-OMe analogues in human neutrophils. *Bioorganic Chem.* **34**, 298–318.

Chatterjee, P.K., Vayda, M.E., Flint, S.J., 1986. Identification of proteins and protein domains that contact DNA within adenovirus nucleoprotein cores by ultraviolet light crosslinking of oligonucleotides ³²P-labelled in vivo. *J. Mol. Biol.* **188**, 23–37.

Chatterjee, P.K., Vayda, M.E., Flint, S.J., 1985. Interactions among the three adenovirus core proteins. *J. Virol.* **55**, 379–386.

Chawla, A., 2010. Control of Macrophage Activation and Function by PPARs. *Circ. Res.* **106**, 1559–1569.

Chermette, R., Bussi eras, R., 1993. Abr eg e de parasitologie v et erinaire. Fascicule V, Mycologie v et erinaire. Service de parasitologie, Ecole nationale v et erinaire d'Alfort, Maisons Alfort, France.

Chiou, S.K., Tseng, C.C., Rao, L., White, E., 1994. Functional complementation of the adenovirus E1B 19-kilodalton protein with Bcl-2 in the inhibition of apoptosis in infected cells. *J. Virol.* **68**, 6553–6566.

- Chotirmall, S.H., Mirkovic, B., Lavelle, G.M., McElvaney, N.G., 2014.** Immuno-evasive *Aspergillus virulence* factors. *Mycopathologia* **178**, 363–370.
- Chroboczek, J., Viard, F., D'Halluin, J.C., 1986.** Human adenovirus 2 temperature-sensitive mutant 112 contains three mutations in the protein IIIa gene. *Gene* **49**, 157–160.
- Chu, Y., Sperber, K., Mayer, L., Hsu, M.T., 1992.** Persistent infection of human adenovirus type 5 in human monocyte cell lines. *Virology* **188**, 793–800.
- Cirillo, J.D., Falkow, S., Tompkins, L.S., Bermudez, L.E., 1997.** Interaction of *Mycobacterium avium* with environmental amoebae enhances virulence. *Infect. Immun.* **65**, 3759–3767.
- Colby, W.W., Shenk, T., 1981.** Adenovirus type 5 virions can be assembled in vivo in the absence of detectable polypeptide IX. *J. Virol.* **39**, 977–980.
- Cooke, E.M., Brayson, J.C., Edmondson, A.S., Hall, D., 1979.** An investigation into the incidence and sources of *klebsiella* infections in hospital patients. *J. Hyg. (Lond.)* **82**, 473–480.
- Coşkun, K.A., Özçelik, S., Tutar, L., Elaldı, N., Tutar, Y., 2013.** Isolation and identification of free-living amoebae from tap water in Sivas, Turkey. *BioMed Res. Int.* 2013.
- Cosson, P., Lima, W.C., 2014.** Intracellular killing of bacteria: is *Dictyostelium* a model macrophage or an alien? *Cell. Microbiol.* **16**, 816–823.
- Cryz, S.J., Pitt, T.L., Ayling-Smith, B., Que, J.U., 1990.** Immunological cross-reactivity between *Enterobacter aerogenes* and *Klebsiella* capsular polysaccharides. *Microb. Pathog.* **9**, 127–130.
- Dagenais, T.R.T., Keller, N.P., 2009.** Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **22**, 447–465.
- Danes, L., Cerva, L., 1981.** Survival of polioviruses and echoviruses in *Acanthamoeba castellanii* cultivated in vitro. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* **25**, 169–174.
- Davison, A.J., Benko, M., Harrach, B., 2003.** Genetic content and evolution of adenoviruses. *J. Gen. Virol.* **84**, 2895–2908.

De Jong, J.C., Wermenbol, A.G., Verweij-Uijterwaal, M.W., Slaterus, K.W., Wertheim-Van Dillen, P., Van Doornum, G.J., Khoo, S.H., Hierholzer, J.C., 1999. Adenoviruses from human immunodeficiency virus-infected individuals, including two strains that represent new candidate serotypes Ad50 and Ad51 of species B1 and D, respectively. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 3940–3945.

De la Torre, J., Sholar, A., 2006. Chronic Wounds: Overview, The Biology of Wound Healing, Common Chronic Wounds.

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

Degos, L., 1987. [Differentiation of human malignant myeloid and lymphoid cells]. *Nouv. Rev. Fr. Hematol.* **29**, 37–41.

Dekker, J., Kanellopoulos, P.N., Loonstra, A.K., van Oosterhout, J.A., Leonard, K., Tucker, P.A., van der Vliet, P.C., 1997. Multimerization of the adenovirus DNA-binding protein is the driving force for ATP-independent DNA unwinding during strand displacement synthesis. *EMBO J.* **16**, 1455–1463.

Delafont, V., Brouke, A., Bouchon, D., Moulin, L., Héchard, Y., 2013. Microbiome of free-living amoebae isolated from drinking water. *Water Res.* **47**, 6958–6965.

Dementhon, K., El-Kirat-Chatel, S., Noël, T., 2012. Development of an in vitro model for the multi-parametric quantification of the cellular interactions between *Candida* yeasts and phagocytes. *PloS One* **7**, e32621.

Desoubeau, G., Chandénier, J., 2010. *Aspergillus* et maladies aspergillaires. *Feuillet Biol.* **293**, 53–63.

Di Paolo, N.C., Doronin, K., Baldwin, L.K., Papayannopoulou, T., Shayakhmetov, D.M., 2013. The transcription factor IRF3 triggers “defensive suicide” necrosis in response to viral and bacterial pathogens. *Cell Rep.* **3**, 1840–1846.

Drancourt, M., Bollet, C., Carta, A., Rousselier, P., 2001. Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 925–932.

Drozanski, W., 1956. Fatal bacterial infection in soil amoebae. *Acta Microbiol. Pol.* 1952 **5**, 315–317.

Dunman, P.M., Murphy, E., Haney, S., Palacios, D., Tucker-Kellogg, G., Wu, S., Brown, E.L., Zagursky, R.J., Shlaes, D., Projan, S.J., 2001. Transcription profiling-based identification of *Staphylococcus aureus* genes regulated by the agr and/or sarA loci. *J. Bacteriol.* **183**, 7341–7353.

Euzéby, J.P., 1997. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**, 590–592.

Fabry, C.M.S., Rosa-Calatrava, M., Conway, J.F., Zubieta, C., Cusack, S., Ruigrok, R.W.H., Schoehn, G., 2005. A quasi-atomic model of human adenovirus type 5 capsid. *EMBO J.* **24**, 1645–1654.

Fernandes, M.C., Cortez, M., Flannery, A.R., Tam, C., Mortara, R.A., Andrews, N.W., 2011. *Trypanosoma cruzi* subverts the sphingomyelinase-mediated plasma membrane repair pathway for cell invasion. *J. Exp. Med.* **208**, 909–921.

Fernández, K.S., de Alarcón, P.A., 2013. Development of the hematopoietic system and disorders of hematopoiesis that present during infancy and early childhood. *Pediatr. Clin. North Am.* **60**, 1273–1289.

Fields, B.S., 1996. The molecular ecology of *legionellae*. *Trends Microbiol.* **4**, 286–290.

Flandrois, 1997. Bactériologie médicale. Presses Universitaires Lyon.

Flannagan, R.S., Jaumouillé, V., Grinstein, S., 2012. The cell biology of phagocytosis. *Annu. Rev. Pathol.* **7**, 61–98.

Friedman, E.J., 2002. Immune modulation by ionizing radiation and its implications for cancer immunotherapy. *Curr. Pharm. Des.* **8**, 1765–1780.

- Fritsche, T.R., Gautom, R.K., Seyedirashti, S., Bergeron, D.L., Lindquist, T.D., 1993.** Occurrence of bacterial endosymbionts in *Acanthamoeba spp.* isolated from corneal and environmental specimens and contact lenses. *J. Clin. Microbiol.* **31**, 1122–1126.
- Fukuto, H.S., Svetlanov, A., Palmer, L.E., Karzai, A.W., Bliska, J.B., 2010.** Global gene expression profiling of *Yersinia pestis* replicating inside macrophages reveals the roles of a putative stress-induced operon in regulating type III secretion and intracellular cell division. *Infect. Immun.* **78**, 3700–3715.
- Gaggar, A., Shayakhmetov, D.M., Lieber, A., 2003.** CD46 is a cellular receptor for group B adenoviruses. *Nat. Med.* **9**, 1408–1412.
- Gams, W., Christensen, M., Onions, A., Pitt, J., Samson, R., 1985.** Infrageneric taxa of *Aspergillus*, in: Plenum Press. New York, pp. 55–62.
- Garner, A., 1993.** Pathogenesis of acanthamoebic keratitis: hypothesis based on a histological analysis of 30 cases. *Br. J. Ophthalmol.* **77**, 366–370.
- Garnett, C.T., Erdman, D., Xu, W., Gooding, L.R., 2002.** Prevalence and quantitation of species C adenovirus DNA in human mucosal lymphocytes. *J. Virol.* **76**, 10608–10616.
- Gordon, S., 2008.** Elie Metchnikoff: father of natural immunity. *Eur. J. Immunol.* **38**, 3257–3264.
- Gordon, S., 2003.** Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 23–35.
- Greber, U.F., Suomalainen, M., Stidwill, R.P., Boucke, K., Ebersold, M.W., Helenius, A., 1997.** The role of the nuclear pore complex in adenovirus DNA entry. *EMBO J.* **16**, 5998–6007.
- Greber, U.F., Willetts, M., Webster, P., Helenius, A., 1993.** Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells. *Cell* **75**, 477–486.
- Greub, G., 2009.** *Parachlamydia acanthamoebae*, an emerging agent of pneumonia. *Clin. Microbiol. Infect.* **15**, 18–28.
- Greub, G., Raoult, D., 2004.** Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**, 413–433.

- Guillot, J., Chermette, R., 2001.** [Aspergillosis in birds]. *Rev. Prat.* **51**, 704–707.
- Haverkorn, M.L., Michel, M.F., 1979.** Nosocomial *klebsiellas*. I. Colonization of hospitalized patients. *J. Hyg. (Lond.)* **82**, 177–193.
- Hayette, M.-P., Christiaens, G., Mutsers, J., Barbier, C., Huynen, P., Melin, P., de Mol, P., 2010.** Filamentous fungi recovered from the water distribution system of a Belgian university hospital. *Med. Mycol.* **48**, 969–974.
- Hennequin, C., Forestier, C., 2007.** Influence of capsule and extended-spectrum beta-lactamases encoding plasmids upon *Klebsiella pneumoniae* adhesion. *Res. Microbiol.* **158**, 339–347.
- Hertzén, E., Johansson, L., Wallin, R., Schmidt, H., Kroll, M., Rehn, A.P., Kotb, M., Mörgelin, M., Norrby-Teglund, A., 2010.** M1 protein-dependent intracellular trafficking promotes persistence and replication of *Streptococcus pyogenes* in macrophages. *J. Innate Immun.* **2**, 534–545.
- Hierholzer, J.C., Wigand, R., Anderson, L.J., Adrian, T., Gold, J.W., 1988.** Adenoviruses from patients with AIDS: a plethora of serotypes and a description of five new serotypes of subgenus D (types 43-47). *J. Infect. Dis.* **158**, 804–813.
- Highsmith, A.K., Jarvis, W.R., 1985.** *Klebsiella pneumoniae*: selected virulence factors that contribute to pathogenicity. *Infect. Control IC* **6**, 75–77.
- Hill, L., 1981.** taxonomy of the *staphylococci*. *The Staphylococci*.
- Hillmann, F., Novohradská, S., Mattern, D.J., Forberger, T., Heinekamp, T., Westermann, M., Winckler, T., Brakhage, A.A., 2015.** Virulence determinants of the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* protect against soil amoeba predation. *Environ. Microbiol.* **17**, 2858–2869.
- Hobson, R.P., 2000.** The effects of diffusates from the spores of *Aspergillus fumigatus* and *A. terreus* on human neutrophils, *Naegleria gruberi* and *Acanthamoeba castellanii*. *Med. Mycol.* **38**, 133–141.

- Horwitz, M.A., 1983a.** The Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes. *J. Exp. Med.* **158**, 2108–2126.
- Horwitz, M.A., 1983b.** Formation of a novel phagosome by the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) in human monocytes. *J. Exp. Med.* **158**, 1319–1331.
- Hsueh, T.-Y., Gibson, K.E., 2015.** Interactions between Human Norovirus Surrogates and *Acanthamoeba* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**, 4005–4013.
- Hume, D.A., Ross, I.L., Himes, S.R., Sasmono, R.T., Wells, C.A., Ravasi, T., 2002.** The mononuclear phagocyte system revisited. *J. Leukoc. Biol.* **72**, 621–627.
- Huws, S.A., McBain, A.J., Gilbert, P., 2005.** Protozoan grazing and its impact upon population dynamics in biofilm communities. *J. Appl. Microbiol.* **98**, 238–244.
- Jacquemin, J.L., Simitzis-Le Flohic, A.M., Chauveau, N., 1981.** [Free-living Amoebae in fresh water. Study of the water supply of the town of Poitiers (France)]. *Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales* **74**, 521–524.
- Jadin, J., 1975.** Amibes “Limax” vecteurs possibles de *Mycobactéries* et de *M. leprae*. *Acta Leprol.* **59/60**, 57–67.
- Jahn, T.L., Bovee, E.C., 1965.** Mechanisms of Movement in Taxonomy of *Sarcodina*. I. As a Basis for a New Major Dichotomy into Two Classes, Autotractea and Hydraulea. *Am. Midl. Nat.* **73**, 30–40.
- Jahn, T.L., Bovee, E.C., Griffith, D.L., 1974.** Taxonomy and Evolution of the *Sarcodina*: A Reclassification. *Taxon* **23**, 483–496.
- Jamilloux, Y., Jarraud, S., Lina, G., Etienne, J., Ader, F., 2012.** [*Legionella*, Legionnaires' disease]. *Med. Sci. MS* **28**, 639–645.
- Janda, J.M., Abbott, S.L., 2006.** The Genera *Klebsiella* and *Raoultella* 115–136.
- Joly, B., Reynaud, A., 2003.** Entérobactéries: systématique et méthodes de diagnostic. Ed. médicales internationales.
- Jones, M.P., Orosz, S.E., 2000.** The diagnosis of aspergillosis in birds. *Fungal Diseases* **9**, 52–58.

- Jung, S.-Y., Matin, A., Kim, K.S., Khan, N.A., 2007.** The capsule plays an important role in *Escherichia coli* K1 interactions with *Acanthamoeba*. *Int. J. Parasitol.* **37**, 417–423.
- Jutras, I., Desjardins, M., 2005.** Phagocytosis: at the crossroads of innate and adaptive immunity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **21**, 511–527.
- Kabha, K., Nissimov, L., Athamna, A., Keisari, Y., Parolis, H., Parolis, L.A., Grue, R.M., Schlepper-Schafer, J., Ezekowitz, A.R., Ohman, D.E., 1995.** Relationships among capsular structure, phagocytosis, and mouse virulence in *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun.* **63**, 847–852.
- Kaur, S., Singh, S., 2014.** Biofilm formation by *Aspergillus fumigatus*. *Med. Mycol.* **52**, 2–9.
- Kawai, T., Akira, S., 2005.** Pathogen recognition with Toll-like receptors. *Curr. Opin. Immunol.* **17**, 338–344.
- Khan, N.A., 2009.** *Acanthamoeba*: Biology and Pathogenesis. Horizon Scientific Press.
- Khunkitti, W., Lloyd, D., Furr, J.R., Russell, A.D., 1998.** *Acanthamoeba castellanii*: growth, encystment, excystment and biocide susceptibility. *J. Infect.* **36**, 43–48.
- Kilvington, S., Price, J., 1990.** Survival of *Legionella pneumophila* within cysts of *Acanthamoeba polyphaga* following chlorine exposure. *J. Appl. Bacteriol.* **68**, 519–525.
- Kim, W.-T., Kong, H.-H., Ha, Y.-R., Hong, Y.-C., Jeong, H.J., Yu, H.S., Chung, D.-I., 2006.** Comparison of specific activity and cytopathic effects of purified 33 kDa serine proteinase from *Acanthamoeba* strains with different degree of virulence. *Korean J. Parasitol.* **44**, 321–330.
- King, C.H., Shotts, E.B., Wooley, R.E., Porter, K.G., 1988.** Survival of coliforms and bacterial pathogens within protozoa during chlorination. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 3023–3033.
- Koczura, R., Kaznowski, A., 2003.** Occurrence of the *Yersinia* high-pathogenicity island and iron uptake systems in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Microb. Pathog.* **35**, 197–202.

Korn, E.D., Weisman, R.A., 1967. Phagocytosis of latex beads by *Acanthamoeba*. II. Electron microscopic study of the initial events. *J. Cell Biol.* **34**, 219–227.

Kosalec, I., Pepeljnjak, S., 2005. Mycotoxigenicity of clinical and environmental *Aspergillus fumigatus* and *A. flavus* isolates. *Acta Pharm. Zagreb Croat.* **55**, 365–375.

Kraibooj, K., Schoeler, H., Svensson, C.-M., Brakhage, A.A., Figge, M.T., 2015. Automated quantification of the phagocytosis of *Aspergillus fumigatus* conidia by a novel image analysis algorithm. *Front. Microbiol.* **6**, 549.

Kuburich, N.A., Adhikari, N., Hadwiger, J.A., 2016. *Acanthamoeba* and *Dictyostelium* Use Different Foraging Strategies. *Protist* **167**, 511–525.

Kuiper, M.W., Valster, R.M., Wullings, B.A., Boonstra, H., Smidt, H., van der Kooij, D., 2006. Quantitative detection of the free-living amoeba *Hartmannella vermiformis* in surface water by using real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 5750–5756.

Kunkle, R., 2003. Fungal diseases, in: *Diseases of Poultry*. Y. M. Saif.

La Scola, B., Desnues, C., Pagnier, I., Robert, C., Barrassi, L., Fournous, G., Merchat, M., Suzan-Monti, M., Forterre, P., Koonin, E., Raoult, D., 2008. The virophage as a unique parasite of the giant mimivirus. *Nature* **455**, 100–104.

Larkin, D.F., Kilvington, S., Easty, D.L., 1990. Contamination of contact lens storage cases by *Acanthamoeba* and bacteria. *Br. J. Ophthalmol.* **74**, 133–135.

Latgé, J.-P., 2010. Tasting the fungal cell wall. *Cell. Microbiol.* **12**, 863–872.

Latgé, J.-P., 2007. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Mol. Microbiol.* **66**, 279–290.

Latgé, J.P., 1999. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**, 310–350.

Lawande, R.V., 1983. Recovery of soil amoebae from the air during the harmattan in Zaria, Nigeria. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **77**, 45–49.

Lawlor, M.S., O'connor, C., Miller, V.L., 2007. Yersiniabactin is a virulence factor for *Klebsiella pneumoniae* during pulmonary infection. *Infect. Immun.* **75**, 1463–1472.

Lee, W.L., Harrison, R.E., Grinstein, S., 2003. Phagocytosis by neutrophils. *Microbes Infect.* **5**, 1299–1306.

Leen, A.M., Rooney, C.M., 2005. Adenovirus as an emerging pathogen in immunocompromised patients. *Br. J. Haematol.* **128**, 135–144.

Li, Q.G., Hambraeus, J., Wadell, G., 1991. Genetic relationship between thirteen genome types of adenovirus 11, 34, and 35 with different tropisms. *Intervirology* **32**, 338–350.

Licitra, G., 2013. Etymologia: *Staphylococcus*. *Emerg. Infect. Dis.* **19**, 1553.

Lin, T.-L., Lee, C.-Z., Hsieh, P.-F., Tsai, S.-F., Wang, J.-T., 2008. Characterization of integrative and conjugative element ICEKp1-associated genomic heterogeneity in a *Klebsiella pneumoniae* strain isolated from a primary liver abscess. *J. Bacteriol.* **190**, 515–526.

Liu, G.Q., Babiss, L.E., Volkert, F.C., Young, C.S., Ginsberg, H.S., 1985. A thermolabile mutant of adenovirus 5 resulting from a substitution mutation in the protein VIII gene. *J. Virol.* **53**, 920–925.

Lorenzo-Morales, J., Coronado-Alvarez, N., Martínez-Carretero, E., Maciver, S.K., Valladares, B., 2007. Detection of four adenovirus serotypes within water-isolated strains of *Acanthamoeba* in the Canary Islands, Spain. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **77**, 753–756.

Lorenzo-Morales, J., Kliescikova, J., Martinez-Carretero, E., De Pablos, L.M., Profotova, B., Nohynkova, E., Osuna, A., Valladares, B., 2008. Glycogen phosphorylase in *Acanthamoeba spp.*: determining the role of the enzyme during the encystment process using RNA interference. *Eukaryot. Cell* **7**, 509–517.

Lowy, F.D., 1998. *Staphylococcus aureus* infections. *N. Engl. J. Med.* **339**, 520–532.

Ly, T.M., Müller, H.E., 1990. Ingested *Listeria monocytogenes* survive and multiply in protozoa. *J. Med. Microbiol.* **33**, 51–54.

Maisey, H.C., Doran, K.S., Nizet, V., 2008. Recent advances in understanding the molecular basis of group B *Streptococcus* virulence. *Expert Rev. Mol. Med.* **10**, e27.

Malliaris, S.D., Steenbergen, J.N., Casadevall, A., 2004. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* can exploit *Acanthamoeba castellanii* for growth. *Med. Mycol.* **42**, 149–158.

- Maltezou, H.C., Giamarellou, H., 2006.** Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Int. J. Antimicrob. Agents* **27**, 87–96.
- Mantovani, A., Sica, A., Locati, M., 2007.** New vistas on macrophage differentiation and activation. *Eur. J. Immunol.* **37**, 14–16.
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., Locati, M., 2004.** The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* **25**, 677–686.
- March, C., Cano, V., Moranta, D., Llobet, E., Pérez-Gutiérrez, C., Tomás, J.M., Suárez, T., Garmendia, J., Bengoechea, J.A., 2013.** Role of bacterial surface structures on the interaction of *Klebsiella pneumoniae* with phagocytes. *PloS One* **8**, e56847.
- Marciano-Cabral, F., Cabral, G., 2003.** *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**, 273–307.
- Martinez, F.O., Gordon, S., Locati, M., Mantovani, A., 2006.** Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J. Immunol.* **177**, 7303–7311.
- Mastroeni, P., Merendino, R.A., Bonina, L., Arena, A., Liberto, M.C., Gazzara, D., 1985.** “In vitro” study on human mononuclear phagocytic cells behaviour versus DNA and RNA viruses. *G. Batteriol. Virol. Immunol.* **78**, 262–273.
- Mattana, A., Serra, C., Mariotti, E., Delogu, G., Fiori, P.L., Cappuccinelli, P., 2006.** *Acanthamoeba castellanii* promotion of in vitro survival and transmission of coxsackie b3 viruses. *Eukaryot. Cell* **5**, 665–671.
- Matthews, D.A., Russell, W.C., 1998.** Adenovirus core protein V is delivered by the invading virus to the nucleus of the infected cell and later in infection is associated with nucleoli. *J. Gen. Virol.* **79**, 1671–1675.
- Matthews, D.A., Russell, W.C., 1995.** Adenovirus protein-protein interactions: molecular parameters governing the binding of protein VI to hexon and the activation of the adenovirus 23K protease. *J. Gen. Virol.* **76**, 1959–1969.

- Matthews, D.A., Russell, W.C., 1994.** Adenovirus protein-protein interactions: hexon and protein VI. *J. Gen. Virol.* **75**, 3365–3374.
- McCormick, A., Loeffler, J., Ebel, F., 2010.** *Aspergillus fumigatus*: contours of an opportunistic human pathogen. *Cell. Microbiol.* **12**, 1535–1543.
- Medina, G., Flores-Martin, S., Fonseca, B., Otth, C., Fernandez, H., 2014.** Mechanisms associated with phagocytosis of *Arcobacter butzleri* by *Acanthamoeba castellanii*. *Parasitol. Res.* **113**, 1933–1942.
- Medzhitov, R., Janeway, C.A., 1997.** Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr. Opin. Immunol.* **9**, 4–9.
- Mensah, K.A., Schwarz, E.M., Ritchlin, C.T., 2008.** Altered bone remodeling in psoriatic arthritis. *Curr. Rheumatol. Rep.* **10**, 311–317.
- Mercandetti, M., Cohen, A., 2005.** Wound Healing and Repair: Overview, Types of Wound Healing, Categories of Wound Healing.
- Mercer, J., Greber, U.F., 2013.** Virus interactions with endocytic pathways in macrophages and dendritic cells. *Trends Microbiol.* **21**, 380–388.
- Milne, J.L., Coukell, M.B., 1991.** A Ca²⁺ transport system associated with the plasma membrane of *Dictyostelium discoideum* is activated by different chemoattractant receptors. *J. Cell Biol.* **112**, 103–110.
- Moliner, C., Raoult, D., Fournier, P.E., 2009.** Evidence of horizontal gene transfer between amoeba and bacteria. *Clin Microbiol Infect* **15 Suppl 2**, 178–80.
- Moore, M.M., 2013.** The crucial role of iron uptake in *Aspergillus fumigatus* virulence. *Curr. Opin. Microbiol.* **16**, 692–699.
- Morris, G., Kokki, M.H., Anderson, K., Richardson, M.D., 2000.** Sampling of *Aspergillus* spores in air. *J. Hosp. Infect.* **44**, 81–92.
- Morton, C.O., Bouzani, M., Loeffler, J., Rogers, T.R., 2012.** Direct interaction studies between *Aspergillus fumigatus* and human immune cells; what have we learned about pathogenicity and host immunity? *Front. Microbiol.* **3**, 413.

Mosser, D.M., 2003. The many faces of macrophage activation. *J. Leukoc. Biol.* **73**, 209–212.

Mosser, D.M., Karp, C.L., 1999. Receptor mediated subversion of macrophage cytokine production by intracellular pathogens. *Curr. Opin. Immunol.* **11**, 406–411.

Murray, P.J., Wynn, T.A., 2011. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 723–737.

Murti, C.R.K., Shukla, O.P., 1984. Differentiation of pathogenic amoebae: encystation and excystation of *Acanthamoeba culbertsoni* — A model. **6**, 475–489.

Mysiak, M.E., Holthuisen, P.E., van der Vliet, P.C., 2004. The adenovirus priming protein pTP contributes to the kinetics of initiation of DNA replication. *Nucleic Acids Res.* **32**, 3913–3920.

Nasser, W., Santhanam, B., Miranda, E.R., Parikh, A., Juneja, K., Rot, G., Dinh, C., Chen, R., Zupan, B., Shaulsky, G., Kuspa, A., 2013. Bacterial discrimination by dictyostelid amoebae reveals the complexity of ancient interspecies interactions. *Curr. Biol.* **23**, 862–872.

Nassif, X., Sansonetti, P.J., 1986. Correlation of the virulence of *Klebsiella pneumoniae* K1 and K2 with the presence of a plasmid encoding aerobactin. *Infect. Immun.* **54**, 603–608.

Nieminen, S.M., Kärki, R., Auriola, S., Toivola, M., Laatsch, H., Laatikainen, R., Hyvärinen, A., Von Wright, A., 2002. Isolation and identification of *Aspergillus fumigatus* mycotoxins on growth medium and some building materials. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 4871–4875.

Norrby, E., Bartha, A., Boulanger, P., Dreizin, R.S., Ginsberg, H.S., Kalter, S.S., Kawamura, H., Rowe, W.P., Russell, W.C., Schlesinger, W., Wigand, R., 1976. *Adenoviridae*. *Intervirology* **7**, 117–125.

O’Gorman, C.M., Fuller, H.T., Dyer, P.S., 2009. Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature* **457**, 471–474.

- Ovrutsky, A.R., Chan, E.D., Kartalija, M., Bai, X., Jackson, M., Gibbs, S., Falkinham, J.O., Iseman, M.D., Reynolds, P.R., McDonnell, G., Thomas, V., 2013.** Cooccurrence of free-living amoebae and nontuberculous *Mycobacteria* in hospital water networks, and preferential growth of *Mycobacterium avium* in *Acanthamoeba lenticulata*. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 3185–3192.
- Page, F.C., 1987.** The Classification of “Naked” Amoebae (Phylum Rhizopoda). *Arch. Für Protistenkd.* **133**, 199–217.
- Pagnier, I., Valles, C., Raoult, D., La Scola, B., 2015.** Isolation of *Vermamoeba vermiformis* and associated bacteria in hospital water. *Microb. Pathog.* **80**, 14–20.
- Pan, M., Xu, X., Chen, Y., Jin, T., 2016.** Identification of a Chemoattractant G-Protein-Coupled Receptor for Folic Acid that Controls Both Chemotaxis and Phagocytosis. *Dev. Cell* **36**, 428–439.
- Paris, S., Debeaupuis, J.-P., Crameri, R., Carey, M., Charlès, F., Prévost, M.C., Schmitt, C., Philippe, B., Latgé, J.P., 2003.** Conidial hydrophobins of *Aspergillus fumigatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 1581–1588.
- Pasanen, A.-L., Kalliokoski, P., Pasanen, P., Jantunen, M.J., Nevalainen, A., 1991.** Laboratory studies on the relationship between fungal growth and atmospheric temperature and humidity. *Environ. Int., Healthy Buildings* **17**, 225–228.
- Pearson, C., Littlewood, E., Douglas, P., Robertson, S., Gant, T.W., Hansell, A.L., 2015.** Exposures and health outcomes in relation to bioaerosol emissions from composting facilities: a systematic review of occupational and community studies. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* **18**, 43–69.
- Peng, H.L., Wang, P.Y., Wu, J.L., Chiu, C.T., Chang, H.Y., 1991.** Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae*. *Zhonghua Min Guo Wei Sheng Wu Ji Mian Yi Xue Za Zhi* **24**, 264–271.
- Perez-Romero, P., Gustin, K.E., Imperiale, M.J., 2006.** Dependence of the encapsidation function of the adenovirus L1 52/55-kilodalton protein on its ability to bind the packaging sequence. *J. Virol.* **80**, 1965–1971.

Philippe, C., Blech, M.F., Hartemann, P., 2006. [Intra-amoebal development of *Legionella pneumophila* and the potential role of amoebae in the transmission of Legionnaires' disease]. *Med. Mal. Infect.* **36**, 196–200.

Pickup, Z.L., Pickup, R., Parry, J.D., 2007. Growth of *Acanthamoeba castellanii* and *Hartmannella vermiformis* on live, heat-killed and DTAF-stained bacterial prey. *FEMS Microbiol. Ecol.* **61**, 264–272.

Pitt, J.I., 1994. The current role of *Aspergillus* and *Penicillium* in human and animal health. *J. Med. Vet. Mycol.* **32 Suppl 1**, 17–32.

Podschun, R., Acktun, H., Okpara, J., Linderkamp, O., Ullmann, U., Borneff-Lipp, M., 1998. Isolation of *Klebsiella planticola* from newborns in a neonatal ward. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 2331–2332.

Podschun, R., Pietsch, S., Höller, C., Ullmann, U., 2001. Incidence of *Klebsiella* species in surface waters and their expression of virulence factors. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 3325–3327.

Podschun, R., Ullmann, U., 1998. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**, 589–603.

Podschun, R., Ullmann, U., 1992. *Klebsiella* capsular type K7 in relation to toxicity, susceptibility to phagocytosis and resistance to serum. *J. Med. Microbiol.* **36**, 250–254.

Portnoy, D.A., Auerbuch, V., Glomski, I.J., 2002. The cell biology of *Listeria monocytogenes* infection: the intersection of bacterial pathogenesis and cell-mediated immunity. *J. Cell Biol.* **158**, 409–414.

Pujol, C., Klein, K.A., Romanov, G.A., Palmer, L.E., Citrota, C., Zhao, Z., Bliska, J.B., 2009. *Yersinia pestis* can reside in autophagosomes and avoid xenophagy in murine macrophages by preventing vacuole acidification. *Infect. Immun.* **77**, 2251–2261.

Radtke, A.L., Anderson, K.L., Davis, M.J., DiMagno, M.J., Swanson, J.A., O’Riordan, M.X., 2011. *Listeria monocytogenes* exploits cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) to escape the phagosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 1633–1638.

- Rajagopal, L., 2009.** Understanding the regulation of Group B Streptococcal virulence factors. *Future Microbiol.* **4**, 201–221.
- Raper, K.B., Fennell, D.I., 1965.** *The Genus Aspergillus*. Williams & Wilkins.
- Ravetch, J.V., Bolland, S., 2001.** IgG Fc receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **19**, 275–290.
- Reed, L.J., Muench, H., 1938.** A SIMPLE METHOD OF ESTIMATING FIFTY PER CENT ENDPOINTS. *Am. J. Epidemiol.* **27**, 493–497.
- Reijula, K., Tuomi, T., 2003.** Mycotoxins of *aspergilli*: exposure and health effects. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* **8**, s232-235.
- Reverey, J.F., Jeon, J.-H., Bao, H., Leippe, M., Metzler, R., Selhuber-Unkel, C., 2015.** Superdiffusion dominates intracellular particle motion in the supercrowded cytoplasm of pathogenic *Acanthamoeba castellanii*. *Sci. Rep.* **5**, 11690.
- Rhoads, W.J., Ji, P., Pruden, A., Edwards, M.A., 2015.** Water heater temperature set point and water use patterns influence *Legionella pneumophila* and associated microorganisms at the tap. *Microbiome* **3**, 67.
- Rickard, A.J., Young, M.J., 2009.** Corticosteroid receptors, macrophages and cardiovascular disease. *J. Mol. Endocrinol.* **42**, 449–459.
- Riscili, B.P., Wood, K.L., 2009.** Noninvasive pulmonary *Aspergillus* infections. *Clin. Chest Med.* **30**, 315–335, vii.
- Rivera, F., Ramírez, E., Bonilla, P., Calderón, A., Gallegos, E., Rodríguez, S., Ortiz, R., Zaldívar, B., Ramírez, P., Durán, A., 1993.** Pathogenic and free-living amoebae isolated from swimming pools and physiotherapy tubs in Mexico. *Environ. Res.* **62**, 43–52.
- Rivera, F., Roy-Ocotla, G., Rosas, I., Ramirez, E., Bonilla, P., Lares, F., 1987.** Amoebae isolated from the atmosphere of Mexico City and environs. *Environ. Res.* **42**, 149–154.
- Roberts, R.J., O'Neill, K.E., Yen, C.T., 1984.** DNA sequences from the adenovirus 2 genome. *J. Biol. Chem.* **259**, 13968–13975.

Rocco, N.M., Carmen, J.C., Klein, B.S., 2011. *Blastomyces dermatitidis* yeast cells inhibit nitric oxide production by alveolar macrophage inducible nitric oxide synthase. *Infect. Immun.* **79**, 2385–2395.

Rodríguez, N.E., Gaur Dixit, U., Allen, L.-A.H., Wilson, M.E., 2011. Stage-specific pathways of *Leishmania infantum* chagasi entry and phagosome maturation in macrophages. *PloS One* **6**, e19000.

Rodríguez-Zaragoza, S., 1994. Ecology of free-living amoebae. *Crit. Rev. Microbiol.* **20**, 225–241.

Romano, P.S., Arboit, M.A., Vázquez, C.L., Colombo, M.I., 2009. The autophagic pathway is a key component in the lysosomal dependent entry of *Trypanosoma cruzi* into the host cell. *Autophagy* **5**, 6–18.

Rosenberg, K., Bertaux, J., Krome, K., Hartmann, A., Scheu, S., Bonkowski, M., 2009. Soil amoebae rapidly change bacterial community composition in the rhizosphere of *Arabidopsis thaliana*. *ISME J.* **3**, 675–684.

Rosenberg, L., De la Torre, J., 2008. Wound Healing and Growth Factors: Overview, Types of Wound Healing, Phases of Wound Healing.

Rowbotham, T.J., 1980. Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J. Clin. Pathol.* **33**, 1179–1183.

Rowe, W.P., Huebner, R.J., Gilmore, L.K., Parrott, R.H., Ward, T.G., 1953. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol.* **84**, 570–573.

Roy, C.R., Berger, K.H., Isberg, R.R., 1998. *Legionella pneumophila* DotA protein is required for early phagosome trafficking decisions that occur within minutes of bacterial uptake. *Mol. Microbiol.* **28**, 663–674.

Russell, W.C., 2000. Update on adenovirus and its vectors. *J Gen Virol* **81**: 2573-2604.

Rux, J.J., Kuser, P.R., Burnett, R.M., 2003. Structural and phylogenetic analysis of adenovirus hexons by use of high-resolution x-ray crystallographic, molecular modeling, and sequence-based methods. *J. Virol.* **77**, 9553–9566.

Saint germain, G., Summerbell, R., 1996. Champignons filamenteux d'intérêt médical. Caractéristiques et idenfication, Belmont, Star Publishing Company. ed.

Schaeffer, A.A., 1926. Taxonomy of the *Amebas*: with descriptions of thirty-nine new marine and freshwater species. The Carnegie Institution of Washington.

Scheid, P., 2015. Viruses in close associations with free-living amoebae. *Parasitol. Res.* **114**, 3959–3967.

Scheid, P., Schwarzenberger, R., 2012. *Acanthamoeba spp.* as vehicle and reservoir of adenoviruses. *Parasitol. Res.* **111**, 479–485.

Schembri, M.A., Blom, J., Krogfelt, K.A., Klemm, P., 2005. Capsule and fimbria interaction in *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun.* **73**, 4626–4633.

Schmidt, A., Wolff, M.H., 1997. Morphological characteristics of *Aspergillus fumigatus* strains isolated from patient samples. *Mycoses* **40**, 347–351.

Schroder, K., Sweet, M.J., Hume, D.A., 2006. Signal integration between IFN γ and TLR signalling pathways in macrophages. *Immunobiology* **211**, 511–524.

Schuster, F.L., Levandowsky, M., 1996. Chemosensory responses of *Acanthamoeba castellanii*: visual analysis of random movement and responses to chemical signals. *J. Eukaryot. Microbiol.* **43**, 150–158.

Schuster, F.L., Visvesvara, G.S., 2004. *Amebae* and ciliated protozoa as causal agents of waterborne zoonotic disease. *Vet. Parasitol.* **126**, 91–120.

Schwartz, J.T., Allen, L.-A.H., 2006. Role of urease in megasome formation and *Helicobacter pylori* survival in macrophages. *J. Leukoc. Biol.* **79**, 1214–1225.

Scott, A.J., Woods, J.P., 2000. Monitoring internalization of *Histoplasma capsulatum* by mammalian cell lines using a fluorometric microplate assay. *Med. Mycol.* **38**, 15–22.

Seal, D.V., Beattie, T.K., Tomlinson, A., Fan, D., Wong, E., 2003. *Acanthamoeba* keratitis. *Br. J. Ophthalmol.* **87**, 516–517.

- Seidler, M.J., Salvenmoser, S., Müller, F.-M.C., 2008.** *Aspergillus fumigatus* forms biofilms with reduced antifungal drug susceptibility on bronchial epithelial cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 4130–4136.
- Shevchuk, O., Jäger, J., Steinert, M., 2011.** Virulence properties of the *legionella pneumophila* cell envelope. *Front. Microbiol.* **2**, 74.
- Siddiqui, R., Khan, N.A., 2012.** *Acanthamoeba* is an evolutionary ancestor of macrophages: a myth or reality? *Exp. Parasitol.* **130**, 95–97.
- Simoons-Smit, A.M., Verweij-van Vught, A.M., MacLaren, D.M., 1986.** The role of K antigens as virulence factors in *Klebsiella*. *J. Med. Microbiol.* **21**, 133–137.
- Singh, B.N., 1952.** Nuclear Division in Nine Species of Small Free-Living *Amoebae* and Its Bearing on the Classification of the Order Amoebida. *Philos. Trans. R. Soc.* **236**, 405–461.
- Singh, R., Jamieson, A., Cresswell, P., 2008.** GILT is a critical host factor for *Listeria monocytogenes* infection. *Nature* **455**, 1244–1247.
- Sivaraman, K., Venkataraman, N., Cole, A.M., 2009.** *Staphylococcus aureus* nasal carriage and its contributing factors. *Future Microbiol.* **4**, 999–1008.
- Smirnov, A.V., Chao, E., Nasonova, E.S., Cavalier-Smith, T., 2011.** A revised classification of naked lobose amoebae (Amoebozoa: lobosa). *Protist* **162**, 545–570.
- Smith, L.M., May, R.C., 2013.** Mechanisms of microbial escape from phagocyte killing. *Biochem. Soc. Trans.* **41**, 475–490.
- Sriram, R., Shoff, M., Booton, G., Fuerst, P., Visvesvara, G.S., 2008.** Survival of *Acanthamoeba* cysts after desiccation for more than 20 years. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 4045–4048.
- Steenbergen, J.N., Shuman, H.A., Casadevall, A., 2001.** *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 15245–15250.

Steinberg, J.P., Galindo, R.L., Kraus, E.S., Ghanem, K.G., 2002. Disseminated acanthamebiasis in a renal transplant recipient with osteomyelitis and cutaneous lesions: case report and literature review. *Clin. Infect.* **35**, e43-49.

Stevens, M.P., Stevens, J.M., Jeng, R.L., Taylor, L.A., Wood, M.W., Hawes, P., Monaghan, P., Welch, M.D., Galyov, E.E., 2005. Identification of a bacterial factor required for actin-based motility of *Burkholderia pseudomallei*. *Mol. Microbiol.* **56**, 40–53.

Stevens, M.P., Wood, M.W., Taylor, L.A., Monaghan, P., Hawes, P., Jones, P.W., Wallis, T.S., Galyov, E.E., 2002. An Inv/Mxi-Spa-like type III protein secretion system in *Burkholderia pseudomallei* modulates intracellular behaviour of the pathogen. *Mol. Microbiol.* **46**, 649–659.

Strasser, J.E., Newman, S.L., Ciruolo, G.M., Morris, R.E., Howell, M.L., Dean, G.E., 1999. Regulation of the macrophage vacuolar ATPase and phagosome-lysosome fusion by *Histoplasma capsulatum*. *J. Immunol.* **162**, 6148–6154.

Struve, C., Bojer, M., Krogfelt, K.A., 2008. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* type 1 fimbriae by detection of phase variation during colonization and infection and impact on virulence. *Infect. Immun.* **76**, 4055–4065.

Suomalainen, M., Nakano, M.Y., Keller, S., Boucke, K., Stidwill, R.P., Greber, U.F., 1999. Microtubule-dependent plus- and minus end-directed motilities are competing processes for nuclear targeting of adenovirus. *J. Cell Biol.* **144**, 657–672.

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

Teitelbaum, S.L., 2000. Bone resorption by osteoclasts. *Science* **289**, 1504–1508.

Tell, L.A., 2005. Aspergillosis in mammals and birds: impact on veterinary medicine. *Med. Mycol.* **43 Suppl 1**, S71-73.

Thom, C., Church, C., 1926. *The Aspergilli*.

Thomas, V., Bertelli, C., Collyn, F., Casson, N., Telenti, A., Goesmann, A., Croxatto, A., Greub, G., 2011. Lausannevirus, a giant amoebal virus encoding histone doublets. *Environ. Microbiol.* **13**, 1454–1466.

Thomas, V., Greub, G., 2010. Amoeba/amoebal symbiont genetic transfers: lessons from giant virus neighbours. *Intervirology* **53**, 254–67.

Thomas, V., Herrera-Rimann, K., Blanc, D.S., Greub, G., 2006. Biodiversity of amoebae and amoeba-resisting bacteria in a hospital water network. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 2428–2438.

Thomas, V., McDonnell, G., Denyer, S.P., Maillard, J.-Y., 2010. Free-living amoebae and their intracellular pathogenic microorganisms: risks for water quality. *FEMS Microbiol. Rev.* **34**, 231–259.

Thywißen, A., Heinekamp, T., Dahse, H.-M., Schmalder-Ripcke, J., Nietzsche, S., Zipfel, P.F., Brakhage, A.A., 2011. Conidial Dihydroxynaphthalene Melanin of the Human Pathogenic Fungus *Aspergillus fumigatus* Interferes with the Host Endocytosis Pathway. *Front. Microbiol.* **2**, 96.

Tjelle, T.E., Lovdal, T., Berg, T., 2000. Phagosome dynamics and function. *BioEssays* **22**, 255–263.

Tollefson, A.E., Ryerse, J.S., Scaria, A., Hermiston, T.W., Wold, W.S., 1996. The E3-11.6-kDa adenovirus death protein (ADP) is required for efficient cell death: characterization of cells infected with adp mutants. *Virology* **220**, 152–162.

Toth, K., Spencer, J.F., Dhar, D., Sagartz, J.E., Buller, R.M.L., Painter, G.R., Wold, W.S.M., 2008. Hexadecyloxypropyl-cidofovir, CMX001, prevents adenovirus-induced mortality in a permissive, immunosuppressed animal model. *Proc. Natl.* **105**, 7293–7297.

Uhnoo, I., Wadell, G., Svensson, L., Johansson, M.E., 1984. Importance of enteric adenoviruses 40 and 41 in acute gastroenteritis in infants and young children. *J. Clin. Microbiol.* **20**, 365–372.

Underhill, D.M., Ozinsky, A., 2002. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr. Opin. Immunol.* **14**, 103–110.

Valentin-Weigand, P., Benkel, P., Rohde, M., Chhatwal, G.S., 1996. Entry and intracellular survival of group B streptococci in J774 macrophages. *Infect. Immun.* **64**, 2467–2473.

Valster, R.M., Wullings, B.A., Bakker, G., Smidt, H., van der Kooij, D., 2009. Free-living protozoa in two unchlorinated drinking water supplies, identified by phylogenetic analysis of 18S rRNA gene sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 4736–4746.

van Aartsen, J.J., Stahlhut, S.G., Harrison, E.M., Crosatti, M., Ou, H.-Y., Krogfelt, K.A., Struve, C., Rajakumar, K., 2012. Characterization of a novel chaperone/usher fimbrial operon present on KpGI-5, a methionine tRNA gene-associated genomic island in *Klebsiella pneumoniae*. *BMC Microbiol.* **12**, 59.

van Furth, R., 1989. Origin and turnover of monocytes and macrophages. *Curr. Top. Pathol. Ergeb. Pathol.* **79**, 125–150.

van Oostrum, J., Burnett, R.M., 1985. Molecular composition of the adenovirus type 2 virion. *J. Virol.* **56**, 439–448.

van Raaij, M.J., Mitraki, A., Lavigne, G., Cusack, S., 1999. A triple beta-spiral in the adenovirus fibre shaft reveals a new structural motif for a fibrous protein. *Nature* **401**, 935–938.

Van Waeyenberghe, L., Baré, J., Pasmans, F., Claeys, M., Bert, W., Haesebrouck, F., Houf, K., Martel, A., 2013. Interaction of *Aspergillus fumigatus* conidia with *Acanthamoeba castellanii* parallels macrophage-fungus interactions. *Environ. Microbiol. Rep.* **5**, 819–824.

Vanessa, B., Virginie, M., Nathalie, Q., Marie-Hélène, R., Christine, I., 2012. *Hartmannella vermiformis* can promote proliferation of *Candida spp.* in tap-water. *Water Res.* **46**, 5707–5714.

Venieri, D., Fraggadaki, A., Binas, V., Zachopoulos, A., Kiriakidis, G., Mantzavinos, D., 2015. Study of the generated genetic polymorphisms during the photocatalytic elimination of *Klebsiella pneumoniae* in water. *Photochem. Photobiol.* **14**, 506–513.

Verani, M., Di Giuseppe, G., Tammaro, C., Carducci, A., 2016. Investigating the role of *Acanthamoeba polyphaga* in protecting Human Adenovirus from water disinfection treatment. *Eur. J. Protistol.* **54**, 11–18.

Verreck, F.A.W., de Boer, T., Langenberg, D.M.L., Hoeve, M.A., Kramer, M., Vaisberg, E., Kastelein, R., Kolk, A., de Waal-Malefyt, R., Ottenhoff, T.H.M., 2004. Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc. Natl.* **101**, 4560–4565.

Vincenot, F., Saleh, M., Prévost, G., 2008. Les facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus*. *Rev. Francoph. Lab.* **407**, 61–69.

Vonberg, R.-P., Gastmeier, P., 2006. Nosocomial aspergillosis in outbreak settings. *J. Hosp. Infect.* **63**, 246–254.

Waye, M.M.Y., Sing, C.W., 2010. Anti-Viral Drugs for Human Adenoviruses. *Pharmaceuticals* **3**, 3343–3354.

Weekers, P.H., Bodelier, P.L., Wijen, J.P., Vogels, G.D., 1993. Effects of Grazing by the Free-Living Soil Amoebae *Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba polyphaga*, and *Hartmannella vermiformis* on Various Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 2317–2319.

Wellington, M., Dolan, K., Krysan, D.J., 2009. Live *Candida albicans* suppresses production of reactive oxygen species in phagocytes. *Infect. Immun.* **77**, 405–413.

Wertheim, H.F.L., Melles, D.C., Vos, M.C., van Leeuwen, W., van Belkum, A., Verbrugh, H.A., Nouwen, J.L., 2005. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect. Dis.* **5**, 751–762.

Whan, L., Grant, I.R., Rowe, M.T., 2006. Interaction between *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and environmental protozoa. *BMC Microbiol.* **6**, 63.

Wickham, T.J., Mathias, P., Cheresh, D.A., Nemerow, G.R., 1993. Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell* **73**, 309–319.

Wiethoff, C.M., Wodrich, H., Gerace, L., Nemerow, G.R., 2005. Adenovirus protein VI mediates membrane disruption following capsid disassembly. *J. Virol.* **79**, 1992–2000.

Williams, P., Lambert, P.A., Brown, M.R., Jones, R.J., 1983. The role of the O and K antigens in determining the resistance of *Klebsiella aerogenes* to serum killing and phagocytosis. *J. Gen. Microbiol.* **129**, 2181–2191.

Winberg, M.E., Holm, A., Särndahl, E., Vinet, A.F., Descoteaux, A., Magnusson, K.-E., Rasmusson, B., Lerm, M., 2009. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan inhibits phagosomal maturation via action on membrane rafts. *Microbes Infect.* **11**, 215–222.

Yahyaoui, G., Tlamçani, I., Benjelloun, S., Atwani, M., Errami, M., 2014. Aspergillose pulmonaire chronique nécosante à *Aspergillus niger* chez un patient tabagique et ancien tuberculeux. *Pan Afr. Med. J.* **17**.

Yan, L., Cerny, R.L., Cirillo, J.D., 2004. Evidence that hsp90 is involved in the altered interactions of *Acanthamoeba castellanii* variants with bacteria. *Eukaryot. Cell* **3**, 567–578.

Yli-Pirilä, T., Kusnetsov, J., Hirvonen, M.-R., Seuri, M., Nevalainen, A., 2006. Effects of amoebae on the growth of microbes isolated from moisture-damaged buildings. *Can. J. Microbiol.* **52**, 383–390.

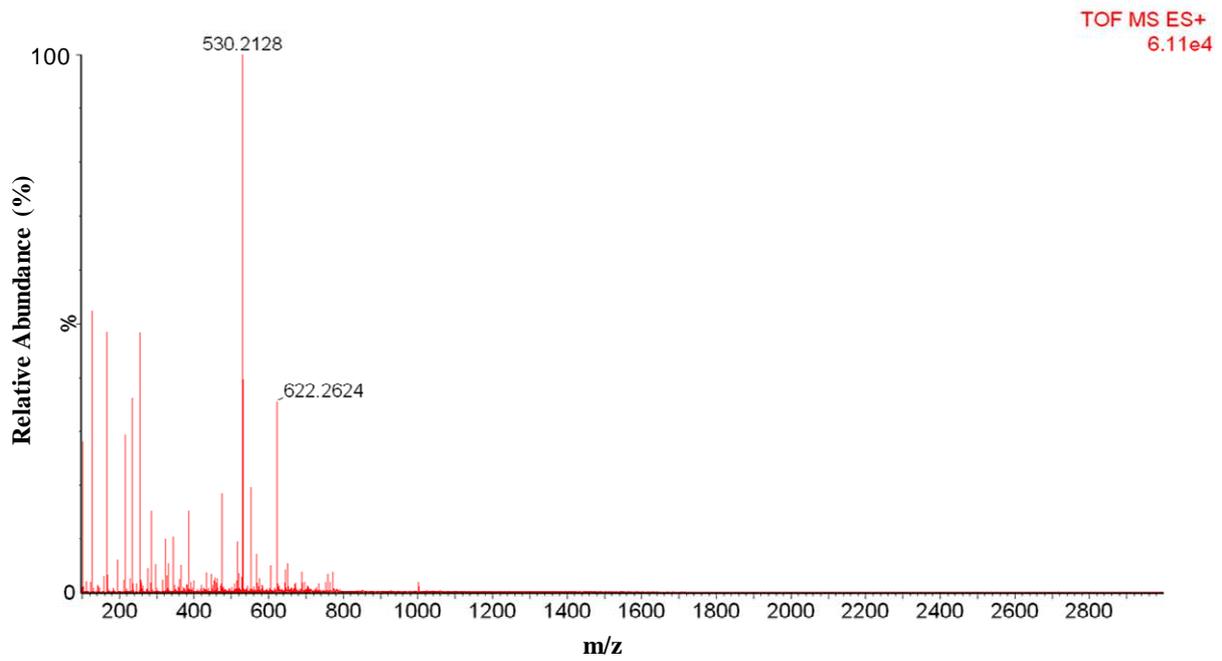
Yu, H.S., Jeong, H.J., Hong, Y.-C., Seol, S.-Y., Chung, D.-I., Kong, H.-H., 2007. Natural occurrence of *Mycobacterium* as an endosymbiont of *Acanthamoeba* isolated from a contact lens storage case. *Korean J. Parasitol.* **45**, 11–18.

Zaiss, A.K., Vilaysane, A., Cotter, M.J., Clark, S.A., Meijndert, H.C., Colarusso, P., Yates, R.M., Petrilli, V., Tschopp, J., Muruve, D.A., 2009. Antiviral antibodies target adenovirus to phagolysosomes and amplify the innate immune response. *J. Immunol.* **182**, 7058–7068.

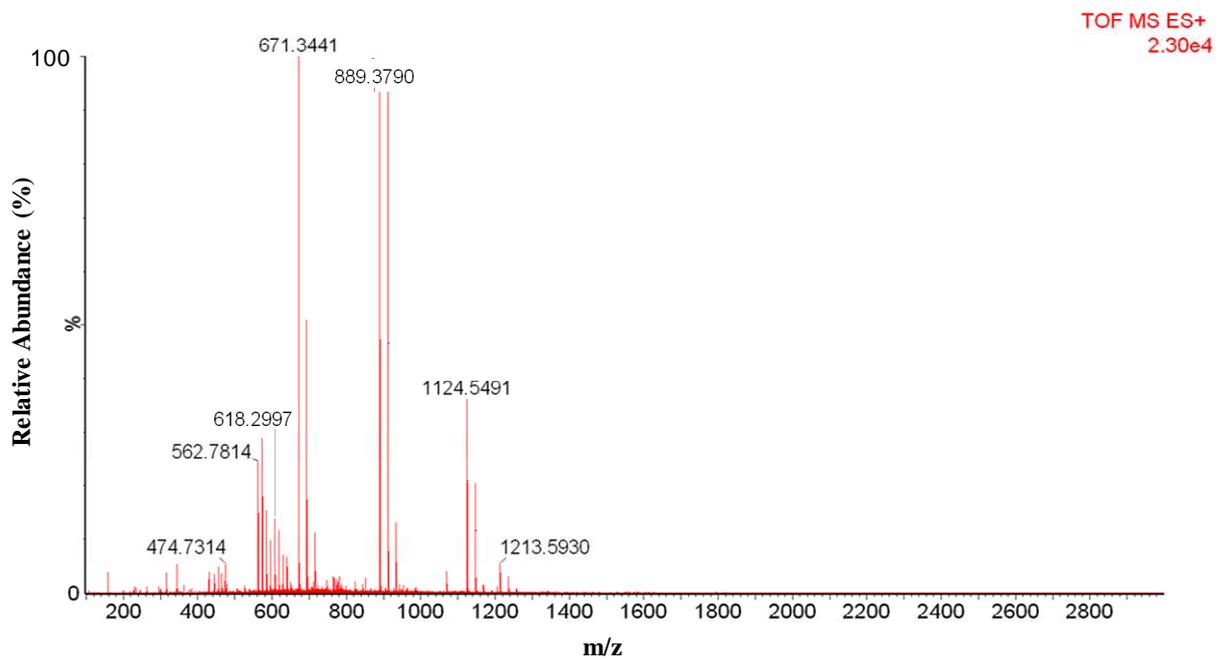
Zhang, W., Arcos, R., 2005. Interaction of the adenovirus major core protein precursor, pVII, with the viral DNA packaging machinery. *Virology* **334**, 194–202.

Zsengellér, Z., Otake, K., Hossain, S.A., Berclaz, P.Y., Trapnell, B.C., 2000. Internalization of adenovirus by alveolar macrophages initiates early proinflammatory signaling during acute respiratory tract infection. *J. Virol.* **74**, 9655–9667.

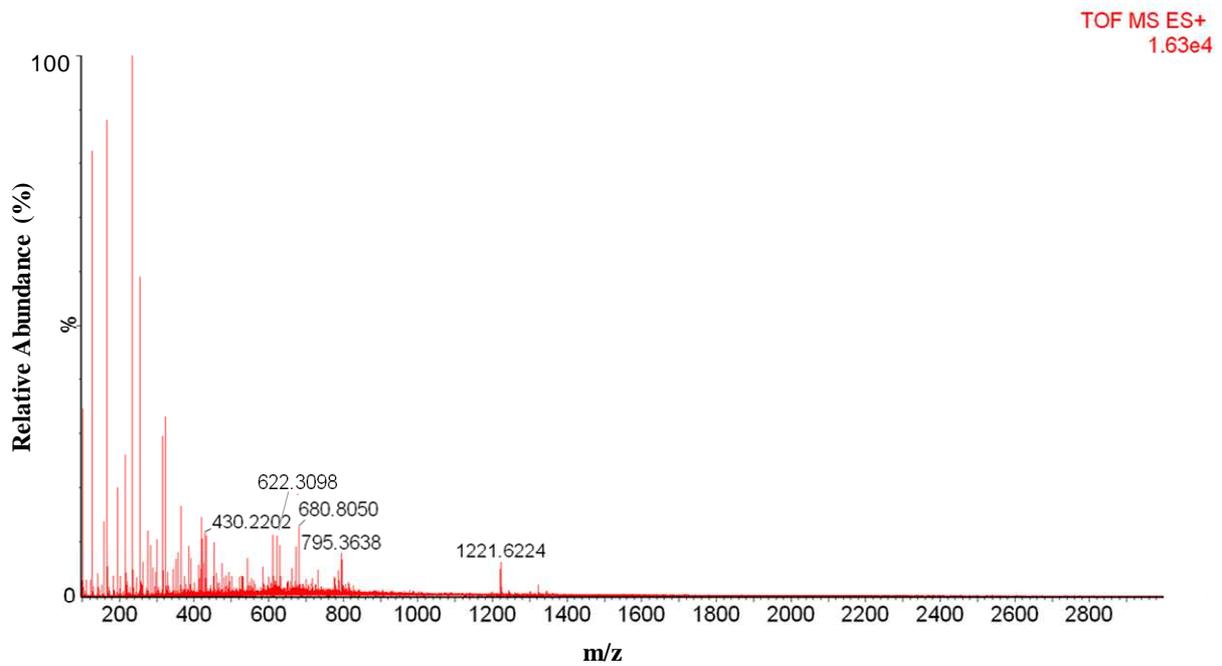
Chapitre 8 : Annexes



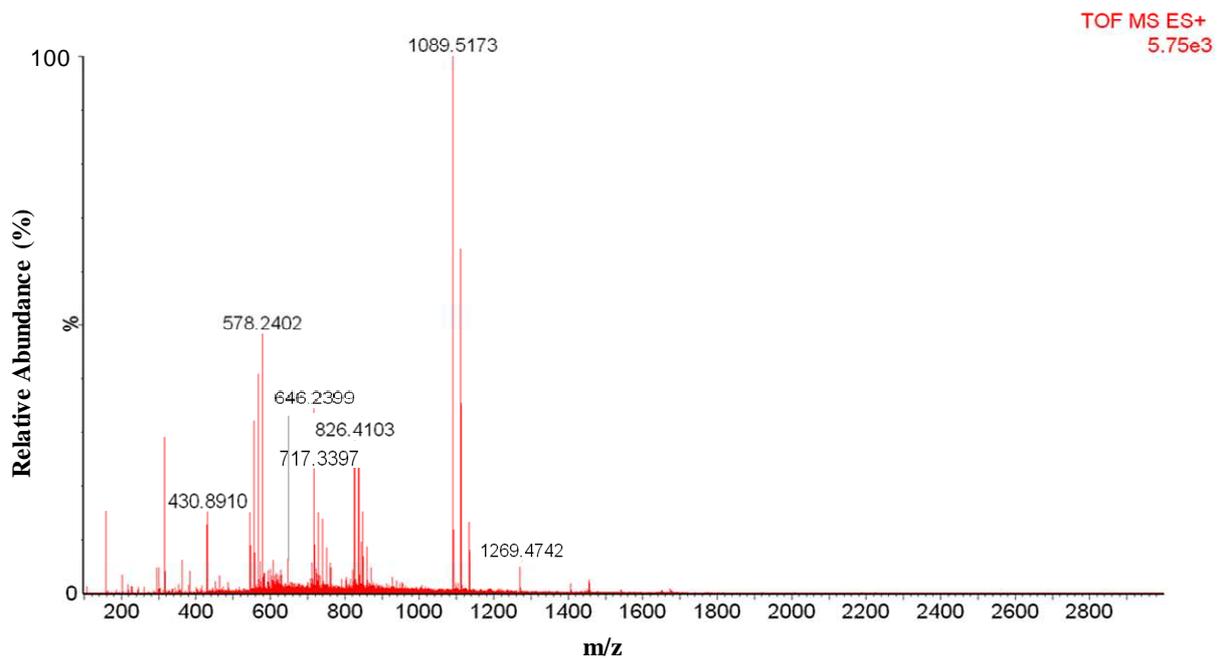
Annexe 1 : Spectre total ESI-MS en mode positif de faible intensité de la fraction A pour *K. pneumoniae*



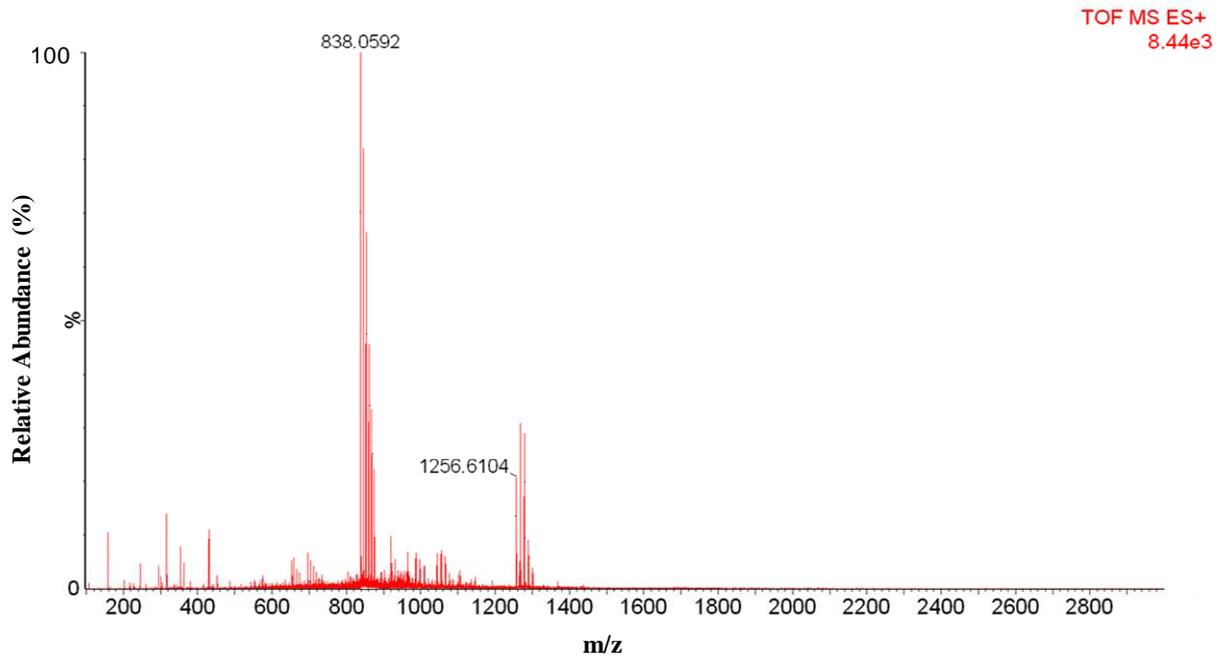
Annexe 2 : Spectre total ESI-MS en mode positif de faible intensité de la fraction B pour *K. pneumoniae*



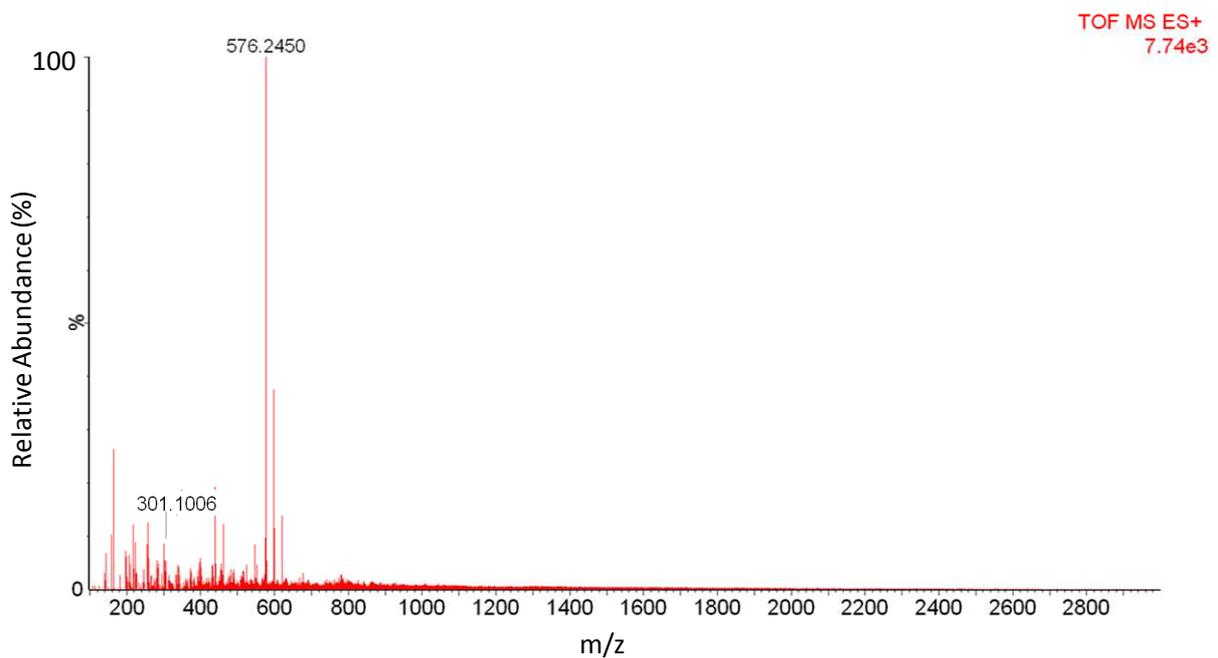
Annexe 3 : Spectre total ESI-MS en mode positif de faible intensité de la fraction C pour *K. pneumoniae*



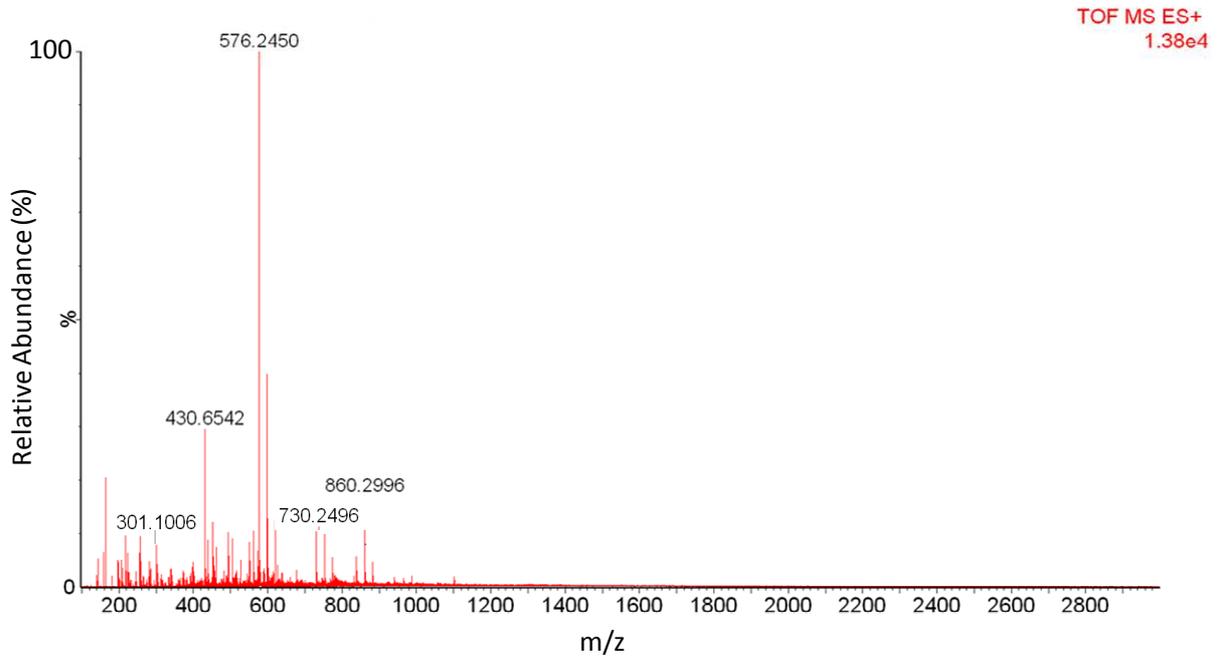
Annexe 4 : Spectre total ESI-MS en mode positif de faible intensité de la fraction D pour *K. pneumoniae*



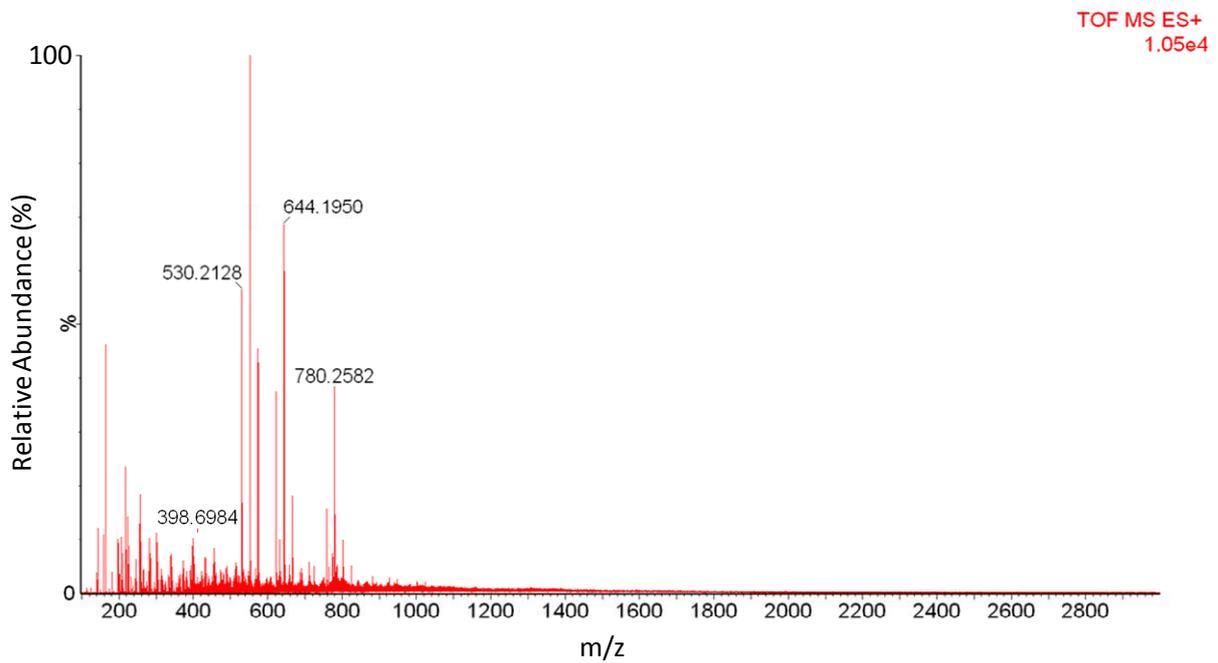
Annexe 5 : Spectre total ESI-MS en mode positif de faible intensité de la fraction E pour *K. pneumoniae*



Annexe 6 : Spectre total ESI-MS en mode positif de faible intensité de la fraction A pour *S. aureus*



Annexe 7 : Spectre total ESI-MS en mode positif de faible intensité de la fraction B pour *S. aureus*



Annexe 8 : Spectre total ESI-MS en mode positif de faible intensité de la fraction C pour *S. aureus*

Résumé

Les amibes libres sont des protozoaires retrouvés dans de nombreux environnements où ils ingèrent par phagocytose des bactéries, des champignons, des virus ou d'autres protozoaires. Le modèle d'étude principal de cette thèse, divisée en deux grandes parties, a été *Acanthamoeba castellanii*. La première partie de la thèse a concerné l'étude de la préférence trophique des amibes, en présence de différents micro-organismes. Parmi ceux-ci, deux bactéries, *Klebsiella pneumoniae* et *Staphylococcus aureus*, se sont montrées les plus attractives pour les protozoaires étudiés. Des extraits bactériens ont été fractionnés et leur étude a permis de mettre en évidence la nature protéique des composés chimioattractifs impliqués dans ce dialogue intergenre.

Certaines données de la littérature ont rapporté les similitudes entre *A. castellanii* et d'autres cellules phagocytaires que sont les macrophages. La seconde partie de la thèse a permis de comparer les activités de phagocytose d'*A. castellanii* et de la lignée macrophagique Thp-1 vis-à-vis de quatre micro-organismes : le champignon filamenteux *Aspergillus fumigatus*, les bactéries *Klebsiella pneumoniae* et *Staphylococcus aureus*, et un adénovirus de sérotype B3. L'influence des deux types de cellules phagocytaires sur la croissance des micro-organismes a également été étudiée. Ces travaux ont permis de mettre en évidence des différences de comportements des amibes libres par rapport aux macrophages vis-à-vis de micro-organismes pathogènes, montrant qu'il n'est pas toujours possible d'extrapoler les résultats d'études amibes libres/micro-organismes aux relations macrophages/micro-organismes.

Mots-clés : Amibes libre, nutrition, communication inter-cellulaire, macrophages, phagocytes, micro-organismes, interactions

Abstract

Free living amoebae (FLA) are protozoa found in various environments where they can feed by phagocytosis on bacteria, fungi, viruses or other protozoa. *Acanthamoebae castellanii* was used as the main model in this thesis, divided in two parts. The first part of the thesis relied on the trophic preference of amoebae, in presence of different microorganisms. Amongst them, two bacteria, *Klebsiella pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*, appeared as the most attractive for the studied protozoa. Bacterial extracts have been fractionned and their study has shown the protein nature of the chemoattractants involved in this interspecies crosstalk.

Literature data have reported similarities between *A. castellanii* and other phagocytic cells such as macrophages. The second part of the thesis allowed us to compare phagocytic activities of *A. castellanii* and Thp-1 macrophagic cells towards four microorganisms: the filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*, the bacteria *Klebsiella pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* and an adenovirus B3 serotype. The influence of the two phagocytic cells on the microorganisms' growth has also been investigated. This has evidenced the behavior differences between FLA and macrophages towards pathogenic microorganisms, showing that results obtained by studying amoebae and microorganisms relationships could not be extrapolated in all cases to the relationships between macrophages and microorganisms.

Key words: Free living amoebae, nutrition, inter-cellular communication, macrophages, phagocytes, microorganisms, interactions