



HAL
open science

Étude de la prolifération d'*Acanthamoeba castellanii* suite à l'infection par *Legionella pneumophila*

Luce Laétitia Mengue Assoumou Louma

► To cite this version:

Luce Laétitia Mengue Assoumou Louma. Étude de la prolifération d'*Acanthamoeba castellanii* suite à l'infection par *Legionella pneumophila*. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Poitiers, 2017. Français. ⟨NNT : 2017POIT2259⟩. ⟨tel-01858353⟩

HAL Id: tel-01858353

<https://theses.hal.science/tel-01858353v1>

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.



HAL Authorization

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 : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Présentée par :

Luce Laétitia MENGUE ASSOUMOU LOUMA

Etude de la prolifération d'*Acanthamoeba castellanii*
suite à l'infection par *Legionella pneumophila*

Directeurs de Thèse :

Yann HECHARD, PU, Université de Poitiers

Ascel SAMBA-LOUAKA, MCU, Université de Poitiers

Soutenue le 05 Avril 2017 devant la Commission d'Examen

JURY

Rapporteurs :

Patricia DOUBLET, PU, Université Lyon 1

Olivier DUSSURGET, PU, Université Paris Diderot

Examineurs :

Marie Hélène RODIER, PU-PH, Université de Poitiers

Frédéric TAIEB, CR1, INRA

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 : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Présentée par :

Luce Laétitia MENGUE ASSOUMOU LOUMA

Etude de la prolifération d'*Acanthamoeba castellanii*
suite à l'infection par *Legionella pneumophila*

Directeurs de Thèse :

Yann HECHARD, PU, Université de Poitiers

Ascel SAMBA-LOUAKA, MCU, Université de Poitiers

Soutenue le 05 Avril 2017 devant la Commission d'Examen

JURY

Rapporteurs :

Patricia DOUBLET, PU, Université Lyon 1

Olivier DUSSURGET, PU, Université Paris Diderot

Examineurs :

Marie Hélène RODIER, PU-PH, Université de Poitiers

Frédéric TAIEB, CR1, INRA

« Une parole éclaire ma recherche : comprendre » Marc Bloch.

Remerciements

*Je commencerai par remercier l'Agence Nationale des Bourses du Gabon pour m'avoir octroyé cette bourse d'étude. J'exprime ensuite mes sincères remerciements à **Didier BOUCHON**, directeur du laboratoire « Ecologie et Biologie des Interactions, UMR CNRS 7267 de l'Université de Poitiers », de m'avoir accueilli dans son laboratoire mais aussi de m'avoir accordé un complément de bourse et financé mes travaux de recherche. Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'équipe « Microbiologie de l'Eau » du laboratoire, dirigée par **Yann HECHARD** au début de ma thèse, puis par **Jean-Marc BERJEAUD**, que je remercie tous les deux de m'avoir accueillie au sein de l'équipe et de m'avoir accompagné durant cette thèse. Je ne voudrai pas oublier l'école doctorale « Sciences pour l'environnement Gay Lussac », dirigée par **Boniface KOKOH** et à laquelle j'étais rattachée, pour son accompagnement qui a permis le bon déroulement de ma thèse.*

*J'adresse mes sincères remerciements au professeur **Patricia DOUBLET-DAR**, du centre international de Recherche en Infectiologie à l'université de Lyon 1, et au professeur **Olivier DUSSURGET**, de l'Unité des Interactions Bactéries-Cellules de l'Institut Pasteur et rattaché à l'université Paris Diderot, d'avoir accepté de rapporter ce travail.*

*Je remercie également **Marie Hélène RODIER**, professeur universitaire au laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions de l'université de Poitiers et praticien hospitalier en parasitologie et mycologie du Centre Hospitalier Universitaire de Poitiers, et **Frédéric TAIEB**, chercheur à l'Institut de Recherche en Santé Digestive de l'université de Toulouse Paul Sabatier, d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse.*

*Je remercie particulièrement mes directeurs de thèse **Ascel SAMBA-LOUAKA**, maître de conférences à l'université de Poitiers, et **Yann HECHARD**, professeur à l'université de Poitiers, d'avoir accepté de m'encadrer durant ces 3 années de thèse. Je suis particulièrement reconnaissante de tous vos conseils et de votre implication tout au long de ce travail. Merci pour vos encouragements, votre présence, les différentes discussions qui m'ont aiguillé durant ce travail et pour tout ce que j'ai pu apprendre grâce à vous deux. Merci de m'avoir fait confiance, de m'avoir soutenu et accompagné tout au long de cette belle expérience. Grâce à vous deux j'en sors grandie.*

Je remercie Anne CANTEREAU, Adriana DELWAIL et Emile BERE de la plate-forme ImageUP de l'université de Poitiers, pour leur aide précieuse pendant les analyses en microscopie et en cytométrie en flux. Je remercie aussi Matthieu REGNACQ, Yves CAUBET et Freddie-Jeanne RICHARD avec qui j'ai collaboré pendant de ce travail.

Je remercie du fond du cœur François BATY-SOREL, pour son écoute, ses conseils et toute l'aide qu'il m'a apporté en développement personnel.

Je tiens aussi à remercier tous les autres membres de l'équipe Microbiologie de l'Eau qui ont contribué à mon intégration et à mon épanouissement au sein du laboratoire. Je te remercie Julien VERDON de m'avoir si bien accueilli et renseigné la première fois que j'ai mis les pieds au laboratoire pendant ma recherche de thèse. Merci aussi pour ta bonne humeur quotidienne et pour tes plaisanteries qui ont contribué à mettre un sourire sur mon visage. Merci à Jean-Marc BERJEAUD (de qui j'avais très peur au début de ma thèse et puis après non) pour ton écoute, tes nombreux conseils et tes encouragements qui m'ont beaucoup aidé durant cette aventure. Je me souviendrai longtemps de tes blagues, particulièrement amusantes et des fous rires lorsque tu racontais tes histoires (j'en ris à l'écrire...). Merci à toi Willy AUCHER pour l'aide précieuse que tu m'as apporté et qui a grandement contribué à l'avancé de ce travail. Je te suis reconnaissante pour toutes ces fois où tu as été disponible lorsque j'ai eu besoin de ton aide. Merci surtout pour tes conseils et tes encouragements. Ce fût un grand plaisir de travailler avec toi. Je fais un bisou à Elodie MAISONNEUVE, avec qui j'ai partagé pendant ces 3 années les peurs, les joies, les fous rires, le voyage en Sardaigne lors du Flam2015 et même un lit. Durant nos 3 années de thèses, nous sommes encouragées et soutenues, j'en garde un magnifique souvenir. Merci à ma collègue de bureau Marion GIRADOT qui m'a beaucoup encouragé durant la rédaction de ma thèse, tes bonbons Ricola m'ont aidé. Merci à Alexandre CREPIN, Christine IMBERT, Camille JUIN et Estelle CATEAU pour les échanges qu'on a pu avoir. Merci au personnel technique et administratif Stéphanie CRAPPART, Laurence BELLIGOT, Dominique BEGUIN, Christophe SOUIL, Karine DEMANGEAU et Sylvie MOREL qui m'ont aidé d'une façon ou d'une autre dans l'organisation du laboratoire, dans les procédures administratives et avec qui j'ai partagé de bons moments de discussions, des sortie et des soirées de laboratoire. Vous avez été d'une grande aide durant ma thèse et je vous en suis reconnaissante. Je remercie particulièrement tous les autres doctorants MH CORE, Clément BERNARD, Steven ROLLAND, Meg ROUXEL et Yoann PERRIN avec qui j'ai passé de magnifiques moments. Toutes nos discussions (scientifiques ou non), nos repas les midis, les moments tea-

time, les soirées, les covoiturages, les peurs et les joies partagées ont contribué à rendre cette expérience encore plus belle. Merci à vous de m'avoir soutenu, d'avoir cru en moi et de m'avoir encouragé pendant cette période de rédaction. Je me souviens de tous vos mots quotidiens (la force est en toi, on croit en toi, courage....).

*Je tiens à remercier les anciens membres de l'équipe avec qui j'ai partagé une partie de cette expérience. **Vincent DELAFONT**, les mots me manquent pour te dire combien je te suis reconnaissante pour tout. Tu as fortement contribué à mon intégration au laboratoire. Tu m'as aidé pour les manipes, la recherche des produits, l'utilisation des appareils sans oublier les bases (je me souviens encore du jour où tu m'as montré comment cultiver les amibes). Je me souviens qu'à chaque fois que j'ai eu besoin de toi quelle qu'en soit la raison tu as été là et tu ne m'as jamais donné l'impression d'être agacé. Merci pour la joie et ta bonne humeur communicante. **Emilie Portier**, merci à toi pour tous tes encouragements, ton écoute et pour tous les conseils qui m'ont aidé à avancer. Merci à **Etienne ROBINOT**, **Elodie PONLAITIAC**, **Renaud BIGOT** et **Ségolène DEPAYRAS** avec qui j'ai partagé mon bureau et passé de bons moments de discussions et de rires. Votre compagnie était agréable et je vous souhaite un franc succès pour la suite. Merci à **Clémence LOISEAU** pour ton aide pendant les périodes d'organisation des enseignements et tes conseils; à **Daniel GUIYONNET** pour les nombreuses discussions et les rires, à **Véronique LADEVEZ** de m'avoir fait confiance et soutenu pendant mes premiers pas vers l'enseignement.*

*Je remercie **Karine ALIN** et **Maria-Cristina CIOBANU**, mes deux responsables de stage de master 2, deux bons capitaines qui m'ont beaucoup encouragé et soutenu dans ma recherche de thèse.*

*Je tenais aussi à remercier tous ces merveilleux amis qui m'ont apporté leur soutien et m'ont porté dans leurs prières : **Nathaelle**, **Swesslath**, **Hilca**, **Delmance**, **Stéphanie**, **Anna**, **Stane**, **Claudia**, **Vanessa**, **Linda**, **Emilie**, **Priscilla**, **Gina**, **Line**, **Steeve**, **Stellina**, **Amey**, **Prune**, **Edwige**, **Herwin**, **Chancia**, **Cynthia**, **Milva**, **Urielle** et **César**, **Blysse** et **Serge**, **Alberta** et **Théo**, **Vanessa** et **Achille**, mes petites **Aude** et **Grâce**...*

*Je remercie mon papa **Emmanuel ASSOUMOU NKA**, ma mère **Emilie MIKODJI** et mes frères et sœurs (**Junior**, **Guenady**, **Ludhmila**, **Francky**, **Linda**, **Sarah**, **René**) qui m'ont encouragé et soutenu tout le temps. Bisou spécial à ma mamie **Mayaye** pour tout l'amour qu'elle m'a donné. Je n'oublie pas le reste de ma si nombreuse famille (**tantines**, **tontons**,*

nièces, neveux, cousins, cousines...) pour qui j'écrirai plusieurs pages à les remercier individuellement. Je vous porte dans mon cœur.

*Merci à toi mon chéri **Arsène NZAOU MIHINOT** pour m'avoir motivé, encouragé et soutenu sur tous les plans. Tu as partagé avec moi tous les bons moments comme les difficiles. Tu as su dès le début que j'y arriverai et tu as cru en moi jusqu'à la fin. Merci énormément pour tout l'amour et l'attention que tu me témoignes chaque jour.*

*Par-dessus tout, je remercie **Dieu** pour le souffle de vie et la santé sans laquelle je n'aurai pu réaliser ce travail.*

« *Merci à tous.* »

Sommaire

<i>Liste des abréviations</i>	1
<i>Liste des figures</i>	3
<i>Liste des tableaux</i>	5
<i>Etude Bibliographique</i>	6
I. Les amibes libres	7
I.1. Généralités	7
I.2. Historique.....	8
I.3. Classification des amibes libres.....	9
I.4. Pathogénicité liée aux amibes libres.....	11
II. Le genre <i>Acanthamoeba</i>	13
II.1. Biologie	13
II.1.1. Cycle de vie.....	14
II.1.1.1. Forme trophozoïte	14
II.1.1.2. Forme kyste.....	16
II.1.1.3. Enkystement.....	17
II.1.1.4. Déenkystement	19
II.1.2. Locomotion.....	20
II.1.3. Nutrition.....	21
II.2. Ecologie.....	233
II.2.1. Distribution	23
II.2.2. Hôte de plusieurs autres microorganismes	23
III. Interaction avec <i>Legionella pneumophila</i>	24
III.1. <i>Legionella pneumophila</i>	24
III.1.1. Caractéristiques.....	24
III.1.2. La légionellose.....	25
III.1.3. Ecologie.....	27
III.1.4. Cycle de vie.....	28
III.1.5. Les systèmes de sécrétion.....	32
III.1.5.1. Le système de sécrétion Dot/Icm.....	33
III.1.5.2. Le système de sécrétion Lsp	35
III.1.5.3. Les systèmes de sécrétion Lvh, Lss, Sec et Tat	38
III.2. Mécanisme d'infection	39
III.2.1. L'entrée au sein de la cellule hôte	41
III.2.2. La formation de la vacuole répllicative	43
III.2.3. La répllication intracellulaire.....	45
III.2.4. La manipulation de l'hôte.....	47
III.2.5. La sortie de la cellule hôte.....	49
IV. Cycle cellulaire	50
IV.1. Notions de cycle cellulaire chez les eucaryotes.....	50
IV.2. Régulation du cycle cellulaire.....	51
IV.2.1. Les protéines kinases dépendantes des cyclines (Cdks)	52

IV.2.2. Les points de contrôle.....	56
IV.3. Cycle cellulaire chez <i>Acanthamoeba</i>	57
IV.4. Modulation du cycle cellulaire par les microorganismes.....	58
IV.4.1. Cyclomodulines inhibitrices	59
IV.4.2. Cyclomodulines activatrices	61
<i>Contexte et Objectif de l'étude</i>	64
<i>Matériel et Méthodes</i>	66
I. Microbiologie	67
I.1. Microorganismes	67
I.2. Culture des microorganismes.....	68
I.2.1. Culture d' <i>Acanthamoeba castellanii</i>	68
I.2.2. Culture de <i>Saccaromyces cerevisiae</i>	68
I.2.3. Culture de <i>Legionella pneumophila</i>	69
I.2.4. Culture d' <i>Escherichia coli</i>	69
I.2.5. Co-culture amibes-bactéries.....	70
I.2.6. Enkystement des amibes.....	71
I.3. Dénombrement des microorganismes.....	71
I.3.1. Dénombrement des bactéries.....	71
I.3.2. Dénombrement des amibes.....	71
I.4. Cryoconservation des amibes	72
I.5. Mesure de la lyse cellulaire : quantification de la LDH.....	72
I.6. Analyses statistiques.....	74
II. Biologie Moléculaire	74
II.1. Extraction et purification de l'ARN.....	74
II.2. Transcription inverse (RT).....	75
II.3. PCR quantitative (qPCR)	76
II.3.1. Principe.....	76
II.3.2. Amplification par qPCR.....	76
II.3.3. Calcul du niveau d'expression des gènes.....	78
II.4. Clonage de CDC2b d' <i>A. castellanii</i>	78
III. Microscopie	79
III.1. Microscopie en épifluorescence	79
III.1.1. Marquage au calcofluor	80
III.1.2. Marquage à la phalloïdine	80
III.2. Microscopie confocale	81
III.2.1. Marquage à L'EdU.....	82
III.2.2. Analyse des échantillons.....	83
III.3. Vidéo-microscopie	84
III.4. Microscopie électronique à balayage.....	84
III.5. Microscopie électronique à transmission	85
IV. Cytométrie en flux	87
IV.1. Préparation des échantillons	88
IV.2. Analyse des échantillons.....	89
<i>Résultats</i>	90

I.	Effet de <i>L. pneumophila</i> sur la prolifération d'<i>A. castellanii</i>	91
I.1.	Essai de synchronisation des cellules	91
I.2.	Suivi de croissance d'<i>A. castellanii</i>	94
I.3.	Observation au microscope après infection	95
I.4.	Publication 1 : <i>Legionella pneumophila</i> prevents proliferation of its natural host <i>Acanthamoeba castellanii</i>	96
I.5.	Résultats complémentaires	111
I.5.1.	Niveau d'expression des gènes de cyclines putatives	111
I.5.2.	Mesure de la cytotoxicité et de la lyse cellulaire	112
I.5.3.	Evaluation du contenu en ADN d'<i>A. castellanii</i>	114
II.	Effet de <i>L. pneumophila</i> sur l'enkystement d'<i>A. castellanii</i>	117
III.	Effets de <i>L. pneumophila</i> sur la vélocité d'<i>A. castellanii</i>	119
	Publication 2: <i>Legionella pneumophila</i> decreases velocity of <i>Acanthamoeba castellanii</i>	119
	<i>Discussion</i>	133
	<i>Conclusion et Perspectives</i>	140
	<i>Références Bibliographiques</i>	143

Liste des abréviations

ABC : ATP-binding cassette
ADN : desoxyribonucleic acide
Ank : ankyrin repeat protein
APC : anaphase-promoting complex
ARM : amoeba-resistant microorganisms
ARN : acide ribonucléique
ATP : adenosine triphosphate
ATM : ataxia telangiectasia mutated
ATR: ataxia telangiectasia and Rad3-related
BCYE: buffered charcoal yeast extract
BSA : bovine serum albumin
BYE : buffered yeast extract
Cdc : cell division cycle
Cdk : cyclin-dependent kinase
Chk : checkpoint kinase
CKI: cyclin-dependent kinase inhibitor
CsrA : carbon storage regulator
DMSO : dimethyl sulfoxide
Dot/Icm : defective in organelle trafficking/intracellular multiplication
EdU : 5-ethynyl-2'-deoxyuridine
Gal/GalNAc: galactose/N-acetylgalactosamine
GAP : GTPase-activating protein
GTP : guanosine triphosphate
GTPase : guanosine triphosphatase
Hsp60 : heat-schock protein
LB : lysogeny broth
LCV : *Legionella*-containing vacuole
LDH: lactate dehydrogenase
LetA/LetS : *Legionella* transmission activator/sensor
LPS : lipopolysaccharide
Lss : *Legionella* secretion system

Lsp: *Legionella* type II secretion pathway
Lvh : *Legionella* vir homologues
MAPK : mitogen-activated protein kinase
MFP : membrane fusion protein
MIF : mature intracellular form
MOI : multiplicity of infection
MOMP : major outer membrane proteins
OMF : outer membrane protein
PAS : Page's amoeba saline
PBS : phosphate buffered saline
PCR : polymerase chain reaction
PE : phosphatidylethanolamine
PI : phosphoinositides
pRB : retinoblastoma protein
PYG : peptone yeast glucose
qPCR : quantitative polymerase chain reaction
ROS : reactive oxygen species
RpoS : RNA polymerase, sigma S
RsmY/RsmZ: repressor of secondary metabolites
RT : reverse transcription
Rtx : repeats in toxin
Sec: Secretory pathway
SNC : central nervous system (CNS)
STAT : signal transducers and activators of transcription
SEM: standard error of the mean
T4SS : the type IV secretion system
T2SS : the type II secretion system
T1SS : the type I secretion system
Tat: twin arginine translocation
Vol : volume
YNB : yeast nitrogen base
YPGal : yeast peptone galactose

Liste des figures

Figure 1 : Organisation cellulaire d'une amibe.	7
Figure 2: Première illustration d'une amibe, par Rösel von Resenhof en 1757.	9
Figure 3 : Classification simplifiée des amibes issues de « la classification modifiée des eucaryotes ».....	10
Figure 4 : Evolution des publications sur les amibes libres d'importance médicale.	13
Figure 5 : Coupe transversale d'un trophozoïte d' <i>A. castellanii</i> ATCC 30010 observée au microscope électronique à transmission.	15
Figure 6 : Coupe transversale d'un kyste d' <i>A. castellanii</i> Neff observée au microscope électronique à transmission.	17
Figure 7 : Observation au microscope électronique à balayage des changements morphologiques d' <i>A. castellanii</i> durant le processus d'enkystement.	19
Figure 8 : Coupe transversale d'un kyste en cours de désenkystement observée au microscope électronique à transmission.	20
Figure 9 : Différentes étapes du déplacement des amibes.	21
Figure 10 : Modifications membranaires au cours de la phagocytose chez <i>A. castellanii</i> observées au microscope électronique à transmission.	22
Figure 11 : Différentes représentations de <i>L. pneumophila</i>	25
Figure 12 : Evolution du nombre de cas de légionellose et du taux de notification en France de 1988 à 2014.	27
Figure 13 : Cycle de vie de <i>L. pneumophila</i>	29
Figure 14 : Régulation des caractères réplicatifs et transmissifs de <i>L. pneumophila</i>	31
Figure 15 : Système de sécrétion Dot/Icm.	34
Figure 16 : Système de sécrétion de type II.	36
Figure 17 : Modélisation du processus d'infection de <i>L. pneumophila</i>	40
Figure 18 : Modélisation du métabolisme de <i>L. pneumophila</i> au sein de la cellule hôte.	46
Figure 19 : Cycle cellulaire de mammifères.	51
Figure 20 : Modélisation de la régulation du cycle cellulaire par les Cdks.	55
Figure 21 : Mécanisme de détection de la LDH libéré.	73
Figure 22 : Mécanisme de détection de l'EdU incorporé au sein de l'ADN.	82
Figure 23 : Principe de la cytométrie en flux.	88
Figure 24 : Figure 24: Croissance d' <i>A. castellanii</i> en présence de différentes drogues.	93
Figure 25 : Croissance d' <i>A. castellanii</i> ATCC 30010.	94

Figure 26 : Association d'<i>A. castellanii</i> avec <i>L. pneumophila</i>.	96
Figure 27 : Expression des gènes de cyclines putatives ACA1_374430 (A) et ACA1_377210 (B) d'<i>A. castellanii</i>.	112
Figure 28 : Mesure de la LDH libérée par <i>A. castellanii</i> ATCC 30010 après infection par <i>L. pneumophila</i> Paris.	113
Figure 29 : Intensité de fluorescence correspondant au contenu en ADN d'<i>A. castellanii</i>.	116
Figure 30 : Kystes d'<i>A. castellanii</i> marqué au calcofluor.	118

Liste des tableaux

Tableau 1: cyclomodulines connues d'origine bactérienne.	63
Tableau 2: souches de microorganismes utilisés dans cette étude.	67
Tableau 3: amorces utilisées dans cette étude.	77

Etude Bibliographique

I. Les amibes libres

I.1. Généralités

Les amibes sont des eucaryotes unicellulaires de la grande famille des protozoaires (**figure 1**). Le terme amibe vient du grec « amoibê » qui signifie « transformation » à cause de la capacité des amibes à modifier leur forme. En effet, les amibes se caractérisent par la présence, à leur surface, de pseudopodes issus du prolongement cytoplasmique. Elles se déplacent en effectuant des mouvements dits « amiboïdes ». Il s'agit d'une extension et d'une rétraction des pseudopodes qui leur permettent de se déplacer en rampant sur un support. Pendant leur déplacement, elles capturent leurs proies, principalement des microorganismes dont elles se nourrissent par phagocytose.

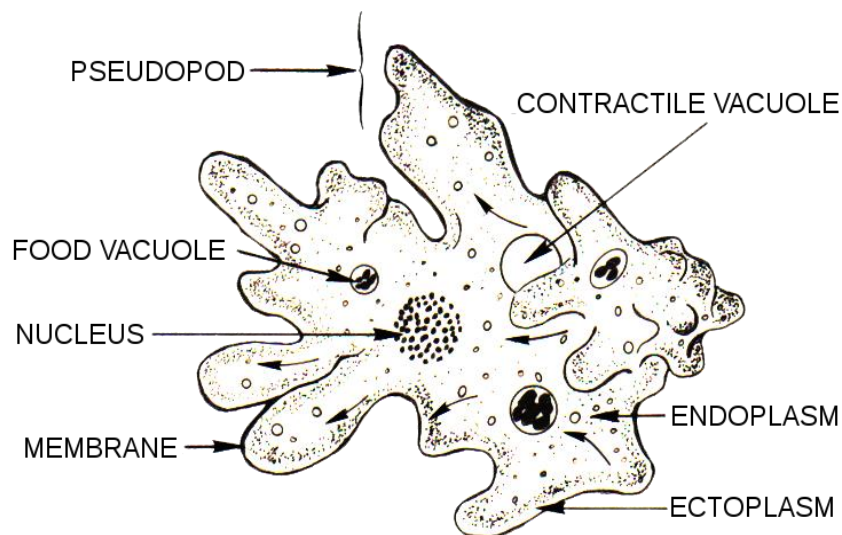


Figure 1 : Organisation cellulaire d'une amibe. Les flèches représentent les pseudopodes, les vacuoles contractiles et digestives, le noyau, la membrane et les zones constituant l'endoplasme et l'ectoplasme.

(http://image.wistatutor.com/content/feed/u1330/Amoeba_new.png).

Les amibes libres sont ubiquitaires dans l'environnement naturel et particulièrement dans les environnements humides, à la différence des amibes parasites (ou intestinales) qui vivent dans le tube digestif des animaux. Le terme « libre » vient de leur capacité à mener une vie de façon autonome dans la nature c'est-à-dire sans la présence d'un hôte. Les amibes parasites, par contre, sont incapables de vivre de façon autonome à l'extérieur d'un hôte. Toutefois, ces amibes peuvent survivre au sein de l'environnement naturel, mais ne peuvent s'y multiplier. Parmi les amibes parasites, on retrouve le pathogène *Entamoeba histolytica* qui infecte le gros intestin de l'homme et qui est responsable de l'amibiase.

I.2. Historique

C'est le naturaliste allemand Rösel von Resenhof en 1757 qui aurait fait la première description d'une amibe (**figure 2**). Rösel les a nommé "*der kleine Proteus*" qui signifie « le petit Proteus » en référence à Proteus, divinité marine dans la mythologie grecque ayant la particularité de se métamorphoser (Rosenhof, 1755). En 1758, Carl Linnaeus les a classées sous le nom de *Volvox chaos* puis après sous le nom de *Chaos chaos*. Le terme *Amibe* a été créé en 1822 par le naturaliste français Bory de Saint-Vincent. Dans son ouvrage « Essai d'une classification des animaux microscopiques », il a décrit l'amibe comme un corps membraneux diffluent et très contractile n'ayant de forme que celle qu'il veut bien se donner (Bory de Saint-Vincent, 1826). Un peu plus tard, Le naturaliste allemand Ehrenberg les nomma *Amoeba* dans sa classification (Ehrenberg, 1830).

La différenciation entre amibes libres et amibes parasites a commencé à la fin du 19^{ème} siècle. Fyodor Lösch, médecin russe, a observé une amibe intestinale dans les fèces d'un patient atteint de dysenterie chronique. Il a mis en évidence la pathogénicité de cet amibe qu'il

nomma *Amoeba coli* en reproduisant les symptômes de la maladie chez la souris en 1875 (Lesh, 1975). C'est au 20^{ème} siècle que les amibes libres furent clairement identifiées et que le caractère pathogène de certaines amibes libres fût démontré pour la première fois (Martinez and Visvesvara, 1997).

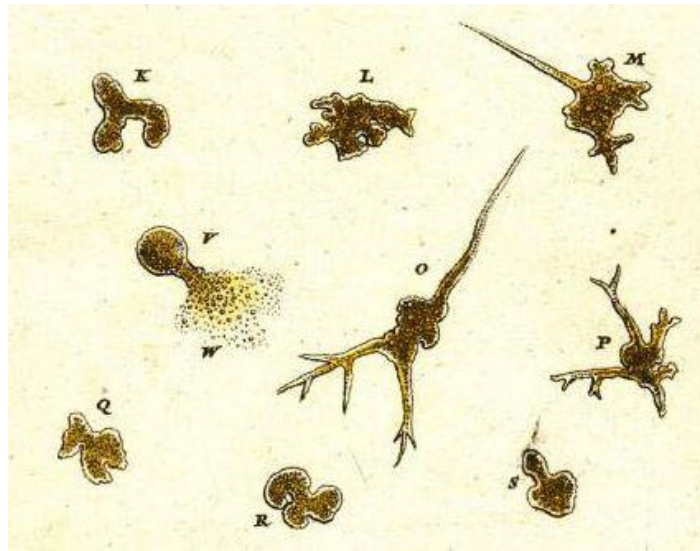


Figure 2: Première illustration d'une amibe, par Rösels von Resenhof en 1757.
(https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Der_Kleine_Proteus_from_Roesel.jpg)

I.3. Classification des amibes libres

Les amibes représentent un groupe d'organismes largement diversifié. Des représentants amibiens sont retrouvés dans plusieurs grandes lignées d'organismes eucaryotes. La classification des amibes a beaucoup évolué avec l'arrivée des méthodes de biologie moléculaire. Dans la classification actuelle, Adl et ses collaborateurs ont intégré les données issues des nouvelles méthodes d'analyses phylogénétiques basées sur des critères moléculaires en plus des critères morphologiques. Les amibes sont réparties principalement dans le super groupe des Amoebozoa mais sont aussi retrouvés dans les supers groupes Opisthokonta, Excavata et SAR (Stramenopiles, Alveolata and Rhizaria) (Adl et al., 2012). On retrouve dans le phylum Amoebozoa les genres *Vermamoeba* appartenant à la classe des

Tubulinea ; *Acanthamoeba*, *Balamuthia* et *Sappinia* appartenant à la classe des Discosea et le genre *Naegleria* est retrouvé dans la classe Discoba du phylum Excavata (**figure 3**).

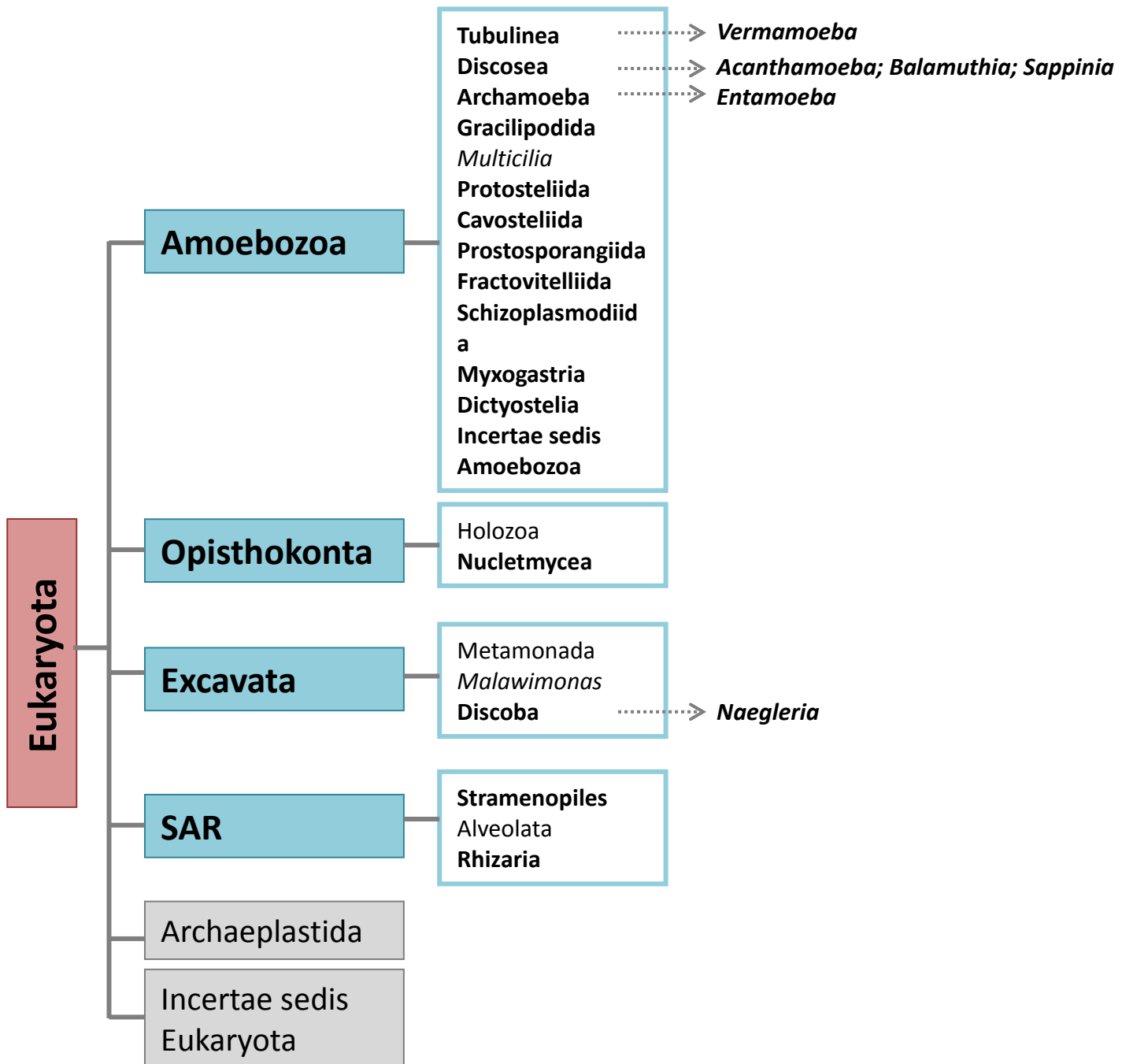


Figure 3 : Classification simplifiée des amibes issues de « la classification modifiée des eucaryotes ». (Adl et al., 2012) . Sont représentés les quatre supers groupes (en bleu) et les différentes classes (en gras) contenant des représentants amibiens. Les flèches représentent les genres amibiens les plus connus.

I.4. Pathogénicité liée aux amibes libres

Parmi les amibes libres, on retrouve des amibes libres capables d'amphizoïdie, c'est-à-dire qu'elles sont capables de mener une vie complètement autonome dans l'environnement naturel et seront parasites en cas d'infection. Bien que le nombre de cas d'infections causées par les amibes libres soit faible, les pathologies associées peuvent être très graves. Le nombre de cas est peut-être sous-évalué car les données reposent sur les cas pathologiques diagnostiqués dont certains sont post-mortem (c'est le cas de l'encéphalite amibienne granulomateuse par exemple). Les genres d'amibes libres connus à ce jour capables de parasitisme sont : *Acanthamoeba*, *Balamuthia*, *Naegleria* et *Sappinia* (Visvesvara et al., 2007). La transmission de ces amibes au sein d'un hôte se fait toujours par effraction et les pathologies associées sont : les kératites amibiennes, l'amibiase cutanée, l'encéphalite amibienne granulomateuse (EAG) et la méningo-encéphalite amibienne primitive (MEAP).

La kératite amibienne est une maladie infectieuse causée par les amibes du genre *Acanthamoeba*. Elle se caractérise par une inflammation de la cornée accompagnée de symptômes tels que l'irritation et les douleurs oculaires, la conjonctivite, la photophobie, les troubles de la vision pouvant aboutir à la cécité et l'énucléation si la pathologie n'est pas traitée à temps (Marciano-Cabral and Cabral, 2003). Les principales personnes atteintes sont les utilisateurs de lentilles de contact. En effet, une mauvaise hygiène des lentilles de contact entraîne le développement des amibes au niveau de l'espace entre la lentille et l'œil provoquant ainsi l'infection. Le contact entre des eaux contaminées et un œil ayant subi un traumatisme représentent des facteurs de risques (Chynn et al., 1995; Erdem et al., 2014).

L'amibiase cutanée est une affection de la peau qui entraîne la formation de nodules érythémateux ou des ulcères cutanés chroniques après infection par les amibes du genre *Acanthamoeba* et *Balamuthia* (*B. mandrillaris*) ayant pénétré dans l'organisme *via* des lésions

cutanées. Cette maladie survient le plus souvent chez les patients immunodéprimés. Elle peut être associée à une infection du système nerveux central (SNC) ou non. La pathologie se manifeste par la formation de nodules érythémateux, d'ulcères cutanés chroniques et de lésions au niveau du sinus qui entraînent la mort du patient en quelques semaines ou quelques mois dans plus de 70% des cas. Dans le cas où elle est associée à une infection du SNC, elle est fatale dans 100% des cas (Marciano-Cabral and Cabral, 2003).

L'EAG est une infection chronique et progressive du SNC. Cette pathologie est causée par les amibes du genre *Acanthamoeba* et *Balamuthia* (*B. mandrillaris*). Un autre cas d'encéphalite amibienne causé par le genre *Sappinia* (*S. diploidea*) a été décrit mais reste jusqu'à ce jour l'unique cas connu (Gelman et al., 2001). L'entrée du pathogène se produit par l'inhalation d'aérosols contaminés présents dans l'air ou par des lésions de la peau ou encore de la trachée. L'immunodéficience et l'alcoolisme représentent des facteurs de risques importants pour contracter l'EAG. Après la pénétration de l'amibe au sein de l'organisme, elle migre vers le SNC, via le système sanguin, et provoque la nécrose des tissus. Le patient manifeste par la suite des maux de tête, de la fièvre, une rigidité de la nuque, une faiblesse musculaire et des troubles du langage (dans le cas d'une infection par *B. mandrillaris*), et d'une altération de l'état mental, qui conduit à la mort en quelques semaines ou en quelques mois (Marciano-Cabral and Cabral, 2003).

La MEAP est une infection aiguë du SNC causée par une amibe du genre *Naegleria* (*N. fowleri*). Le pathogène pénètre dans l'organisme via les voies nasales, traverse l'épithélium olfactif et migre vers le SNC. L'infection se poursuit très rapidement et révèle des symptômes similaires à ceux de l'EAG. La maladie entraîne une nécrose hémorragique des tissus du cerveau puis la mort du patient en quelques jours ou quelques semaines (Marciano-Cabral and Cabral, 2003; Visvesvara et al., 2007).

Le nombre d'études réalisées sur les amibes libres capables d'amphizoïdie a augmenté du fait de leur pouvoir pathogène. Parmi toutes ces amibes, le genre *Acanthamoeba* est le plus étudié comme le montre l'histogramme ci-dessous (**Figure 4**).

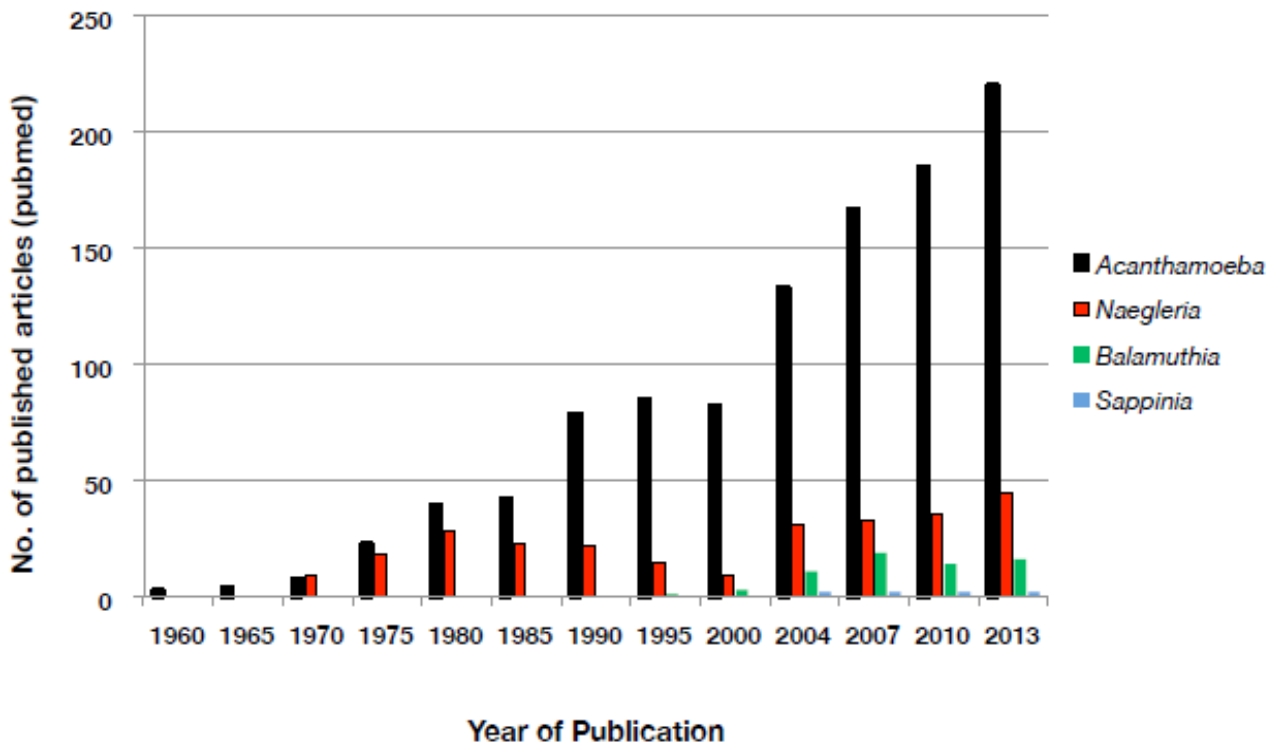


Figure 4 : Evolution des publications sur les amibes libres d'importance médicale.
L'histogramme représente le nombre de publications par an (Khan, 2015).

II. Le genre *Acanthamoeba*

II.1. Biologie

Le genre *Acanthamoeba* est représenté par des amibes libres appartenant à la classe Discosea du phylum Amoebozoa (Adl et al., 2012). Ce genre a été découvert en 1930 par Castellani comme contaminant sur une culture de levure et a été décrit par Volkonsky en 1931 (Castellani, 1930; Volkonsky, 1931). La classification basée sur l'analyse des séquences de

l'ADNr 18S distingue 18 génotypes différents (T1-T18) appartenant au genre *Acanthamoeba*. Parmi eux, les génotypes T1-T6, T10-T12, T15 et T18 ont été retrouvés en association avec des pathologies humaines (Khan, 2015). Elles sont généralement mononuclées mais des formes multinuclées ont aussi été observées dans les cellules en suspension (James and Byers, 1967; Kjellstrand, 1968).

II.1.1. Cycle de vie

Acanthamoeba présente deux morphologies différentes au cours de son cycle de vie : les trophozoïtes et les kystes. Le passage d'une forme à l'autre est réversible *via* les processus d'enkystement et de déenkystement. Ces changements morphologiques dépendent des conditions environnementales. En effet, lorsque les conditions environnementales permettent la croissance du microorganisme, le trophozoïte est observé. En cas de stress ou de conditions défavorables à la croissance du microorganisme, le kyste est observé.

II.1.1.1. Forme trophozoïte

Le trophozoïte aussi appelé « forme végétative » représente la forme métaboliquement active de l'amibe. C'est sous cette forme que l'amibe est capable d'assurer les fonctions nécessaires à son développement c'est-à-dire de se nourrir, de se déplacer et de se multiplier. Cette forme est observée lorsque les conditions environnementales favorables à la croissance du microorganisme sont réunies (pH neutre, température allant de 10-30°C et disponibilité en nutriments). La taille du trophozoïte chez *Acanthamoeba* varie d'une espèce à l'autre de même qu'au sein d'une même espèce du fait du changement continu de morphologie des amibes. De manière générale, lorsqu'il est en mouvement, sa taille varie de 10 à 60 µm de

long (Page, 1967). Le trophozoïte est caractérisé par la présence d'acanthopodes sur toute la surface cellulaire et présente une organisation cytoplasmique typique d'une cellule eucaryote (**figure 5**).

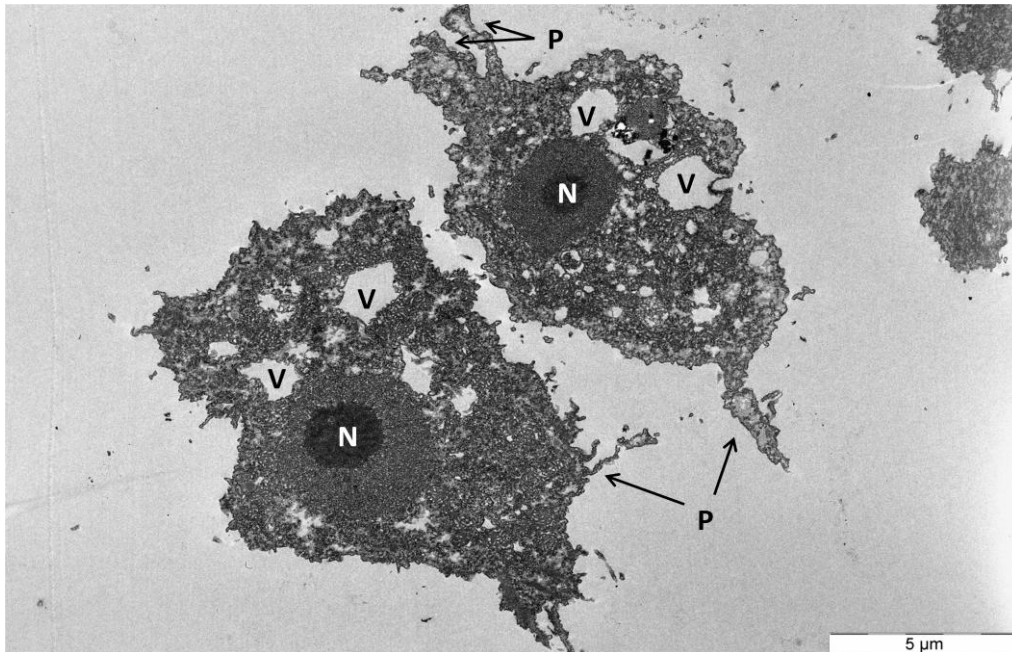


Figure 5 : Coupe transversale d'un trophozoïte d'*A. castellanii* ATCC 30010 observée au microscope électronique à transmission. Le noyau avec son nucléole (N), des vacuoles contractiles (V) et des pseudopodes (P) sont bien visibles.

Le noyau contient un large nucléole et est séparé du cytoplasme par une enveloppe nucléaire caractérisée par la présence de nombreux pores nucléaires. Le cytoplasme est constitué de l'ectoplasme épais et gélatineux principalement constitué de filaments d'actine et de l'endoplasme hyalin, fin et fluide. L'ectoplasme constitue la partie externe du cytoplasme et l'endoplasme constitue la partie interne. Le cytoplasme est délimité par une membrane plasmique et contient le cytosol dans lequel baignent les différents organites (et les corps d'inclusions de nature lipidique et polysaccharidique), mais aussi des éléments du cytosquelette qui donnent leur forme aux cellules. Le réticulum endoplasmique rugueux (RER) forme une continuité avec l'enveloppe nucléaire. Le réticulum endoplasmique lisse

(REL), l'appareil de Golgi, les mitochondries particulièrement nombreuses, les lysosomes et les peroxysomes sont aussi retrouvés. Deux types de vacuoles sont observées au sein du cytoplasme : les vacuoles contractiles (impliquées dans les mouvements d'osmorégulation et de locomotion) et les vacuoles digestives (impliquées dans la dégradation des particules ingérées) (Bowers and Korn, 1968).

II.1.1.2. Forme kyste

Le kyste aussi appelé « forme de résistance » représente la forme métaboliquement inactive de l'amibe. Sous cette forme, l'amibe est incapable d'assurer les fonctions nécessaires à son développement. Cette forme est observée lorsque les conditions environnementales sont défavorables à la croissance du microorganisme et permet à l'amibe de résister aux stress environnementaux (Neff et al., 1964; Turner et al., 2000). Parmi les différents stress on peut citer la carence nutritionnelle, les facteurs physico-chimiques tels que la baisse ou la hausse de température, le pH acide ou basique, l'assèchement du milieu ou la présence de biocides. Un déenkystement pour un retour à la forme trophozoïte est possible lorsque les conditions environnementales redeviennent favorables. Chez *Acanthamoeba*, le kyste se distingue du trophozoïte par sa taille plus petite (entre 10 et 25 μm), par l'absence de pseudopodes donnant une forme plutôt sphérique à l'organisme et surtout par la présence d'une double paroi kystique (l'endokyste et l'ectokyste) de nature cellulosique (Chavez-Munguia et al., 2005; Page, 1967). L'endokyste, constitué de fines fibres granulaires, représente la paroi interne et l'ectokyste, plutôt constitué de fibres laminaires, représente la paroi externe. Les deux parois sont séparées l'une de l'autre par un espace interkystique, excepté à certains endroits appelés ostioles où les deux parois se rencontrent (**figure 6**). A l'intérieur du kyste on observe aussi des autolysosomes qui sont de larges granules basophiles (Bowers and Korn, 1969).

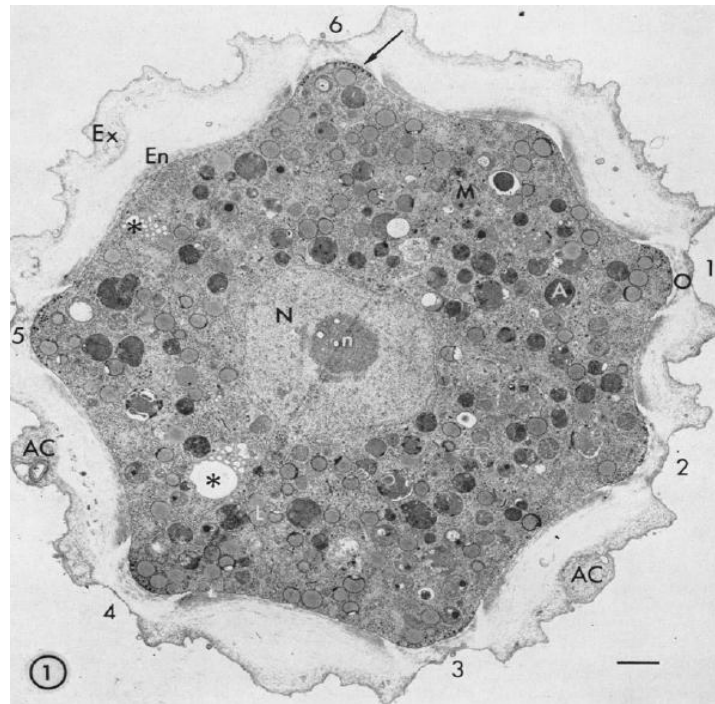


Figure 6 : Coupe transversale d'un kyste d'*A. castellanii* Neff observée au microscope électronique à transmission. Le noyau (N) avec son nucléole (n), l'endokyste (En), l'ectokyste (Ex), une vacuole contractile (*) et des débris cellulaires (AC) sont bien visibles. Les chiffres représentent l'emplacement des ostioles surmonté d'un opercule (o). La barre correspond à 1 μm (Bowers and Korn, 1969).

II.1.1.3. Enkystement

L'enkystement est un processus de différenciation cellulaire qui permet à l'amibe de répondre et de résister aux différents stress environnementaux. Au cours du dit processus, la cellule subit des modifications morphologiques, biochimiques et moléculaires. Des observations au microscope électronique à balayage ont montré différentes morphologies au cours de l'enkystement. Au départ, le trophozoïte se différencie en prékyste, puis en kyste immature et enfin en kyste mature (**figure 7**). La présence de nombreux acanthopodes sur l'ensemble de la cellule caractérise le trophozoïte. Au stade de prékyste, la cellule est ronde avec des acanthopodes persistants sous forme de petites protubérances. Le kyste immature n'a plus d'acanthopodes, l'ectokyste est présent et la présence des ostioles est suggéré mais pas clairement distinguable. Le kyste est dit mature par la présence de la double paroi et des

ostioles clairement distinguables (Chavez-Munguia et al., 2013). L'enkystement se produirait à une phase bien spécifique du cycle cellulaire : la phase G2 (Stohr et al., 1987). Les vésicules du cytoplasme transportent les matériaux fibrillaires formés et les déposent à la surface cellulaire afin de former la paroi (Chavez-Munguia et al., 2005). Le cytosquelette subit des réarrangements au cours de ce processus. Chávez-Munguía et ses collaborateurs ont montré qu'au début de l'enkystement, une faible quantité de filaments d'actine était retrouvée en périphérie de la cellule et qu'il n'y en avait plus du tout au sein des kystes matures (Chavez-Munguia et al., 2013). Ces observations sont mises en lien avec ceux de Jantzen qui a montré que le taux de synthèse de l'actine diminuait de 50% environ au début de l'enkystement et de 90% environ à la fin de l'enkystement (Jantzen, 1981). L'implication de certaines protéines dans le processus d'enkystement a été mise en évidence. L'inhibition de l'expression du gène de la glycogène phosphorylase, par l'utilisation d'ARN interférant (ARNi), empêche l'étape de maturation du kyste (Lorenzo-Morales et al., 2008). De même, l'inhibition du gène *cscp* (cyst specific cystein protease), empêche aussi la maturation du kyste et la digestion des mitochondries au cours de la motophagie (Moon et al., 2012). D'autre part, l'inhibition de l'expression des gènes des sérine-protéases, ou l'inactivation de ces dernières, empêche totalement le processus d'enkystement (Dudley et al., 2008). La protéine ATG8 (Autophagy protein 8), a été localisée dans la membrane de l'autophagosome pendant l'enkystement. Son implication dans les mécanismes d'autophagie nécessaires au processus d'enkystement chez *Acanthamoeba* a été démontrée (Moon et al., 2009). La protéine CSP21 (Cyst Specific Protein 21) a été mise en évidence uniquement dans les kystes et non dans les trophozoïtes. Ce qui a laissé suggérer qu'il s'agirait d'une protéine spécifique des kystes mais dont la fonction reste inconnue à ce jour (Hirukawa et al., 1998).

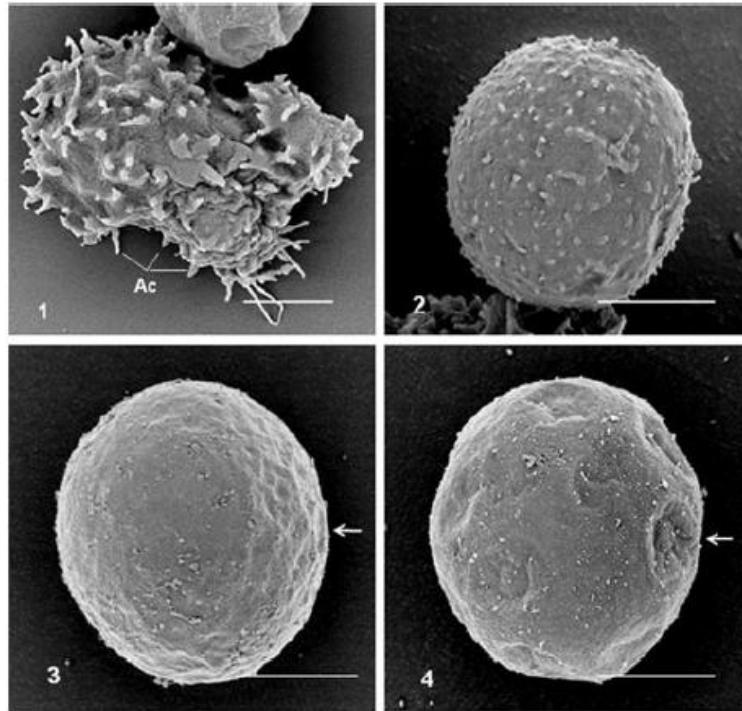


Figure 7 : Observation au microscope électronique à balayage des changements morphologiques d'*A. castellanii* durant le processus d'enkystement. Les différentes photos représentent un trophozoïte (1), un prékyste (2), un kyste immature (3) et un kyste mature (4). Les acanthopodes (Ac) sont bien visibles sur l'image 1. Les ostioles sont indiqués par flèches sur les images 3 et 4. La barre correspond à 5 μm (Chavez-Munguia et al., 2013).

II.1.1.4. Désenkystement

Le désenkystement est le processus de différenciation cellulaire qui permet à l'amibe de recouvrer sa forme végétative lorsque les conditions environnementales le permettent. C'est le processus inverse de l'enkystement qui conduit à la libération du trophozoïte contenu à l'intérieur de la double paroi kystique. Le trophozoïte est libéré *via* les ostioles (Chavez-Munguia et al., 2005) (**figure 8**). Tout comme l'enkystement, le processus de désenkystement fait intervenir des modifications morphologiques, biochimiques et moléculaires. Les filaments d'actine qui disparaissent progressivement au cours de l'enkystement, réapparaissent massivement lorsque le processus de désenkystement est enclenché (Chavez-Munguia et al., 2013). Dudley et ses collaborateurs ont montré qu'en présence d'inhibiteurs de sérine-

protéases, le processus de désenkystement était arrêté, ce qui leur a permis de suggérer l'importance de ces molécules au cours du désenkystement (Dudley et al., 2008).

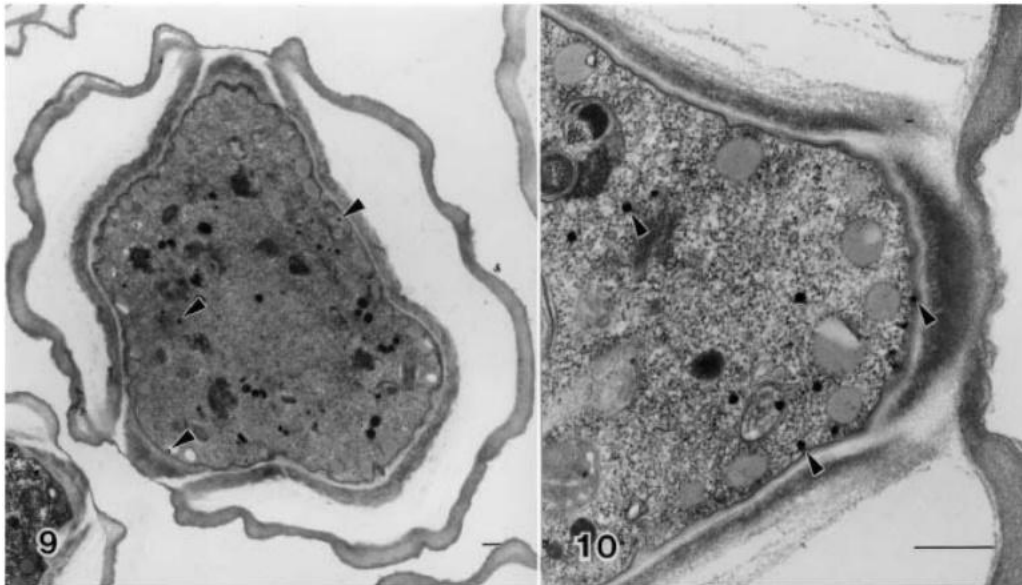


Figure 8 : Coupe transversale d'un kyste en cours de désenkystement observée au microscope électronique à transmission. Les ostioles qui permettent la sortie de l'amibe sont bien visibles. La barre correspond à 0,5 μm (Chavez-Munguia et al., 2005).

II.1.2. Locomotion

Les amibes du genre *Acanthamoeba*, lorsqu'elles sont sous forme trophozoïte, sont extrêmement mobiles. Comme beaucoup d'autres cellules eucaryotes, elles se déplacent sur un support en effectuant des mouvements dits « amiboïdes » autrement dit en « rampant » (Nishigami et al., 2013). Ces mouvements consistent en la contraction et l'extension du cytoplasme pour former des pseudopodes en direction du sens de déplacement pour lui permettre d'avancer. En réponse à un signal tel que la présence de nutriments ou de microorganismes, l'amibe amorce son déplacement par une adhérence de la cellule au substrat (Schuster and Levandowsky, 1996). Il s'en suit des cycles de formation-adhérence des pseudopodes de la zone antérieure et le détachement du substrat de la partie postérieure de l'amibe (**figure 9**). Le mouvement commence par l'écoulement de courants endoplasmiques

en direction du mouvement d'extension puis d'une coagulation au niveau de l'ectoplasme situé à l'extrémité. Simultanément, l'ectoplasme à l'arrière évolue vers une forme endoplasmique fluide et enchaîne des courants vers le mouvement d'extension. L'actine est donc, de façon cyclique, polymérisée à l'avant de la cellule et dépolymérisée à l'arrière pendant le déplacement des amibes (Preston and King, 1984).

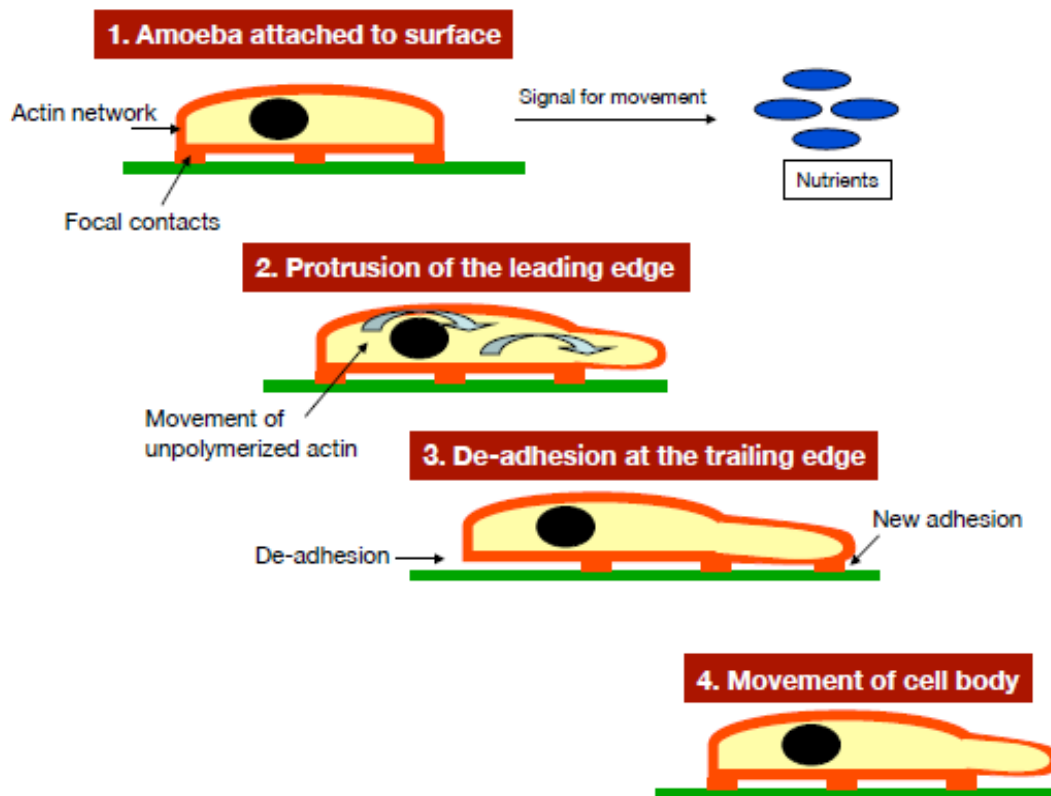


Figure 9 : Différentes étapes du déplacement des amibes. Le déplacement est amorcé par l'attachement de la cellule à la surface (1), il y a ensuite protrusion de la cellule vers l'avant (2) suivi d'un détachement à l'arrière (3) qui permet à la cellule d'avancer (4) (*Acanthamoeba* biology and pathogenesis, second edition (Khan, 2015).

II.1.3. Nutrition

Les amibes en général, du fait de leur activité prédatrice, sont considérées comme des régulateurs des communautés microbiennes de l'environnement (Bamforth, 1985; Clarholm,

1981). En effet, les trophozoïtes se nourrissent principalement d'autres microorganismes (procaryotes et eucaryotes) par phagocytose mais aussi de nutriments par pinocytose (Khan, 2015). Il s'agit de mécanismes membranaires permettant l'internalisation d'une cellule ou de molécules pour être ensuite digérées par la cellule phagocytaire (Jutras and Desjardins, 2005). Au contact de leurs proies, il y a extension de la membrane plasmique autour de l'élément à ingérer de sorte à englober la proie (**figure 10**). La membrane fusionne ensuite pour former un phagosome contenant les aliments ingérés. Après maturation, le phagosome et le lysosome forment le phagolysosome. Le lysosome contient les enzymes nécessaires à la dégradation du contenu du phagosome. Les déchets issus de la digestion sont déversés dans le milieu extracellulaire par le mécanisme inverse à la phagocytose : l'exocytose.

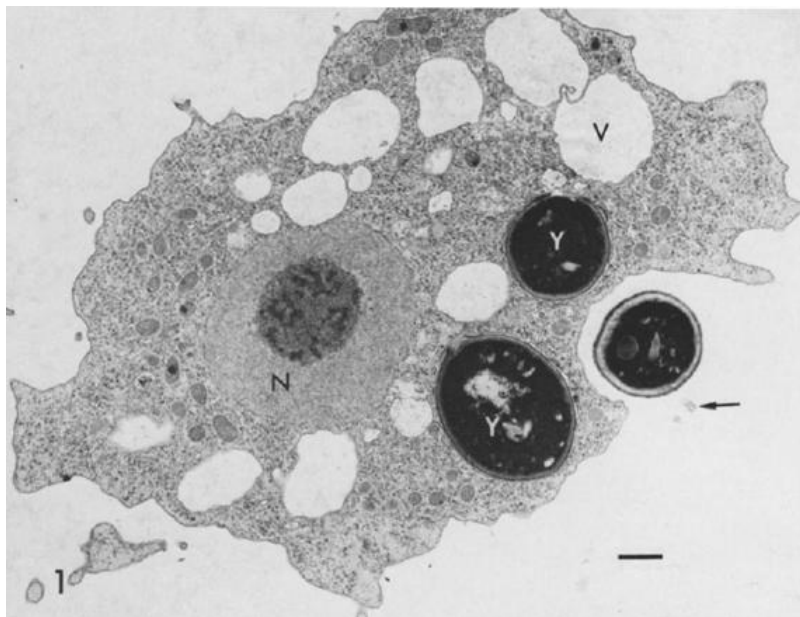


Figure 10 : Modifications membranaires au cours de la phagocytose chez *A. castellanii* observées au microscope électronique à transmission. La flèche indique l'engloutissement d'une levure. Dans le cytoplasme on peut voir deux autres levures déjà internalisées. La barre correspond à 1 μm (Bowers, 1980).

II.2. Ecologie

II.2.1. Distribution

De toutes les amibes libres, le genre *Acanthamoeba* est probablement le plus répandu dans l'environnement (Marciano-Cabral and Cabral, 2003). Ces amibes ont été retrouvées dans différents environnements :

- Milieux aqueux naturels : eaux douces, eau de mer, eau gelée ;
- Milieux aqueux artificiels : eaux des réseaux de distribution, eaux des tours de refroidissement industriel, eaux minérales embouteillées, eaux usées, eau des piscines et des spas ;
- Dans les centres de santé et matériels de soin : hôpitaux, piscines médicales, unités de soins dentaires, unité de dialyse, tubes de lavage gastrique, lentilles de contact ;
- En associations avec d'autres êtres vivants : végétaux, champignons, poissons, reptiles, oiseaux et cultures cellulaires ;
- Chez l'homme : cavités nasales, gorge, intestin et différents tissus infectés tels que le cerveau, les poumons, la cornée et les plaies cutanées ;
- Dans les sols : sédiments terrestres et océaniques, composts et poussières ;
- Dans l'air : vent, aérosols ;

L'augmentation des cas de kératites amibiennes liées à l'utilisation des lentilles de contact serait en lien avec l'abondance de ces amibes dans l'environnement (De Jonckheere, 1991).

II.2.2. Hôte de plusieurs autres microorganismes

Dans l'environnement, *Acanthamoeba* se nourrit principalement d'autres micro-organismes par phagocytose. Parmi ces microorganismes, plusieurs ont acquis des résistances qui leur permettent d'échapper à la digestion et de persister au sein des amibes. Ces microorganismes

sont appelés microorganismes résistants aux amibes (ARM « amoeba-resistant microorganisms ») (Greub and Raoult, 2004). Quelques-uns sont même capables de s’y multiplier comme la bactérie *Legionella pneumophila* qui utilise les amibes libres pour assurer sa protection et sa réplication au sein de l’environnement (Richards et al., 2013). *Acanthamoeba* représente ainsi un réservoir environnemental d’une grande variété de microorganismes (bactéries et levures). Parmi ces ARM, on retrouve des bactéries potentiellement pathogènes pour l’homme (Greub and Raoult, 2004; Khan, 2015; Winiacka-Krusnell and Linder, 2001). Des virus sont aussi retrouvés au sein de ces amibes, dont des virus géants de taille supérieure à 0,2 µm (Claverie et al., 2006; Legendre et al., 2015; Reteno et al., 2015; Scola et al., 2003). Ces virus géants sont capables de se multiplier au sein des amibes et de provoquer la lyse de leur hôte (Colson et al., 2016; Suzan-Monti et al., 2007). *Acanthamoeba* héberge aussi en son sein, des endosymbiotes qui seraient potentiellement impliqués dans la pathogénicité d’*Acanthamoeba* (Fritsche et al., 1993, 1998; Yu et al., 2007). Par conséquent, ces amibes sont indirectement impliquée dans plusieurs pathologies en ce sens qu’elle permettent la survie au sein de l’environnement et la multiplication des pathogènes associés (Barker and Brown, 1994; Winiacka-Krusnell and Linder, 2001).

III. Interaction avec *Legionella pneumophila*

III.1. *Legionella pneumophila*

III.1.1. Caractéristiques

L. pneumophila est une bactérie Gram négatif appartenant à la famille des Legionellaceae du phylum Proteobacteria (Brenner et al., 1979). C’est une bactérie aérobie stricte, catalase positif et non capsulée. Elle ne réduit pas le nitrate, dégrade l’urée, et ne forme pas de spores.

Elle est de forme coccobacille et mesure 0,3 à 1 µm de large et 1 à 2 µm de long (**figure 11a**) mais elle peut également former des filaments (**figure 11b**) allant jusqu'à 20 µm de long (Rodgers, 1979). En fonction des conditions, elle possède ou non un flagelle (**figure 11c**) et des pili. Rodgers et ses collaborateurs ont observé la présence de flagelles et pili lorsque les bactéries étaient cultivées dans des milieux permettant une croissance profuse précoce (Rodgers et al., 1980).

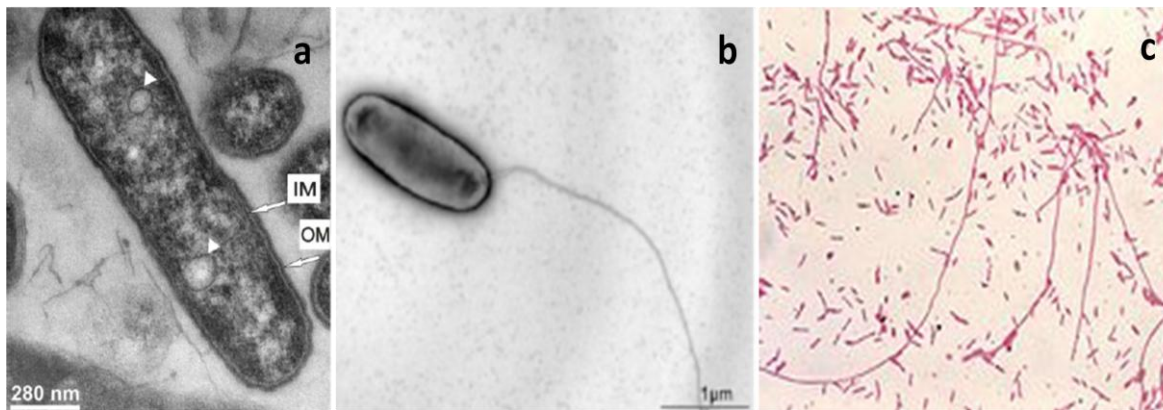


Figure 11 : Différentes représentations de *L. pneumophila*. (a) coupe transversale de *L. pneumophila* observée au microscope électronique à transmission, les membrane interne (IM) et externe (OM) sont observées (Palusińska-Szyszlak et al., 2012). (b) *L. pneumophila* sous forme flagellée observée au microscope électronique à balayage (Sahr et al., 2009). (c) *L. pneumophila* en coloration de Gram présentant des formes bacilles et filamenteuses (http://de.wikipedia.org/wiki/Bild:LegionellaPneumophila_Gram.jpg).

III.1.2. La légionellose

La légionellose, encore appelée « maladie du légionnaire » est une infection pulmonaire aiguë (pneumonie) causant des difficultés respiratoires graves et potentiellement mortelles (McDade et al., 1977). La maladie tire son nom d'une épidémie survenue en juillet 1976 à Philadelphie et qui a coûté la vie à 29 anciens membres d'une légion américaine réunis dans un hôtel pour un congrès (Fraser et al., 1977). Dans plus de 90% des cas, la légionellose est causée par le

pathogène *L. pneumophila* dont plus de 80% sont attribués au seul sérotype 1 (Yu et al., 2002). La contamination par voie aérienne avait déjà été suggérée par Fraser et ses collaborateurs en 1977 qui avaient exclu la transmission de personne à personne (Fraser et al., 1977). Quelques années plus tard, Rowbotham observe des vacuoles remplies de *L. pneumophila* au sein des amibes et suggère que l'infection serait due à l'inhalation de ces vacuoles contaminées (Rowbotham, 1980). Ces hypothèses ont été confirmées par Baskerville et ses collaborateurs qui ont obtenu des cochons malades après avoir été exposés aux aérosols contaminés (Baskerville et al., 1981). Une probable transmission du pathogène entre deux individus a été décrite récemment. La transmission se serait produite lors d'un contact rapproché pendant plusieurs heures, d'une mère qui prenait soin de son fils sévèrement atteint par la maladie (Borges et al., 2016; Correia et al., 2016). En France, la surveillance de la légionellose repose sur le système des maladies à déclaration obligatoire (MDO) institué en 1987 et est coordonnée par l'Institut de Veille Sanitaire (InVS). Depuis 1996, le nombre de cas de légionellose a beaucoup augmenté. Depuis 2006, le nombre de cas est plus ou moins stable et est compris entre 1000 et 1500 cas par an (**figure 12**). La maladie touche plus les hommes que les femmes, avec une sensibilité accrue pour les personnes âgées de plus de 50 ans, atteintes de maladies chroniques ou consommateurs de tabac. Les voyages, la fréquentation d'hôtels et la pratique régulière d'une toilette au lavabo qui favorise une exposition à la production d'eau chaude sont des facteurs de risques importants (Che, 2007).

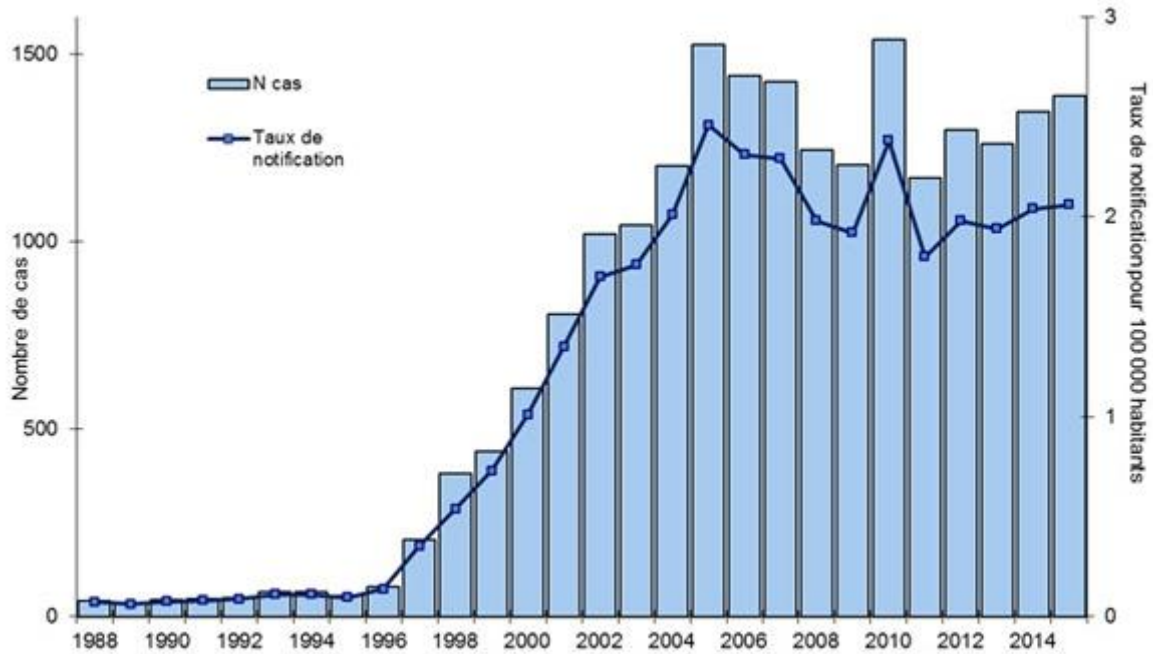


Figure 12 : Evolution du nombre de cas de légionellose et du taux de notification en France de 1988 à 2014. L'histogramme représente le nombre de cas par an et la courbe représente le taux de notification. (<http://invs.santepubliquefrance.fr>).

III.1.3. Ecologie

L. pneumophila est une bactérie ubiquitaire des milieux aqueux naturels et artificiels. Dans l'environnement, *L. pneumophila* vit au sein des protozoaires ou en association avec le biofilm (Andreozzi et al., 2014; Declerck et al., 2007; Fields et al., 2002). Les biofilms sont reconnus comme une source majeure de microorganismes (Watnick and Kolter, 2000). La majorité des cas de légionellose diagnostiqués ont comme origine de contamination les circuits d'eau chaude sanitaires (hôtels, hôpitaux, spas, jacuzzi, douches et fontaines), les systèmes de climatisation et les eaux issues des tours de refroidissement. *L. pneumophila* est considéré comme un pathogène accidentel car très peu de cas diagnostiqués ont pour origine une contamination à partir des sources naturelles (Mekkour et al., 2013; Steinert et al., 2002). La maladie a émergé au 20ème siècle. La rencontre entre le pathogène et l'homme a été favorisée par le développement industriel entraînant ainsi l'augmentation du nombre de cas de

légiellosse (Fields et al., 2002). La multiplication de cette bactérie dépend fortement de la température. *L. pneumophila* se multiplie généralement au sein des protozoaires dans un intervalle de température allant de 25 à 42°C avec un optimum de croissance autour de 35°C. Dans ces milieux, la température de l'eau favorise le développement de la bactérie d'une part et la formation des aérosols contaminés à l'origine de l'infection d'autre part (Berk et al., 2006).

III.1.4. Cycle de vie

Au laboratoire, deux formes différentes sont observées au cours d'une culture en milieu liquide de *L. pneumophila*. Tant que le milieu de culture contient suffisamment de nutriments pour permettre leur croissance, les bactéries se multiplient et restent en « phase exponentielle ». Par contre, lorsque les nutriments du milieu s'épuisent, les bactéries cessent progressivement de se multiplier et entrent en « phase stationnaire ». Cette différenciation de la bactérie est aussi observée dans l'environnement et correspond respectivement aux formes répliquatives et transmissives (**figure 13**).

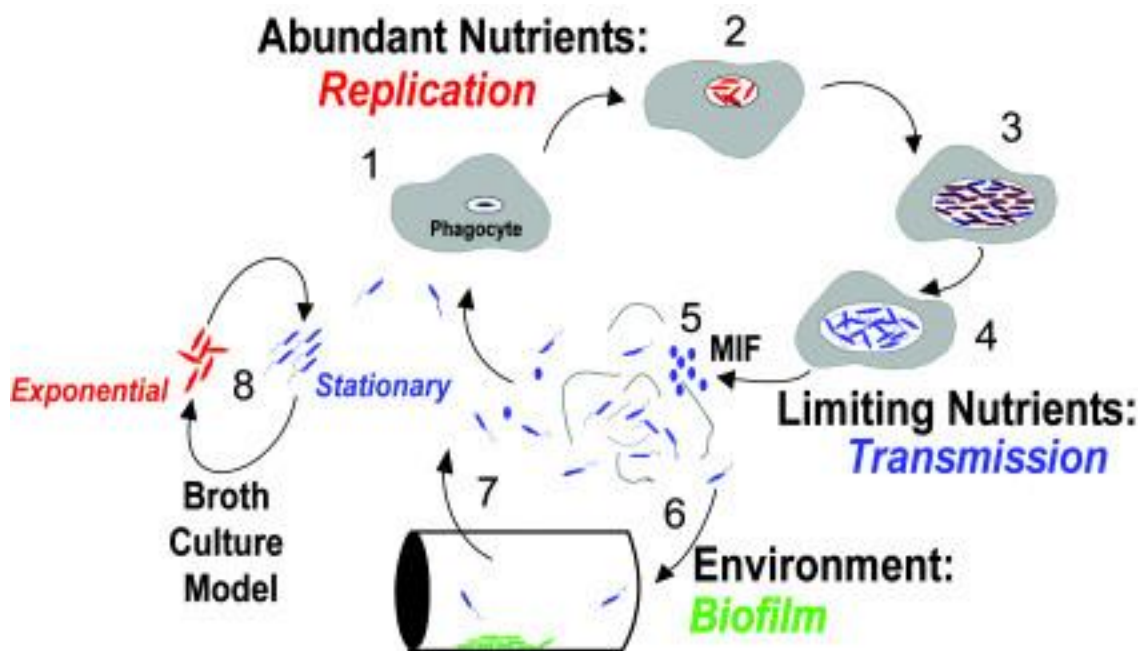


Figure 13 : Cycle de vie de *L. pneumophila*. Les formes stationnaires/transmissives (bleu) et les formes exponentielles/répliquatives (rouge). La bactérie *L. pneumophila* présente dans le milieu sous forme stationnaire/transmissive est phagocytée (1) et se réplique au sein de la cellule hôte (2). *L. pneumophila* arrête sa multiplication intracellulaire et entame sa différenciation suite à l'épuisement des nutriments (3) pour devenir complètement différenciée en une forme intracellulaire mature (MIF « mature intracellular form ») très infectieuse (4). *L. pneumophila* sortie de la cellule hôte est prête à infecter un nouvel hôte (5) au sein d'un biofilm (6). *L. pneumophila* peut se détacher d'un biofilm suite à la présence d'un hôte (7) et amorcer un nouveau cycle infectieux (8) (Molofsky and Swanson, 2004).

Pendant la phase exponentielle ou répliquative, *L. pneumophila* réprime les caractères de transmission et poursuit sa multiplication tant que les conditions environnementales le permettent (Byrne and Swanson, 1998; Molofsky and Swanson, 2004). Cette forme présente des caractéristiques phénotypiques spécifiques. En plus de se multiplier, la bactérie est sous forme de longue tige filamenteuse non flagellée, elle est résistante au sodium, faiblement cytotoxique et peu résistante aux stress environnementaux (Steinert et al., 2002). En condition de carence nutritive, *L. pneumophila* arrête sa multiplication et exprime à nouveau les caractères de transmission qui lui permettront de s'échapper de son hôte, de résister au sein de l'environnement et d'effectuer un nouveau cycle infectieux au sein des amibes ou des cellules humaines (Molofsky and Swanson, 2004). Sous forme stationnaire ou transmissive, la

bactérie est sous la forme d'un court bacille épais flagellée. La présence de ce flagelle lui confère la mobilité nécessaire pour aller à la recherche d'un nouvel hôte ou encore pour migrer au sein d'un biofilm. La bactérie est plus virulente, sensible au sodium, fortement cytotoxique et plus résistante aux stress environnementaux (Steinert et al., 2002). La différenciation de *L. pneumophila* implique plusieurs mécanismes de régulation transcriptionnels et post-transcriptionnels qui nécessitent l'implication de différents facteurs. Plusieurs gènes sont régulés durant ce processus. Comme chez d'autres bactéries, la réponse stringente est utilisée par *L. pneumophila* pour s'adapter rapidement en réponse au stress. Le processus de régulation est détaillé dans la **figure 14**. La diminution du niveau d'acides aminés et d'autres éléments nutritifs dans le milieu environnant entraîne une augmentation d'ARNt non chargés qui est perçue par les enzymes ribosomales RelA et SpoT (Dalebroux et al., 2009). Ces enzymes sont surexprimées et synthétisent le (p)ppGpp par conversion du GTP et de l'ATP. Le (p)ppGpp est une alarmone qui va activer les caractères de différenciation *via* la modulation des gènes de régulation (Hammer and Swanson, 1999). Le facteur sigma RpoS est activé durant la phase stationnaire et coordonne l'expression des caractères de virulence impliqués dans le passage à la forme transmissive de *L. pneumophila* (Bachman and Swanson, 2001). Ce facteur intervient aussi dans la phase répllicative en régulant les gènes essentiels à la survie et la réplication intracellulaire de *L. pneumophila* (Bachman and Swanson, 2004). *L. pneumophila* compte en plus de RpoS, cinq autres facteurs sigma : RpoD, RpoE, RpoH, RpoN et FliA (Cazalet et al., 2004) qui interviennent également dans la régulation des mécanismes de conversion de *L. pneumophila* (Albert-Weissenberger et al., 2007; Molofsky and Swanson, 2004). Le système à deux composants LetA/LetS (*Legionella* transmission activator/sensor) induit l'expression des facteurs de transmission nécessaire à la survie dans l'environnement (Hammer et al., 2002). L'action du complexe LetA/LetS passe par deux petits ARNs non-codants RsmY et RsmZ (repressor of secondary metabolites) nécessaires au

processus d'infection et à la réplication intracellulaire et à la virulence de *L. pneumophila*. Ces ARNs non-codants ont la capacité de se lier à CsrA (carbon storage regulator) et d'inhiber son action (Sahr et al., 2009). CsrA est décrit pour réprimer les facteurs de transmission et activer les facteurs de réplication chez *L. pneumophila* (Albert-Weissenberger et al., 2007; Fettes et al., 2001; Molofsky and Swanson, 2003).

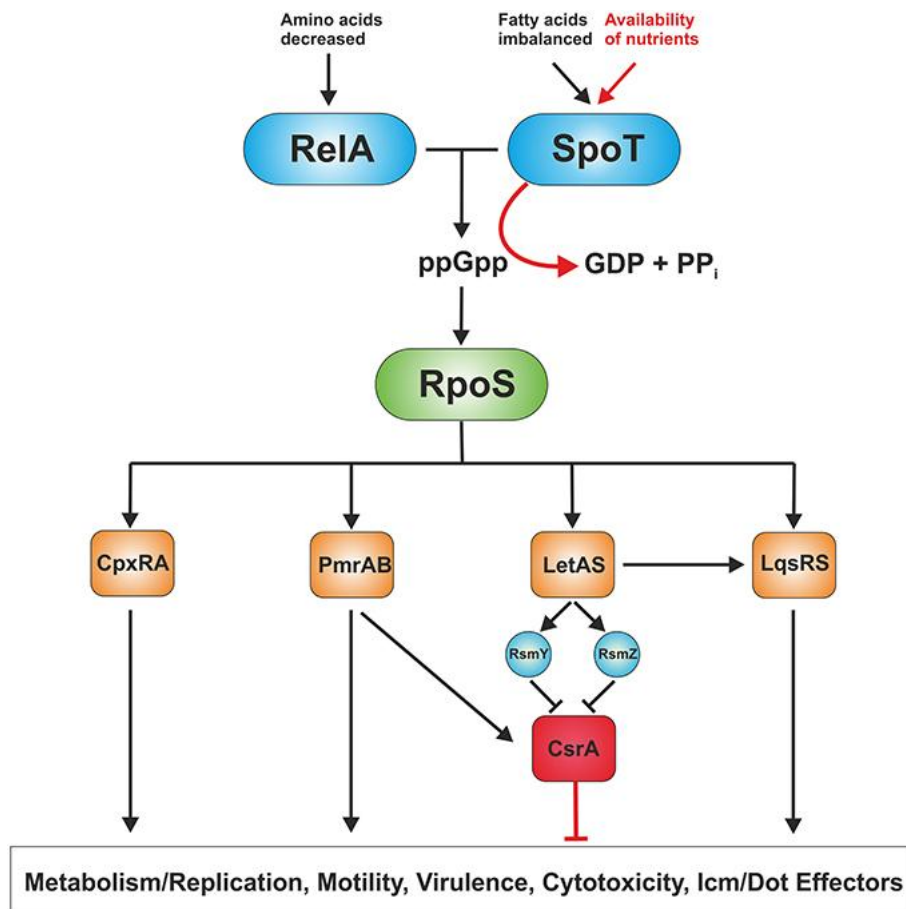


Figure 14 : Régulation des caractères réplcatifs et transmissifs de *L. pneumophila*. RelA et SpoT synthétisent le (p)ppGpp en réponse à un appauvrissement du milieu. Le (p)ppGpp synthétisé active le facteur sigma RpoS qui à son tour active les facteurs de régulation CpxRA, PmrAB, LetsAS et LqsRS, qui contrôlent les traits de virulence de *L. pneumophila* et gouvernent le passage de la forme réplcative à la forme transmissive. Le système à deux composants LetA/LetS inhibe le facteur de régulation CsrA par l'intermédiaire des ARNs non-codants RsmY et RsmZ (Manske and Hilbi, 2014).

Bien qu'il soit possible de cultiver la bactérie *L. pneumophila* en laboratoire, sa réplication au sein de l'environnement n'a été observée qu'au sein des protozoaires. Plusieurs études ont montré qu'en absence d'un hôte, *L. pneumophila* peut survivre au sein de l'environnement sous forme planctonique libre ou au sein des biofilms mais ne s'y multiplie pas (Declerck et al., 2009; Murga et al., 2001). Murga et ses collaborateurs ont réalisé un système de biofilm composé de *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* et *Flavobacterium* sp. Ces microorganismes sont le plus souvent retrouvés au sein des eaux potables et sont classiquement utilisés dans des études portant sur les biofilms. Avec ce système, ils ont observé une croissance significative de *L. pneumophila* uniquement en présence de *Vermamoeba vermiformis* (Murga et al., 2001). Ces résultats ont été confirmés par Declerck et ses collaborateurs qui ont observé une croissance de *L. pneumophila* uniquement en présence de l'amibe libre *A. castellanii* dans un système de biofilm composé de *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli* et *Flavobacterium breve* (Declerck et al., 2009). Bien que les systèmes de biofilms utilisés dans ces deux études n'aient pas permis une croissance de *L. pneumophila* en absence d'amibes, ils ont toutefois montré que ces systèmes permettaient la survie de *L. pneumophila* pendant plusieurs jours (Declerck et al., 2009; Murga et al., 2001). L'augmentation de la quantité de *L. pneumophila* au sein des biofilms a été corrélée avec l'augmentation de la biomasse des protozoaires (Liu et al., 2012b).

III.1.5. Les systèmes de sécrétion

L. pneumophila possède plusieurs systèmes de sécrétion qui participent à sa virulence. Il s'agit des systèmes de sécrétion Dot/Icm, Lsp, Lvh, Lss, Sec et Tat (Albert-Weissenberger et al., 2007; Lammertyn and Anné, 2004; Zhan et al., 2015).

III.1.5.1. Le système de sécrétion Dot/Icm

Le système de sécrétion Dot/Icm (defective in organelle trafficking/intracellular multiplication) de *L. pneumophila* appartient à la grande famille des systèmes de sécrétion de type IVB (T4BSS). Les systèmes de sécrétion de type IV sont des complexes multi-protéiques utilisés par certaines bactéries pour le transport de molécules de nature et de taille très variées au sein de cellules cibles diverses (Fischer et al., 2002). Leur utilisation est liée à la pathogénicité car ils permettent l'échange de matériel génétique mais aussi l'administration d'effecteurs au sein de la cellule cible dans le but de moduler les fonctions de l'hôte pour créer un environnement intracellulaire favorisant la survie et la multiplication bactérienne. Les systèmes de sécrétion de type IV peuvent être divisés en trois catégories : le système dit de « conjugaison » qui permet le transport intra et inter-espèce de l'ADN ; les systèmes dits d'« absorption et libération de l'ADN » qui permettent l'échange génétique sans contact direct avec la cellule hôte et enfin les systèmes dits de « translocation d'effecteurs » qui délivrent leurs substrats par injection directe dans la cellule hôte (Cascales and Christie, 2003). Le système de sécrétion Dot/Icm de *L. pneumophila*, utilisé au cours de l'infection de la cellule hôte, rentre dans cette dernière catégorie de système (Cascales and Christie, 2003). Il représente un complexe protéique cytoplasmique et intra-membranaire (**figure 15**) codé par 27 gènes appartenant aux loci « icm » et « dot » (Berger and Isberg, 1993; Marra et al., 1992). Toutes ces protéines sont nécessaires à la virulence de *L. pneumophila*. Elles œuvrent de manière coordonnée en assurant des fonctions de réception, de translocation, et de régulation pour permettre la réplication intracellulaire de la bactérie.

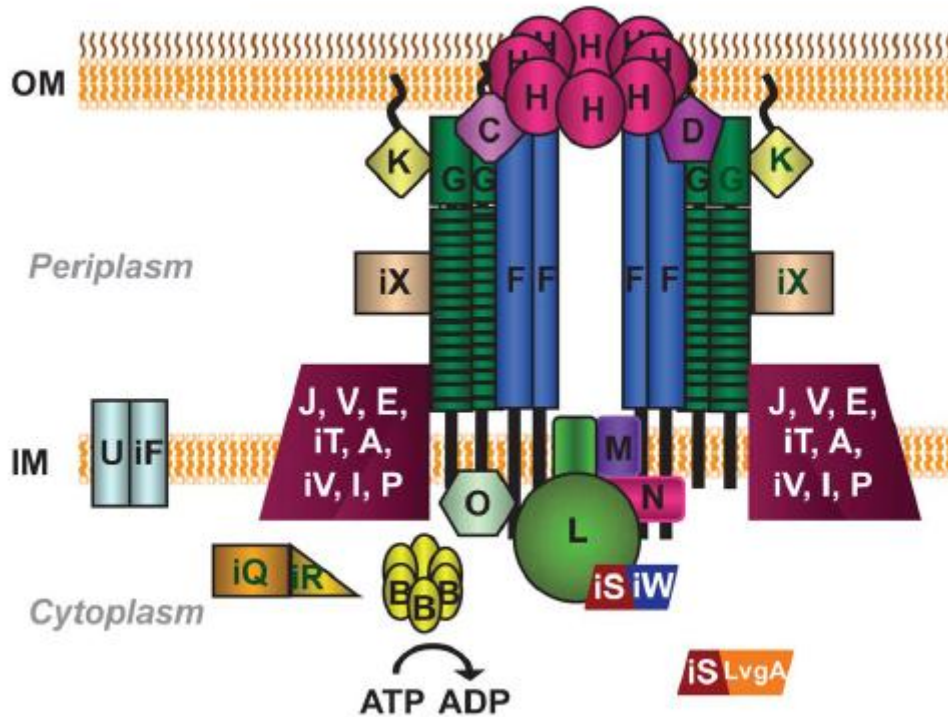


Figure 15 : Système de sécrétion Dot/Icm. Les protéines sont représentées sur la base des localisations subcellulaires (présumentes ou déterminées expérimentalement) et les relations topologiques des divers composants Dot/Icm dans la membrane externe (OM), le périplasm, la membrane interne (IM) et le cytoplasme. Les lettres individuelles représentent les noms de protéines Dot et les lettres précédées d'un « i » représentent les noms de protéines Icm (Sutherland et al., 2013).

Les complexes protéiques IcmS/IcmW, et IcmS/LvgA (protéine de virulence) sont des constituants cytoplasmiques qui coordonnent la présentation des substrats transloqués (Isberg et al., 2009). Le complexe protéique DotL, DotM et DotN fait partie de la membrane interne. Il interagit directement avec le complexe IcmS/IcmW via des récepteurs présents sur DotL et possède une activité ATPase qui permet le transport des substrats (Isberg et al., 2009; Sutherland et al., 2012). Le complexe protéique DotH, DotC, DotD, DotF et DotG forme une structure en forme d'aiguille moléculaire qui traverse les membranes interne et externe de la bactérie. Cette structure représente le corps du système de translocation et permet le transit des substrats (Kubori et al., 2014; Sutherland et al., 2013; Vincent et al., 2006). Le complexe

protéique transmembranaire IcmF/DotU, associé au corps du système, servirait à la régulation des composants du système (Sexton et al., 2004a). Le complexe protéique cytoplasmique IcmQ/IcmR serait impliqué dans les mécanismes de perméabilisation membranaire (Duménil et al., 2004; Raychaudhury et al., 2009). La protéine cytoplasmique DotB possède une activité ATPase qui fournit l'énergie nécessaire au fonctionnement du système de translocation Dot/Icm pour le transport des substrats (Sexton et al., 2004b). La protéine transmembranaire IcmT, *via* son extrémité C terminale, participe à la formation de pores qui permettent la sortie de *L. pneumophila* des cellules hôtes (Bitar et al., 2005; Molmeret et al., 2002c). La protéine DotA est indispensable à la multiplication intracellulaire de *L. pneumophila* (Roy and Isberg, 1997; Roy et al., 1998; Scaturro et al., 2009).

L'appareil de translocation Dot/Icm permet la sécrétion de plus de 300 effecteurs à l'intérieur de la cellule hôte. Ces effecteurs induisent la modulation de nombreuses fonctions de l'hôte afin d'échapper à la phagocytose et de permettre la réplication intracellulaire de *L. pneumophila* (Finsel and Hilbi, 2015; Hoffmann et al., 2014; Simon and Hilbi, 2015).

III.1.5.2. Le système de sécrétion Lsp

Le système de sécrétion Lsp (*Legionella* type II secretion pathway) de *L. pneumophila* est un système de sécrétion de type II (T2SS). Le T2SS est utilisé par plusieurs bactéries pathogènes ou non pour le transport des protéines du milieu intracellulaire vers le milieu extérieur (Cianciotto, 2005). Chez les bactéries pathogènes, il favorise de manière générale l'altération des cellules ou des tissus de la cellule hôte tandis que chez les bactéries non pathogènes, il aide de manière significative à l'adaptation et à la multiplication des bactéries au sein de l'environnement (Cianciotto, 2005, 2013). Avant la translocation, les protéines sont transloquées à la membrane externe par les systèmes de sécrétion Sec ou Tat. Les protéines

sont ensuite transloquées par l'appareil de sécrétion qui est constitué de 12 protéines (**figure 16**).

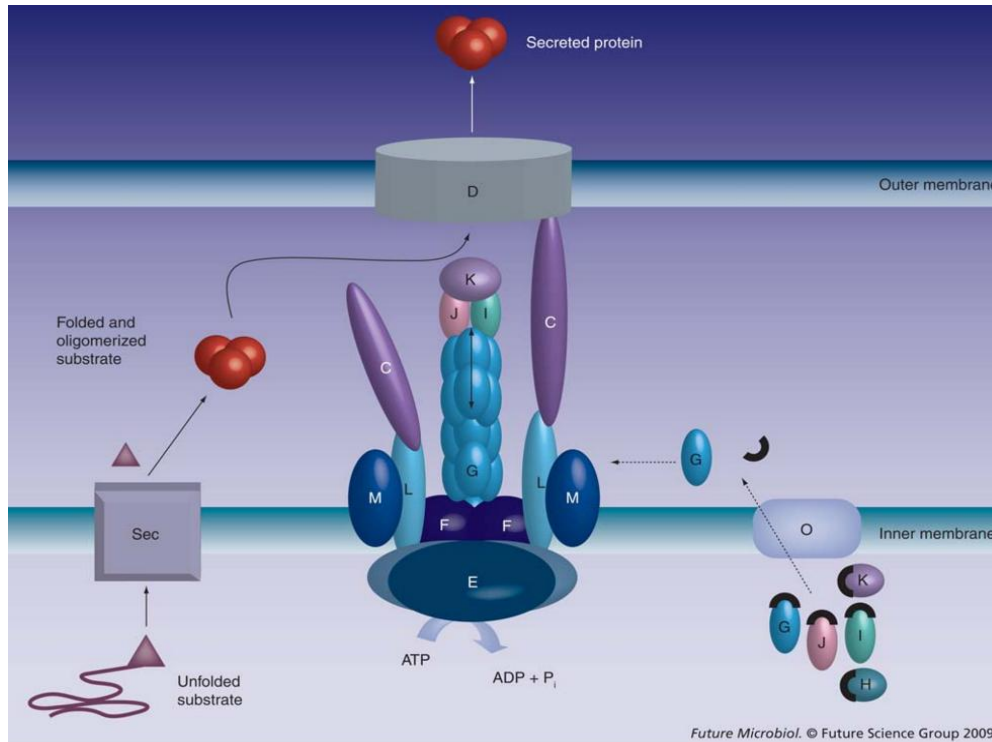


Figure 16 : Système de sécrétion de type II. Le système Sec, confère aux protéines issues du cytoplasme, une structure tertiaire avant de les transloquer à la membrane. Arrivées à la membrane, les protéines sont prises en charge par l'appareil de sécrétion et sont transloquées dans le milieu extracellulaire. Les différentes lettres représentent les noms des protéines T2S (Cianciotto, 2009).

La protéine T2SE est une protéine cytoplasmique possédant une activité ATPase. Les protéines T2SF, T2SL et T2SM sont des protéines associées à la membrane interne et liées à la protéine T2SE. Les protéines périplasmiques T2SG, T2SH, T2SI, T2SJ et T2SK sont des pseudopilines qui forment une structure de type pilus. La protéine T2SO est une peptidase/méthyltransférase associée à la membrane interne. Elle est essentielle à la formation du pilus car elle modifie les pseudopilines avant leur intégration à l'appareil de sécrétion. La protéine T2SD est associée à la membrane externe et forme le port de sécrétion de l'appareil.

La protéine T2SC est une protéine qui serait liée à la protéine D et dont le complexe serait impliqué dans des mécanismes de reconnaissance des substrats (Cianciotto, 2005, 2009).

Le système de sécrétion Lsp sécrète environ 25 protéines dont la majorité possède une activité enzymatique (DebRoy et al., 2006; Zhan et al., 2015). Il fonctionne en association avec le système de sécrétion de Type IV et contribue à la virulence et la croissance intracellulaire de *L. pneumophila* (Rossier et al., 2004). C'est la découverte du gène *pilD*, codant la pseudopiline peptidase PilD (ou T2SO), qui a permis de mettre en évidence l'existence du T2SS chez *L. pneumophila* (Liles et al., 1998). La mutation du gène *pilD* entraîne une diminution significative de la croissance de la bactérie (Söderberg et al., 2004). Le rôle essentiel du système de sécrétion Lsp dans la croissance extracellulaire de *L. pneumophila* en dessous de 20°C a été mis en évidence. Ce système sécréterait des protéines qui favoriseraient la croissance de la bactérie à faible température (Söderberg et al., 2004). Une étude a montré que des hélicases et des RNAses sécrétées par le Lsp compenseraient l'inhibition transitoire de la synthèse de protéine causée par le froid. Tandis qu'une protéine LpxP-like favoriserait la production des lipides A plus adaptés au froid. A ces deux mécanismes s'ajouterait le rôle des protéines transmembranaires qui faciliterait la croissance à basse température de *L. pneumophila* (Söderberg and Cianciotto, 2010). Le Lsp serait aussi impliqué dans la modulation de facteurs immunitaires, notamment la baisse de la production de cytokines pour favoriser la croissance intracellulaire au sein des macrophages et des cellules épithéliales du poumon (McCoy-Simandle et al., 2011). Contrairement à d'autres Gram négatifs, *L. pneumophila* n'a pas une exigence particulière du système de sécrétion Lsp dans les mécanismes d'attachement au biofilm (Lucas et al., 2006).

III.1.5.3. Les systèmes de sécrétion Lvh, Lss, Sec et Tat

Le système de sécrétion Lvh (*Legionella vir homologues*) de *L. pneumophila* est un système de sécrétion de type IVA (T4ASS). Il est codé par 11 gènes homologues aux gènes d'autres T4SS et participe aux mécanismes de conjugaison en association avec le système de sécrétion Dot/Icm (Segal et al., 1999). Contrairement au T4BSS, le T4ASS n'est pas indispensable à la répllication intracellulaire de *L. pneumophila* (Segal et al., 1999). Toutefois, Ridenour et ses collaborateurs ont observé que la répllication intracellulaire de *L. pneumophila* à 30°C était affectée en absence du gène *lvhB2*. Ce qui les a laissé suggérer que le système Lvh participerait à la virulence de *L. pneumophila* dans l'environnement naturel où les températures sont inférieures à 37°C (Ridenour et al., 2003). Cette hypothèse a été confirmée par Bandyopadhyay et ses collaborateurs qui ont montré que le système Lvh serait fonctionnel dans un milieu similaire au milieu environnemental aqueux. Ils ont montré qu'en cas de non fonctionnalité ou d'absence du système de sécrétion Dot/Icm, le relais serait assuré par système de sécrétion Lvh (Bandyopadhyay et al., 2007).

Le système de sécrétion Lss (*Legionella secretion system*) est un système de sécrétion de type I (T1SS). Il est constitué d'un transporteur ABC (ATP-binding cassette), d'une protéine périplasmique MFP (membrane fusion protein) et d'une protéine TolC ou OMF (outer membrane factor) enchâssée dans la membrane externe. Ces 3 composants forment un canal qui traverse la membrane interne et externe et assure le transport de toxines du milieu intracellulaire vers le milieu extérieur. Parmi les toxines exportées, il y a les toxines de la famille Rtx (repeats in toxin) qui représentent un groupe de cytolysines et cytotoxines produites par les bactéries. Le système Lss de *L. pneumophila* est codé par 6 gènes (*lssX*, *lssY*, *lssZ*, *lssA*, *lssB* et *lssD*) dont 2 présentent des similarités avec le T1SS de *V. cholerae* et *E. coli*. Il s'agit respectivement des gènes *lssB* et *lssD* (Jacobi and Heuner, 2003). La protéine LssB est une protéine de type ABC transporteur et la protéine LssD serait une protéine MFP.

L'étude sur les mutants $\Delta rtxA$, $\Delta lssB$ et $\Delta lssD$ a permis de mettre en évidence le rôle du système de sécrétion Lss dans la virulence de *L. pneumophila*. Ainsi donc, il a été montré qu'il participe à l'adhésion et à l'entrée du pathogène au sein de la cellule hôte (Cirillo et al., 2002; Fuche et al., 2015).

Les systèmes Sec (Secretory pathway) et Tat (Twin arginine translocation) sont deux systèmes de translocation localisés dans la membrane interne et qui fusionnent avec le T2SS. Ils interviennent dans la première étape de translocation des protéines par le T2SS. Le système Sec confère aux protéines une structure tertiaire avant de les transloquer à la membrane externe (de Keyzer et al., 2003), tandis que le système Tat reconnaît les protéines déjà transformées dans le cytoplasme (Berks et al., 2003). Chez *L. pneumophila*, les 3 gènes codant les protéines TatA, TatB et TatC présentes chez *E. coli* ont été identifiés (De Buck et al., 2004). Une mutation des gènes *tatB* et *tatC* entraîne une réduction de la formation de biofilm par *L. pneumophila*, ce qui suggère que le système Tat sécréterait des substrats impliqués dans la formation de biofilm (De Buck et al., 2005). Un autre rôle important du système Tat est son implication dans la croissance intracellulaire de *L. pneumophila* en présence d'une faible concentration en fer (Rossier and Cianciotto, 2005).

III.2. Mécanisme d'infection

L. pneumophila vit dans l'environnement où il peut parasiter des protozoaires, mais peut aussi infecter les macrophages. Le processus d'infection par *L. pneumophila* est similaire pour les amibes et les macrophages (Escoll et al., 2013; Fields et al., 2002; Hoffmann et al., 2014). L'infection se déroule en cinq grandes étapes allant de l'entrée à la sortie du pathogène de la cellule hôte (**figure 17**).

Au cours de l'infection, *L. pneumophila* injecte plusieurs protéines au sein de la cellule hôte via son système de sécrétion dot/icm. Ces protéines sont des effecteurs qui permettront de moduler les fonctions de l'hôte pour favoriser le développement intracellulaire de la bactérie (Finsel and Hilbi, 2015; Simon and Hilbi, 2015).

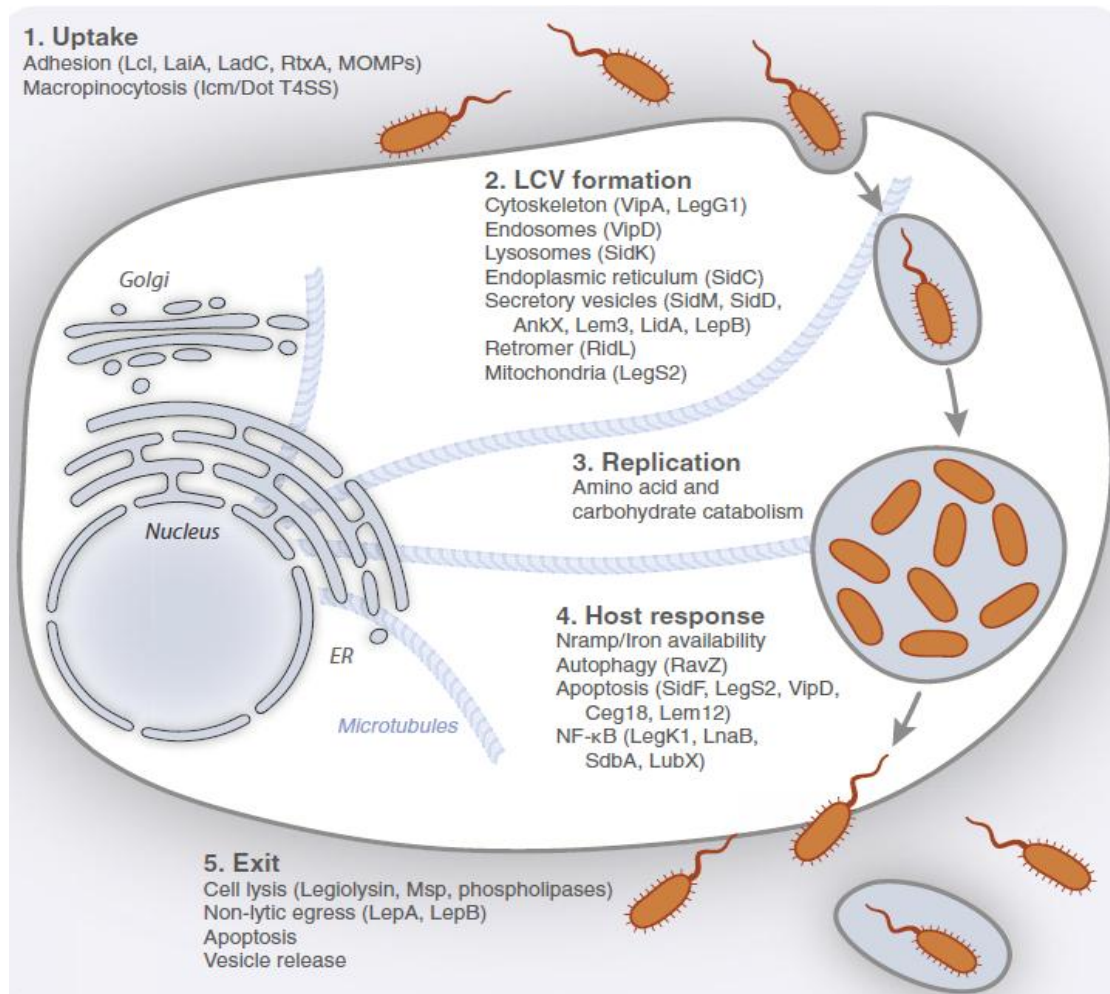


Figure 17 : Modélisation du processus d'infection de *L. pneumophila*. (1) Entrée de *L. pneumophila* au sein de la cellule hôte par phagocytose. (2) Formation de la vacuole répliquative (LCV « *Legionella*-containing vacuole »). (3) Réplication intracellulaire de *L. pneumophila*. (4) Réponse de l'hôte. (5) Sortie des bactéries après multiplication. Les différents processus de la cellule hôte, les composés impliqués et les effecteurs bactériens qui les ciblent sont représentés à chaque étape (Hoffmann et al., 2014).

III.2.1. L'entrée au sein de la cellule hôte

Le processus d'infection par *L. pneumophila* est initié par l'adhésion de la bactérie suivie de son entrée au sein des cellules hôtes (**figure 17**). L'attachement de *L. pneumophila* à la cellule hôte est facilité par l'existence d'adhésines à sa surface mais aussi de récepteurs exprimés à la surface de la cellule hôte. La protéine Lcl (*Legionella* collagen-like) est une adhésine qui permet la fixation de *L. pneumophila* à la membrane des cellules épithéliales mais aussi à celles des amibes (Abdel-Nour et al., 2014; Duncan et al., 2011; Vandersmissen et al., 2010). La protéine RtxA est impliquée dans l'adhésion et l'entrée de *L. pneumophila* à la cellule hôte (Cirillo et al., 2000, 2002). La protéine Hsp60 (heat-shock protein) est une protéine chaperonne associée à l'enveloppe cellulaire de *L. pneumophila* et qui serait impliquée dans les mécanismes d'adhésion, d'internalisation et d'invasion de *L. pneumophila* à la cellule hôte (Garduño et al., 1998a, 1998b, 2011; Hoffman and Garduno, 1999). Les protéines MOMP de *L. pneumophila* (major outer membrane proteins) sont impliquées dans les mécanismes d'adhésion à l'hôte (Krinos et al., 1999). La liaison des MOMP aux récepteurs présents à la surface des macrophages serait facilitée par l'intermédiaire du récepteur du complément C3 (Bellinger-Kawahara and Horwitz, 1990). La protéine Enhc (enhanced-entry) est une protéine périplasmique impliquée de façon indirecte dans l'adhésion et l'invasion de *L. pneumophila*. Elle est requise pour le maintien de l'intégrité de l'enveloppe de la bactérie qui est nécessaire à l'invasion au sein des cellules épithéliales et des macrophages (Cirillo et al., 2000; Liu et al., 2012a). La protéine putative LadC (*L. pneumophila*-specific adenylate cyclase) est aussi impliqué dans les mécanismes d'adhésion de *L. pneumophila* (Newton et al., 2008). En plus des adhésines, d'autres composants associés à l'enveloppe cellulaire de *L. pneumophila* interviennent dans les mécanismes d'adhésion et d'invasion de la bactérie. Il s'agit notamment du LPS (lipopolysaccharide), du flagelle et des pili (Mintz et al., 1992; Shevchuk et al., 2011). La mutation au niveau du gène *pilE_L* codant pour une molécule du pili conduit à

une baisse de l'adhérence de *L. pneumophila* aux cellules hôtes. Ce qui signifie que les pili de *L. pneumophila* seraient impliqués dans les mécanismes d'adhésion à l'hôte (Stone and Abu Kwaik, 1998). LaiA (*Legionella* adhesion molecule integrin-like), aussi appelé SdeA, est un effecteur du système de sécrétion Dot/Icm. Cet effecteur serait impliqué dans la phase d'adhésion de *L. pneumophila* aux cellules hôtes (Bardill et al., 2005; Chang et al., 2005).

Sur les cellules épithéliales, les oligosaccharides associés aux lipides ou aux protéines de la surface cellulaire contribuent à l'attachement de *L. pneumophila* (Thomas and Brooks, 2004). *L. pneumophila* induit la déphosphorylation de la tyrosine de la lectine Gal/GalNAc (galactose/*N*-acetylgalactosamine) ou d'autres protéines de l'enveloppe cellulaire de l'amibe. Cette déphosphorylation serait nécessaire à l'adhésion de *L. pneumophila* aux amibes (Venkataraman et al., 1997, 1998).

L'attachement de *L. pneumophila* à l'hôte est directement suivi de son internalisation au sein de la cellule hôte par phagocytose ou par « coiling phagocytosis » (phagocytose par enroulement) (Bozue and Johnson, 1996; Horwitz, 1984). L'inhibition de l'activité du cytosquelette et des mécanismes de pinocytose inhibe l'entrée et la prolifération de *L. pneumophila* au sein de la cellule hôte. Ceci suggère que l'entrée par phagocytose de *L. pneumophila* nécessite la participation du cytosquelette (Elliott et al., 1986; King et al., 1991; Moffat and Tompkins, 1992). De façon plus précise, il s'agirait d'un processus médié par des mouvements de l'actine et de l'actine liée aux protéines (Lu and Clarke, 2005). La protéine LpnE (*L. pneumophila* entry) participe à l'entrée de *L. pneumophila* au sein de la cellule hôte mais aussi au trafic vésiculaire qui permet la formation de la vacuole répliquative de *L. pneumophila* (Newton et al., 2006, 2007).

III.2.2. La formation de la vacuole réplivative

Après l'internalisation de *L. pneumophila*, il y a la formation d'une vacuole réplivative ou LCV (*Legionella*-containing vacuole) dans laquelle la bactérie effectuera sa multiplication intracellulaire (**figure 17**). Une fois le phagosome contenant *L. pneumophila* formé, la fusion du phagosome et du lysosome est inhibée, ce qui empêche l'acidification du phagosome et permet la survie de la bactérie (Horwitz, 1983, 1984). Le phagosome contenant *L. pneumophila* fusionne ensuite avec le réticulum endoplasmique (Abu Kwaik, 1996; Swanson and Isberg, 1995). *L. pneumophila* procède ensuite au recrutement des ribosomes afin de modifier la membrane du phagosome et permettre la formation de LCV dans laquelle la bactérie va se multiplier et acquérir la maturation nécessaire à sa virulence (Tilney et al., 2001).

Le mécanisme d'évasion à la phagocytose est médié par des protéines effectrices principalement sécrétées par le système de sécrétion Dot/Icm. Ces effecteurs ciblent des composants de la cellule hôte permettant ainsi la modification de la membrane du phagosome qui conduit à la formation de la vacuole réplivative. Parmi les cibles il y a les PIs (phosphoinositides) et les GTPases (guanosine triphosphatases) de la cellule hôte (Finsel and Hilbi, 2015; Hoffmann et al., 2014; Xu and Luo, 2013).

Les PIs sont des dérivés phosphorylés du phosphatidylinositol. Ce sont des phospholipides essentiels aux mécanismes de signalisation cellulaire, à l'organisation du cytosquelette, à l'échange vésiculaire. En se liant à des effecteurs spécifiques, ils peuvent aussi contrôler l'activité enzymatique et induire des changements conformationnels des protéines membranaires. Le PI(4)P est impliqué dans la formation des vésicules. Des effecteurs issus du système de sécrétion Dot/Icm ciblent PI(4)P afin de manipuler les régulateurs de la voie sécrétoire. Les effecteurs SidC/SdcA et SidM (substrate of Icm/Dot) se fixent au PI(4)P *via* les domaines « P4C » et « P4M » respectivement permettant ainsi l'ancrage des protéines issues du réticulum

endoplasmique à la surface de la vacuole répliquative (Brombacher et al., 2009; Weber et al., 2006). Les effecteurs LptD, LidA, LpnE et SetA interagissent aussi avec les PIs pour détourner les produits issus de la voie sécrétoire au profit de *L. pneumophila* (Conover et al., 2003; Derré and Isberg, 2005; Harding et al., 2013; Jank et al., 2012; Newton et al., 2007).

Les GTPases sont des régulateurs essentiels du transport des vésicules membranaires le long de la voie sécrétoire, de la dynamique du cytosquelette et des processus de transduction. Rab1 est une petite GTPase essentielle au trafic vésiculaire du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi. Les effecteurs LidA (*Lowered viability in the presence of dotA*) et SidM/DrrA participent à la modulation des fonctions de Rab1 et permettent son recrutement au sein de la vacuole répliquative (Machner and Isberg, 2006). L'effecteur LidA (*Lowered viability in the presence of dotA*) stabilise Rab1 tandis que SidM/DrrA est un GEF (guanine nucleotide exchange factor) qui active Rab1 *via* l'incorporation du GTP (Murata et al., 2006; Neunuebel et al., 2012). L'effecteur AnkX (ankyrin repeat protein) est une phosphocholinase qui permet une modification post-transcriptionnelle des Rab-GTPases modulant ainsi ses fonctions (Campanacci et al., 2013; Mukherjee et al., 2011). L'effecteur Lem3 est une déphosphocholinase qui permet de ramener les Rab-GTPases transformées par l'effecteur AnkX à leur état d'origine (Tan et al., 2011). L'effecteur SidD est une dé-AMPyase qui participe à l'inactivation de Rab1 régulant ainsi l'activité de SidM/ DrrA (Neunuebel et al., 2011; Tan and Luo, 2011). L'effecteur LepB est une GAP (GTPase-activating protein) qui inactive Rab1 *via* l'hydrolyse du GTP associé régulant ainsi l'activité de SidM/DrrA (Ingmundson et al., 2007).

Arf1 (ADP-ribosylation factor 1) est une petite GTPase impliquée dans le trafic des vésicules rétrogrades de l'appareil de Golgi vers le RE. Cette GTPase est activée par l'effecteur RalF qui est un GEF permettant l'activation et le recrutement de Arf1 *via* l'incorporation du GTP

(Nagai et al., 2002). L'effecteur RidL inhibe le trafic rétrograde des vésicules et participe à la multiplication intracellulaire de *L. pneumophila* (Finsel et al., 2013).

III.2.3. La réplication intracellulaire

Une fois la vacuole répliquative formée, *L. pneumophila* qui était jusque-là sous forme transmissive se différencie sous forme répliquative. Les caractères de transmission sont réprimés tandis que les caractères de réplication sont exprimés tels que décrits dans son cycle de vie (Byrne and Swanson, 1998; Molofsky and Swanson, 2004). Une fois différenciée, *L. pneumophila* amorce sa réplication intracellulaire au sein de la vacuole répliquative (**figure 17**). La multiplication intracellulaire de *L. pneumophila* nécessite la disponibilité de certains substrats utiles au métabolisme de la bactérie. Il s'agit principalement des acides aminés mais aussi des glucides et du glycérol (Eisenreich and Heuner, 2016; Manske and Hilbi, 2014).

Les acides aminés sont des éléments indispensables au métabolisme de *L. pneumophila* (George et al., 1980; Tesh and Miller, 1981). La disponibilité en acides aminés est requise pour le maintien de la forme répliquative de *L. pneumophila* (Byrne and Swanson, 1998). Le transporteur PhtA (phagosomal transporter), qui permet l'apport en thréonine au sein du phagosome, est impliqué dans les mécanismes de différenciation et de réplication intracellulaire de *L. pneumophila* (Sauer et al., 2005). *L. pneumophila* utilise aussi des transporteurs de la cellule hôte pour l'apport des acides aminés au sein du phagosome. Par exemple, le transporteur SLC1A5 qui permet le transport des acides aminés neutres dans les cellules humaines contribuerait à l'apport en acides aminés nécessaires à la réplication intracellulaire de *L. pneumophila* (Wieland et al., 2005) (**figure 18**).

Les effecteurs AnkB, AnkH et AnkJ (ankyrin repeats protein) sont impliqués dans la réplication intracellulaire de *L. pneumophila* (Al-Khodor et al., 2008; Habyarimana et al., 2008, 2010). AnkB contient un domaine F-box qui lui permettrait d'interagir avec les

protéines de l'hôte et d'exploiter les mécanismes d'ubiquitination de l'hôte pour l'apport des protéines ubiquitinées au phagosome (Al-Quadan and Kwaik, 2011; Bruckert et al., 2014; Price et al., 2010). Le système de dégradation des protéines de l'hôte est aussi exploité par *L. pneumophila* afin de produire des acides aminés à partir des protéines ubiquitinées (Price et al., 2011).

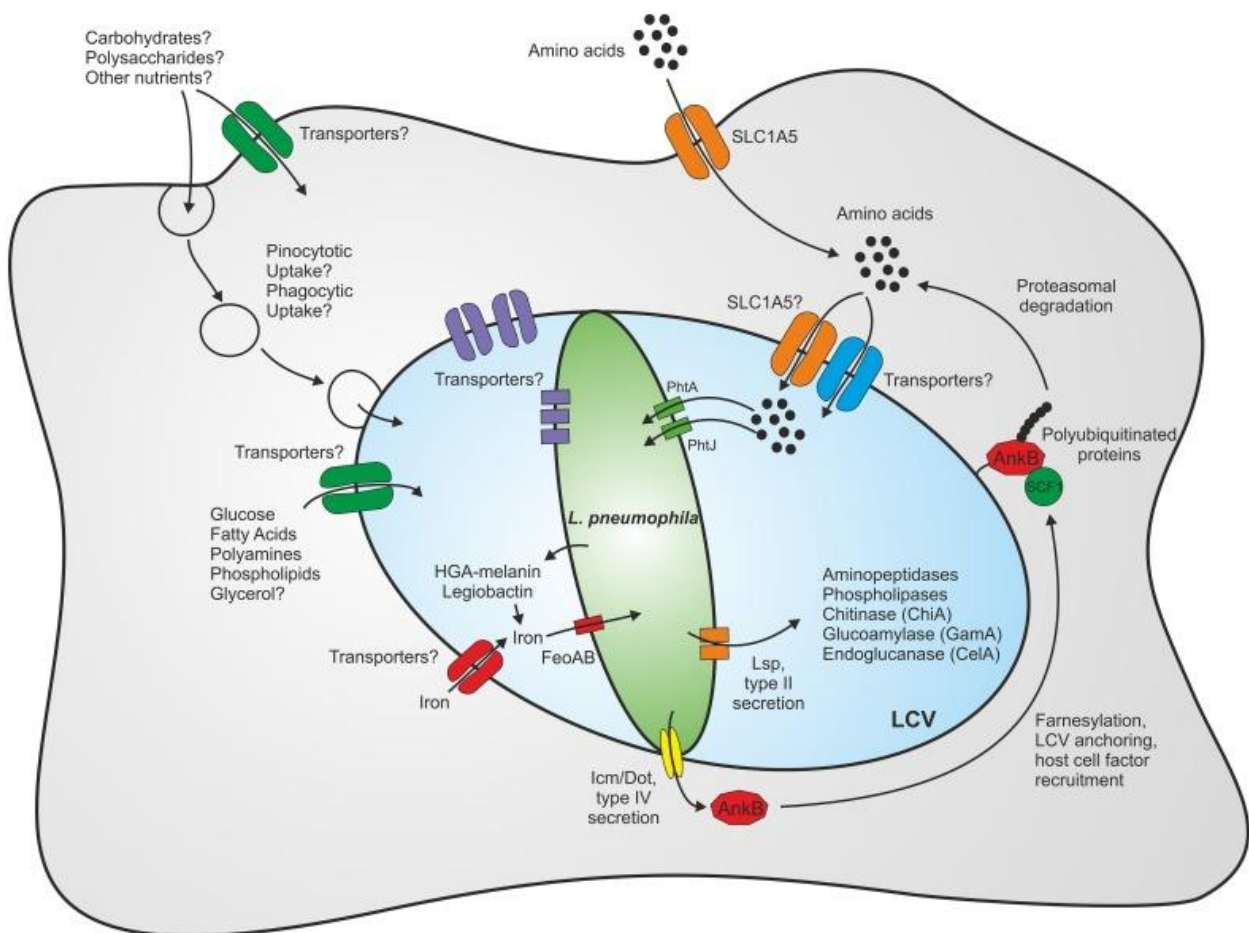


Figure 18 : Modélisation du métabolisme de *L. pneumophila* au sein de la cellule hôte. Le système d'accès des nutriments au sein du phagosome, les potentiels transporteurs de même que leur localisation potentielle y sont représentés (Manske and Hilbi, 2014).

Le fer est un élément essentiel à la réplication intracellulaire de *L. pneumophila* (Gebran et al., 1994a, 1994b, 1994c). La protéine IroT/MavN (iron transporter/more regions allowing vacuolar colocalization) qui est associée à la membrane du phagosome faciliterait l'entrée du

fer au sein de la vacuole répliquative avant d'être transportée par FeoB au sein de la bactérie (Isaac et al., 2015; Portier et al., 2015).

Les glucides ne sont pas indispensables au métabolisme de *L. pneumophila*. La protéine GamA est une amylase sécrétée par le T2SS de *L. pneumophila* et est impliquée dans la dégradation du glycogène et de l'amidon. Cette protéine est active et fortement produite durant la répliquative intracellulaire de *L. pneumophila*. Cela suggère que le glucose serait utilisé par *L. pneumophila* comme source supplémentaire de carbone au cours de la répliquative intracellulaire (Herrmann et al., 2011). Une récente étude a montré que le glycérol servirait de source de carbone supplémentaire pour *L. pneumophila* et qu'il serait métabolisé par glyconéogenèse et par la voie des pentoses phosphates (Häuslein et al., 2016).

III.2.4. La manipulation de l'hôte

En réaction à l'infection par *L. pneumophila*, la cellule hôte a développé plusieurs mécanismes de défense. Des effecteurs sécrétés par le système de sécrétion Dot/Icm permettent un contrôle de ces mécanismes de défense pour permettre la multiplication intracellulaire de *L. pneumophila* et sa sortie de la cellule hôte (**figure 17**).

L'autophagie, processus d'autodégradation des constituants du cytosol par le lysosome, est utilisé par la cellule hôte en réponse à l'infection par *L. pneumophila* (Amer and Swanson, 2005). L'effecteur RavZ est une cystéine protéase qui empêche le couplage du complexe Atg8/LC3 (microtubule-associated protein light chain 3) au PE (phosphatidylethanolamine) dont l'association est nécessaire au processus d'autophagie. Cette action qui conduit à l'inhibition de l'autophagie par le pathogène permet ainsi son invasion au sein de la cellule hôte (Choy et al., 2012; Horenkamp et al., 2015). L'effecteur LpSpl (*L. pneumophila* sphingosine-1 phosphate lyase) serait impliqué dans l'inhibition de l'autophagie *via* un autre

processus. Grâce à son activité lyase, il permettrait la réduction des sphingolipides de l'hôte bloquant ainsi le processus d'autophagie (Rolando et al., 2016).

Chez les macrophages et les cellules épithéliales, *L. pneumophila* contrôle les mécanismes d'induction et d'inhibition de l'apoptose via des effecteurs du système de sécrétion Dot/Icm (Abu-Zant et al., 2007; Amer, 2010; Zhu et al., 2013; Zink et al., 2002). Abu-Zant et ses collaborateurs ont montré que bien que le processus d'apoptose soit enclenché dès les premiers stades d'invasion de *L. pneumophila*, la cellule ne subit l'apoptose qu'à la fin de la phase de réplication (Abu-Zant et al., 2005). L'effecteur SidF interagit avec BNIP3 et Bcl-rambo et participe à l'inhibition de ces deux facteurs pro-apoptotiques (Banga et al., 2007). NF-κB est un facteur de transcription impliqué dans la transcription des gènes anti-apoptotiques. Au cours de l'infection, ce facteur est activé par les effecteurs LnaB (*Legionella* NF-κB Activator B) et LegK1 du système de sécrétion Dot/Icm contribuant ainsi à l'inhibition du processus d'apoptose (Abu-Zant et al., 2007; Ge et al., 2009; Losick and Isberg, 2006; Losick et al., 2010). L'effecteur SdhA participe au maintien de l'intégrité de la vacuole répliquative prévenant ainsi les mécanismes de réponse inflammatoire de l'hôte (Creasey and Isberg, 2012; Laguna et al., 2006). *L. pneumophila* via son système de sécrétion Dot/Icm induit le processus d'apoptose par activation de la caspase 3 (Gao and Abu Kwaik, 1999a). Certaines caspases sont des protéines qui *via* leur activité de clivage de molécules permettent la formation de corps apoptotiques. L'effecteur VipD, sécrété par le système de sécrétion Dot/Icm, est une phospholipase dont l'activité compromettrait l'intégrité membranaire des mitochondries entraînant ainsi l'activation de la caspase-3 (Zhu et al., 2013).

En plus des mécanismes précités, d'autres mécanismes de l'hôte sont modulés. Par exemple, le cytosquelette de l'hôte subit des réarrangements durant l'infection par *L. pneumophila*. HtpB une protéine chaperonne localisée à la surface de *L. pneumophila* et qui est impliquée

dans la modification des microfilaments d'actine au sein des cellules de mammifères (Chong et al., 2009). L'effecteur VipA secrété par le système de sécrétion Dot/Icm permettrait la polymérisation des microfilaments via sa liaison directe à l'actine (Franco et al., 2012). Les effecteurs LegG1 induiraient la polymérisation de l'actine *via* l'activation de la GTPase Ran. Cette réorganisation du cytosquelette permettrait les déplacements de la vacuole réplivative (Hilbi et al., 2014; Rothmeier et al., 2013). Les effecteurs Ceg14 et LegK2 en revanche seraient impliqués dans l'inhibition de la polymérisation de l'actine (Guo et al., 2014; Michard et al., 2015). En inhibant la polymérisation de l'actine, LegK2 aiderait l'échappement à la phagocytose en empêchant la fusion du phagosome et du lysosome (Michard et al., 2015). La modulation de l'expression des gènes de l'hôte est aussi ciblée par *L. pneumophila*. L'interaction de l'effecteur RomA secrété par Dot/Icm avec le noyau permettrait la répression de l'expression des gènes de l'hôte (Rolando et al., 2013).

III.2.5. La sortie de la cellule hôte

La sortie de *L. pneumophila* de la cellule hôte constitue la dernière étape du processus d'infection. Au cours de cette ultime étape, *L. pneumophila* utilise des mécanismes de manipulation de l'hôte qui lui confèrent la capacité de s'échapper afin de recommencer un nouveau cycle infectieux (**figure 17**). Une fois que les nutriments deviennent limitants au sein de la vacuole réplivative, *L. pneumophila* qui était sous forme réplivative va se différencier en forme transmissive et exprimera à nouveau les caractères de virulence nécessaires à la sortie, à la survie extracellulaire et l'infection d'un nouvel hôte (Molofsky and Swanson, 2004).

La sortie lytique de *L. pneumophila* se fait via la formation de pores cytolitiques dans la cellule hôte qui conduisent à la lyse de la cellule (Gao and Kwaik, 2000; Molmeret et al., 2002c). Chez les macrophages et les cellules épithéliales, *L. pneumophila* induirait le

processus d'apoptose qui permettrait sa sortie de la cellule hôte (Gao and Abu Kwaik, 1999b; Hägele et al., 1998). Une sortie non lytique de *L. pneumophila* ferait intervenir les effecteurs LepA et LepB (Chen et al., 2004). *L. pneumophila* pourrait sortir de la cellule hôte *via* le processus d'exclusion des vésicules. Bouyer et ses collaborateurs ont d'ailleurs montré que ces vésicules pourraient conserver *L. pneumophila* pendant plusieurs mois (Bouyer et al., 2007).

En somme, l'infection des cellules eucaryotes par *L. pneumophila* est un processus qui met en jeu plusieurs mécanismes. Le succès de cette infection est possible *via* les effecteurs sécrétés par le système de sécrétion Dot/Icm qui permettent de manipuler l'hôte en induisant ou inhibant certaines de ses fonctions au profit de réplication intracellulaire de la bactérie.

IV. Cycle cellulaire

IV.1. Notions de cycle cellulaire chez les eucaryotes

Le cycle cellulaire est le processus par lequel une « cellule-mère », donne naissance à deux « cellules-filles », génétiquement identiques à la cellule-mère. Le cycle cellulaire est constitué de différentes étapes qui déterminent et délimitent la vie de la cellule. Dans le cas d'une cellule de mammifère par exemple, le cycle cellulaire est constitué de 4 phases successives: la phase G1 (gap 1), la phase S (synthesis), la phase G2 (gap 2) et la phase M (mitosis) qui constitue la phase de division de la cellule. Les phases G1, S et G2 constituent l'interphase et préparent la cellule à la mitose. La durée de chaque phase varie selon les types cellulaires. Certaines cellules peuvent arrêter la progression du cycle cellulaire et entrer en quiescence (ou en phase G0) (**figure 19**). La phase G1 représente l'étape d'initiation du cycle cellulaire. C'est durant cette phase que la cellule entre ou sort du cycle cellulaire pour se différencier. La phase

S constitue l'étape de duplication de l'ADN contenu dans la cellule. Une fois l'ADN répliqué, la cellule entre en phase G2 où elle poursuit sa croissance et se prépare à entrer en mitose. La mitose représente la dernière étape du cycle cellulaire. Elle constitue la phase au cours de laquelle, L'ADN et le contenu cellulaire est réparti dans chacune des deux cellules filles.

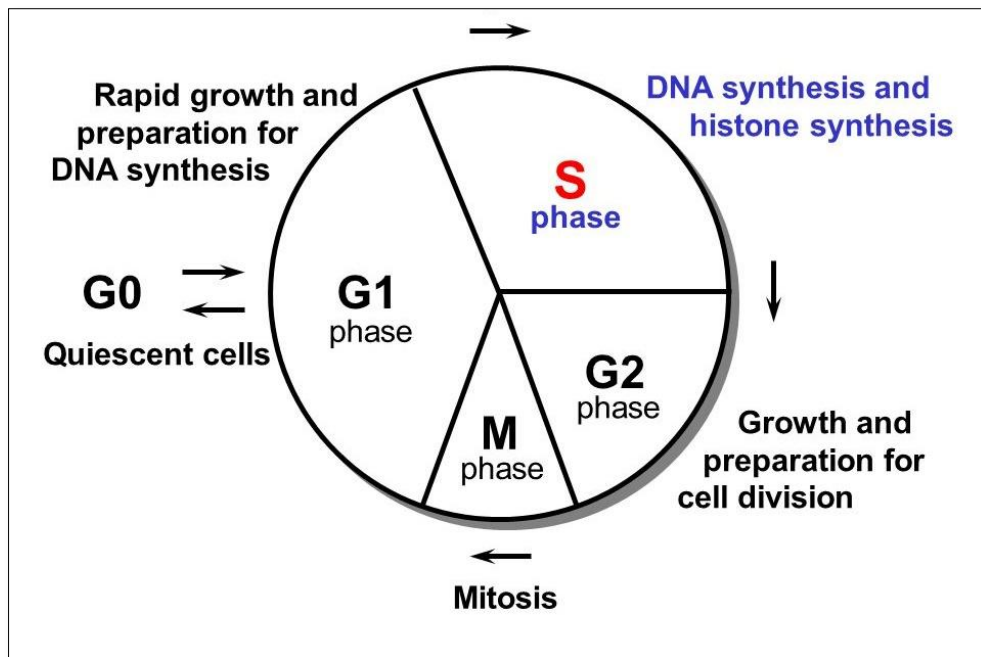


Figure 19 : Cycle cellulaire de mammifères. La phase G1 est la période de croissance et de préparation de la cellule à la phase S qui correspond à l'étape de duplication du matériel génétique. La phase G2 est la période de croissance avant l'entrée en mitose. La mitose correspond à la répartition du contenu cellulaire dupliqué entre deux cellules filles. La phase G0 ou phase de quiescence permet la différenciation cellulaire. (http://images.slideplayer.com/3/780261/slides/slide_24.jpg).

IV.2. Régulation du cycle cellulaire

Le contrôle du cycle cellulaire est un mécanisme important pour la physiologie des organismes. Le cycle cellulaire est un processus très complexe qui nécessite l'action de plusieurs acteurs pour réguler les différentes phases et contrôler la progression ordonnée du cycle. La vérification du bon déroulement du cycle cellulaire est exercée au niveau de

nombreux points de contrôle régis par une activité importante des protéines kinases appelées Cdks (cyclin-dependent kinases).

IV.2.1. Les protéines kinases dépendantes des cyclines (Cdks)

Les protéines Cdks sont des acteurs majeurs de la progression du cycle cellulaire. Ce sont des sérine/thréonine kinases dont l'activité catalytique dépend de leur association à une sous-unité régulatrice appelé « cycline ». La régulation des Cdks fait également intervenir des protéines inhibitrices ou CKIs (cyclin-dependent kinases inhibitors) qui ont la capacité de se fixer aux Cdks et d'inhiber leur action. L'action de ces différents acteurs est coordonnée par des mécanismes de phosphorylation qui permettent d'activer ou d'inhiber des voies de signalisation (Lim and Kaldis, 2013; Malumbres, 2014). D'après les données récentes, il existe chez l'homme une vingtaine de Cdks et une trentaine de cyclines (Cao et al., 2014). Les principaux complexes cycline/Cdk qui interviennent dans les différentes phases du cycle cellulaire des mammifères sont : cycline D/Cdk4-6 ; cycline E/Cdk2, cycline A/Cdk2 et cycline B/Cdk1. La régulation ainsi que le rôle de chaque complexe sont résumés dans la **figure 20**.

Le cycle cellulaire est enclenché en présence de facteurs de croissance (GF) et nécessite une rigidité suffisante de la matrice extracellulaire (ECM) qui permet la fixation des cellules au support. Les facteurs de croissance permettent l'activation des voies de signalisation qui conduisent à la synthèse de la protéine AP1 (activating protein-1) (Karin, 1995). Cette protéine est un facteur de transcription qui favorise la synthèse de la cycline D (Shaulian and Karin, 2002). La rigidité de la matrice extracellulaire quant à elle favorise l'activation des kinases d'adhésion focale (FAK) qui conduisent à la synthèse de la cycline D. Une forte densité cellulaire conduit à une inhibition de contact permettant l'activation de la voie de signalisation Hippo/YAP qui entrave le cycle cellulaire (Gérard and Goldbeter, 2014).

Les protéines E2F représentent une famille de facteurs de transcription qui favorise la progression du cycle cellulaire tandis que la protéine suppresseur de tumeur pRB (retinoblastoma protein) entrave cette progression. Ce sont les complexes, cycline D/Cdk4-6 et cycline E/Cdk2 qui régulent l'activité de la protéine RB par phosphorylation (Weinberg, 1995). L'inhibition de la protéine RB permet l'activation des protéines E2F qui à leur tour induisent la synthèse des cyclines D, E et A favorisant ainsi la progression du cycle cellulaire en phase G1 puis la transition G1/S (Henley and Dick, 2012; Müller and Helin, 2000).

Le complexe cycline A/Cdk2 assure la progression du cycle en phase S et la transition S/G2. Les protéines p21^{waf1/cip1} et p27^{kip1} sont des CKIs (cyclin-dependent kinases inhibitors) qui empêchent la progression du cycle cellulaire (Sherr and Roberts, 1995). L'action de ces protéines est régulée par la protéine Skp2 (S-phase kinase-associated protein 2), une enzyme qui favorise la dégradation des protéines p21 et p27, permettant ainsi la progression du cycle cellulaire en phase S (Bornstein et al., 2003; Nakayama et al., 2000).

La progression en G2 jusqu'à la transition G2/M est contrôlée par le complexe cycline B/Cdk1. Ce complexe est régulé par des mécanismes de phosphorylation et de déphosphorylation de la protéine kinase Cdk1 qui permettent de maintenir le complexe sous forme active ou inactive. Les protéines Wee1 et Myt1 sont des kinases qui phosphorylent la protéine Cdk1 au niveau des résidus tyrosine 15 et thréonine 14 et maintiennent le complexe cycline B/Cdk1 sous forme inactive (Liu et al., 1997; Parker and Piwnicka-Worms, 1992). Par contre, les protéines Cdc25 (Cdc25B et Cdc25C) sont des phosphatases qui dé-phosphorylent la protéine Cdk1 et maintiennent le complexe cycline B/Cdk1 sous forme active pour assurer la transition G2/M. L'isoforme Cdc25A agit sur la Cdk2 et assure la transition G1/S (Sur and Agrawal, 2016).

Le complexe APC (anaphase-promoting complex) est une ubiquitine ligase qui permet la dégradation des cyclines mais aussi la séparation des cellules au cours de la mitose (Peters,

2006). En début de mitose, la protéine kinase Cdk1 active le complexe APC par phosphorylation et favorise sa liaison à la protéine Cdc20. Le complexe APC^{Cdc20} coordonne la progression en mitose en favorisant la dégradation des cyclines A et B, qui conduisent à la réduction des complexes cycline A/Cdk2 et cycline B/Cdk1 (Kraft et al., 2003; Yu, 2007). En fin de mitose, la baisse d'activité des protéines kinases Cdk1 conduit à la séparation du complexe APC^{Cdc20} et favorise la liaison du complexe APC à la protéine Cdh1 (Cadherin-1). Le complexe APC^{Cdh1} favorise la dégradation de la cycline B et l'inactivation de la protéine Cdk1 par phosphorylation permet l'accumulation de la protéine Wee1 pour que les cellules sortent de mitose et entament un nouveau cycle. Ce complexe permet aussi l'activation de la protéine Skp2 qui favorise la dégradation de la cycline E afin de retarder l'entrée des cellules en phase S (Hu et al., 2011).

De toutes les Cdks, la Cdk1 est considérée comme la protéine kinase majeure du cycle cellulaire, car elle est essentielle et peut assurer la progression du cycle cellulaire en l'absence des kinases Cdk4-6 et Cdk2 (Santamaría et al., 2007).

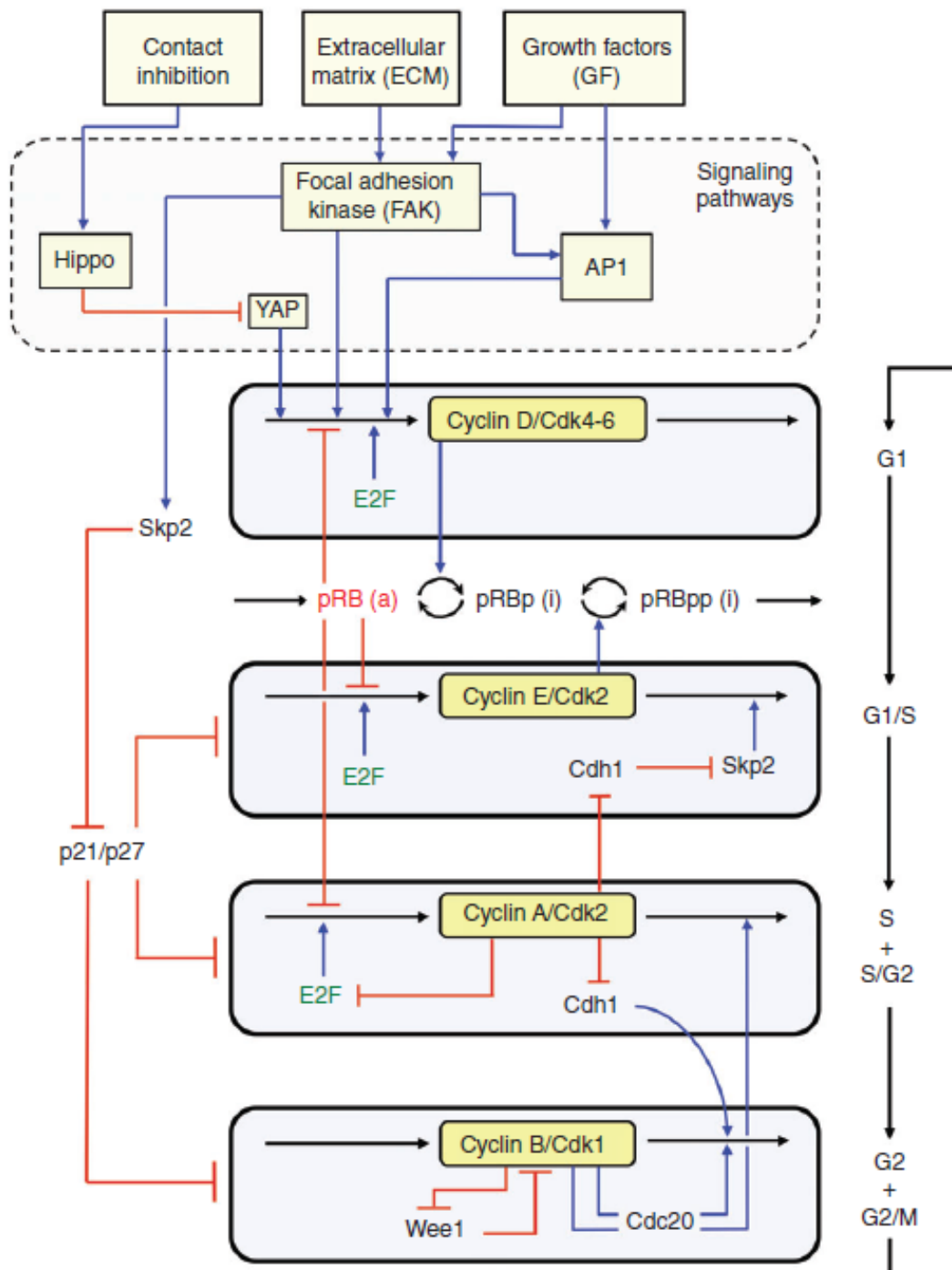


Figure 20 : Modélisation de la régulation du cycle cellulaire par les Cdk. Les complexes majeurs de cycline/Cdks qui contrôlent la succession des différentes phases du cycle cellulaire sont surlignés en jaune. Les complexes, cycline D/Cdk4-6 et cyclin E/Cdk2 contrôlent respectivement la progression du cycle cellulaire en phase G1 et la transition G1/S via l'inhibition de pRB par phosphorylation. Le complexe cycline A/Cdk2 contrôle la progression en phase S et à la transition S/G2 et le complexe cycline B/Cdk1 agit sur la progression en phase G2 et à la transition G2/M. L'action des protéines inhibitrices est représentée par des traits rouges et celle des protéines inductrices par des flèches bleues (Gérard and Goldbeter, 2016).

IV.2.2. Les points de contrôle

Au cours du cycle cellulaire, il existe différents points de contrôle, où des mécanismes de vérifications et de réparations sont effectués afin de garantir la bonne progression du cycle cellulaire (Barnum and O'Connell, 2014; Hartwell and Weinert, 1989). En cas d'erreurs, il y a un arrêt du cycle cellulaire au niveau de ces points de contrôle afin d'effectuer d'éventuelles réparations avant de reprendre la progression du cycle cellulaire. Toutefois, si les dommages sont irréversibles, des voies de destruction de la cellule par apoptose sont activées (Friedberg, 2003; Zhou and Elledge, 2000). Il existe plusieurs points de contrôle mais nous n'en citerons que quelques-uns.

L'entrée dans le cycle cellulaire est contrôlée par des facteurs mitogènes extracellulaires (Duronio and Xiong, 2013). A la fin de la phase G1, il existe un point de contrôle appelé « point de restriction » qui vérifie la taille de la cellule et la qualité de l'ADN avant l'entrée en phase S. Ce point de contrôle représente un point de non-retour à partir duquel la progression dans le cycle cellulaire est irréversible et ne dépend plus des facteurs mitogènes (Blagosklonny and Pardee, 2002; Pardee, 1974). En fin de phase G2, il existe un deuxième point de contrôle qui vérifie si l'ADN a été correctement dupliqué, si la taille de la cellule est conforme et si les éléments nécessaires à la mitose sont disponibles (Stark and Taylor, 2006). Au cours de la mitose, il existe un autre point de contrôle appelé « point de contrôle du fuseau mitotique » qui vérifie l'attachement des chromosomes sur le fuseau mitotique et leur alignement sur la plaque équatoriale afin de permettre une distribution équitable du matériel génétique dans les cellules filles (Gorbsky, 2015).

Les dommages à l'ADN peuvent être causés par des facteurs endogènes comme des erreurs de réplication, des coupures de brins dues à l'activité des ADN topoisomérases, ou une altération de l'appariement des bases dues à des attaques par les ROS (reactive oxygen species) issus de la respiration ou du métabolisme cellulaire. L'ADN peut aussi être endommagé par des

facteurs exogènes comme les UV (ultra violet), le rayonnement ionisant, les agents intercalants de l'ADN, les produits chimiques mutagènes, les virus ou des toxines (Jackson and Bartek, 2009). Ces dommages à l'ADN induisent l'activation des protéines kinases ATM (ataxia telangiectasia mutated) et ATR (ataxia telangiectasia and Rad3-related), deux protéines senseurs qui vont induire un arrêt du cycle cellulaire et activer des voies de réparation de l'ADN. Lorsque les protéines senseurs ATM et ATR sont activées, elles phosphorylent et activent les protéines transductrices Chk2 et Chk1 (checkpoint kinase) qui à leur tour phosphorylent et inactivent les protéines effectrices CDC25. Il en résulte un arrêt temporaire du cycle cellulaire au niveau des phases de transition G1/S et G2/M (Awasthi et al., 2015; Li et al., 2016; Maréchal and Zou, 2013). Si les dommages ne sont pas réparés à temps, la protéine ATM phosphoryle et stabilise la protéine suppresseur de tumeur p53 pour maintenir l'arrêt du cycle cellulaire. La protéine p53 est un facteur de transcription activé en réponse à de nombreux stress et qui est responsable de la transcription de nombreux gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire (comme les inhibiteurs de Cdks p21^{waf1/cip1} et p27^{kip1}), la sénescence ou l'apoptose permettant ainsi de maintenir la stabilité génétique des cellules (Banin et al., 1998; Chen, 2016; Riley et al., 2008).

IV.3. Cycle cellulaire chez *Acanthamoeba*

Les amibes du genre *Acanthamoeba*, lorsqu'elles sont sous forme trophozoïte, se multiplient de façon asexuée par mitose. Le cycle cellulaire d'*Acanthamoeba* a été très peu étudié. Des études portant sur le cycle cellulaire chez *Acanthamoeba* ont révélé une quasi absence de la phase G1 et une phase S relativement courte (environ 2% de la durée totale du cycle). Les cellules en sortie de la phase M entameraient directement un nouveau cycle par la duplication de l'ADN (phase S) (Band and Mohrlök, 1973; Stohr et al., 1987). La grande majorité du

cycle cellulaire, environ 90 % de la durée totale, serait représenté par la phase G2 et les 10 % restants seraient partagés entre la phase S et la phase M (Stohr et al., 1987). Cette répartition du cycle cellulaire n'est pas propre au genre *Acanthamoeba*. Le cycle cellulaire de l'amibe sociale *Dictyostelium discoideum* est caractérisé par l'absence de phase G1, une phase S très rapide et d'une longue phase G2 représentant plus de 90% de la durée totale du cycle cellulaire (Weijer et al., 1984). La multiplication d'*Acanthamoeba* est entravée par des conditions environnementales qui favoriseraient l'enkystement. Il semblerait que ce processus de différenciation survient à une phase précise du cycle cellulaire, probablement en G2 (Byers et al., 1991; Stohr et al., 1987). Les mécanismes impliqués dans le processus d'enkystement au cours de cette phase précise du cycle cellulaire ont été peu étudiés. Il existerait une position en fin de phase G2, appelé point de compétence, à partir duquel les cellules peuvent s'enkyster en réponse au stress. Il a été suggéré que ce point de compétence serait absent dans les cellules en croissance car une augmentation de l'activité de la protéine kinase Cdc2 (homologue à la protéine kinase Cdk1 et Cdc28) a été observé plus rapidement, suggérant une entrée précoce des cellules en mitose avant d'atteindre ce point de compétence (Jantzen et al., 1988, 1990).

IV.4. Modulation du cycle cellulaire par les microorganismes

En plus des virus, des effecteurs sécrétés par des bactéries sont capables de moduler le cycle cellulaire des cellules eucaryotes afin de permettre leur propre réplication. Le terme « cyclomoduline » décrit une famille grandissante de toxines et effecteurs bactériens, qui interfèrent avec le cycle cellulaire des eucaryotes (Nougayrède et al., 2005; Oswald et al., 2005). Ces cyclomodulines peuvent induire des cassures de l'ADN (génotoxines) ou détourner des voies de signalisations cellulaires de la cellule hôte. Les cyclomodulines peuvent être

classées en deux catégories : les cyclomodulines « inhibitrices », qui provoquent un arrêt du cycle cellulaire et les cyclomodulines « activatrices », qui induisent la prolifération cellulaire. Le mode d'action de quelques-unes d'entre elles est décrit ci-dessous.

IV.4.1. Cyclomodulines inhibitrices

La toxine CDT (cytolethal distending toxins) est une génotoxine hétérotrimérique produite par plusieurs bactéries Gram négatif (Jinadasa et al., 2011). Elle est composée de trois sous unités. Les sous unités CdtA et CdtC permettent la translocation de la sous-unité CdtB, qui *via* son activité nucléase, induit des lésions de l'ADN de l'hôte (Lara-Tejero and Galán, 2001; Shenker et al., 2000). Ces lésions entraînent l'activation de la protéine senseur ATM (Cortes-Bratti et al., 2001). Il s'ensuit des phosphorylations en cascade de Chk2 puis de Cdc25C qui se retrouve bloquée dans le cytoplasme et par conséquent incapable d'activer le complexe Cyclin B/Cdk1 (Alby et al., 2001; Escalas et al., 2000). Il en résulte un arrêt du cycle cellulaire en G2/M (Comayras et al., 1997; Pérès et al., 1997; Whitehouse et al., 1998).

La colibactine et la toxine typhoïde sont deux autres génotoxines produites respectivement par les bactéries *Escherichia coli* et *Salmonella enterica* sérotype Typhi. Tout comme la toxine CDT, ces deux toxines induisent un arrêt du cycle cellulaire en G2/M à travers l'activation de la voie de contrôle de dommage à l'ADN. La toxine typhoïde est un hétérotrimère composé des sous unités PltA et PltB qui permettent la translocation de la sous-unité CdtB (Spanò et al., 2008). La colibactine, quant à elle, est un polycétide produit par une machinerie de synthèse codé par un îlot génomique appelé « pks » (Nougayrede et al., 2006).

Les ROS (reactive oxygen species) produites par *Enterococcus faecalis* causent un arrêt du cycle cellulaire en G2/M *via* l'activation du facteur de transcription p53. Ces phénotypes sont suivis d'une diminution du niveau de l'expression des gènes impliqués dans les mécanismes

de réparation de l'ADN altérant ainsi la capacité des cellules à réparer ces dommages (Strickertsson et al., 2013; Wang et al., 2008). L'effecteur invasion plasmid anitigen B (IpaB), sécrété par *Shigella flexneri* via le T3SS (type III secretion system), interagit avec la protéine Mad2L2. Cette protéine intervient au niveau du point de contrôle du fuseau mitotique et prévient l'anaphase en empêchant l'activation du complexe APC (anaphase-promoting complex) par Cdh1 (Cdc20 and Cdc20 homolog 1). En interagissant avec Mad2L2, IpaB empêche l'inhibition du complexe APC^{Cdh1} entraînant ainsi la dégradation non programmée de la Cyclin B1 et par conséquent un arrêt du cycle cellulaire en G2/M (Iwai et al., 2007).

Les cytotoxines subtilase (SubAB) et vacuolante (VacA), produites respectivement par *Escherichia coli* et *Helicobacter pylori*, induisent un arrêt du cycle cellulaire en G1/S et l'apoptose des cellules hôtes. A l'intérieur de la cellule, SubAB clive le régulateur BiP, impliqué dans le maintien de l'intégrité du réticulum endoplasmique au cours de la translocation des protéines, entraînant ainsi une diminution de synthèse des protéines dont la Cycline D1 (Morinaga et al., 2008; Yahiro et al., 2012). VacA induit l'arrêt du cycle cellulaire en G1/S en favorisant la surexpression de la protéine p53 (Cho et al., 2003; Gebert et al., 2003). FIP (fusobacterial immunosuppressive protein), produite par *Fusobacterium nucleatum*, entrave la progression du cycle cellulaire en inhibant l'expression du facteur PCNA (proliferating cell nuclear antigen), nécessaire à la réplication et à la réparation de l'ADN. Les cellules se retrouvent ainsi bloquées en G1 et incapables d'entrer en phase S (Shenker and Datar, 1995). La mycolactone, polycétide sécrété par *Mycobacterium ulcerans*, induit un arrêt du cycle cellulaire en G0/G1 et l'apoptose des cellules hôtes (George et al., 1999, 2000).

La toxine Cif (cycle inhibiting factor) est un effecteur sécrété par le T3SS des bactéries Gram négatif le T3SS (Jubelin et al., 2009). A l'intérieur de la cellule hôte, Cif induit un effet cytopathique progressif de la cellule hôte caractérisé par : la formation d'une adhésion focale,

l'accumulation de fibres de stress, un grossissement du noyau causé par l'accumulation de l'ADN synthétisé résultant d'une inhibition de la mitose ainsi qu'une apoptose tardive (Marchès et al., 2003; Samba-Louaka et al., 2009). Cif est une désaminase qui modifie la protéine Nedd8 qui ne peut plus activer les CRLs (cullin-RING ubiquitin ligases). Les protéines CRLs ainsi inhibées ne peuvent plus assurer la dégradation par ubiquitination des protéines CKIs p21 et p27, entraînant ainsi un arrêt du cycle cellulaire en G1/S et en G2/M (Boh et al., 2011; Samba-Louaka et al., 2008). L'effecteur CopN (chlamydial outer protein N) est sécrété par *Chlamydomphila pneumonia* via le T3SS. L'arrêt du cycle cellulaire en G2/M induit par CopN est associé à une manipulation du cytosquelette de l'hôte. A l'intérieur de la cellule hôte, CopN se lie à la tubuline et la séquestre, empêchant ainsi sa polymérisation. Cette réorganisation du cytosquelette empêche la formation du fuseau mitotique nécessaire à la mitose (Archuleta et al., 2011; Huang et al., 2008).

IV.4.2. Cyclomodulines activatrices

Les toxines CNF (cytotoxic necrotizing factor) produites par *Escherichia coli* et *Yersinia pseudotuberculosis* et DNT (dermonecrotic toxin) sécrétée par *Bordetella* sp., stimulent l'assemblage de l'actine filamenteuse contenue dans les fibres de stress et l'adhésion focale (Horiguchi, 2001). Elles stimulent la synthèse de l'ADN de leurs hôtes, tout en inhibant la division cellulaire, créant ainsi des cellules multinucléées (Falzano et al., 2006; Giamboi-Miraglia et al., 2007; Horiguchi, 2001). A travers leur activité transglutaminase, CNF et DNT désaminent et activent les petites GTPases de la famille Rho (Horiguchi, 2001; Huelsenbeck et al., 2009). Ces GTPases sont impliquées dans la dynamique de l'actine au sein de la cellule, le développement cellulaire, la régulation du cycle cellulaire, l'adhésion cellulaire et

bien d'autres fonctions. CNF et DNT préviennent aussi l'apoptose en favorisant la surexpression des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Miraglia et al., 2007).

La toxine PMT (*Pasteurella multocida* toxin), produite par *Pasteurella multocida*, est un agent mitogène de plusieurs types cellulaires. Au sein de la cellule hôte, il stimule des voies de transduction des signaux et induit la formation des fibres de stress et l'adhésion focale (Lacerda et al., 1996; Lax and Grigoriadis, 2001; Rozengurt et al., 1990). PMT induit les effets précités *via* l'activation de la GTPase RhoA (Blocker et al., 2006; Harmey et al., 2004; Lax et al., 2004; Vogt et al., 2003). Cette activation nécessite la participation des protéines G (Gαq/11 et G12/13) impliquées dans la transduction du signal (Buhl et al., 1995; Orth et al., 2005; Vogt et al., 2003). Associée à sa fonction mitogène, PMT prévient l'apoptose en activant les facteurs de transcription STATs (Signal Transducers and Activators of Transcription), impliqués dans les voies de signalisations anti-apoptotiques, et en inhibant l'activité des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Orth et al., 2007; Preuß et al., 2010).

L'effecteur CagA (cytotoxin-associated antigen A), sécrété par *Helicobacter pylori* *via* le T4SS, induit une rapide prolifération cellulaire et l'apoptose des cellules hôtes (Mine et al., 2000; Moss et al., 2001; Peek et al., 1999; Saito et al., 2005). Cette prolifération cellulaire passe par l'activation la voie de signalisation MAPK (mitogen-activated protein kinases) par CagA, augmentant ainsi la transcription de la cycline D1 (Hirata et al., 2001). CagA induit des lésions de l'ADN au sein de la cellule hôte qui activent la voie de contrôle des dommages et de réparation de l'ADN. Ces dommages à l'ADN sont continuellement réparés au cours de l'infection par *Helicobacter pylori* et l'apoptose est entravée par l'inhibition de p53. A travers ces mécanismes, CagA permet la progression du cycle cellulaire avec de potentielles mutations qui induiraient une instabilité génétique responsable du cancer gastrique (Toller et al., 2011; Wei et al., 2012).

Tableau 1: cyclomodulines connues d'origine bactérienne.

Cyclomodulines	Bactéries	Action sur le cycle cellulaire	Références
Inhibitrices			
CDT	Gram négatifs	Induisent des dommages à l'ADN entraînant l'activation des voies de contrôle de dommage à l'ADN. Il en résulte un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M.	(Comayras et al., 1997; Nougayrède et al., 2006; Spanò et al., 2008)
Colibactine	<i>E. coli</i>		
Toxine typhoid	<i>S. enterica</i> Typhi		
ROS	<i>E. faecalis</i>	Induisent des dommages à l'ADN et activent le facteur de transcription p53, induisant ainsi un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M.	(Wang et al., 2008)
IpaB	<i>S. flexneri</i>	Interagit avec la protéine Mad2L2 et favorise la dégradation de la Cycline B1, provoquant un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M.	(Iwai et al., 2007)
SubAB	<i>E. coli</i>	Clive le régulateur BIP et entraîne une diminution de la synthèse des protéines y compris la Cycline D1. Il s'en suit un arrêt du cycle cellulaire en phase G1/S.	(Morinaga et al., 2008; Yahiro et al., 2012)
VacA	<i>H. pylori</i>	Favorise la surexpression de la protéine p53 et induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G1/S.	(Gebert et al., 2003)
FIP	<i>F. nucleatum</i>	Inhibe l'expression du facteur PCNA bloquant ainsi les cellules en phase G1.	(Shenker and Datar, 1995)
Mycolactone	<i>M. ulcerans</i>	Induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1.	(George et al., 1999)
CIF	Gram négatifs	Modifie la protéine Nedd8 empêchant ainsi la dégradation des protéines p21 et p27. Il en résulte un arrêt du cycle cellulaire en phase G1/S et G2/M.	(Boh et al., 2011; Samba-Louaka et al., 2008)
CopN	<i>C. pneumonia</i>	Se lie à la tubuline et empêche sa polymérisation. Il en résulte un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M.	(Huang et al., 2008)
Activatrices			
CNF	<i>E. coli</i> ,	Activent les petites GTPases de la famille Rho et stimulent la synthèse de l'ADN, la formation des fibres de stress et l'adhésion focale.	(Horiguchi, 2001)
DNT	<i>Y. pseudotuberculosis</i> <i>Bordetella</i> sp.		
PMT	<i>P. multocida</i>	Active la GTPase RhoA et stimule les voies de transduction des signaux et induit la formation des fibres de stress et l'adhésion focale	(Lacerda et al., 1996)
CagA	<i>H. pylori</i>	Active la voie de signalisation MAPK et augmente la transcription de la cycline D1.	(Hirata et al., 2001)

Contexte et Objectif de l'étude

Plusieurs bactéries ont acquis des résistances à la phagocytose qui leur permettent d'infecter les cellules eucaryotes, d'échapper aux mécanismes de défenses de leurs hôtes et même de s'y multiplier. Les amibes libres sont des cellules eucaryotes essentiellement retrouvées au sein des environnements humides. Ces amibes se nourrissent principalement de bactéries par phagocytose. Seulement, certaines bactéries ont acquis des résistances qui leur permettent d'échapper à la digestion et même de se multiplier au sein des amibes. C'est le cas de la bactérie pathogène *L. pneumophila*, responsable de la légionellose chez l'homme. A travers son système de sécrétion Dot/Icm, *L. pneumophila*, injecte plus de 300 effecteurs directement dans la cellule hôte. Ces effecteurs sont capables d'interagir avec les protéines de l'hôte, et de moduler diverses fonctions de la cellule comme l'expression génétique, la dynamique du cytosquelette, les processus d'autophagie et d'apoptose etc... Dans d'autres modèles eucaryotes, notamment dans les cellules de mammifères, l'impact des bactéries, précisément des toxines bactériennes sur le cycle cellulaire de leurs cellules hôtes a été très étudié. De nouvelles toxines, de nature très variée, et provenant d'une grande diversité bactérienne, sont continuellement décrites pour leur capacité à moduler le cycle cellulaire de leurs hôtes eucaryotes. Le terme « cyclomoduline » a été proposé pour décrire cette famille grandissante de toxines. Parmi toutes les fonctions modulées par *L. pneumophila*, aucune étude n'a rapporté l'impact de l'infection par cette bactérie sur la prolifération des amibes. Cette absence de données a conduit à définir l'objectif principal de cette thèse qui consistait à étudier l'effet de *L. pneumophila* sur la prolifération de son hôte *A. castellanii*. L'objectif secondaire était d'identifier les changements physiologiques qui pourraient être associés à la modulation de la prolifération de l'hôte. *A. castellanii* représentait un modèle de choix car cette amibe est très étudiée, notamment au sein de notre laboratoire dans l'interaction avec *L. pneumophila*, et son génome est entièrement séquencé.

Matériel et Méthodes

I. Microbiologie

I.1. Microorganismes

Les différentes souches d'amibes, de levures ou de bactéries utilisées dans cette étude sont référencées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 2: souches de microorganismes utilisés dans cette étude.

Souches	Références
<i>Acanthamoeba castellanii</i> Neff (ATCC 30010)	(Clarke et al., 2013)
<i>Acanthamoeba castellanii</i> (ATCC 30234)	
<i>Saccaromyces cerevisiae</i> Y10000	(Baker Brachmann et al., 1998)
<i>Saccaromyces cerevisiae</i> Y838	(Kovacech et al., 1996)
<i>Legionella pneumophila</i> Paris	Casalet <i>et al.</i> 2004
<i>Legionella pneumophila</i> Lens	Casalet <i>et al.</i> 2004
<i>Legionella pneumophila</i> Paris G_EP10	Mengue <i>et al.</i> 2016
<i>Legionella pneumophila</i> Paris R_EP10	Mengue <i>et al.</i> 2016
<i>Legionella pneumophila</i> Paris Δ dotA	Gomez-Valero <i>et al.</i> 2014
<i>Escherichia coli</i> K12 (ATCC 10798)	

I.2. Culture des microorganismes

I.2.1. Culture d'*Acanthamoeba castellanii*

Les deux souches d'amibes *A. castellanii* ATCC 30010 et ATCC 30234, récupérées à partir du stock à -80°C ont été pré-cultivées sur gélose non nutritive constituée. Cette gélose a été faite à partir du tampon PAS (Page's Amoeba Saline) : 4 mM MgSO_4 , 0,4 M CaCl_2 , 0,1% citrate de sodium, 2,5 mM NaH_2PO_3 , 2,5 mM K_2HPO_3 et 0,05 mM $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ à pH 6,5 et 1,5% agar. La gélose est ensuite recouverte avec *E. coli* à 10^9 bactéries/mL de sorte à former un tapis bactérien à la surface de la gélose. Les amibes sont déposées au centre de la gélose puis incubées à 25°C . Le déplacement des amibes à la surface de la gélose se matérialise par un front migratoire visible à l'œil nu.

En milieu liquide, les amibes ont été cultivées à 30°C dans une flasque de 25 ou 75 cm³ avec 10 mL ou 30 mL de PYG (Peptone Yeast Glucose) : 2% proteose peptone, 0,1% extrait de levure, 0,1 M glucose, 4 mM MgSO_4 , 0,4 mM CaCl_2 , 0,1% citrate de sodium déshydraté, 0,05 mM $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2,5 mM NaH_2PO_3 et 2,5 mM K_2HPO_3 à pH 6,5.

I.2.2. Culture de *Saccaromyces cerevisiae*

Les différentes souches de *Saccaromyces cerevisiae* ont été cultivées sur milieu minimal YNB (Yeast Nitrogen Base) avec 0,5% sulfate d'ammonium et 2% glucose supplémenté avec les acides aminés et bases appropriés, ou avec de milieu YPGal complet (1% extrait de levure ; 1% peptone et 2% galactose). Les cellules ont ensuite été incubées à 28°C .

I.2.3. Culture de *Legionella pneumophila*

Les différentes souches de *L. pneumophila* ont été cultivées sur boîte de Pétri avec du BCYE (Buffered Charcoal Yeast Extract) : 1% ACES (N-(2-Acetamido)-2-aminoethanesulfonic acid), 1% extrait de levure, 0.2% charbon actif, 1.5% agar, 0.025% pyrophosphate de fer (III), 0.04% L-cystéine, pH 6,9. Les boîtes ont été incubées pendant 3 jours à 37°C.

La culture en milieu liquide a été faite avec du BYE (Buffered Yeast Extract) : 1% ACES, 1% extrait de levure, 0,2% charbon actif, 0,25% pyrophosphate de fer (III), 0,04% L-cystéine et pH 6,9. En partant d'une densité optique à 600 nm (DO₆₀₀) de 0,1, les bactéries ont été incubées à 37°C sous agitation (160 rpm) jusqu'à atteindre une phase stationnaire (DO₆₀₀ supérieure à 2,3).

Concernant les spécificités nutritives : pour la souche *L. pneumophila* Paris, 0,1% alpha-cétoglutarate a été rajouté au milieu. Pour les souches *L. pneumophila* Paris G_EP10 et *L. pneumophila* Paris R_EP10, 0,1% alpha-cétoglutarate additionné de 5 µg/mL chloramphenicol ont été rajouté au milieu. Pour *L. pneumophila* Paris $\Delta dotA$, 0,1% alpha-cétoglutarate additionné de 15 µg/mL kanamycine ont été rajoutés au milieu.

I.2.4. Culture d'*Escherichia coli*

La bactérie *Escherichia coli* K12 a été cultivée sur boîte de Pétri avec du LB (Lysogeny Broth) agar (1% tryptone; 1% NaCl 10 g/L, 0,5% extrait de levure et 1,5% agar). Les boîtes ont été incubées pendant 24 heures à 37°C. Les bactéries isolées sur milieu gélosé ont ensuite été cultivés en milieu liquide LB sous agitation (160 rpm) à 37°C.

I.2.5. Co-culture amibes-bactéries

Les amibes ont été prélevées à partir d'une culture vieille de 3 jours puisensemencées avec du tampon PAS dans des plaques de 6 ou 24 puits à la concentration respectives de 1×10^4 cellules/mL. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 2 heures environ à 30°C pour permettre une adhésion au fond du puits. Le PAS a alors été retiré des puits et a été remplacé par du PAS contenant des bactéries en phase stationnaire (DO_{600nm} supérieure à 2,3). Les bactéries ont été rajoutées à différentes multiplicité d'infection, MOI (1, 5, 10 et 20). Pour synchroniser l'infection, les plaques ont été centrifugées (500 g pendant 10 min à température ambiante) et les co-cultures ont été incubées pendant 2 heures à 30°C. Après l'infection, les amibes ont été rincées avec du tampon PAS et incubées avec du milieu de culture PYG complémenté avec 20 µg/mL de gentamicine pour empêcher la croissance des bactéries extracellulaires. L'ajout du milieu de culture correspond au temps zéro de la cinétique de croissance.

Pour déterminer le pourcentage d'association d'*A. castellanii* ATCC 30010 à *L. pneumophila*, les cellules ont été incubées pendant 30 minutes dans le milieu de culture PYG après l'infection. Les amibes ont ensuite été détachées puis centrifugées (500 g pendant 5 minutes à température ambiante). Les amibes ont été rincées avec du PBS (Phosphate-Buffered Saline) puis fixées dans 1 mL de 4% paraformaldehyde pendant 15 minutes à température ambiante. Les amibes ont ensuite été rincées 2 fois puis centrifugées. Le culot cellulaire a été re-suspendu dans 40 µl de CitiFluor® AF1 (Citifluor) et 5 µL de cette suspension ont été déposés sur lame puis recouvert d'une lamelle. Les cellules ont été observées au microscope à épifluorescence (Olympus BX41) à l'objectif x 100 (Olympus PlanC N) avec de l'huile à immersion (Nikon).

I.2.6. Enkystement des amibes

L'enkystement d'*A. castellanii* a été induit en incubant les cellules dans du tampon d'enkystement : 0,1 M KCl, 8 mM MgSO₄, 0,4 M CaCl₂, 20 mM Tris (2-amino-2hydroxymethyl-1,3-propanediol), 1 mM NaHCO₃ à pH 8,8, puis incubé à 30°C. Au bout de 16h d'incubation, on obtient des kystes matures.

I.3. Dénombrement des microorganismes

I.3.1. Dénombrement des bactéries

Les bactéries ont été dénombrées par mesure de la densité optique par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 600_{nm} (DO_{600nm}). Le nombre de bactéries a été déterminé par correspondance, DO_{600nm} de 1 correspond à 10⁹ bactéries/mL.

I.3.2. Dénombrement des amibes

Le dénombrement des amibes s'est fait en utilisant des cellules de numération en plastique Fast-Read 102[®] (Biosigma). Une lame en plastique Fast-Read contient 10 cellules de numération et chaque cellule compte 10 grands carrés (eux-mêmes constitués de 16 petits carrés). Le volume total des cellules contenues dans les puits a été détaché au moyen d'une pipette par aspiration refoulement et celles contenues dans les flasques ont été détachées par tapotement de la flasque sur une table. A partir de la suspension cellulaire bien homogénéisée, 7 µL de cette dernière ont été déposés sur les cellules de dénombrement. Le volume de la cellule étant de 1 µL, la concentration est ramenée au nombre de cellules/mL en multipliant le nombre d'amibes comptées dans l'ensemble des 10 carrés contenus dans la cellule par 10³.

I.4. Cryoconservation des amibes

Les cellules d'*A. castellanii* ont été congelées à partir d'une flasque de culture de 3 jours suivant un protocole adapté de l'ATCC. Les cellules ont été détachées et centrifugées, puis re-suspendues dans 5 mL de PYG. Cette suspension cellulaire a été rajoutée à une solution de DMSO 15% préalablement préparée. Le tout a été mélangé par inversion des tubes puis distribué dans des cryotubes à raison de 1 mL par tube.

Pour préparer le DMSO à 15 %, 750 µL de DMSO ont été introduits dans un tube Falcon 15 mL puis incubés sur glace. Après solidification du DMSO, 4,25 mL de PYG ont été rajoutés et le mix a été mélangé par inversion du tube.

I.5. Mesure de la lyse cellulaire : quantification de la LDH

La lactate déshydrogénase (LDH) est une enzyme présente dans le cytoplasme des cellules et qui catalyse la conversion du lactate en pyruvate. Cette enzyme est libérée dans le milieu extracellulaire en cas de lyse cellulaire. La mesure de cette enzyme dans le milieu extracellulaire permet donc de déterminer quantitativement la lyse cellulaire. Dans cette étude, la LDH a été quantifiée en utilisant le kit Cytotoxicity Detection Kit Plus (LDH) (Roche). Il s'agit d'un test colorimétrique dont le principe repose sur une réaction en deux étapes. Au cours de la première étape, la LDH libérée catalyse la conversion du lactate en pyruvate, ce qui conduit à la réduction du NAD⁺ en NADH/H⁺. La deuxième étape consiste en l'ajout de la diaphorase (un catalyseur fourni avec le kit) qui permet le transfert des protons du NADH/H⁺ au sel de tétrazolium INT (fourni avec le kit) qui conduit à la réduction du tétrazolium en formazan (**figure 21**). Le formazan est un sel coloré dont l'absorbance est mesurée à 490 nm. Son intensité de coloration est directement proportionnelle à la quantité d'enzyme LDH relarguée au départ.

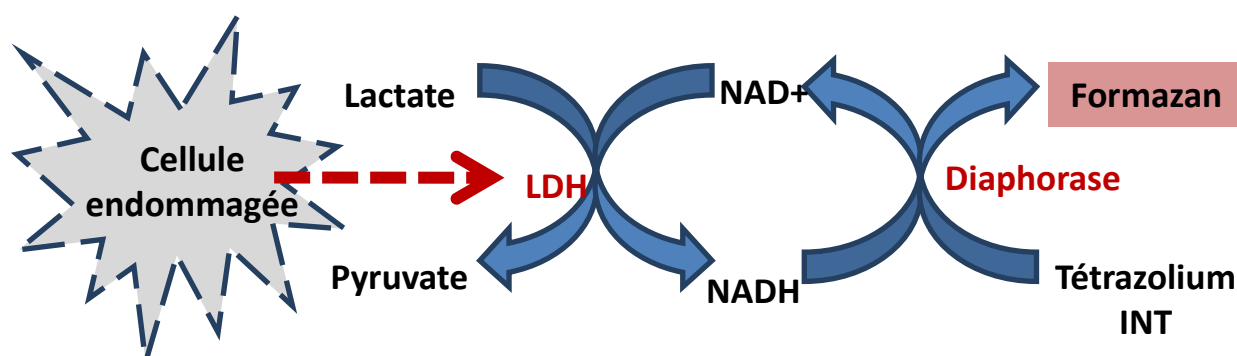


Figure 21 : Mécanisme de détection de la LDH libéré. Les cellules qui ont perdu leur intégrité membranaire libèrent la LDH dans le milieu extracellulaire. La Ldh libérée catalyse la conversion du lactate en pyruvate qui conduit à la réduction du NAD⁺ en NADH/H⁺. La diaphorase rajoutée dans le milieu transfère des protons du NADH/H⁺ au sel de tétrazolium et permet ainsi sa réduction en formazan. La quantité de formazan ainsi obtenu est mesuré par spectrophotométrie.

Les cellules d'*A. castellanii* 30010 ont été infectées par *L. pneumophila* Paris aux MOIs de 1, 5, 10 et 20. Pour chaque condition, la LDH a été mesurée directement à partir du surnageant de culture d'une part, mais aussi à partir du lysat des cellules totales d'autre part. Après le temps d'incubation voulu, 300 µL de surnageant de culture ont été prélevés à partir de chaque puits et centrifugés (500 g pendant 5 minutes à température ambiante). Pour la lyse totale (témoin positif), les cellules ont été détachées et introduites dans des tubes FastPrep de 2mL contenant 400 mg de billes de glace en verre 150-212 µM (Sigma). Aux cellules ont été rajoutés 5 µL de tampon de lyse (fourni avec le kit). Le mélange a été vortexé avant d'être passé au FastPrep vitesse 5.0 pendant 30 secondes (deux fois). Dans une plaque 96 puits, 100 µL de chaque condition (surnageant de culture ou cellules totales lysées) ont été déposés en triplicat dans les puits. Puis, 100 µL de réaction de mélange LDH Cytotoxicity (préparé uivant les recommandations du fabricant) ont été rajoutés. Le mélange a été incubé pendant 30 minutes à température ambiante avant de rajouter 100 µL de réaction stop (fourni avec le kit).

Les différences d'absorbances A492nm-A595nm des échantillons ont été directement mesurées au lecteur de microplaque Tecan A-5082 Sunrise Remote Microplate Reader (Autriche).

I.6. Analyses statistiques

Les résultats sont des moyennes des trois expériences indépendantes et les barres d'erreurs représentent l'erreur type de la moyenne (« ± SEM » pour standard error of the mean). Les résultats ont été analysés soit par la méthode Two-way RM ANOVA suivie d'un post-test Bonferroni au moyen du logiciel GraphPad Prism5, soit en utilisant le test unilatéral Mann-Whitney avec une signification statistique à $p \leq 0,05$.

II. Biologie Moléculaire

II.1. Extraction et purification de l'ARN

Pour chaque condition, 1×10^6 cellules/puits d'*A. castellanii* ont étéensemencées dans des plaques 6 puits. Les amibes ont été infectées à la MOI de 20 par *L. pneumophila* puis ont été détachées aux temps 2 h, 16 h et 24 h post-infection pour une extraction d'ARN.

L'ARN des amibes a été extrait à l'aide du kit d'extraction High Pure RNA Isolation Kit (Roche) en suivant les recommandations du fabricant avec quelques modifications. Brièvement, les cellules ont été détachées et centrifugées à 1000 g pendant 5 minutes à température ambiante. Le culot a été re-suspendu dans 200 µL de PBS additionné de 400 µL de tampon de lyse puis vortexé pendant 15 secondes. Une lyse mécanique a été réalisée en

plus de la lyse chimique afin d'optimiser l'étape de la lyse cellulaire. La lyse mécanique a été réalisée au FastPrep[®]-24 Instrument (MP) à la vitesse 5.0 pendant 30 secondes (2 fois) avec des billes de 150 à 212 μ M (Sigma). Le surnageant a ensuite été introduit dans le filtre puis centrifugé (8000 g pendant 15 secondes à température ambiante). L'ADN a été digéré en rajoutant 10 % DNase I (dilué avec le tampon DNase incubation buffer, fourni dans le kit) sur la membrane de la colonne et incubé pendant 15 minutes à température ambiante. L'ARN a été élué avec 50 μ L de tampon d'éluion (Elution buffer, fourni dans le kit)

Afin d'optimiser l'étape de purification de l'ARN pour éliminer des éventuels résidus d'ADN, une digestion supplémentaire de l'ADN a été réalisée. Pour cela, le kit de purification Turbo DNA-free[™] kit (Ambion[®]) a été utilisé suivant les recommandations du fabricant. Les extraits d'ARN purifiés ont été stockés à -80°C jusqu'à utilisation. La qualité des ARN a été contrôlée sur gel d'électrophorèse au multiNA (Microchip Electrophoresis system for DNA/RNA Analysis MCE, SHIMADZU).

II.2. Transcription inverse (RT)

Une transcription inverse a été réalisée sur les extraits d'ARN en utilisant le kit GoScript[™] Reverse Transcription System (Promega) et en suivant les recommandations du fabricant.

Les produits de la transcription inverse (ADNc) ont été purifiés au moyen du kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel) en respectant les recommandations du fabricant. Les transcrits purifiés ont été stockés à -20°C jusqu'à utilisation.

Les acides nucléiques (ARN et ADNc) ont été mesurés par spectrophotométrie au moyen du BioSpec-nano (Shimadzu). La mesure au BioSpec-nano renseigne sur la concentration en

acide nucléique mais aussi sur la pureté de la matrice *via* l'analyse du ratio des absorbances 260/280 nm et 260/230nm.

II.3. PCR quantitative (qPCR)

II.3.1. Principe

La PCR quantitative est une technique de PCR (polymerase chain reaction) qui permet de mesurer le nombre d'amplicons d'ADN contenus dans l'échantillon. Le principe de la technique repose sur la détection de la fluorescence émise par les produits PCR nouvellement formés. Plus il y aura de copies d'ADN cible dans l'échantillon, plus vite le seuil de détection de la fluorescence émise sera atteint car nécessitant moins de cycles d'amplification. La valeur de cycle correspondant au signal seuil de détection de la fluorescence est appelée Ct (Cycle threshold) ou Cp (Crossing point).

II.3.2. Amplification par qPCR

Les amorces utilisées dans cette étude sont référencées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 3: amorces utilisées dans cette étude.

Cible	amorces	Référence
Cycline 1b	5'AGACTGCCGCACCATAAC3' 5'ACCTCGACCAACCAATCC3'	XM_004334340.1
Cycline 2b	5'GCGATGAGATGGAGGTAG3' 5'CTGATCGTTCGGTGGATG3'	XM_004337582.1
CDC2b (cell division cycle protein 2b)	5'ATGCAAGCCAAACCCAGTC3' 5'GAATCGCTGGTTCTCGGTATC3'	XM_004353658.1
PKC24 (Protein Kinase C)	5'TCCTTTCCGGCTGAATTG3' 5'ATGCGTGTTGAGGGATTG3'	JQ253399.1
18S rDNA	5'TCCAATTTTCTGCCACCGAA3' 5'ATCATTACCCTAGTCCTCGCGC3'	Moon et al. 2009

Tous les ADNc ont été normalisés à 10 µg/mL avant de procéder à la réaction de qRT-PCR. Toutes les réactions de qPCR ont été effectuées en utilisant le kit LightCycler® FastStart DNA Master^{Plus} SYBR Green I kit (Roche) sur l'appareil LightCycler 1.5 capillaires (Roche). Le SYBR Green est une molécule pouvant se fixer à l'ADN double brin formant ainsi le complexe ADN double brin/SYBR Green qui émet une fluorescence à 520_{nm}.

Pour le mélange réactionnel, chaque tube contenait 9 μL de mix (2 μL de Sybr 5X ; 0,5 μL de chaque amorce à 10 μM et 6 μL d'eau) et 1 μL d'ADNc (ou 1 μL d'eau pour le control négatif).

L'amplification a été faite avec le programme suivant: 10 minutes à 95°C pour activer la Taq polymérase, 45 cycles d'amplification répartis en plusieurs étapes : 10 secondes à 95°C de dénaturation de l'ADNc, 10 secondes à 61°C pour l'hybridation des amorces et 10 secondes à 72°C pour l'élongation de la chaîne. Les courbes de fusion ont été construites en mode acquisition continue selon le programme 1 minute à 65°C pour l'extension de la chaîne et un refroidissement 30 secondes à 40°C.

II.3.3. Calcul du niveau d'expression des gènes

L'expression des gènes a été normalisée avec l'expression du gène de référence 18S de l'ARNr. Le niveau relatif de l'expression des gènes a été calculé avec la méthode du $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ décrite par Livak et Schmittgen (Livak and Schmittgen, 2001).

La première variation est $\Delta\text{Ct} = \text{Ct du gène d'intérêt} - \text{Ct du gène de référence (18S)}$.

La deuxième variation est $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct de la condition traitée} - \Delta\text{Ct de la condition contrôle}$.

II.4. Clonage de CDC2b d'*A. castellanii*

Cette manipulation a été réalisée par Willy Aucher (laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions EBI) et Mathieu Regnacq (laboratoire Signalisation et Transports Ioniques Membranaires STIM) de l'Université de Poitiers.

L'ADNc *CDC2b* d'*A. castellanii* (XM_004353658.1) a été amplifié par PCR à partir de l'ADNc total avec les enzymes de restriction BamHI et XbaI en utilisant les amorces ACA-cdc2b-5' (TTTTTTTTGGATCCTACACAATGCAAGCCAAACCCAGTCC) et ACA-cdc2b-3'-STOP (TTTTTTTTCTAGATTAGGGGTTACTTGGTCTTGTCC). L'amplicon de *CDC2b* a été inséré entre les sites BamHI et XbaI du plasmide d'expression pYES2-CT (Invitrogen) de *S.cerevisiae* donnant pWA-cdc2b-Ac. L'ADN pasmidique a été purifié avec le kit Nucleo Spin Plasmid kit (Macherey-Nagel).

La souche Y838 de *S.cerevisiae* a été transformée par la méthode Lithium Acetate décrite par Gietz et Woods (Gietz and Woods, 2006). Les transformants ont été sélectionnés à la température permissive de 28°C sur milieu YNB supplémenté des acides aminés et bases adéquates. Pour les essais de complémentation du phénotype *cdc28-4ts⁻*, les transformants ont été striés sur du milieu YPGal et incubés à 30°C, 34°C ou 37°C pendant 4 jours.

III. Microscopie

III.1. Microscopie en épifluorescence

La microscopie en épifluorescence est une technique de microscopie optique qui permet de visualiser des microorganismes ou des molécules tout en tirant profit du phénomène de fluorescence. La fluorescence décrit la particularité de certaines molécules à émettre de la lumière fluorescente (ou lumière d'émission) après avoir été excitées à une longueur d'onde incidente (ou lumière d'excitation).

Dans cette étude, Les cellules d'*A. castellanii* 30010 ont été infectées par *L. pneumophila* Paris G_EP10 (exprimant la protéine fluorescente verte en abrégé « GFP » pour green fluorescent protein en anglais). Les kystes marqués au calcofluor White Reagent Droppers et

la distribution des filaments d'actine marqués à la phalloïdine ont été observés au microscope à épifluorescence (Olympus BX41).

III.1.1. Marquage au calcofluor

Le calcofluor (4,4'-bis-[4-anilino-bis-diéthylamino-5-triazine-2-ylamino]-2,2'-stilbène-disulfonique) est un fluorochrome colorant qui permet de colorer les parois cellulaires afin de les délimiter. Le principe de la méthode repose sur la capacité de ce colorant à se lier aux polysaccharides β 1-3 et β 1-4 (cellulose et chitine par exemple) et de fournir une fluorescence après exposition dans l'ultraviolet. Dans cette étude, les kystes ont été révélés en utilisant le Calcofluor White Reagent Droppers (BD).

Après traitement voulu (culture en tampon d'enkystement ou infection des amibes par *L. pneumophila*), les cellules ont été détachées puis centrifugées (1000 g pendant 10 minutes à température ambiante). Le culot a été repris dans 50 μ L d'eau distillée. Sur une lame de verre, 4,5 μ L d'échantillon ont été déposés, additionnés de 0,5 μ L de calcofluor 10%. Le mélange a été incubé pendant 2 minutes à température ambiante pour le marquage de la cellulose puis observé au microscope.

III.1.2. Marquage à la phalloïdine

La phalloïdine est une toxine mortelle issue du champignon *Amanita phalloides* (plus connue sous le nom de « oronge verte »). C'est une molécule avec des propriétés fluorescentes et qui a la capacité de se lier à l'actine filamenteuse (actine-F). Elle permet ainsi de visualiser la distribution du réseau d'actine-F dans les cellules. Dans cette étude, le réseau d'actine-F a été

marqué en utilisant le Phalloidin CruzFluor™ 488 Conjugate (Santa Cruz Biotechnology) afin de mettre en évidence les pseudopodes.

Après l'infection, les amibes ont été incubées pendant 16 heures environ dans du milieu PYG complétement en gentamicine 20 µg/mL. Les cellules ont été détachées et centrifugées (500 g pendant 5 minutes à température ambiante). Le culot a été fixé dans 1 mL de paraformaldehyde à 4% (dans du PBS) pendant 15 minutes à température ambiante. Après la fixation, les cellules ont été rincées avec 1 mL de solution tampon (PBS 1X avec du BSA 1%) et centrifugées. Les cellules ont été perméabilisées avec du 1 mL de Triton-X100 à 1% (dans du PBS) pendant 5 minutes à température ambiante. Après une dernière étape de lavage et centrifugation, le culot a été repris dans 50 µL de solution de marquage de l'actine-F (Phalloidin 1X avec la solution tampon). Les cellules ont été incubées pendant 15 minutes à température ambiante puis observées au microscope.

III.2. Microscopie confocale

La microscopie confocale est une technique de microscopie optique qui permet de réaliser des images avec une grande résolution. Ces images (aussi appelées sections optiques) sont réalisées sur une faible profondeur de champ. A la différence du microscope à épifluorescence, où l'objet est directement visualisé par l'examineur, au microscope confocal, l'objet est visualisé après reconstruction tridimensionnelle de plusieurs séries d'images obtenues à partir de plusieurs sections optiques.

III.2.1. Marquage à L'EdU

L'étape de synthèse de l'ADN du cycle cellulaire d'*A. castellanii* 30010 a été mis en évidence en utilisant le kit Click-iT® EdU Imaging Kits (Invitrogen™). L'EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) est un nucléoside analogue de la thymidine qui est incorporé dans l'ADN cellulaire pendant la phase de synthèse de l'ADN. Sa détection est basée sur une réaction covalente entre un azide (Alexa Fluor® 488, fournit dans le kit) et un alcyne (groupement éthyne de l'EdU) et permet donc de mettre en évidence la phase de synthèse de l'ADN comme le montre le schéma ci-dessous.

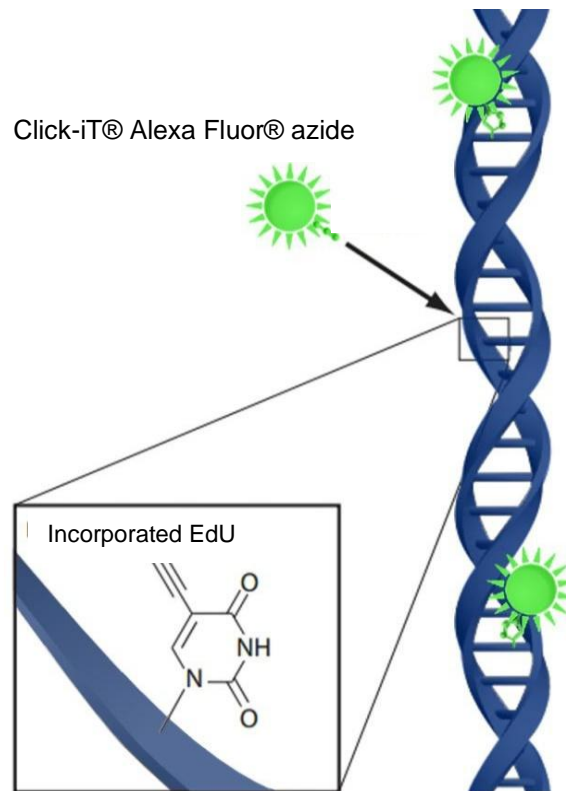


Figure 22 : Mécanisme de détection de l'EdU incorporé au sein de l'ADN.
(<http://www.abpbio.com>).

Après l'infection, les amibes ont été incubées pendant 4 heures dans du milieu PYG complétement en gentamicine 20 µg/mL et en EdU 40 µM. Les amibes ont ensuite été

détachées puis centrifugées (1000 g pendant 10 minutes à température ambiante) et fixées avec du paraformaldehyde à 3,7% pendant 15 minutes à température ambiante. Après l'étape de fixation, les amibes ont été rincées deux fois avec la BSA à 3% (bovine serum albumin, Sigma) dissoute dans du PBS. Après une étape de lyse avec du Triton[®] X-100 1% (Sigma) pendant 20 minutes à température ambiante, les amibes ont été rincées deux fois puis centrifugées à nouveau. Le culot a été repris dans 0,5 mL du cocktail réactionnel (Click-iT[®] reaction cocktail, préparé suivant les recommandations du fabricant) et laissé en incubation pendant 1 heure à température ambiante à l'abri de la lumière.

Pour marquer l'ADN, les cellules ont été rincées avec 1 mL de PBS 1X puis incubées dans 1 mL d'iodure TO-PRO[®]-3 (dilution 1:1000) pendant 1 heure à température ambiante à l'abri de la lumière. Les amibes ont été rincées une dernière fois avec du PBS puis re-suspendues dans 50 µL d'eau.

III.2.2. Analyse des échantillons

Les cellules d'*A. castellanii* ont été analysées au microscope confocal à balayage laser (FluoView-1000, Olympus) couplé à un microscope inversé IX-81(Olympus). Les images ont été obtenues avec l'objectif Olympus UPLSAPO 60X W NA: 1,2 et zoom x2 (800x800 pixels ; 0,13 µm/pixel). Les filtres d'excitation-émission étaient 488/500-530_{nm} pour le marquage de l'ADN à l'EdU, 543/555-625_{nm} pour les bactéries exprimant la protéine DsRed et 633/LP650_{nm} pour le marquage des noyaux au Topro-3.

Plusieurs signaux de fluorescence ont été acquis de façon séquentielle pour éviter les interférences entre les canaux de couleur. Pour l'acquisition 3D, le sectionnement optique de l'échantillon (séries Z) a été conduit par un axe Z moteur et la projection d'intensité maximale

a été générée. L'analyse des échantillons a été effectuée à la plateforme d'Imagerie de l'Université de Poitiers (ImageUp).

III.3. Vidéo-microscopie

Les cellules d'*A. castellanii* 30010 ont étéensemencées à 1.3×10^4 cellules/puits dans des micro-plaques 8 puits (μ -Slide 8 well IbiTreat microscopy chamber, ibidi) et infectées avec *L. pneumophila* Paris G_EP10 à la MOI de 20. Le volume final par puits était de 300 μ L.

Les images ont été acquises avec le disque de rotation confocal (Andor technology) monté sur un microscope inversé IX81 (Olympus) en utilisant une caméra rétro-éclairée Ixon+897 EMCCD (Andor). La vidéo a débuté après l'infection et s'est déroulée dans une chambre à 30 °C pour une durée totale de 17 heures environ. Une image a été prise toutes les 30 secondes avec l'objectif x40 (512x512 pixels, 0,33 μ m / pixel). L'analyse des échantillons a été effectuée à la plateforme d'Imagerie de l'Université de Poitiers (ImageUp).

III.4. Microscopie électronique à balayage

La microscopie électronique à balayage (en abrégé « MEB » ou « SEM » pour scanning electron microscopy) est une technique de microscopie électronique qui permet de produire à haute résolution, des images représentatives de la surface d'un échantillon. Le principe de la technique repose sur les interactions entre les électrons produits par la cathode du microscope et l'échantillon à analyser.

Environ 16 heures après infection, les cellules d'*A. castellanii* 30010 ont été détachées puis centrifugées (500 g pendant 10 minutes à température ambiante). Les protéines cellulaires ont

été fixées avec du glutaraldéhyde 2,5% (dilué dans du PBS 0,1M, pH 7,1) pendant 1 heure à température ambiante. Les cellules ont été rincées puis centrifugées à nouveau avant d'être déshydratées avec de l'acétone 70% pendant 5 minutes, puis 90% pendant 10 minutes et enfin 100% pendant 15 minutes.

Pour l'analyse, les cellules ont été déposées sur une lamelle de verre de 12 mm et séchées par traitement au hexamethyldisilazane (HMDS). La surface de la lamelle a été traitée par pulvérisation cathodique sous vide avec une couche électrique conductrice de 25 nm d'épaisseur d'alliage d'or-palladium (BALTEC Scd 005). Les images ont ensuite été enregistrées avec un microscope électronique à balayage (JEOL 5600Lv) à une tension de 20 kV. Les échantillons ont été analysés au MEB 5600Lv de l'institut Pprime (département PHYMAT, Physique des matériaux du Futuroscope).

III.5. Microscopie électronique à transmission

La microscopie électronique à transmission (en abrégé « MET » ou « TEM » pour transmission electron microscopy) est une technique de microscopie électronique qui permet de produire à haute résolution, des images représentatives des structures ou des organites cellulaires. Le principe de la méthode repose sur l'émission d'électrons sur un échantillon de très faible épaisseur (coupe fine) de façon à permettre la traversée des électrons au travers de l'échantillon. Les électrons ayant traversés l'échantillon sont alors détectés et leur signal est traduit en image contrastée.

Les cellules d'*A. castellanii* 30010 ont été préparées de la même manière que pour le MEB mais avec des étapes supplémentaires. Après l'étape de fixation des protéines au glutaraldéhyde 2,5%, les lipides ont aussi été fixés puis les cellules ont été rincées avant la

série de déshydratation à l'acétone. Les lipides ont été fixés avec 1 mL de tétra oxyde d'osmium (OsO₄) 1% (dilué dans du PBS 0,1M, pH 7,1). L'étape de déshydratation a tout de suite été suivie d'une étape d'imprégnation des cellules dans un mélange de résine (Epon812) et d'oxyde de propylène (1v/1v) pendant 2 heures à température ambiante. La résine a été retirée puis une résine d'époxy a été rajoutée et laissée en incubation pendant 24 heures à température ambiante. La dernière étape a été celle de l'inclusion. La résine de la veille a été retirée et les cellules ont été incubées à nouveau dans la résine pendant 24 heures à 60°C pour la polymérisation.

Des sections de 70 nm ont été coupées à l'aide d'un ultra-microtome UC6 (Leica). L'acétate d'uranyle (2% dans l'éthanol à 70%) et le citrate de plomb ont été utilisés comme agent de contraste pour la microscopie électronique (JEOL 1010) à une tension de 80 kV. Les images ont été enregistrées à l'aide de la caméra numérique Quemesa (Olympus) avec le logiciel Item. Les échantillons ont été analysés à la plateforme d'Imagerie de l'Université de Poitiers (ImageUp).

IV. Cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une technique qui permet de mesurer simultanément sur une suspension de cellules (ou de particules), les caractéristiques individuelles telles que la taille, la complexité ou l'intensité de fluorescence d'une cellule (ou d'une particule). Un tri de ces cellules (ou particules) en suspension peut aussi être réalisé afin de les séparer sur la base de leurs caractéristiques individuelles. Le cytomètre fournit alors de façon rapide, des données qualitatives et quantitatives sur une suspension d'échantillon à analyser. Le principe de la méthode repose sur la combinaison de trois systèmes : le système fluidique, le système optique et le système numérique. Le système fluidique permet d'introduire et d'aligner les cellules les unes à la suite des autres au centre du flux afin d'être excitées individuellement par le faisceau lumineux. Le système optique constitue la source lumineuse d'excitation de l'échantillon et de récupération des signaux émis. Le système numérique quant à lui permet de convertir les signaux optiques (ou signal analogique) en signaux électroniques (ou signal digital) et de les numériser afin de les analyser sur un ordinateur (**figure 23**).

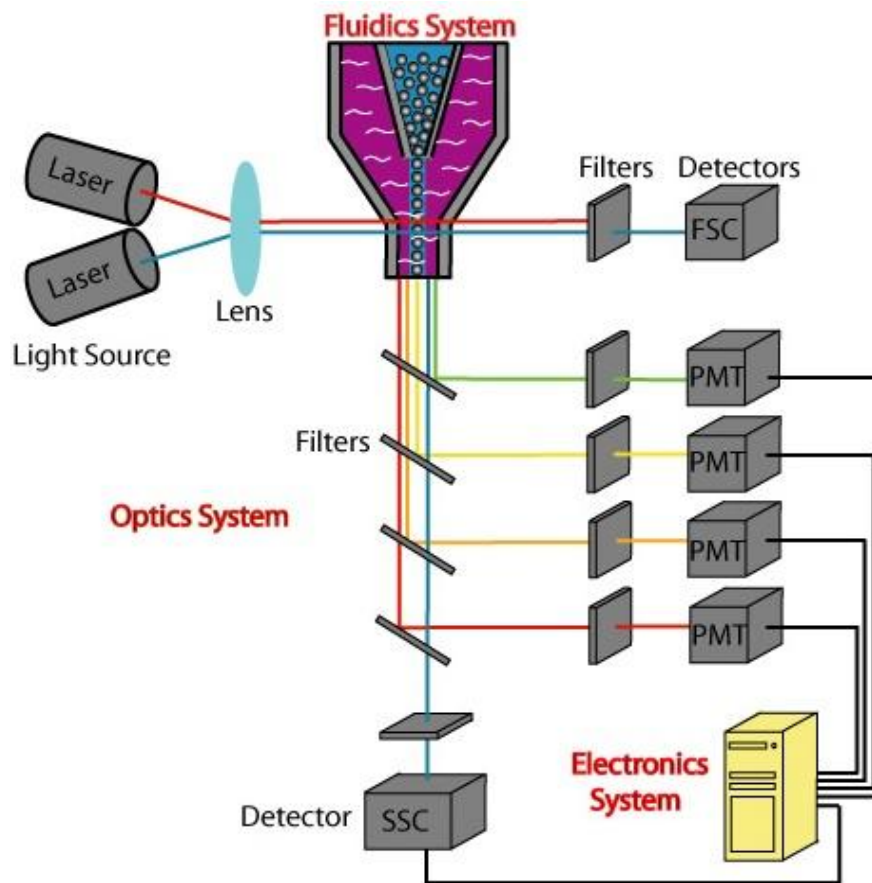


Figure 23 : Principe de la cytométrie en flux. Le système fluidique qui permet l’alignement des cellules, le système optique qui excite les cellules et récupère les signaux émis et le système numérique qui permet de convertir le signal analogique en signal digital sont représentés. (<http://www.selectscience.net>).

IV.1. Préparation des échantillons

Environ 16 heures après l’infection, les cellules ont été détachées toutes les 30 minutes pendant environ 9 heures, puis traitées pour l’analyse au cytomètre en flux. Le contenu en ADN a été analysé en se basant sur la méthode d’extraction des noyaux décrite par Stöhr et ses collaborateurs (Stöhr et *al.*, 1987) pour s’affranchir du biais de l’ADN mitochondrial. Brièvement, les cellules détachées ont été centrifugées (1700 g pendant 3 minutes à température ambiante). Le culot a été resuspendu dans 0,6 mL d’H₂O et 2 mL de tampon Ficoll à 2,5% (Sorbitol 0,5M, CaCl₂ 0,5mM et Tris-HCl 20mM pH 7,5). Après l’ajout de 0,2

mL Triton[®] X-100 10% ((Sigma) dilué dans du Ficoll 2,5%) à la suspension cellulaire, les cellules ont été incubées pendant 5 minutes à 30°C pour permettre la lyse d'un maximum de cellules. Au lysat a été rajouté 1 mL de tampon Ficoll 10% et les noyaux ont été centrifugés (1000 g pendant 20 minutes à température ambiante). Le culot a été re-suspendu dans 1 mL de glycérol 30% (dilué dans du Ficoll 2,5%) puis stocké à – 20°C jusqu'à utilisation.

Pour le marquage, les noyaux stockés à – 20°C ont été décongelés puis centrifugés (2500 g pendant 20 minutes à température ambiante). Le culot a été resuspendu dans 1 mL de solution de marquage (2vol de Tampon Ficoll 2,5% / 1vol H₂O, 15 µg/mL d'iodure de propidium et 10 µg/mL de RNase et laissé toute la nuit à 4°C à l'abri de la lumière.

IV.2. Analyse des échantillons

Les noyaux ont été analysés au cytomètre analyseur BD FACSVerse du service cytométrie de la plateforme d'Imagerie de l'Université de Poitiers (ImageUp). Les paramètres analysés ont été les FSC (Forward SCatter qui renseignent sur la taille), les SSC (Side SCatter qui renseignent sur la granulométrie) et l'intensité de fluorescence de l'iodure de propidium.

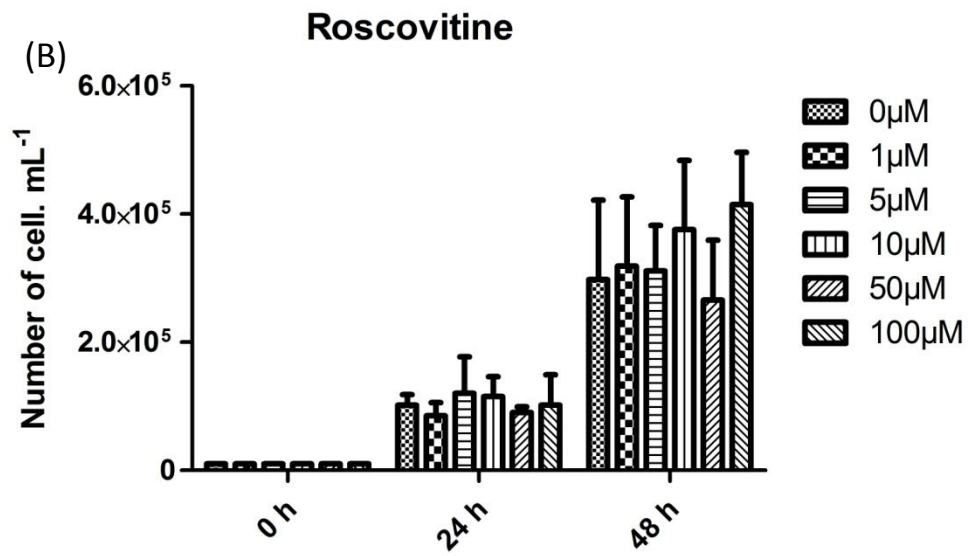
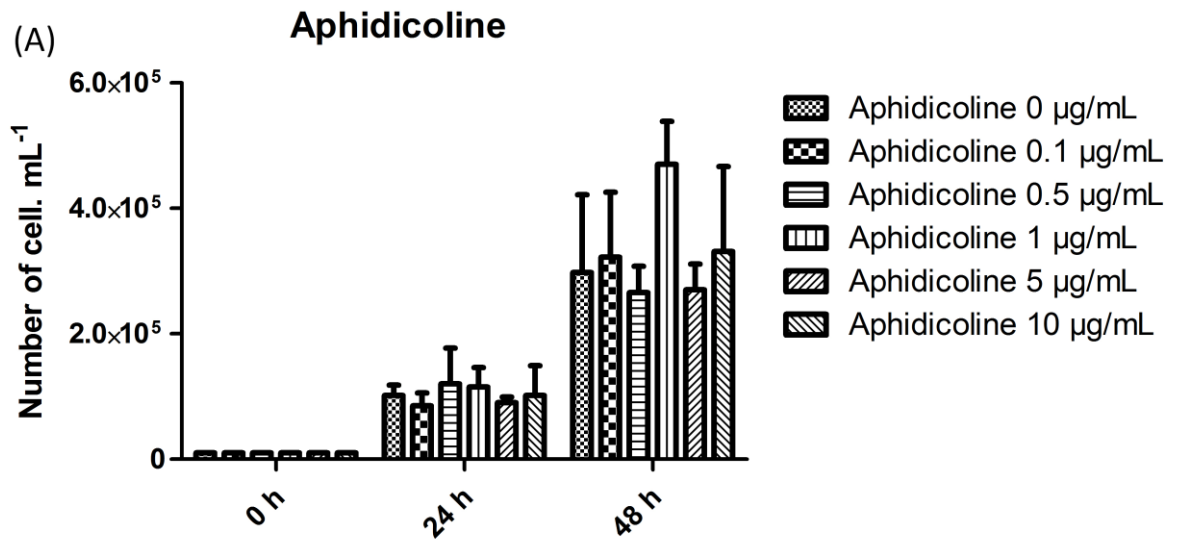
Résultats

I. Effet de *L. pneumophila* sur la prolifération d'*A. castellanii*

I.1. Essai de synchronisation des cellules

Afin de travailler sur des cellules synchrones, nous avons testé l'effet de différentes drogues pour arrêter le cycle cellulaire des cellules. Les cellules ont été incubées dans du PYG à 30°C en présence de différentes drogues : l'aphidicoline (inhibiteur de l'ADN polymérase) qui arrête les cellules en phase G1/s du cycle cellulaire, la roscovitine (inhibiteur de Cdks) qui arrête les cellules en phase S et à la transition G2/M, la thymidine qui lorsqu'elle est en excès dans le milieu de croissance empêche la réplication de l'ADN et arrête les cellules en phase S et enfin le nocodazole (inhibiteur de la polymérisation des microtubules) qui arrête les cellules à la transition G2/M.

Nous avons observé une croissance pour des cellules incubées en présence de l'aphidicoline, de la roscovitine à toutes les concentrations utilisées (**figure 24A** et **24B**). En présence de la thymidine, nous avons observé un ralentissement de croissance à partir de 40 h aux concentrations 6 mM et 20 mM (**figure 24C**). En présence de nocodazole, la croissance était ralentie dès 24 h dès la concentration 100nM et l'effet était encore plus accentué à 300 nM et à 1 μ M (**figure 24D**). Dans l'ensemble, la prolifération des cellules n'était arrêtée qu'en présence de nocodazole à 1 μ M. Par contre, les cellules étaient incubées à 30°C pour vérifier si elles étaient capables de reprendre leur cycle. Nous n'avons pas observé de croissance pendant 48 h. Toutes les drogues testées ne nous ont pas permis de synchroniser les cellules, nous avons donc décidé de travailler sur des cellules asynchrones.



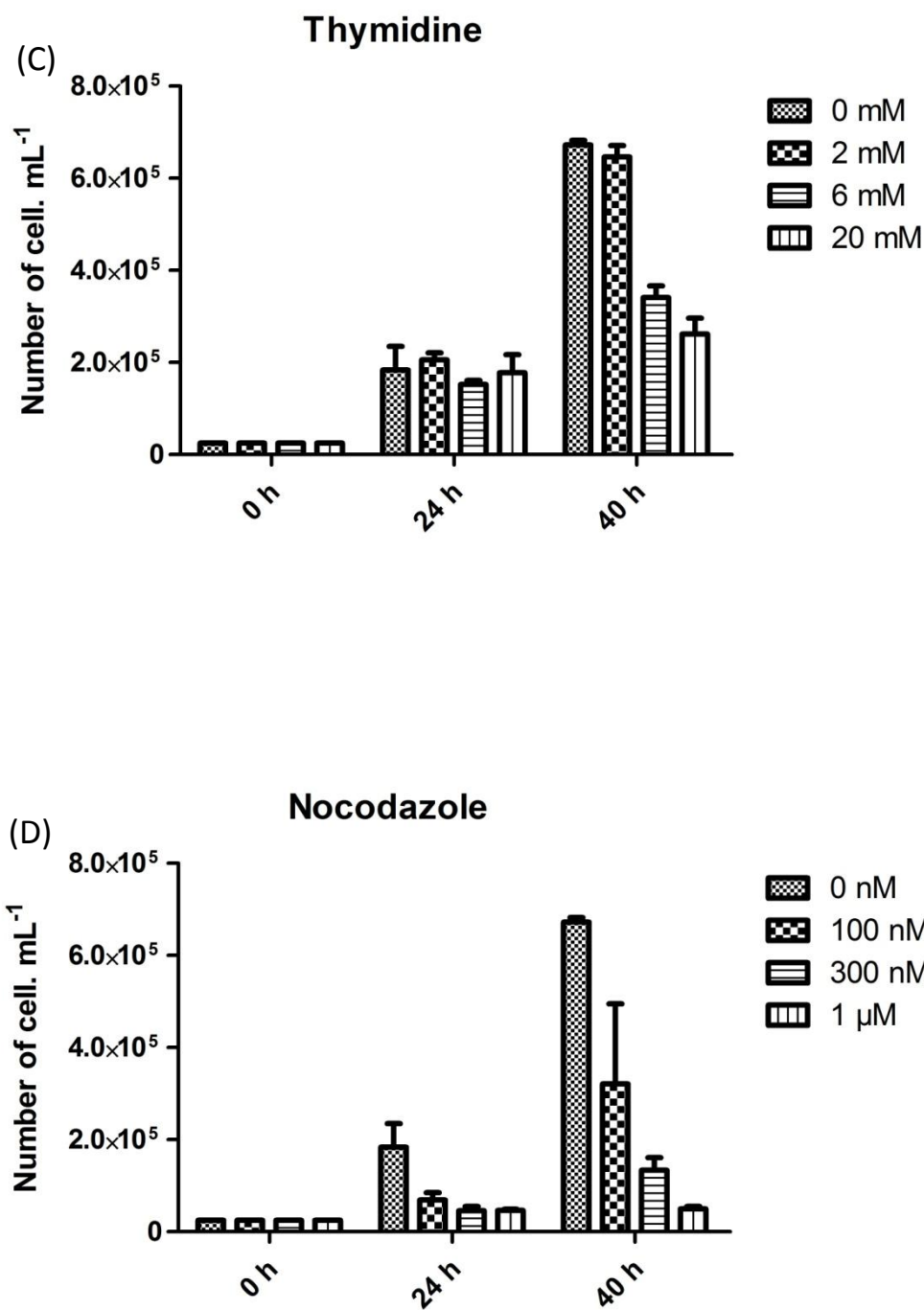


Figure 24 : Croissance d'*A. castellanii* en présence de différentes drogues. Les cellules d'*A. castellanii* ATCC 30010 ont été ensemencées dans du PYG en présence de différentes drogues (A) aphidocoline, (B) roscovitine, (C) thymidine et (D) nocodazole. A différents temps d'incubation, les cellules ont été détachées puis comptées. Les barres d'erreurs représentent l'erreur type de la moyenne « \pm SEM » ($n=3$).

I.2. Suivi de croissance d'*A. castellanii*

Nous avons suivi la croissance d'*A. castellanii* ATCC 30010 afin de déterminer le temps de génération dans nos conditions de culture. *A. castellanii* ATCC 30010 a été cultivée dans le milieu de croissance PYG à 30°C pendant 24 h. Les données générées nous ont permis de tracer une courbe de croissance (**figure 25**) et de déterminer le temps de génération qui était d'environ 6,5 h. Ce résultat est en accord avec les observations de Byers qui avait évalué le temps de génération d'*A. castellanii* Neff (ATCC 30010) entre 6 et 8 heures (Byers, 1979).

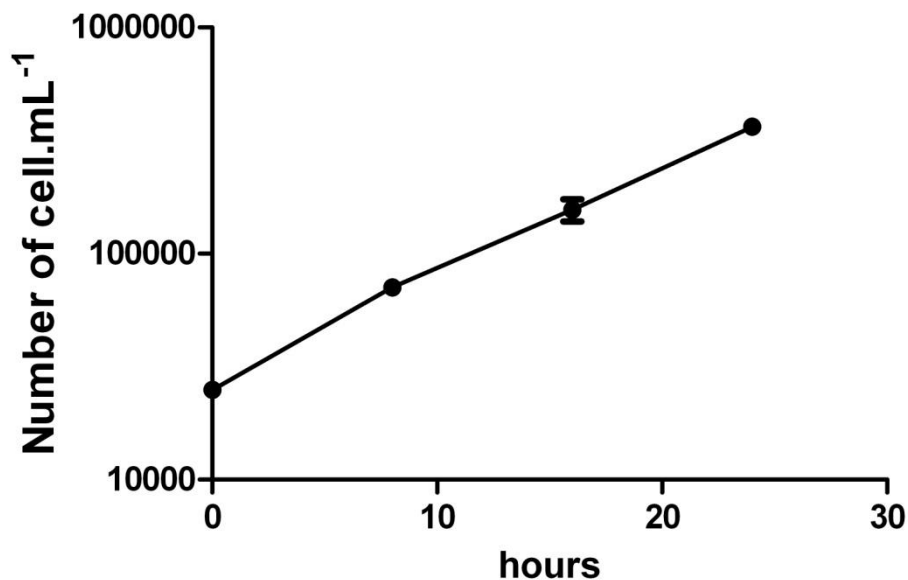


Figure 25 : Croissance d'*A. castellanii* ATCC 30010. *A. castellanii* ATCC 30010 a été cultivée à 30°C dans le PYG pendant 24 h. A différents temps, les cellules ont été détachées et comptées. Les barres d'erreurs représentent l'erreur type de la moyenne « \pm SEM » de trois expériences indépendantes.

L. pneumophila est connue pour moduler plusieurs fonctions de sa cellule hôte au moyen de ses effecteurs. L'effet de l'infection par *L. pneumophila* sur la prolifération de la cellule hôte

n'ayant pas été décrit, l'objectif principal de la thèse était d'étudier cet effet sur son hôte *A. castellanii*.

Pour répondre à cet objectif, nous avons réalisé des co-cultures de *L. pneumophila* et d'*A. castellanii* afin de permettre l'internalisation des bactéries par phagocytose et de suivre la croissance de l'amibe. La prolifération a été évaluée par comptage cellulaire et par l'analyse de l'incorporation de l'EdU, un analogue de la thymidine, mettant en évidence la phase de synthèse de l'ADN du cycle cellulaire. La division cellulaire a été observée à travers des expériences de vidéo-microscopie. Afin d'analyser le contenu en ADN des amibes infectées par *L. pneumophila*, nous avons utilisé la technique de cytométrie en flux.

I.3. Observation au microscope après infection

Avant de procéder à l'étude des effets de *L. pneumophila* sur la prolifération d'*A. castellanii*, nous avons évalué le niveau d'association des amibes avec les bactéries. *A. castellanii* a été infectée avec *L. pneumophila* Paris G_EP10, exprimant la GFP, à MOI 20. Les cellules ont été détachées 30 minutes après l'infection puis observées au microscope (**figure 26A**). Les amibes associées à *L. pneumophila* et celles qui ne l'étaient pas ont été comptées afin de déterminer un pourcentage de chaque condition. Les résultats indiquent qu'environ 80% des amibes étaient associées à *L. pneumophila* (**figure 26B**).

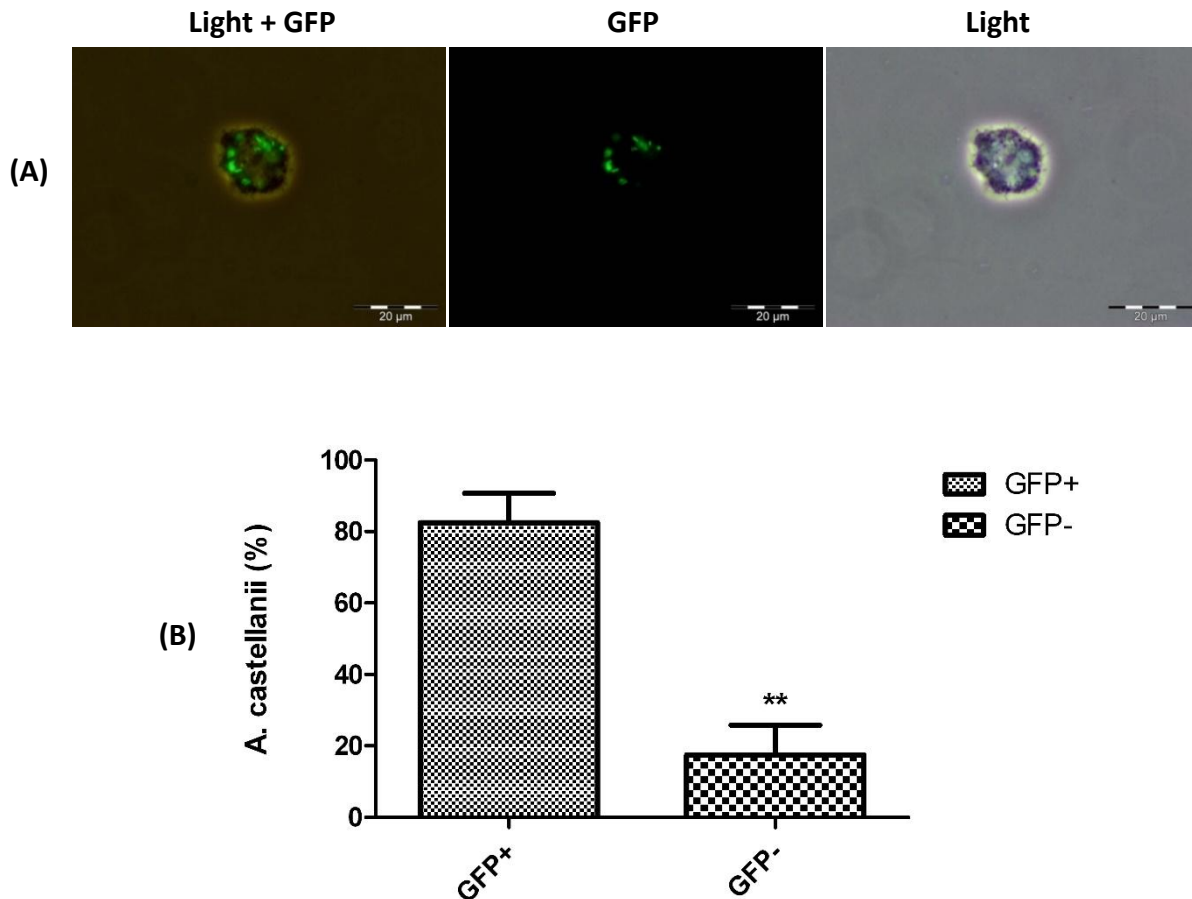


Figure 26 : Association d'*A. castellanii* avec *L. pneumophila*. *A. castellanii* ATCC 30010 a été infectée par *L. pneumophila* Paris G_EP10 à MOI 20. Les amibes ont été détachées 30 minutes après l'infection et observées au microscope (A). Les cellules ont été comptées au microscope suivant qu'elles contenaient ou non un signal GFP pour définir un pourcentage (B).

I.4. Publication 1 : *Legionella pneumophila* prevents proliferation of its natural host *Acanthamoeba castellanii*

L'objectif principal de ma thèse était d'étudier l'effet de *L. pneumophila* sur la prolifération de son hôte *A. castellanii*. Pour cela, les amibes ont été mises en co-cultures avec *L. pneumophila* et avec *E. coli* aux MOIs (multiplicité d'infection) de 1, 5, 10 et 20. La prolifération d'*A. castellanii* a été évaluée par comptage cellulaire. Ce test nous a permis d'observer une diminution de la prolifération d'*A. castellanii* en condition de co-cultures avec

la souche sauvage de *L. pneumophila* comparée aux amibes non-infectées ou infectées avec *E. coli*. Nous avons aussi observé que cet effet dépendait de la MOI car plus cette dernière était grande, moins les amibes proliféraient. En infectant *A. castellanii* avec le mutant $\Delta dotA$ de *L. pneumophila* (avec un système de sécrétion Dot/Icm défectueux) ou la souche sauvage tuée à la chaleur, nous n'avons pas observé une différence de croissance comparée aux amibes non-infectées. Ces résultats suggèrent que la baisse de la prolifération observée pour *A. castellanii* pourrait être induite par un ou plusieurs effecteur(s) sécrété(s) par *L. pneumophila* à travers son système de sécrétion Dot/Icm. Le suivi des amibes par vidéo microscopie a montré une absence de division cellulaire pour les amibes infectées. L'utilisation de l'EdU, un analogue de la thymidine, a permis de montrer que ce nucléotide n'était pas incorporé dans l'ADN des cellules infectées par *L. pneumophila*, témoignant ainsi de l'absence de phase de synthèse de l'ADN. Tous ces résultats indiquent que *L. pneumophila* induit un arrêt de la prolifération d'*A. castellanii*. L'analyse des vidéos a révélé, en plus de l'absence de division cellulaire, un changement morphologique des amibes infectées, une baisse de la mobilité et une perte d'adhérence des amibes au substrat. Sur le plan moléculaire, l'absence de multiplication cellulaire était liée à une baisse de l'expression du gène *CDC2b* dans les amibes infectées par *L. pneumophila*. Cette protéine d'*A. castellanii* présente une forte homologie de séquence avec des protéines kinase essentielles au cycle cellulaire eucaryote. La complémentation génétique de la levure *Saccharomyces cerevisiae* Y838, qui possède une mutation thermosensible du gène *cdc28-4*, par *CDC2b*, a permis de restaurer partiellement la croissance du mutant à 34°C. Ce résultat suggère que la protéine CDC2b est fonctionnelle et pourrait être une CDK (cyclin dépendant kinase).

Ces résultats, publiés dans l'article ci-dessous, indiquent que *L. pneumophila* arrête la prolifération de son hôte *A. castellanii*. Cet effet dépend de la MOI et d'un système de

sécrétion Dot/Icm fonctionnel. L'absence de multiplication cellulaire est associée à une baisse du niveau d'expression de la protéine CDC2b.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN *Legionella pneumophila* prevents proliferation of its natural host *Acanthamoeba castellanii*

Luce Mengue¹, Matthieu Régnacq², Willy Aucher¹, Emilie Portier¹, Yann Héchard¹ & Ascel Samba-Louaka¹

Received: 30 June 2016

Accepted: 14 October 2016

Published: 02 November 2016

Legionella pneumophila is a ubiquitous, pathogenic, Gram-negative bacterium responsible for legionellosis. Like many other amoeba-resistant microorganisms, *L. pneumophila* resists host clearance and multiplies inside the cell. Through its Dot/Icm type IV secretion system, the bacterium injects more than three hundred effectors that modulate host cell physiology in order to promote its own intracellular replication. Here we report that *L. pneumophila* prevents proliferation of its natural host *Acanthamoeba castellanii*. Infected amoebae could not undergo DNA replication and no cell division was observed. The Dot/Icm secretion system was necessary for *L. pneumophila* to prevent the eukaryotic proliferation. The absence of proliferation was associated with altered amoebal morphology and with a decrease of mRNA transcript levels of CDC2b, a putative regulator of the *A. castellanii* cell cycle. Complementation of CDC28-deficient *Saccharomyces cerevisiae* by the CDC2b cDNA was sufficient to restore proliferation of CDC28-deficient *S. cerevisiae* and suggests for the first time that CDC2b from *A. castellanii* could be functional and a *bona fide* cyclin-dependent kinase. Hence, our results reveal that *L. pneumophila* impairs proliferation of *A. castellanii* and this effect could involve the cell cycle protein CDC2b.

Legionella pneumophila is a pathogenic Gram-negative bacterium found in natural and artificial aqueous environments¹. It is responsible for legionellosis, a potentially lethal pneumonia that occurs after inhalation of aerosols containing the bacterium². In water systems, *L. pneumophila* was found associated with free-living amoebae (FLA) which ensure its survival and replication³. The genus *Acanthamoeba*, among the most prevalent FLA found in the environment, has been characterized as a natural host of *L. pneumophila*³. The bacterium is phagocytized during *Acanthamoeba* grazing but it resists intracellular digestion^{3,4}. *L. pneumophila* has evolved a number of mechanisms to modulate amoebal signal-transduction pathways to its advantage to support its replication. This successful strategy lies in the ability of *L. pneumophila* to perturb essential functions such as transcription, translation, cytoskeleton machineries, organelle function, vesicular trafficking, autophagy and host survival processes⁵. During infection of amoebae or alveolar macrophages, *L. pneumophila* injects more than three hundred effectors through a type IV secretion system (T4SS) called Dot/Icm (Defect in organelle trafficking; Intracellular multiplication) which is critical for resistance to host digestion, replication and exit of the bacterium from the cell^{6,7}. The disturbance of eukaryotic functions by *L. pneumophila* is facilitated by bacterial proteins that contain a eukaryotic domain allowing the pathogen to mimic host cell functions⁸. To our knowledge, no study thus far has characterized the consequences of *L. pneumophila* infection on host-cell proliferation.

The cell cycle is a vital process that ensures growth and reproduction or proliferation of all living cells. It consists of duplication of the cell content (DNA and organelles) and repartition of the duplicated material into the daughter cells during mitosis and cytokinesis. The eukaryotic cell cycle is driven by a class of serine/threonine kinases named Cyclin-Dependent Kinases (CDKs) that act in concert with protein regulatory subunits called Cyclins⁹. Activities of some CDKs, such as the human protein CDK1 or the homologous protein in *Saccharomyces cerevisiae* CDC28, can be essential for cell proliferation^{10,11}. Although CDK activity was detected in *Acanthamoeba*, the responsible protein had yet to be identified¹². The sequencing of the genome of *A. castellanii* provided some clues as to the identity of the putative cell cycle regulator¹³.

¹Laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions, Microbiologie de l'Eau, Université de Poitiers, UMR CNRS 7267, Poitiers, France. ²Signalisation et Transports Ioniques Membranaires, Université de Poitiers, CNRS ERL 7368, Poitiers, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to A.S.-L. (email: ascel.samba@univ-poitiers.fr)

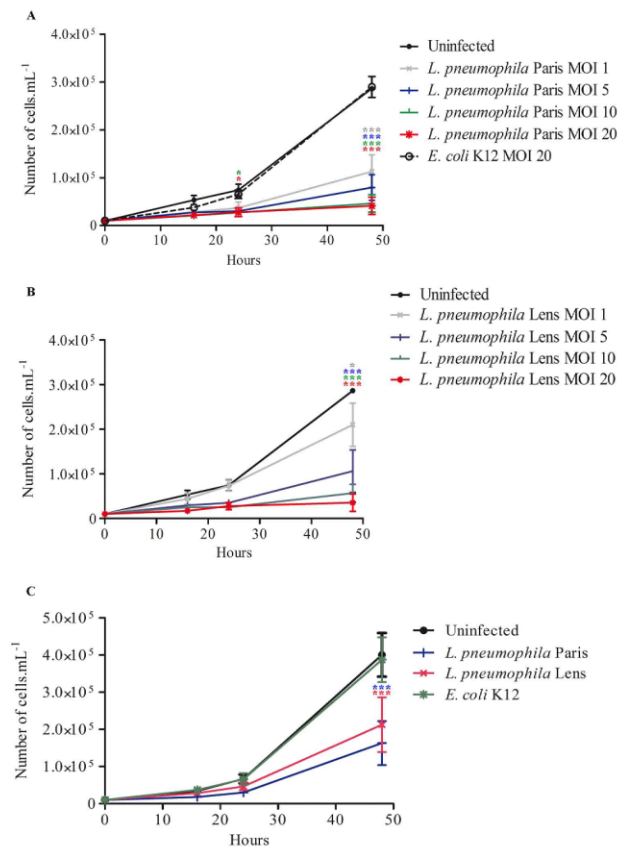


Figure 1. *L. pneumophila* prevents proliferation of *A. castellanii*. (A) *A. castellanii* ATCC 30010 were infected with *L. pneumophila* Paris and *E. coli* K12 or (B) with *L. pneumophila* Lens at a MOI of 1, 5, 10 and 20. Infections were carried out within the PAS solution for 2 h and cells were further incubated within the PYG medium containing gentamicin. Sixteen, twenty four and forty eight hours after infection, cells were harvested for counting. Results are average of three independent experiments and errors bars represent the standard error of the mean (\pm SEM). (C) *A. castellanii* ATCC 30234 were co-cultured with *L. pneumophila* Paris, *L. pneumophila* Lens and *E. coli* K12 at a MOI of 20. At different time points, cells were harvested for counting. Results are average of three independent experiments and errors bars represent the standard error of the mean (\pm SEM). The asterisks indicate conditions that are significantly different compared to uninfected cells (* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$).

Here, we show that *L. pneumophila* is able to prevent the proliferation of its natural host *Acanthamoeba*. This effect depends on the number of bacteria per amoebae and required the Dot/Icm secretion system. The arrest in *Acanthamoeba* multiplication provoked by *L. pneumophila* correlated with changes of the shape and motility of *Acanthamoeba*. Moreover, *L. pneumophila* induced a decrease in host mRNA levels of CDC2b, a putative CDK in *Acanthamoeba*. Furthermore, the genetic complementation of CDC2b cDNA from *Acanthamoeba* in CDC28-deficient *S. cerevisiae* demonstrates that CDC2b is a functional CDK and suggests that the cell cycle inhibition of *Acanthamoeba* upon infection could be related to down-regulation of CDC2b mRNA.

Results

***L. pneumophila* impairs proliferation of *A. castellanii*.** In order to assess the impact of *L. pneumophila* on amoebal proliferation, *A. castellanii* 30010 were infected with *L. pneumophila* Paris or with *Escherichia coli* K12, which does not resist host digestion, at multiplicities of infection (MOIs) of 1, 5, 10 and 20. Proliferation of *A. castellanii* was evaluated for 48 h. In contrast to uninfected cells or *A. castellanii* co-cultured with *E. coli*, we did not observe any increase of the cell population when *A. castellanii* was infected with *L. pneumophila* (Fig. 1A). The difference between *L. pneumophila* infected and uninfected cells was significant as soon as 24 h post-infection (Fig. 1A). The inhibition of cell proliferation upon infection with *L. pneumophila* seemed dependent on the MOI used as this effect was more pronounced with higher MOIs (Fig. 1A). To address the possibility that the absence of proliferation of *A. castellanii* induced by *L. pneumophila* was bacterial or amoebal strain specific, we infected *A. castellanii* 30010 with the *L. pneumophila* Lens strain. Although compared to uninfected cells the difference was less pronounced at a MOI of 1, *L. pneumophila* Lens also impaired proliferation of *A. castellanii* (Fig. 1B). Similarly, another strain of *A. castellanii* (ATCC 30234) was co-cultured with *L. pneumophila* (Lens and Paris strains) and with *E. coli* K12 at a MOI of 20. Less proliferation over time was observed when infection

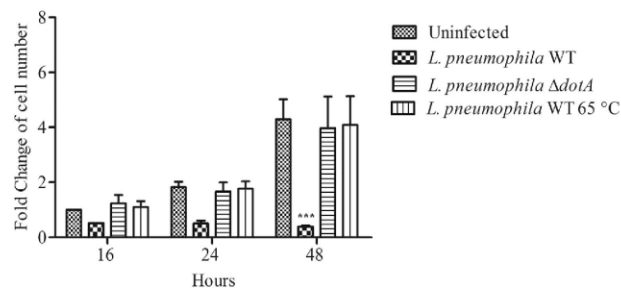


Figure 2. *L. pneumophila* prevents proliferation of *A. castellanii* through the Dot/Icm secretion system. *A. castellanii* ATCC 30010 were infected with wild type (WT) *L. pneumophila* Paris, heat-killed (65 °C) and $\Delta dotA$ *L. pneumophila* Paris at a MOI of 20. Sixteen, twenty-four and forty-eight hours after infection, cells were harvested for counting. Results are average of three independent experiments and errors bars represent the standard error of the mean. Cell numbers are relative to uninfected cells at 16 h. The asterisks indicate conditions that are significantly different compared to uninfected cells (***) $p < 0.001$.

was performed with *L. pneumophila* compared to uninfected cells or those infected with *E. coli* K12 (Fig. 1C). According to these results, *L. pneumophila* prevents proliferation of *A. castellanii*.

***L. pneumophila* inhibits proliferation of *A. castellanii* through the Dot/Icm secretion system.**

To address how *L. pneumophila* inhibited *A. castellanii* proliferation, amoebae were infected with live, heat-killed (65 °C) or $\Delta dotA$ mutant of *L. pneumophila* at a MOI of 20. The number of *A. castellanii* was assessed at different time-points to establish a kinetic of proliferation for each condition. In contrast to live *L. pneumophila*, infection with heat-killed or $\Delta dotA$ *L. pneumophila* did not impair proliferation of *A. castellanii* (Fig. 2). These results suggested that inhibition of *A. castellanii* proliferation requires live *L. pneumophila* with a functional Dot/Icm T4SS.

***L. pneumophila* induces modifications in shape, motility and cell division of *A. castellanii*.**

Time lapse microscopy was performed to visualize cell division of *A. castellanii* after infection with *L. pneumophila* Paris expressing the GFP protein (G_EP10). Videos were performed 16 h after infection and taken for approximately 17 h. As shown in the supplementary video 1, uninfected *A. castellanii* were highly motile and cell division was observed. Whereas in infected cells, we did not observe any cell division in GFP positive cells (supplementary video 2 and Fig. 3A). Infected cells seemed less motile with modifications of their shape as they became rounded (supplementary video 2 and Fig. 3A). In addition, cells positive for GFP seemed less adherent than the GFP negative cells (supplementary video 2).

In order to test cell adherence of *A. castellanii* following infection with *L. pneumophila*, floating cells were harvested after infection with live, heat-killed or $\Delta dotA$ mutant of *L. pneumophila* at a MOI of 20. We observed that in contrast to heat-killed and $\Delta dotA$ *L. pneumophila*, live wild-type *L. pneumophila* seemed to induce cell detachment (Fig. 3B). These data indicate that inhibition of cell division induced by *L. pneumophila* was associated with modifications of the shape and of the motility of *A. castellanii*. Moreover, *L. pneumophila* required a functional Dot/Icm secretion system to decrease adherence of *A. castellanii* from the surface.

A. castellanii has a life cycle that oscillates between a dormant and a replicative forms named cyst and trophozoite, respectively. Under unfavorable conditions, amoebae form cysts, which are resistant to environmental stress and metabolically inactive¹⁴. During encystation, *A. castellanii* retracts its pseudopodia and becomes rounded^{15,16}. In order to verify that rounded-infected cells were not encysted, *A. castellanii* were stained with Calcofluor White to reveal cellulose in the cell wall of mature cysts¹⁷. We found that cells that were highly infected with *L. pneumophila* G_EP10 did not share phenotypic characteristics with *A. castellanii* cysts. Indeed, there was a striking difference in cell size and, in contrast to cysts, no cell wall containing cellulose was observed in infected amoebae with *L. pneumophila* G_EP10 (Fig. 3C). In our experimental conditions, round cells that seemed barely adherent upon infection with *L. pneumophila* were not cysts.

***L. pneumophila* impairs the ability of infected cells to replicate their DNA.**

Cell division and DNA replication represent the two essential cell cycle phases of any eukaryotic cell. Thus we assessed whether the absence of cell division upon *L. pneumophila* infection was associated to an inhibition of DNA synthesis. *A. castellanii* infected or not with *L. pneumophila* Paris expressing the DsRed protein (R_EP10) were incubated in a growth medium containing 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) for 4 h. Incorporation of EdU, an analogue of thymidine, indicates DNA synthesis. Thus, as expected, uninfected cells were able to duplicate their DNA since around 20% of cells were positive for the EdU signal (Fig. 4A,C). However, in *A. castellanii* that were co-cultured with *L. pneumophila* R_EP10, the number of cells positive for EdU dropped to around 1% (Fig. 4B,C). In addition, we never detected cells positive both for EdU and DsRed signals (Fig. 4B). This result suggests that *L. pneumophila* prevented DNA replication in *A. castellanii*.

The protein CDC2b from *A. castellanii* is a putative CDK. Eukaryotic cell cycle regulation is driven by cyclin dependent kinases (CDKs). Because *Homo sapiens* cells possess a considerable number of CDKs, we ran a blast search of protein sequences of human CDKs (supplementary Data 1)¹⁸ within the genome of *A. castellanii*

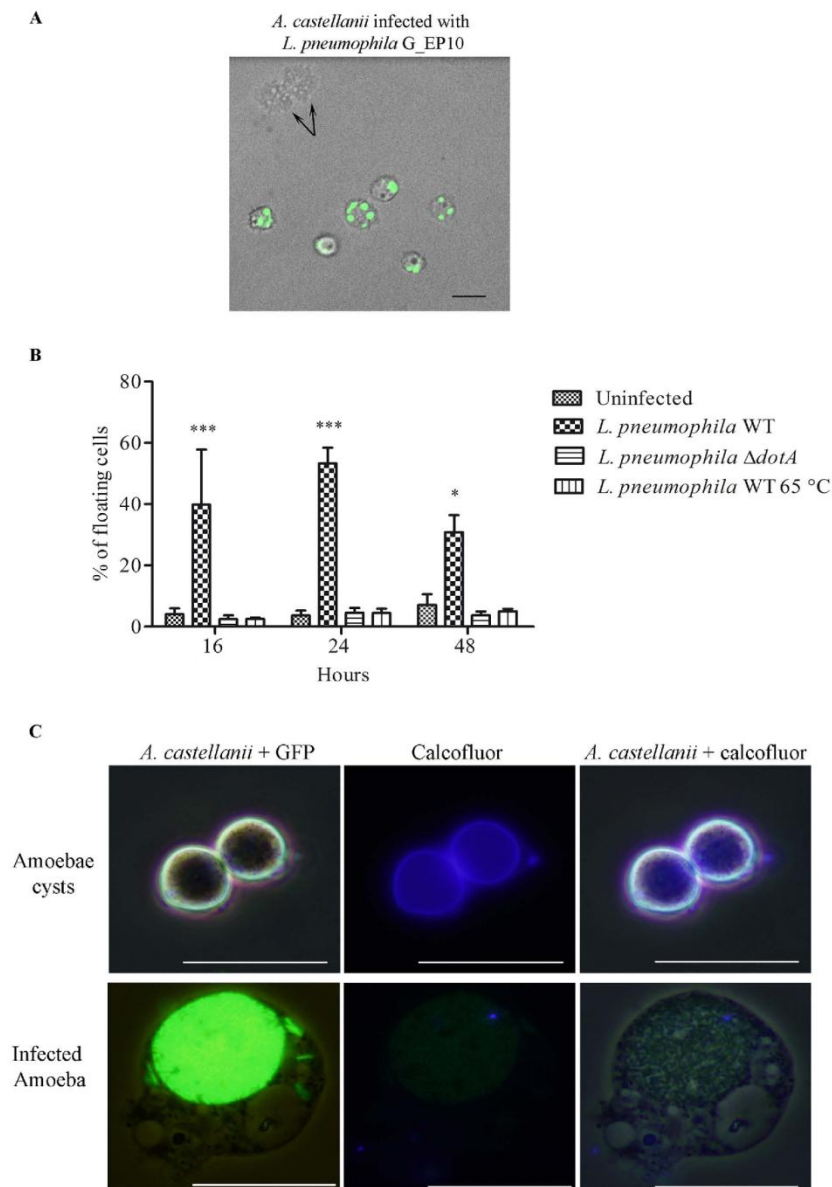


Figure 3. *L. pneumophila* modifies the shape of *A. castellanii*. (A) *A. castellanii* ATCC 30010 were infected with *L. pneumophila* Paris expressing GFP (G_EP10) at a MOI of 20. Green color represents the GFP signal. Images were captured 18 h post-infection. Black arrows show cell division of one mother cell into two daughter cells. The size bar represents 20 μ m. (B) *A. castellanii* ATCC 30010 were infected with wild type (WT) *L. pneumophila* Paris, heat-killed and Δ dotA *L. pneumophila* Paris at a MOI of 20. At different time points, the percentage of floating cells was estimated. Results are average of three independent experiments and errors bars represent the standard error of the mean (\pm SEM). The asterisks indicate data that are significantly different compared to uninfected cells (* p < 0.05, *** p < 0.001). (C) *A. castellanii* ATCC 30010 were cultured in encystation medium or infected with *L. pneumophila* Paris G_EP10 at MOI of 20. Twenty-four hours after treatment or infection, cells were harvested and stained with calcofluor in order to reveal cyst forms. Transmitted light, green and blue channels represented respectively amoebae, GFP (*L. pneumophila*) and calcofluor (cellulose) signals. The size bar represents 20 μ m.

(NCBI). Based on an E-value less than 1 and a percentage of identity of at least 35%, we obtained five candidates as putative CDKs of *A. castellanii* (Table 1). These five proteins were aligned with human CDKs in order to perform a phylogenetic analysis. Similarly to Cao *et al.*¹⁸, we used human (Hsa) cyclin-dependent kinase like-1 (CDKL1), glycogen synthase kinase-3 (GSK3) alpha and serine/threonine-protein kinase MAK isoform 1 as outgroups. Six of the human CDKs are directly related to the cell cycle (CDK1, CDK2, CDK3, CDK4, CDK6 and CDK7)¹⁹. As shown on the Fig. 5A, only the XP_004353710.1 CDC2b putative protein appeared phylogenetically similar to a cell cycle-related human CDK (CDK1).

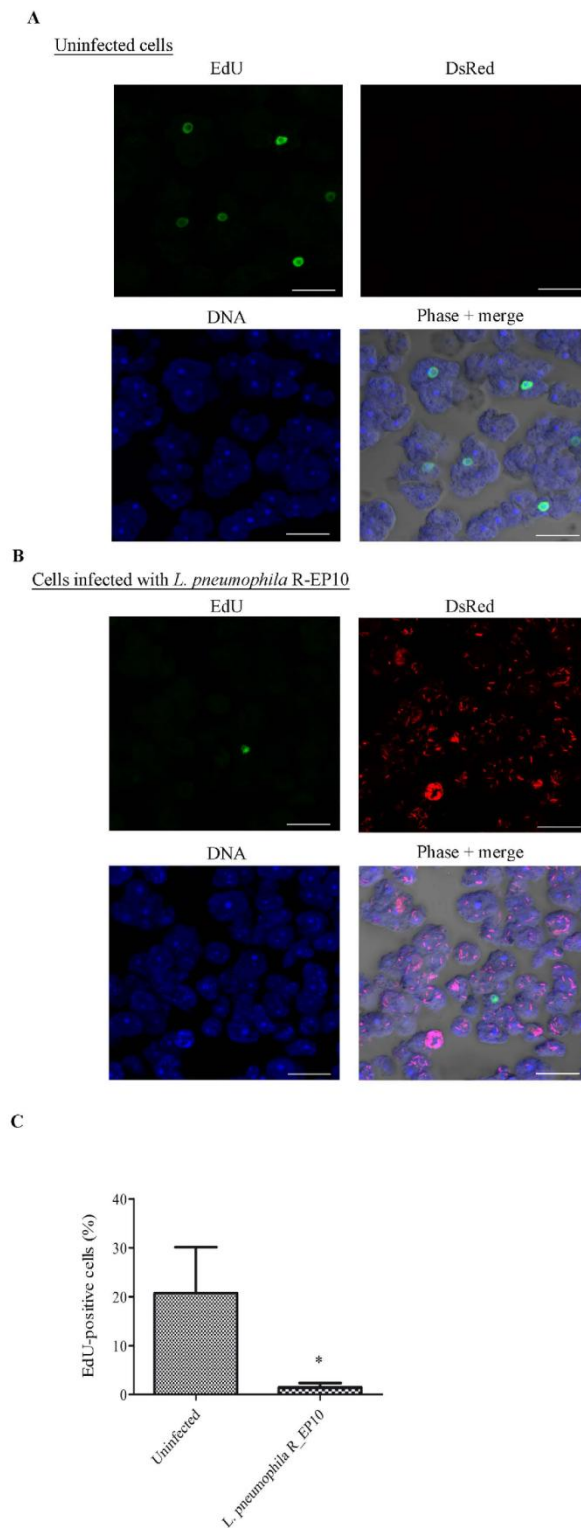


Figure 4. *L. pneumophila* prevents DNA synthesis in *A. castellanii*. (A) Uninfected *A. castellanii* 30010 and (B) cells infected at a MOI of 20 with *L. pneumophila* Paris expressing DsRed (R_EP10) were incubated in PYG medium supplemented with gentamicin (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and EdU (40 μM) for 4 h. For uninfected cells, the EdU treatment started just after infection. Cells were harvested for microscopic observation. EdU appears in green, DsRed signal in red, nuclei in blue (TO-PRO[®]-3 Iodide). The size bar represents 20 μm . (C) Quantification of EdU positive cells from 3 independent experiments, for a total of more than 350 *A. castellanii* counted. The graph shows the mean \pm SEM (* $p \leq 0.05$).

Accession number	Name
XP_004353710.1	Cell division control protein 2b, putative (CDC2b)
XP_004336625.1	Cdk10/11, putative
XP_004367653.1	Protein kinase domain containing protein
XP_004335644.1	Cyclin-dependent kinase
XP_004342572.1	Protein kinase domain containing protein

Table 1. Putative *A. castellanii* CDK resulting from the blast of all human CDKs¹⁸.

In order to further assess the similarity between CDC2b from *A. castellanii* and well described eukaryotic CDKs, we aligned the protein sequences with those of human (CDK1), and of Baker's and fission yeast, *Saccharomyces cerevisiae* (CDC28) and *Schizosaccharomyces pombe* (CDC2), respectively. We found that the CDC2b protein sequence was highly conserved compared to the CDKs from the other organisms (Fig. 5B). Aside from the PSTAIRE cyclin-binding domain, all the CDKs we aligned displayed many highly conserved residues and domains that characterize CDKs¹⁹ such as an ATP-binding domain, an inhibitory phosphorylation site, an activating phosphorylation site and the start and end of a T-loop (Fig. 5B). Thus, the putative protein CDC2b from *A. castellanii* shares strong homology with other CDKs that are essential for the progression of the cell cycle.

Since *S. cerevisiae* can be used to test the function of proteins from *A. castellanii*²⁰, we sought to determine whether heterologous expression of CDC2b could complement the loss of function of the *CDC28* gene from yeast. To this end, the coding sequence of CDC2b was introduced into plasmid pYES2 under the control of an inducible *GALI* promoter. The yeast strain Y838, which harbors a temperature sensitive mutation *cdc28-4*, was transformed with the recombinant plasmid pYES2-CDC2b or the empty vector as a negative control. After propagation of the transformants at the permissive temperature, they were challenged for growth on YPGal medium at various temperatures. As shown in Fig. 5C, Y838 transformed with pYES-CDC2b was capable of robust growth at 30 °C or 34 °C but could not grow at 37 °C, whereas the same strain transformed with the empty plasmid was unable to grow above 30 °C. In contrast, the wild type strain Y10000 was able to grow regardless of the temperature of incubation (Fig. 5C). We conclude from this experiment that *A. castellanii* CDC2b can restore growth of the *cdc28-4* mutant but not as well as a wild type yeast strain.

***L. pneumophila* provokes a decrease of the *CDC2b* gene expression.** We next explored whether *L. pneumophila* modulates expression levels of CDC2b. We infected *A. castellanii* with *L. pneumophila* and monitored the level of CDC2b mRNA at different time-points. One found that *L. pneumophila* decreased CDC2b mRNA level as soon as 2 h after the beginning of the infection (0 h). The difference between uninfected and infected cells was significant at 0 and 2 h post-infection (Fig. 6). These results indicate that *L. pneumophila* infection leads to down-regulation of the mRNA levels of CDC2b, which correlates with a defect in amoebal proliferation during infection.

Discussion

L. pneumophila is an intracellular bacterium that manipulates host functions to support its replication. However, the impact of *Legionella* infection on the host cell cycle has never been addressed. In this study, we demonstrate that *L. pneumophila* prevents multiplication of its natural host *A. castellanii* through the T4SS. Infection with *L. pneumophila* impairs cell division, DNA synthesis and motility of *A. castellanii*. The inability of infected cells to multiply correlates with a decrease of the mRNA levels of the putative amoebal cell cycle regulator CDC2b.

Some studies previously suggested a negative effect of *L. pneumophila* on the proliferation of *Acanthamoeba*^{21,22}. In both studies, authors observed a decrease of the amoebal cell number upon infection, at least three days later, that was associated to an amoebal lysis^{21,22}. Indeed, *L. pneumophila* provokes necrosis-mediated lysis of *Acanthamoeba* within 48 h after infection²³. Here, we demonstrate that, even only several hours after infection with *L. pneumophila*, *A. castellanii* were unable to replicate their DNA, nor to undergo cytokinesis; two critical steps for cell proliferation. Thus, inhibition of proliferation, and not only *Legionella*-induced host lysis could account for this decrease in cell number. The type IV secretion system Dot/Icm was necessary for the inhibition of the host proliferation induced by *L. pneumophila*. Our ongoing work aims at identifying the *L. pneumophila* effectors involved in the regulation of proliferation of *A. castellanii*.

Our video microscopy experiments revealed that *L. pneumophila* induced a modification of the shape of amoebae which became rounded with some detachment from the substrate. The membrane of infected amoebae differed from mature *Acanthamoeba* cyst as no evidence for cellulose was observed by calcofluor stain. Modulation of encystment has been shown with other bacteria^{24,25}. Regarding *Legionella*, controversially results could be found. Several papers have described cysts fully bound with *L. pneumophila*^{26,27} while some authors did not succeed to isolate infected cysts²⁸. This suggests that some specific conditions might be required to obtain infected cysts with *L. pneumophila*. This question is of importance since cysts are thought to play a role in persistence and dissemination of *L. pneumophila*.

The alteration in amoebal shape and motility that we observed support previous results indicating that *L. pneumophila* modulates the cell host cytoskeletal molecules and migration²⁹⁻³². Interestingly, treatment of the social amoeba *Dictyostelium discoideum* with the *Legionella* quorum sensing molecule LAI-1 induced down-regulation of genes involved in movement and in cell proliferation³¹. LAI-1 led to inactivation of the cytoskeletal-regulating protein CDC42 that was reported to induce cell cycle progression^{33,34}. We aim to characterize the possible contribution of LAI-1 to the inhibition of *A. castellanii* proliferation in future studies.

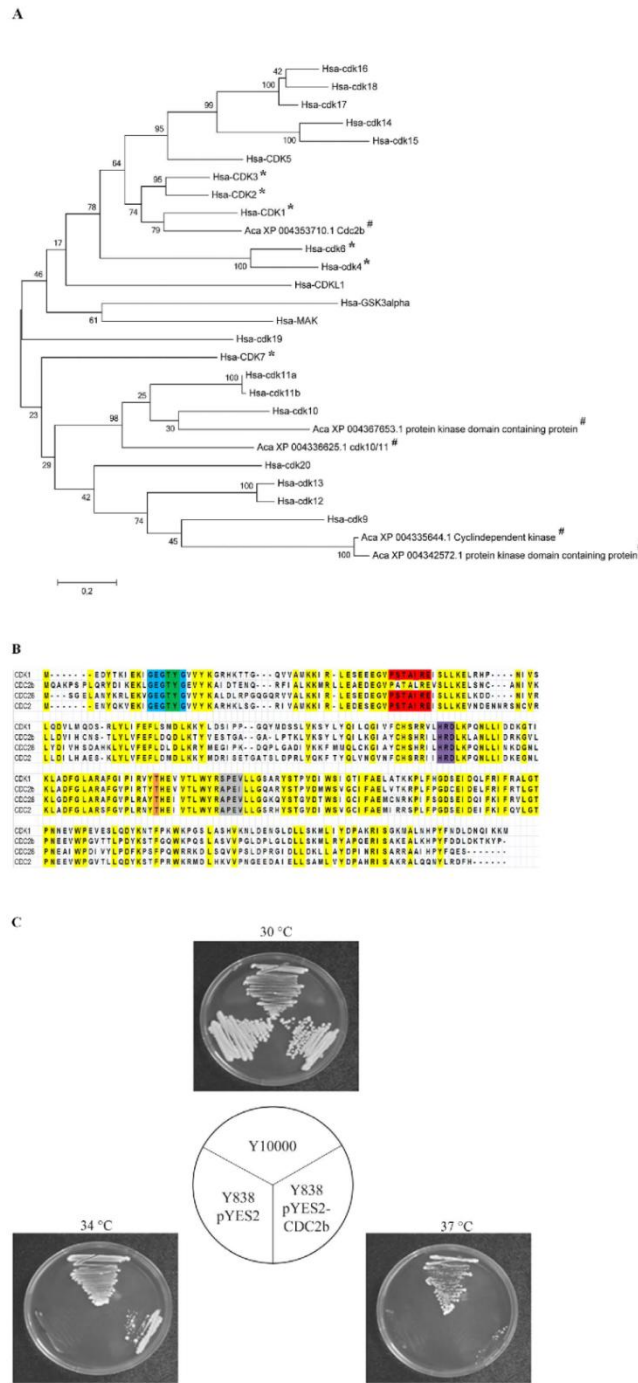


Figure 5. CDC2b from *A. castellanii* could be the regulator of the cell cycle. (A) CDK phylogeny inferred by Maximum Likelihood based on human (Hsa) CDKs¹⁸ and putative *A. castellanii* (Aca) CDKs. 1000 bootstrap replications were inferred and displayed at the nodes. The scale bar represents the number of amino acid substitution per site. All proteins were first labeled with their species name (Aca, *A. castellanii*; Hsa, *Homo sapiens*). *Indicates humans cell cycle-related proteins and # represents proteins from *A. castellanii*. (B) Sequence alignment between CDC2b (XP_004353710.1) from *A. castellanii*, CDK1 (NP_001777.1) from *Homo sapiens*, CDC28 (NP_009718.3) from *Saccharomyces cerevisiae* and CDC2 (CAC37513.1) from *Schizosaccharomyces pombe* using MUSCLE of the MEGA6 software. Yellow color highlight conserved residues. Motifs characteristics of CDK are displayed in blue (ATP-binding domain), green (inhibitory phosphorylation sites), red (cyclin-binding domain), purple (start of T-loop), orange (activating phosphorylation site) and grey (end of T-loop). (C) The *S. cerevisiae* strains Y10000 (wild type), Y838 (*cdc28-4*) transformed with the empty plasmid pYES2 or the recombinant plasmid pYES2-CDC2b were streaked on galactose-containing medium and cultivated at 30°C, 34°C or 37°C for 4 days.

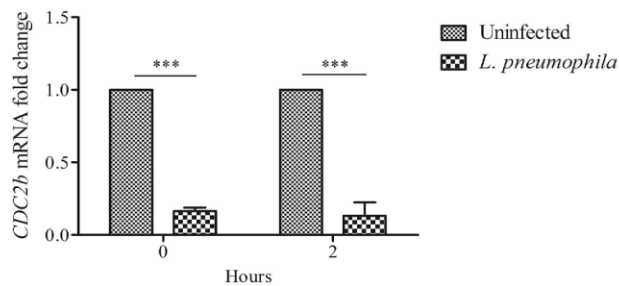


Figure 6. *L. pneumophila* induces a down-regulation of the *A. castellanii* cell cycle related protein CDC2b. *A. castellanii* ATCC 30010 were infected with *L. pneumophila* Paris at a MOI of 20. RT-qPCR for *CDC2b* mRNA extracted was performed just after the end of infection (0 h) and 2 h latter (2 h). Expression levels were normalized to the 18S mRNA. *CDC2b* levels are presented as levels relative to the uninfected condition. Results are average of three independent experiments and errors bars represent the standard error of the mean (\pm SEM). The asterisks indicate a significant difference between uninfected and infected conditions (** $p < 0.001$).

Legionella pneumophila was shown to regulate transcription of genes implicated in proliferation of human monocyte-derived macrophages and of bone marrow-derived macrophages^{35,36}. Furthermore, *L. pneumophila* modifies the host chromatin resulting in a repression of gene expression^{37,38}. Since chromatin structure impinges on the cell cycle and vice-versa³⁹, contribution of effectors implicated in chromatin-remodeling is a promising area to investigate.

To our knowledge, CDK proteins have never been characterized in *A. castellanii*. Thanks to genome sequencing of *A. castellanii*¹³, we found that the putative protein CDC2b shares a strong homology with other cell cycle-related CDKs. CDC2b could restore the ability of CDC28-deficient *S. cerevisiae* to grow although growth of transformants was limited at high temperature. Interestingly, the same conclusion was reported for the *CDC2* gene of the distantly related amoeba *Dictyostelium discoideum*⁴⁰. As CDK acts in concert with cyclin proteins, growth limitation of transformants carrying CDC2b could arise from the putative cyclin-binding domain of CDC2b that is different from the conserved PSTAIRE motif. This would be analogous to CDC2 from *D. discoideum* whose PSTAIRE is not completely conserved with an isoleucine substituted for leucine⁴⁰.

From Amoebozoa to Vertebrata, several CDK proteins are present in one cell. The number of CDKs increases with eukaryotic evolution. While 20 CDKs are found in humans, only 6 and 8 CDKs are found in the yeast *S. cerevisiae* and in the amoeba *D. discoideum*, respectively¹⁸. As reported in yeast and mammalian systems, only one CDK is essential to drive the cell cycle from DNA replication to mitosis^{10,11}. The ability of CDC2b to functionally complement CDC28-deficient *S. cerevisiae* suggests that CDC2b could represent the main cell cycle regulator in *A. castellanii*. Although as yet there is no method to generate mutants in *A. castellanii*, such experiments are needed to confirm our hypothesis.

Intracellular bacteria were reported to affect the growth rate of free-living amoebae⁴¹. Beyond, several bacteria are able to promote or to inhibit the eukaryotic cell cycle by using bacterial effectors called cyclomodulins^{42,43}. Inhibitory cyclomodulins impair the function of cyclin/CDK complexes through activation of the DNA-damage response, tubulin protein sequestration, down-regulation of cyclins, stabilization of CDK inhibitors, interaction with proteins of the anaphase promoting complex or cleavage of the regulator of the endoplasmic reticulum (ER) function Bip⁴⁴⁻⁴⁶. Because cyclomodulins induce pleiotropic effects on target cells, the next challenge will be to confirm that the decrease of CDC2b mRNA by *L. pneumophila* is responsible for the *A. castellanii* proliferation prevention and how this transcriptional/translational effect is important for *L. pneumophila*. Since down-regulation of CDK expression upon bacterial infection has never been reported, the down-regulation of the CDC2b mRNA level could be a novel strategy for a bacterium to regulate proliferation of its host.

In summary, this study shows for the first time that *L. pneumophila* prevents the proliferation of its host. Our work identifies a novel CDK of *A. castellanii* and shows that *Legionella* perturbs host proliferation, DNA replication and amoebal morphology during infection. Regulation of the host cell cycle contributes to the impressive list of the eukaryotic functions that are perturbed by *L. pneumophila*. We are currently attempting to decipher the signaling pathway responsible for *A. castellanii* cell cycle arrest and the bacterial effectors which mediate this effect during infection.

Methods

Strains, media and culture conditions. *A. castellanii* ATCC 30010 and ATCC 30234 were cultured in Peptone Yeast Glucose medium (2% proteose peptone, 0.1% yeast extract, 0.1 M glucose, 4 mM MgSO₄, 0.4 mM CaCl₂, 0.1% sodium citrate dehydrate, 0.05 mM Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ 6H₂O, 2.5 mM NaH₂PO₃, 2.5 mM K₂HPO₃, pH 6.5) at 30 °C.

To induce encystation, *A. castellanii* were incubated in encystation buffer (0.1 M KCl, 8 mM MgSO₄, 0.4 mM CaCl₂, 20 mM Tris (2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol), 1 mM NaHCO₃, pH 8.8) at 30 °C for 24 h⁴⁷.

L. pneumophila strains were cultured on buffered charcoal yeast extract (BCYE) (1% ACES, 1% yeast extract, 0.2% charcoal, 1.5% agar, 0.025% Iron (III) pyrophosphate, 0.04% L-cysteine, pH 6.9) agar plate. For *L. pneumophila* Paris strains, 0.1% alpha-ketoglutarate was added to medium. Bacteria were cultured on BCYE at 37 °C for 3 days. Then, bacteria were inoculated at the optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of 0.1 in Buffered Yeast Extract (BYE) at 37 °C under agitation 160 rpm to reach OD₆₀₀ above 2.3.

Different strains of *L. pneumophila* were used as *L. pneumophila* Paris CIP 107629T⁸ and *L. pneumophila* Lens CIP108286⁸. The $\Delta dotA$ mutant of *L. pneumophila* Paris (resistant to the kanamycin (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$)) was a gift of Carmen Buchrieser from Institut Pasteur (Paris, France)⁴⁸. *E. coli* K12 (ATCC 10798) was cultured on Lysogeny Broth (LB) medium at 37 °C under agitation at 160 rpm.

S. cerevisiae strains were cultured in minimal YNB medium (yeast nitrogen base with ammonium sulfate and 2% glucose) supplemented with the appropriate amino acids and bases, or complete YPGal medium (1% yeast extract, 1% peptone, 2% galactose) at 28 °C unless otherwise indicated. Yeast strains used in this study are Y10000 (BY4742; *MAT α ura3 Δ 0leu2 Δ 0 his3 Δ 1 lys2 Δ 0*) and Y838 (*cdc28-4 ura3-52 lys2-801 leu2 Δ 1 his3 Δ 200*).

Bacterial transformation. *L. pneumophila* Paris in exponential phase were washed with 10% cold glycerol solution and centrifuged (6000 g, 10 min at 4 °C). Pellets were washed in 20, 10 and 5 mL of 10% cold glycerol solution. Bacteria were re-suspended in 10% cold glycerol solution to reach an OD₆₀₀ of 100. Electroporation was performed with the plasmid pSW001⁴⁹ for bacteria producing the DsRed Fluorescent Protein and with pNT28 built from the plasmid pMMB207-Km14-GFPc⁵⁰ for bacteria producing the Green Fluorescent Protein (GFP). One μg of plasmid and 100 μL of bacterial suspension were mixed. Electroporation was performed by using the EC2 programm (2.50 kV, 1 pulse) of the MicroPulsar apparatus (Biorad). After the electroporation, 900 μL of liquid BYE were added to the bacteria followed by an incubation at 37 °C without agitation for two hours. Suspension was spread on BCYE supplemented with chloramphenicol (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and the petri dishes were incubated at 37 °C during 3 or 4 days. The bacteria *L. pneumophila* Paris producing the DsRed and the GFP proteins were named *L. pneumophila* R_EP10 and *L. pneumophila* G_EP10 respectively.

Infection of *A. castellanii*. Three days old *A. castellanii* were seeded in 24-well plates at 1×10^4 cells per well in Page's Amoeba Saline solution (PAS) (4 mM MgSO₄, 0.4 M CaCl₂, 0.1% sodium citrate dehydrate, 2.5 mM NaH₂PO₃, 2.5 mM K₂HPO₃, pH 6.5) for about 2 h at 30 °C. Once cells adhered on the plate, bacteria that reached an OD₆₀₀ above 2.3 were added to the amoebae at different multiplicity of infection. The infection was synchronized by centrifugation (500 g, 10 min at room temperature). Co-cultures were incubated 2 h at 30 °C, rinsed with PAS and cultured within the PYG medium containing gentamicin (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Plates were incubated at 30 °C.

To estimate the proliferation of *A. castellanii*, cells were harvested at different time-points and counted in triplicate for each condition using plastic counting slides FastRead 102 (Biosigma).

To obtain heat-killed *L. pneumophila*, bacteria were heated at 65 °C for 15 min.

Estimation of the cell detachment upon infection was performed by counting floating and adherent cells. The percentage of floating cells represents the number of floating cells under total cells, multiplied per 100.

Percentage of infected cells was assessed on epifluorescence microscope (Olympus BX41) using *L. pneumophila* Paris G_EP10. *A. castellanii* were seeded in 6-well plates at 1×10^6 cells/well and infection was performed with *L. pneumophila* Paris G_EP10 at MOI 20. After the infection, cells were incubated 30 min in PYG medium, and amoebae were harvested, centrifuged (500 g, 5 min at room temperature) and washed with Phosphate-Buffered Saline (PBS). Cells were fixed for 15 min with 4% paraformaldehyde at room temperature, washed twice with PBS and centrifuged. The pellet was suspended in 40 μL of CitiFluor[®] AF1 (CitiFluor) and slide were analyzed under the microscope.

Cysts were assessed by a fluorescent microscopic detection using Calcofluor White Reagent Droppers (Becton Dickinson) according manufacturer's instructions. 4.5 μL of *A. castellanii* and 0.5 μL of calcofluor were loaded on a glass slide. The mix was incubated 2 min at room temperature for staining followed by microscopic observations.

Video microscopy. *A. castellanii* 30010 (1.35×10^4 cells) were infected with *L. pneumophila* Paris G_EP10 at a MOI of 20 for 2 h in a μ -Slide 8 well IbiTreat microscopy chamber (Ibidi). Transmission images were acquired with confocal spinning disk from Andor technology mounted on an Olympus inverted IX81 microscope using Andor Ixon + 897 back illuminated EMCCD camera. Live imaging started 16 h after the end of the infection and run for around 17 h using the spinning disk confocal laser microscopy. Time lapse imaging was realized in 30 °C incubation chamber with x40 objective (512 \times 512 pixels, 0.33 $\mu\text{m}/\text{pixel}$) and 1 image every 30 seconds.

DNA synthesis. The DNA synthesis was determined using the Click-iT[®] EdU Imaging Kits (Invitrogen[™]) following manufacturer's recommendations with some modifications. Briefly, 1×10^6 *A. castellanii* cells were infected with *L. pneumophila* Paris R_EP10 at MOI 20 in 6-well plates. After infection period, EdU (40 μM) was added to the PYG medium supplemented with gentamicin (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 4 h. Amoebae were harvested and centrifuged (1000 g, 10 min at room temperature) before fixation for 15 min at room temperature with 3.7% paraformaldehyde. Amoebae were washed twice with 1 mL of washing solution (3% bovine serum albumin (BSA) (Sigma)) in PBS and lysed for 20 min at room temperature with 1% Triton[®] X-100 (Sigma). After two additional washes, 0.5 mL of Click-iT[®] reaction cocktail (according to the manufacturer's instructions) was added to the pellet and incubated 1 h protected from the light. For DNA staining, amoebae were washed with 1 mL of PBS, treated with TO-PRO[®]-3 Iodide (dilution of 1:1000) and incubated for 1 h at room temperature in the dark. Amoebae were washed for the last time with PBS and suspended in washing buffer for analysis.

A. castellanii were examined with a laser scanning confocal microscope (FluoView-1000, Olympus) coupled to an inverted microscope IX-81 (Olympus). Images were obtained with an Olympus UPLSAPO 60X W NA: 1.2 and zoom x2 (800 \times 800 pixels, 0.13 $\mu\text{m}/\text{pixel}$). Samples were excited with 488/500–530 nm excitation/emission filters for EdU staining, 543/555–625 nm for bacteria producing DsRed and 633/LP650 nm for Topro-3 nuclear staining. Multiple fluorescence signals were acquired sequentially to avoid cross-talk between colour channels. For 3D acquisition, optical sectioning of the specimen (Z series) was driven by a Z-axis stepping motor and maximum intensity projection was further generated.

Extraction and purification of RNA. 1×10^6 cells of *A. castellanii* were infected with *L. pneumophila* Paris at a MOI of 20 for 2 h in 6-well plates. After the infection (0 h), cells were harvested for RNA extraction at different time points 2 h, 16 h and 24 h. To increase the efficiency of the cell lysis, RNA extractions were preceded by a mechanical cell lysis using a FastPrep[®]-24 Instrument (MP) for 30 seconds at a speed of 5.0 (twice) with FastPrep Tubes containing glass beads 150–212 μm (Sigma). RNA extraction was performed using the High Pure RNA Isolation Kit (Roche).

An additional digestion of residual DNA was performed with Turbo DNA-free[™] kit (Ambion[®]) according to manufacturer's instructions.

Reverse transcription (RT) and quantitative PCR (qPCR). Reverse transcription of RNA was performed using GoScript[™] Reverse Transcription System (Promega) following manufacturer's recommendations. Products of reverse transcription (RT) were purified with NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel). All cDNA were normalized (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) before proceeding to qRT-PCR reaction. All qPCR reactions were performed using the LightCycler[®] FastStart DNA Master^{plus} SYBR Green I kit (Roche) on the LightCycler 1.5 instrument (Roche). Each tube contained 9 μL of reaction mix containing 0.5 μL of each primers CDC2b (XM_004353658.1) (5' ATGCAAGCCAAACCCAGTC 3' and reverse: 5' GAATCGCTGGTCTCGGTATC 3') or 18S primers⁵¹ at 10 μM , 2 μL of Master Mix 5X, 6 μL of water and 1 μL of cDNA or 1 μL of water for negative control. The qPCR program was: 10 min at 95 °C and 45 cycles of the amplification step (10 sec at 95 °C, 10 sec at 61 °C and 10 sec at 72 °C for extension time in a single acquisition mode), the melting curves step for 1 min at 65 °C for annealing and the cooling 30 seconds at 40 °C. The relative level of genes expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method⁵². Expression level were normalized to the 18S mRNA.

Phylogenetic analysis. To construct the phylogenetic tree, proteins were aligned using MUSCLE of the software MEGA6 with a Maximum likelihood and a bootstrap replications of 1000.

***A. castellanii* CDC2b cloning.** The *CDC2b* (XM_004353658.1) cDNA from *A. castellanii* was amplified by PCR from total cDNA with flanking BamHI and XbaI restriction sites using primers ACA-cdc2b-5' (TTTTTTTGGATCCTACACAATGCAAGCCAAACCCAGTCC) and ACA-cdc2b-3'-STOP (TTTTTTTCTAGATTAGGGTACTTGGTCTTGTC) and inserted between BamHI and XbaI sites of the *S. cerevisiae* expression plasmid pYES2-CT (Invitrogen), yielding pWA-cdc2b-Ac. Plasmid DNA was prepared with a NucleoSpin Plasmid kit (Macherey-Nagel).

Yeast transformation of Y838 was done by the Li Acetate method as described by Gietz and Woods⁵³. This strain is temperature sensitive for growth (ts^-) due to a deficient *CDC28* gene product. Transformants were selected at the permissive temperature (28 °C) on YNB medium supplemented with adequate amino acids and bases. For complementation assays of the *cdc28-4ts^-* phenotype, transformants were streaked on YPGal medium and incubated at the indicated temperature (30 °C, 34 °C or 37 °C) for 4 days.

Statistical analyses. All experiments were performed three times. Results were analyzed by Two-way RM ANOVA with the Bonferroni post-test (GraphPad Prism5) or using a one-tailed Mann-Whitney test considering a statistical significance at $p \leq 0.05$. All data are average of three independents experiments and error bars represent the standard error of the mean (\pm SEM).

References

- Borella, P. *et al.* Legionella infection risk from domestic hot water. *Emerging infectious diseases* **10**, 457–464, doi: 10.3201/eid1003.020707 (2004).
- Fields, B. S., Benson, R. F. & Besser, R. E. Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clinical microbiology reviews* **15**, 506–526 (2002).
- Rowbotham, T. J. Preliminary report on the pathogenicity of Legionella pneumophila for freshwater and soil amoebae. *Journal of clinical pathology* **33**, 1179–1183 (1980).
- Greub, G. & Raoult, D. Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clinical microbiology reviews* **17**, 413–433 (2004).
- Isaac, D. T. & Isberg, R. Master manipulators: an update on Legionella pneumophila Icm/Dot translocated substrates and their host targets. *Future microbiology* **9**, 343–359, doi: 10.2217/fmb.13.162 (2014).
- Lifshitz, Z. *et al.* Computational modeling and experimental validation of the Legionella and Coxiella virulence-related type-IVB secretion signal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, E707–715, doi: 10.1073/pnas.1215278110 (2013).
- Zhu, W. *et al.* Comprehensive identification of protein substrates of the Dot/Icm type IV transporter of Legionella pneumophila. *PloS one* **6**, e17638, doi: 10.1371/journal.pone.0017638 (2011).
- Cazalet, C. *et al.* Evidence in the Legionella pneumophila genome for exploitation of host cell functions and high genome plasticity. *Nat Genet* **36**, 1165–1173, doi: 10.1038/ng1447 (2004).
- Harashima, H., Dissmeyer, N. & Schnittger, A. Cell cycle control across the eukaryotic kingdom. *Trends in cell biology* **23**, 345–356, doi: 10.1016/j.tcb.2013.03.002 (2013).
- Reed, S. I. & Wittenberg, C. Mitotic role for the Cdc28 protein kinase of Saccharomyces cerevisiae. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**, 5697–5701 (1990).
- Santamaria, D. *et al.* Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. *Nature* **448**, 811–815, doi: 10.1038/nature06046 (2007).
- Jantzen, H. & Schulze, I. Growth condition-induced precocious activation of p34cdc2 kinase inhibits the expression of developmental competence. *Developmental biology* **166**, 311–322, doi: 10.1006/dbio.1994.1317 (1994).
- Clarke, M. *et al.* Genome of Acanthamoeba castellanii highlights extensive lateral gene transfer and early evolution of tyrosine kinase signaling. *Genome biology* **14**, R11, doi: 10.1186/gb-2013-14-2-r11 (2013).
- Fouque, E. *et al.* Cellular, biochemical, and molecular changes during encystment of free-living amoebae. *Eukaryotic cell* **11**, 382–387, doi: 10.1128/EC.05301-11 (2012).
- Bowers, B. & Korn, E. D. The fine structure of Acanthamoeba castellanii (Neff strain). II. Encystment. *The Journal of cell biology* **41**, 786–805 (1969).

16. Chavez-Munguia, B. *et al.* Acanthamoeba castellanii cysts: new ultrastructural findings. *Parasitology research* **112**, 1125–1130, doi: 10.1007/s00436-012-3261-7 (2013).
17. El-Sayed, N. M. & Hikal, W. M. Several staining techniques to enhance the visibility of Acanthamoeba cysts. *Parasitol Res* **114**, 823–830, doi: 10.1007/s00436-014-4190-4 (2015).
18. Cao, L. *et al.* Phylogenetic analysis of CDK and cyclin proteins in premetazoan lineages. *BMC evolutionary biology* **14**, 10, doi: 10.1186/1471-2148-14-10 (2014).
19. Lim, S. & Kaldis, P. Cdk, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development* **140**, 3079–3093, doi: 10.1242/dev.091744 (2013).
20. Régnacq, M. *et al.* Identification of Atg8 from Acanthamoeba castellanii by genetic complementation in Saccharomyces cerevisiae. *Molecular and biochemical parasitology*. In press (2016).
21. Anacarso, I. *et al.* Influence of Legionella pneumophila and other water bacteria on the survival and growth of Acanthamoeba polyphaga. *Archives of microbiology* **192**, 877–882, doi: 10.1007/s00203-010-0618-0 (2010).
22. Dey, R., Bodenec, J., Mameri, M. O. & Pernin, P. Free-living freshwater amoebae differ in their susceptibility to the pathogenic bacterium Legionella pneumophila. *FEMS microbiology letters* **290**, 10–17, doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01387.x (2009).
23. Gao, L. Y. & Kwaik, Y. A. The mechanism of killing and exiting the protozoan host Acanthamoeba polyphaga by Legionella pneumophila. *Environ Microbiol* **2**, 79–90 (2000).
24. El-Etr, S. H. *et al.* Francisella tularensis type A strains cause the rapid encystment of Acanthamoeba castellanii and survive in amoebal cysts for three weeks postinfection. *Appl Environ Microbiol* **75**, 7488–7500, doi: 10.1128/AEM.01829-09 (2009).
25. Leitsch, D. *et al.* Proteomic aspects of Parachlamydia acanthamoebae infection in Acanthamoeba spp. *The ISME journal* **4**, 1366–1374, doi: 10.1038/ismej.2010.68 (2010).
26. Kilvington, S. & Price, J. Survival of Legionella pneumophila within cysts of Acanthamoeba polyphaga following chlorine exposure. *The Journal of applied bacteriology* **68**, 519–525 (1990).
27. Skinner, A. R., Anand, C. M., Malic, A. & Kurtz, J. B. Acanthamoebae and environmental spread of Legionella pneumophila. *Lancet* **2**, 289–290 (1983).
28. Bouyer, S., Imbert, C., Rodier, M. H. & Hechard, Y. Long-term survival of Legionella pneumophila associated with Acanthamoeba castellanii vesicles. *Environ Microbiol* **9**, 1341–1344, doi: 10.1111/j.1462-2920.2006.01229.x (2007).
29. Chong, A., Lima, C. A., Allan, D. S., Nasrallah, G. K. & Garduno, R. A. The purified and recombinant Legionella pneumophila chaperonin alters mitochondrial trafficking and microfilament organization. *Infection and immunity* **77**, 4724–4739, doi: 10.1128/IAI.00150-09 (2009).
30. Rothmeier, E. *et al.* Activation of Ran GTPase by a Legionella effector promotes microtubule polymerization, pathogen vacuole motility and infection. *PLoS pathogens* **9**, e1003598, doi: 10.1371/journal.ppat.1003598 (2013).
31. Simon, S. *et al.* Inter-kingdom Signaling by the Legionella Quorum Sensing Molecule LAI-1 Modulates Cell Migration through an IQGAP1-Cdc42-ARHGEF9-Dependent Pathway. *PLoS pathogens* **11**, e1005307, doi: 10.1371/journal.ppat.1005307 (2015).
32. Simon, S., Wagner, M. A., Rothmeier, E., Muller-Taubenberger, A. & Hilbi, H. Icm/Dot-dependent inhibition of phagocyte migration by Legionella is antagonized by a translocated Ran GTPase activator. *Cellular microbiology* **16**, 977–992, doi: 10.1111/cmi.12258 (2014).
33. Lamarche, N. *et al.* Rac and Cdc42 induce actin polymerization and G1 cell cycle progression independently of p65PAK and the JNK/SAPK MAP kinase cascade. *Cell* **87**, 519–529 (1996).
34. Olson, M. F., Ashworth, A. & Hall, A. An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. *Science* **269**, 1270–1272 (1995).
35. Fortier, A., Faucher, S. P., Diallo, K. & Gros, P. Global cellular changes induced by Legionella pneumophila infection of bone marrow-derived macrophages. *Immunobiology* **216**, 1274–1285, doi: 10.1016/j.imbio.2011.06.008 (2011).
36. Price, C. T. & Abu Kwaik, Y. The transcriptome of Legionella pneumophila-infected human monocyte-derived macrophages. *PloS one* **9**, e114914, doi: 10.1371/journal.pone.0114914 (2014).
37. Li, T. *et al.* SET-domain bacterial effectors target heterochromatin protein 1 to activate host rDNA transcription. *EMBO reports* **14**, 733–740, doi: 10.1038/embor.2013.86 (2013).
38. Rolando, M. *et al.* Legionella pneumophila effector RomA uniquely modifies host chromatin to repress gene expression and promote intracellular bacterial replication. *Cell host & microbe* **13**, 395–405, doi: 10.1016/j.chom.2013.03.004 (2013).
39. Ma, Y., Kanakousaki, K. & Buttitta, L. How the cell cycle impacts chromatin architecture and influences cell fate. *Frontiers in genetics* **6**, 19, doi: 10.3389/fgene.2015.00019 (2015).
40. Michaelis, C. & Weeks, G. Isolation and characterization of a cdc 2 cDNA from Dictyostelium discoideum. *Biochimica et biophysica acta* **1132**, 35–42 (1992).
41. Collingro, A. *et al.* Chlamydial endocytobionts of free-living amoebae differentially affect the growth rate of their hosts. *Eur J Protistol* **40**, 57–60 (2004).
42. Nougayrede, J. P., Taieb, F., De Rycke, J. & Oswald, E. Cyclomodulins: bacterial effectors that modulate the eukaryotic cell cycle. *Trends in microbiology* **13**, 103–110, doi: 10.1016/j.tim.2005.01.002 (2005).
43. Oswald, E., Nougayrede, J. P., Taieb, F. & Sugai, M. Bacterial toxins that modulate host cell-cycle progression. *Current opinion in microbiology* **8**, 83–91, doi: 10.1016/j.mib.2004.12.011 (2005).
44. Huang, J., Lesser, C. F. & Lory, S. The essential role of the CopN protein in Chlamydia pneumoniae intracellular growth. *Nature* **456**, 112–115, doi: 10.1038/nature07355 (2008).
45. Iwai, H. *et al.* A bacterial effector targets Mad2L2, an APC inhibitor, to modulate host cell cycling. *Cell* **130**, 611–623, doi: 10.1016/j.cell.2007.06.043 (2007).
46. Samba-Louaka, A., Taieb, F., Nougayrede, J. P. & Oswald, E. Cif type III effector protein: a smart hijacker of the host cell cycle. *Future microbiology* **4**, 867–877, doi: 10.2217/fmb.09.60 (2009).
47. Fouque, E., Trouilhe, M. C., Thomas, V., Humeau, P. & Hechard, Y. Encystment of Vermamoeba (Hartmannella) vermiformis: Effects of environmental conditions and cell concentration. *Experimental parasitology* **145** Suppl, S62–68, doi: 10.1016/j.exppara.2014.03.029 (2014).
48. Gomez-Valero, L. *et al.* Comparative analyses of Legionella species identifies genetic features of strains causing Legionnaires' disease. *Genome biology* **15**, 505, doi: 10.1186/PREACCEPT-1086350395137407 (2014).
49. Mampel, J. *et al.* Planktonic replication is essential for biofilm formation by Legionella pneumophila in a complex medium under static and dynamic flow conditions. *Applied and environmental microbiology* **72**, 2885–2895, doi: 10.1128/AEM.72.4.2885-2895.2006 (2006).
50. Tladen, A. *et al.* The Legionella pneumophila response regulator LqsR promotes host cell interactions as an element of the virulence regulatory network controlled by RpoS and LetA. *Cellular microbiology* **9**, 2903–2920, doi: 10.1111/j.1462-5822.2007.01005.x (2007).
51. Moon, E. K., Chung, D. I., Hong, Y. C. & Kong, H. H. Autophagy protein 8 mediating autophagosome in encysting Acanthamoeba. *Molecular and biochemical parasitology* **168**, 43–48, doi: 10.1016/j.molbiopara.2009.06.005 (2009).
52. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method. *Methods* **25**, 402–408, doi: 10.1006/meth.2001.1262 (2001).
53. Gietz, R. D. & Woods, R. A. Yeast transformation by the LiAc/SS Carrier DNA/PEG method. *Methods in molecular biology* **313**, 107–120, doi: 10.1385/1-59259-958-3:107 (2006).

Acknowledgements

This work has benefited from the facilities and expertise of ImageUP platform (Université de Poitiers). We thank Anne Cantereau (STIM-ERL7368 CNRS, Université de Poitiers) for her help on analysis in microscopy. We thank Dr. Carmen Buchrieser (Institut Pasteur de Paris, France) for the gift of $\Delta dotA$ *L. pneumophila* Paris and Dr. Hubert Hilbi (Max von Pettenkofer-Institute, Germany) for the gift of plasmids expressing GFP and DsRed. We thank as well Dr. Paule Seite (Université de Poitiers, France) for her technical assistance. We gratefully acknowledge Dr. Carl Mann (Université Paris-Saclay, France) for providing the *cdc28-4* strain. We would like to thank Dr. Liliana Radoshevich (Institut Pasteur de Paris, France) for critical reading.

Author Contributions

L.M., M.R., Y.H. and A.S.-L. conceived and designed the experiments; L.M., M.R., W.A. and E.P. performed the experiments; L.M., M.R., Y.H. and A.S.-L. analyzed data; L.M., M.R., W.A. and E.P. contributed reagents/materials/analysis tools; L.M., M.R. and A.S.-L. wrote the paper.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Mengue, L. *et al.* *Legionella pneumophila* prevents proliferation of its natural host *Acanthamoeba castellanii*. *Sci. Rep.* **6**, 36448; doi: 10.1038/srep36448 (2016).

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2016

I.5. Résultats complémentaires

I.5.1. Niveau d'expression des gènes de cyclines putatives

Dans l'article ci-dessus, nous avons montré que *L. pneumophila* induit une réduction de l'expression génétique de *cdc2b*. L'activité des Cdks comme régulateurs du cycle cellulaire est dépendante des cyclines. Nous avons sélectionné deux gènes codants pour des cyclines putatives d'*A. castellanii* car présentant des homologies de séquences avec les cyclines A et B humaines. Nous avons évalué le niveau d'expression des ces ARNm à différents temps après infection. Il s'agit respectivement des gènes *ACA1_374430* (**figure 27A**) et *ACA1_377210* (**figure 27B**). Les résultats obtenus montrent que le niveau d'expression des ARNm des deux cyclines putatives est inférieur dans les amibes infectées par rapport aux amibes non-infectées aussi bien à 0 h qu'à 2 h post-infection. Les analyses statistiques par le test Two-way RM ANOVA suivie d'un post-test Bonferroni indiquent que les différences entre les conditions infectées et non infectées sont significatives (**figure 27**). Ces résultats indiquent que les gènes pouvant coder les cyclines, en plus de *cdc2b*, pourraient aussi bien être réprimés par *L. pneumophila* lors de l'arrêt du cycle cellulaire d'*A. castellanii*.

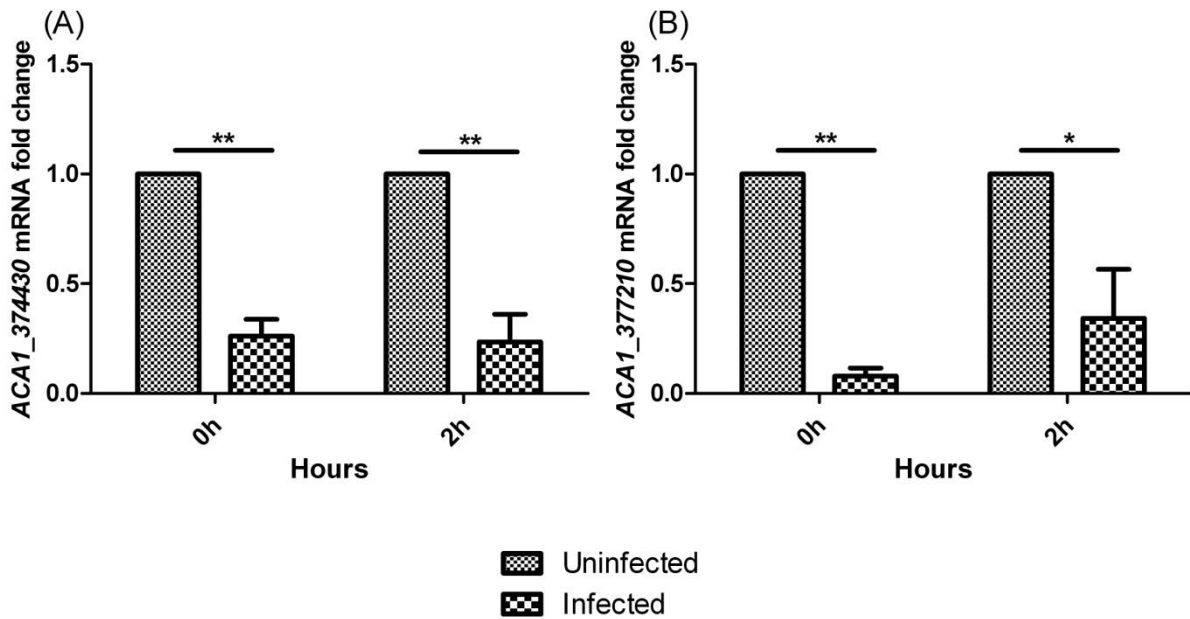


Figure 27 : Expression des gènes de cyclines putatives ACA1_374430 (A) et ACA1_377210 (B) d’*A. castellanii*. Ces gènes de cyclines putatives sont respectivement référencés sous les numéros XM_004334340.1 (A) et XM_004337582.1 (B) dans la base de donnée NCBI. *A. castellanii* ATCC 30010 a été infecté avec *L. pneumophila* Paris à MOI de 20 et l’ARN a été extrait à 0 h et 2 h post-infection. Le niveau d’expression des gènes a été normalisé avec l’ARNm 18S et l’expression des gènes des cyclines putatives a été normalisée par rapport au control. Les astérisques indiquent les différences significatives entre les conditions infectées et non infectées (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$) Two-way RM ANOVA avec un post-test Bonferroni). Les barres d’erreurs représentent l’erreur type de la moyenne « \pm SEM » de trois expériences indépendantes.

I.5.2. Mesure de la cytotoxicité et de la lyse cellulaire

Les résultats présentés dans l’article ci-dessus ont montré que *L. pneumophila* arrête le cycle cellulaire d’*A. castellanii*. Il est décrit que *L. pneumophila*, après s’être multipliée au sein des amibes, peut induire ou non des pores cytolytiques qui provoquent la lyse de la cellule et la sortie des bactéries (Chen et al., 2004; Molmeret et al., 2002a, 2002b). Une mesure de l’activité de la lactate déshydrogénase (LDH) contenue dans le milieu de croissance a été réalisée afin de vérifier si l’arrêt de prolifération observée était associé à un effet cytotoxique ou cytolitique induit par *L. pneumophila*. Pour cela, *A. castellanii* a été infecté par *L.*

pneumophila aux MOIs de 1, 5, 10 et 20. La LDH a été mesurée à 24 h et à 48 h post-infection. Pour toutes les MOIs testées, nous n'avons pas détecté de LDH dans le milieu de culture jusqu'à 48 h post-infection (**figure 28**). Ce résultat indique que l'arrêt de la prolifération d'*A. castellanii* ne serait pas dû à un effet cytolytique de *L. pneumophila*.

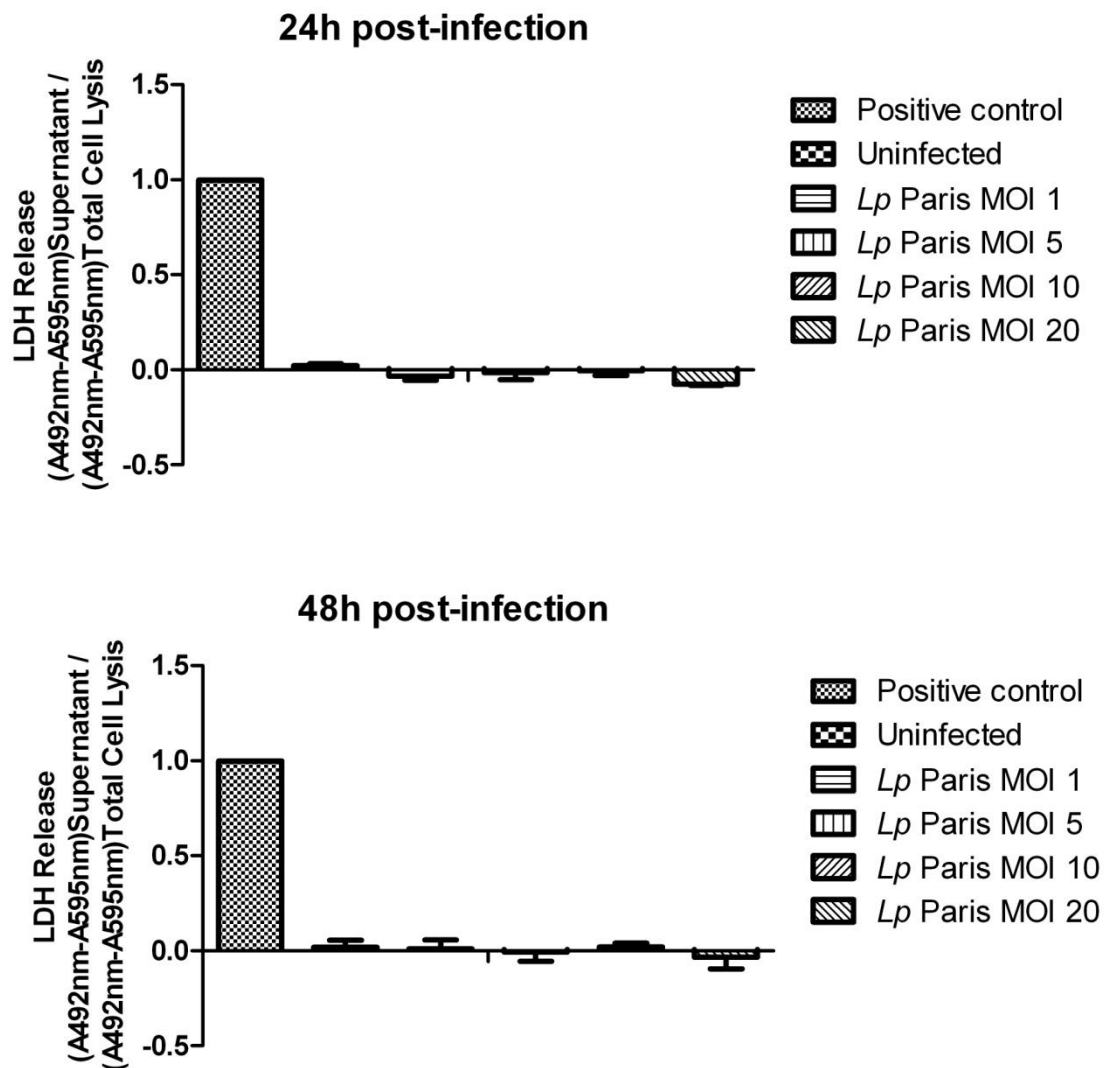


Figure 28 : Mesure de la LDH libérée par *A. castellanii* ATCC 30010 après infection par *L. pneumophila* Paris. *A. castellanii* ATCC 30010 a été infectée par *L. pneumophila* Paris aux MOIs de 1, 5, 10 et 20. Le témoin positif représente les cellules non-infectées qui ont été lysées avec le tampon de lyse avant d'être mécaniquement lysées au FastPrep. Les barres d'erreurs représentent l'erreur type de la moyenne « \pm SEM» de trois expériences indépendantes.

I.5.3. Evaluation du contenu en ADN d'*A. castellanii*

Suite à l'observation de l'arrêt de la prolifération cellulaire d'*A. castellanii* par *L. pneumophila*, nous nous sommes intéressés à évaluer le contenu en ADN de l'amibe. Pour cette étude, nous nous sommes basés sur le protocole d'extraction des noyaux décrits par Stohr et ses collaborateurs (Stohr et al., 1987). L'objectif étant de se débarrasser des mitochondries, très nombreuses dans les amibes. *A. castellanii* a été infectée par *L. pneumophila* Paris à la MOI 20. Le temps de génération d'*A. castellanii* Neff étant de 7h environ, les cellules ont été détachées toutes les heures pendant 9h et les noyaux ont été extraits. Nous avons commencé la cinétique 16h après l'infection. L'ADN a été marqué à l'iodure de propidium et a été mesuré par cytométrie en flux. Les résultats sont présentés sous la forme de pics d'histogrammes correspondants au nombre d'évènements en fonction de l'intensité de fluorescence de l'iodure de propidium (**figure 29**). L'intensité de fluorescence mesurée est proportionnelle à la quantité d'ADN présent dans l'échantillon. Nous n'avons observé qu'un pic d'intensité d'ADN pour chaque condition (infectés et non infectés). La différence de taille des pics vient du fait qu'il y avait moins de cellules acquises et analysées en conditions d'infection par rapport au contrôle non-infecté. En effet, la cinétique ayant commencé 16 h après l'infection, les amibes non infectées continuaient de proliférer tandis que les amibes infectées ne se multipliaient plus. Au début de la cinétique, l'intensité de fluorescence de l'iodure de propidium est la même dans les deux conditions. Nous avons commencé à observer une différence d'intensité de fluorescence 3 h et 30 minutes plus tard. Le pic de fluorescence était décalé vers la droite, donc était plus intense. Cette différence est devenue plus nette à partir de 5 h et 30 minutes et est restée inchangée jusqu'à 9 h. L'intensité de fluorescence de l'iodure de propidium augmentait au cours du temps, ce qui indique une augmentation de la quantité d'ADN dans l'échantillon. Précédemment, l'analyse de l'incorporation de l'EdU, avait révélé que l'ADN n'était pas synthétisé de novo au sein des

cellules infectées. Nous avons alors procédé à une vérification de nos échantillons au microscope. *A. castellanii* ATCC 30010 a été infectée par *L. pneumophila* Paris G_EP10, exprimant la GFP. Nous avons procédé à l'extraction des noyaux comme lors de la préparation de nos échantillons pour la cytométrie en flux. En observant les noyaux au microscope, nous avons observé une grande quantité de bactéries (données non présentées). L'augmentation de la quantité d'ADN observé en cytométrie, serait le résultat d'une contamination de l'ADN d'*A. castellanii* par de l'ADN issu de *L. pneumophila* qui a continué de se répliquer dans les vacuoles répliquatives. Il en résulte alors une quantité de bactéries plus élevée et donc une quantité d'ADN plus élevée. Le fait que nous ayons observé un seul pic de fluorescence tout au long cette cinétique, confirme la prédominance d'une seule phase dans le cycle cellulaire d'*A. castellanii* ATCC 30010. En effet, Stohr et ses collaborateurs avaient observé que, le cycle cellulaire d'*A. castellanii* Neff était majoritairement constitué de la phase G2 (plus de 90% de la durée totale du cycle) et d'une phase S et M très courte (Stohr et al., 1987). Dans notre cas, le pic de fluorescence observé pourrait correspondre à des cellules en phase G2, confirmant ainsi les précédentes observations de Stohr et ses collaborateurs.

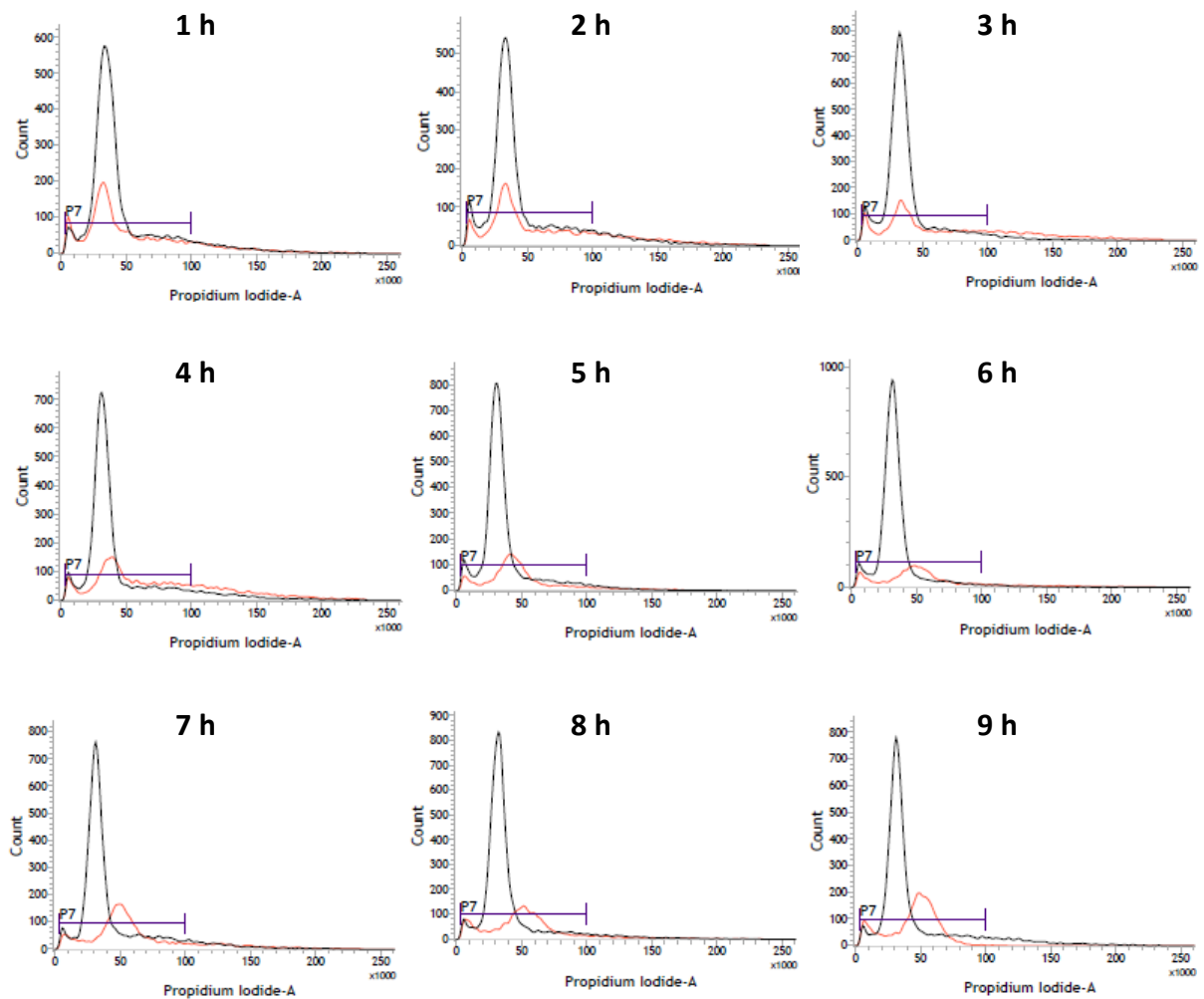


Figure 29 : Intensité de fluorescence correspondant au contenu en ADN d'*A. castellanii*. *A. castellanii* ATCC 30010 a été infectée par *L. pneumophila* Paris à MOI 20. Environ 16 h post-infection, les noyaux ont été extraits toutes les heures pendant 9 h. Les noyaux ont été marqués à l'iodure de propidium et analysés par cytométrie en flux. Les profils représentatifs du contenu en ADN d'*A. castellanii* infecté par *L. pneumophila* (rouge) et d'*A. castellanii* en culture seule (noir) sont indiqués.

II. Effet de *L. pneumophila* sur l'enkystement d'*A. castellanii*

Nous avons remarqué dans les résultats précédents, que *L. pneumophila*, en plus d'arrêter la prolifération d'*A. castellanii*, modifiait la forme de son hôte. Les amibes infectées étaient plutôt arrondies comparées aux amibes non infectées. En réponse au stress, *Acanthamoeba* se différencie en une forme plus petite et plutôt arrondie appelée kyste. Nous avons donc marqué ces cellules au calcofluor, un marqueur fluorescent qui a la capacité de se lier à la cellulose et à la chitine. L'analyse a révélé que ces cellules arrondies suite à l'infection n'étaient pas des kystes. Durant cette expérience, l'amibe *A. castellanii* était dans un milieu de croissance. Nous nous sommes demandé si en milieu de carence, les amibes infectées pouvaient s'enkyster. Nous avons par conséquent utilisé la carence comme stress pour stimuler l'enkystement. Les amibes *A. castellanii* ATCC 30010 ont été infectées avec *L. pneumophila* Paris R_EP10, exprimant la DsRed. Après l'infection, les amibes ont été incubées dans du tampon d'enkystement (milieu carencé) pendant 24 h, puis nous avons marqué les cellules au calcofluor pour révéler les kystes. Les cellules co-cultivées avec *L. pneumophila* ne s'étaient pas toutes enkystées. Nous avons observé des kystes pour la quasi-totalité des cellules d'*A. castellanii* en culture seule. Par contre, en condition de co-culture avec *L. pneumophila*, nous avons observé un mélange composé de kystes et de cellules non enkystées. Ces cellules qui ne se sont pas enkystées contenaient des bactéries tandis que les kystes n'en contenaient pas (**figure 30**). Ces résultats suggèrent que l'infection par *L. pneumophila* entraverait la capacité d'*A. castellanii* à s'enkyster en réponse au stress.

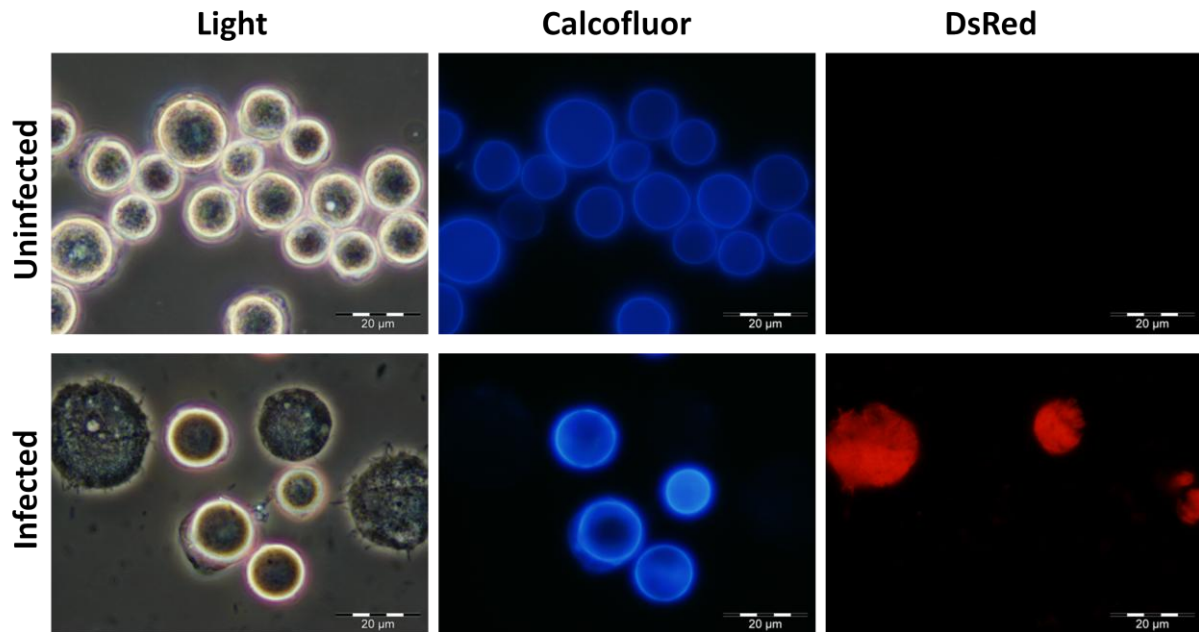


Figure 30 : Kystes d'*A. castellanii* marqué au calcofluor. *A. castellanii* ATCC 30010 a été infectée par *L. pneumophila* Paris R_EP10 à MOI 20. Après l'infection, les cellules ont été incubées dans le tampon d'enkystement pendant 24 heures à 30°C. Les cellules d'*A. castellanii* sont visibles en lumière transmise, les kystes d'*A. castellanii* marqués au calcofluor sont marqués en bleu et *L. pneumophila* Paris R_EP10 exprimant la DsRed en rouge.

III. Effets de *L. pneumophila* sur la vélocité d'*A. castellanii*

Nous avons observé une diminution de la mobilité et un détachement des cellules d'*A. castellanii* lorsque celles-ci étaient infectées par *L. pneumophila*. Dans cette partie, nous avons quantifié cet effet et décrit les changements phénotypiques qui pourraient y être associés.

Publication 2: *Legionella pneumophila* decreases velocity of *Acanthamoeba castellanii*

Cet article traite de l'effet de *L. pneumophila* sur la mobilité d'*A. castellanii*. Pour cela, *A. castellanii* ATCC 30010 a été infecté par *L. pneumophila* Paris à MOI 20. Après l'infection, les cellules ont été suivies pendant environ 16 h par vidéo-microscopie. Les images recueillies ont permis d'analyser la trajectoire des cellules et leur vélocité. Les résultats indiquent que l'infection par *L. pneumophila* diminue la vélocité et modifie la trajectoire d'*A. castellanii*. L'analyse au microscope électronique à balayage montre une diminution des acanthopodes à la surface des amibes co-cultivées avec *L. pneumophila*. En marquant l'actine par la phalloïdine, nous avons semblé observer moins d'extensions filamenteuses dans les extensions des amibes infectées par rapport aux amibes non infectées. Les résultats n'étant pas conséquents, nous avons décidé de ne pas les associer à la publication.

Les acanthopodes sont essentiels à l'adhérence et à la locomotion d'*A. castellanii*. La diminution de vélocité observée pourrait être causée par les changements morphologiques induisant une diminution des acanthopodes à la surface de la cellule.

Legionella pneumophila* decreases velocity of *Acanthamoeba castellanii

Luce Mengue, Freddie-Jeanne Richard, Yves Caubet, Steven Rolland, Yann Héchard, Ascel Samba-Louaka

Laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions, Université de Poitiers, UMR CNRS 7267, Poitiers, France.

Corresponding author:

Ascel Samba-Louaka

Laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions, UMR CNRS 7267, Université de Poitiers, 1 rue Georges Bonnet, TSA 51106, 86073 POITIERS Cedex 9.

Email : ascel.samba@univ-poitiers.fr

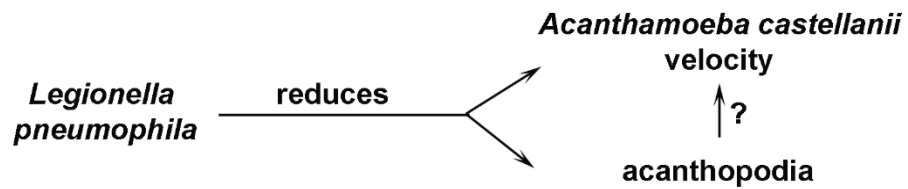
Tel : 05.49.45.40.13

Fax : 05.49.45.35.03

Highlights

- *Legionella pneumophila* reduced velocity of *Acanthamoeba castellanii*
- *Legionella pneumophila* impaired trajectometry of *Acanthamoeba castellanii*
- *Legionella pneumophila* induced a slight decrease of acanthopodia number

Graphical abstract



Abstract

Acanthamoeba castellanii is a free-living amoeba commonly found in aquatic environment. It feeds on bacteria even if some bacteria resist amoebal digestion. Thus, *A. castellanii* is described as a Trojan horse able to harbor pathogenic bacteria. *L. pneumophila* is one of the amoeba-resisting bacteria able to avoid host degradation by phagocytosis and to multiply inside the amoebae. When infecting its host, *L. pneumophila* injects hundreds of effectors via a type IV secretion system that change physiology of the amoeba to its profit. In this study, we assessed mobility of *A. castellanii* upon infection with *L. pneumophila*. Electron-microscopy analysis of amoebae revealed a reduction of acanthopodia on cells infected with *L. pneumophila*. Analysis of velocity showed that migration of *A. castellanii* infected with *L. pneumophila* was significantly impaired compare to uninfected cells. Taken together, infection with *L. pneumophila* could prevent formation of cytoplasmic extensions such as acanthopodia with consequences on the shape, adherence and mobility of *A. castellanii*.

Keywords

Acanthamoeba castellanii, acanthopodia, free-living amoeba, *Legionella pneumophila*, velocity.

1. Introduction

Amoebae of the genus *Acanthamoeba* are free-living amoebae (FLA) ubiquitous of natural and artificial aquatic environments (Marciano-Cabral and Cabral 2003). Depending on the environmental conditions, *Acanthamoeba* exhibits two states: a metabolically active form named trophozoite that differentiates, under harsh conditions, into a resting and resistant form named cyst (Fouque et al. 2012). Trophozoites exhibit spine-like structures on their membrane named acanthopodia used for surface adhesion (Bowers and Korn 1969; Preston and King 1984). *Acanthamoeba* moves using amoeboid extensions on a support (Nishigami et al. 2013). These morphological changes that look like a cell crawling are due to internal pressure of cytoplasm inducing projections of cell membrane.

Like every other protozoa, *Acanthamoeba* feed mainly by phagocytosis. In the environment, they engulf other microorganisms such as bacteria, algae, fungi or other protozoa. Several bacteria, called amoeba-resisting bacteria (ARB), have developed the ability to hijack cellular machinery in order to avoid being cleared and possibly multiply inside the host cell (Greub and Raoult 2004). This characteristic is found in *Legionella pneumophila*, a pathogenic Gram-negative bacterium living in natural and artificial aquatic environment (Borella et al. 2004). *L. pneumophila* is the causative agent of legionellosis, a pulmonary infection which can lead to death (Hilbi et al. 2011; Newton et al. 2010). Numerous studies have shown that *L. pneumophila*, when infecting its host, injects several effectors via its type IV secretion system (T4SS) that allows to modulate host's cell physiology to its own advantage (Ensminger and Isberg 2009). Thus, *L. pneumophila* was reported to inhibit migration of phagocytes (Simon and Hilbi 2015). We also recently showed that *Acanthamoeba* infected with *L. pneumophila* became rounded, less adherent and less motile (Mengue et al. 2016). However, how *L. pneumophila* impairs *Acanthamoeba* surface adhesion and cell migration remains unknown.

In the present study, we measured behavioral consequences of *Acanthamoeba* infected by *L. pneumophila*. To evaluate behavioral changes, we compared different factors linked to mobility and individual movements such as disappearance of acanthopodia on amoebae membrane.

2. Materials and methods

2.1. Strains, culture, media

The strains used in the present study were *A. castellanii* ATCC 30010 and *L. pneumophila* Paris CIP 107629T (Cazalet et al. 2004).

A. castellanii was cultured in flasks containing Peptone Yeast Glucose (PYG) medium (2% proteose peptone, 0.1% yeast extract, 0.1 M glucose, 4 mM MgSO₄, 0.4 mM CaCl₂, 0.1% sodium citrate dehydrate, 0.05 mM Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ 6H₂O, 2.5 mM NaH₂PO₃, 2.5 mM K₂HPO₃, pH 6.5) incubated at 30°C for 3 days (Mengue et al. 2016).

L. pneumophila Paris was cultured in Buffered Charcoal Yeast Extract agar plate (BCYE) medium (1% ACES, 1% yeast extract, 0.2% charcoal, 1.5% agar, 0.025% Iron (III) pyrophosphate, 0.04% L-cysteine, 0.1% alpha-ketoglutarate, pH 6.9) at 37°C for 3 days.

Infection experiments were performed as previous described (Mengue et al. 2016). Briefly, *A. castellanii* was infected by *L. pneumophila* at multiplicity of infection (MOI) of 20 for 2 h in Page's Amoeba Saline (PAS) solution (4 mM MgSO₄, 0.4 M CaCl₂, 0.1% sodium citrate dehydrate, 2.5 mM NaH₂PO₃, 2.5 mM K₂HPO₃, 0.05 mM Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ 6H₂O, pH 6.5). After the infection, cells were washed and incubated in growth medium supplemented with 20 µg/mL gentamicin at 30°C.

2.2. Time lapse microscopy

A. castellanii (4.5x10³ cells) were infected with *L. pneumophila* at a MOI of 20 in one µ-Slide 8 well IbiTreat microscopy chamber (Ibidi). As control, uninfected *A. castellanii* were also maintained in the PAS solution for 2 h before being incubated in the PYG growth medium containing gentamicin. Live imaging started at the end of infection (or after incubation within the PAS) for about 15 h and was performed as described previously (Mengue et al. 2016).

2.3. Scanning electron microscopy

A. castellanii was infected with *L. pneumophila* at a MOI of 20. Fifteen hours after the infection, cells were harvested and treated for observations by scanning electron microscopy. Briefly, cells were harvested by centrifugation (500 g, 10 min). First, cells were fixed with 2.5% glutaraldehyde, in phosphate buffer, for 1h. Then, cells were washed with phosphate buffer for 2 min and centrifuged. Cells were dehydrated in a 70% acetone bath for 5 min, followed by incubation in 90% acetone for 10 min and in 100% acetone for 15 min. Cells were impregnated for 2h of incubation with resin (1volume/1volume) (Epon812) and propylene oxide. Semi-thin and ultra-thin cuts using a microtome were performed followed by metallization. Cells were observed with a scanning electron microscopy (JEOL 5600Lv) at 20 kV.

2.4. Trajectory analysis

The trajectory of *A. castellanii* was assessed from data obtained in time lapse microscopy. Five independent videos of *A. castellanii* movements were analyzed for infected and uninfected individuals. We used the AfterEffect software (Adobe CS4) to identify each *A. castellanii* and to follow their trajectory with automatized video analysis. The *A. castellanii* cells were identified by individual color mark from their apparition until they disappear from the camera screen. The trajectory of each *A. castellanii* was drawn frame by frame for the whole sequence. The modified video was analyzed with the software Noldus (Ethovision XT 12) in order to track the center point of each amoeba and calculate mobility statistics such as velocity and distance. In total, out of the ten movies, we marked and followed 155 amoebae: 78 infected and 77 uninfected individuals.

To compare individual trajectory, we used four dependent variables. Velocity is characterized by the distance move by the center point of the individual per unit time. Heading is the direction of movement of the center of the current individual relative to the line parallel to the x axis in the coordinate system (Heading range from -180°C to +180°C). Turn angle is the change in direction of the center between two consecutive samples. Turn angle is calculated as a difference between two subsequent values of Heading of the specified body point. Absolute Meander is the change in direction, unsigned, of movement of an individual relative to the distance moved by that subject. It provides an indication of how convoluted the

individual's trajectory is. Meander is calculated from the turn angle of the center of the body point divided by the moved distance.

2.5. Statistics

Experiments of time lapse microscopy were performed five times. Results of velocity of *A. castellanii* were analyzed using t-test (Statistica 6). We used mean \pm SEM to express data of Velocity mean ($\mu\text{m}/\text{sec}$), Velocity max ($\mu\text{m}/\text{sec}$), Meander ($\text{degree}/\mu\text{m}$) and Turn angle (degree).

3. Results

3.1. *L. pneumophila* impairs trajectometry of *A. castellanii*

A previous study reported that *L. pneumophila* induced a decrease of *Acanthamoeba* surface-adherence and motility (Mengue et al. 2016). In order to quantify the difference in velocity between infected and uninfected cells, time lapse microscopy experiments were performed over 15h. Analysis of velocity indicated that velocity mean of uninfected and infected cells were respectively 0.338 and 0.250 $\mu\text{m}/\text{sec}$ (Fig. 1). *L. pneumophila* infection induced a significant decrease of *Acanthamoeba* velocity, around one third both for velocity mean and the velocity maximum.

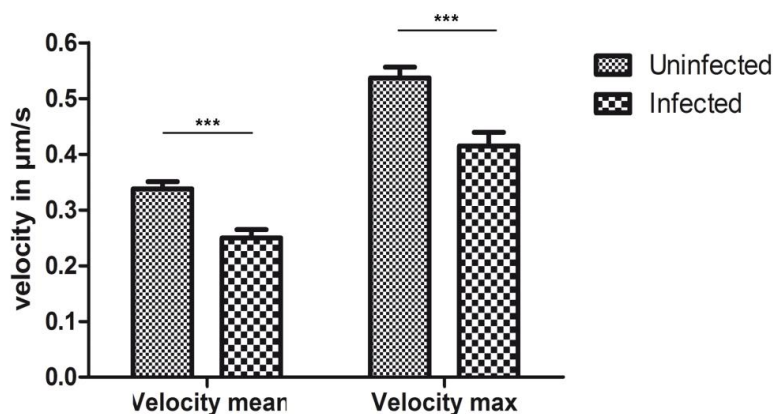


Fig. 1: Velocity mean and Velocity maximum of uninfected and infected *A. castellanii*

A. castellanii were infected with *L. pneumophila* at a MOI of 20 and time-lapse microscopy was performed for 15 h. Velocity represents the distance move by amoebae per unit time. The graph shows means and standard errors of the mean. *** represent $p < 0.0001$ for the velocity mean (t-test: $t = -4.49$; $df = 153$) and for the velocity maximum (t-test: $t = -3.99$; $df = 153$).

Moreover, *L. pneumophila* infection also impaired trajectory convolution, as infected individuals performed significantly less turn angle (respectively 2.24 ± 0.17 degree and 2.83 ± 0.21 degree; t test: $t = -2.14$; $df = 153$; $p < 0.05$) (Fig. 2). However, meander means of infected and uninfected individuals are not significantly different (respectively 2.49 ± 0.48 degree/ μm and 1.60 ± 0.19 degree/ μm ; t test: $t = 1.68$; $df = 153$; $p < 0.05$). *L. pneumophila* modified trajectometry of *A. castellanii*.

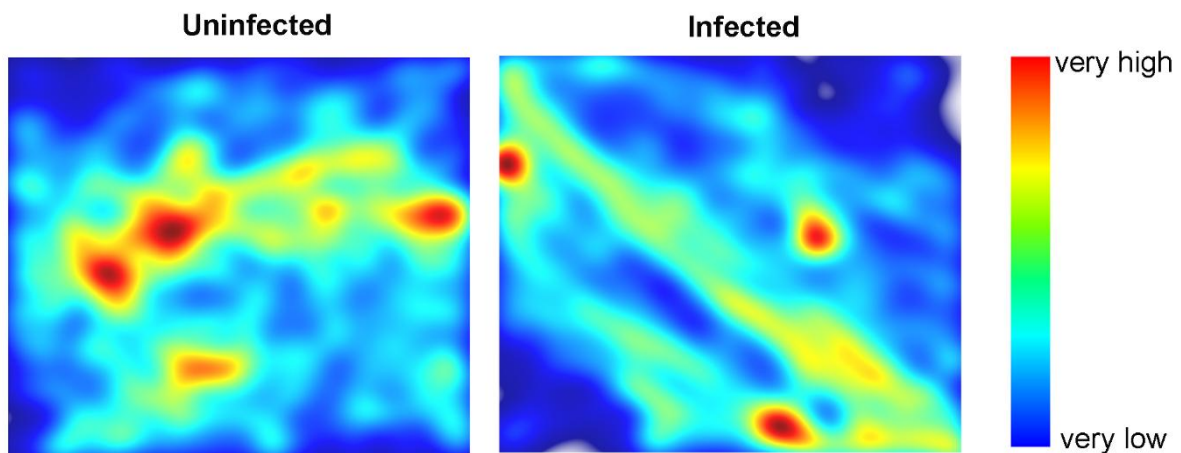


Fig. 2: Trajectory convolution of uninfected and infected *A. castellanii*

Heat maps represent *Acanthamoeba* cumulated trajectory of uninfected cells (left) and *A. castellanii* infected with *L. pneumophila* (right) (respectively $N=77$ and $N=78$). Blue and red denote, respectively, area with very low and very high passing.

3.2. *L. pneumophila* induces a slight decrease of acanthopodia number

In order to identify how *L. pneumophila* impairs *A. castellanii* velocity, morphological changes were assessed on scanning electron microscopy. Compared to uninfected cells,

infection with *L. pneumophila* seemed to induce a slight decrease of acanthopodia number (Fig. 3). *L. pneumophila* modified the shape of the amoeba *A. castellanii*.

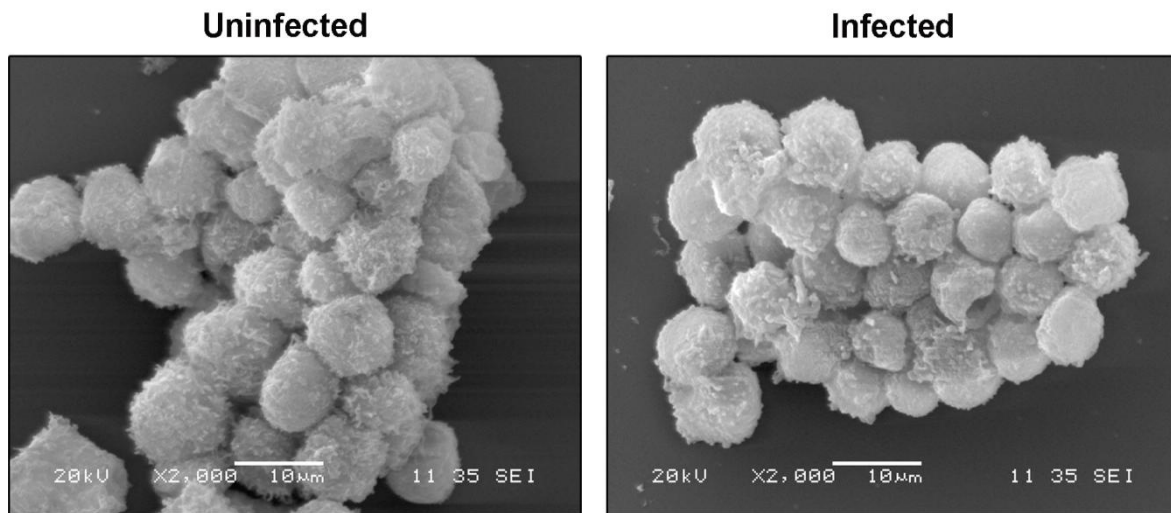


Fig. 3: Acanthopodia of uninfected and infected *A. castellanii*

A. castellanii were co-cultured with *L. pneumophila* for 2 h at a MOI of 20 and amoebae were incubated for 15 h. Acanthopodia were observed on scanning electron microscopy and secondary electron imaging (SEI) parameters were as follows: 20 KV, 11 mm for working distance, 35 nm objective lens aperture and a magnification of x 2000.

4. Discussion

In the current study, we showed that *L. pneumophila* induces a reduction of acanthopodia that is associated to a decrease of *A. castellanii* velocity. Our results on *Acanthamoeba* are in line with another study that has shown that *L. pneumophila* impaired cell migration of phagocytes such as the social amoeba *Dictyostelium discoideum*, macrophages or polymorphonuclear neutrophils (Simon et al. 2014).

Regarding the speed of mobility of uninfected *Acanthamoeba* in our study, we found 0.338 $\mu\text{m}/\text{sec}$. A previous report estimated an *Acanthamoeba* locomotory rate at 0.8 $\mu\text{m}/\text{sec}$ (Preston et al. 2001). Several parameters can explain the difference between the two studies. Preston and colleagues worked on an environmental fresh isolate that grew feeding *Escherichia coli*

and/or *Aeromonas hydrophila*. They performed their locomotory experiment under Volvic mineral water that have a specific conductivity at 22°C (Preston et al. 2001). This latter could affect motility as concentration of electrolytes was shown to modify both *Acanthamoeba* adhesion and motility (Preston and King 1984). Here, we worked with an axenic strain moving under a PYG medium at 30°C. Our findings suggest that differences in nutrient availability could impact on *A. castellanii* velocity.

Reduction of acanthopodia has been observed under the encystation process (Chavez-Munguia et al. 2013). However, our previous work showed that the reduction of acanthopodia upon *L. pneumophila* infection was not related to formation of cysts (Mengue et al. 2016). The biological relevance of host cell shape modification by *L. pneumophila* remains to explore.

Endosymbiotic chlamydiae removal in *Acanthamoeba* induced changes in the amoebal mobility (Okude et al. 2012). Actin protein is abundant within *A. castellanii* cytoplasmic projection (Gonzalez-Robles et al. 2013). Thus, the slightly reduction of the number of acanthopodia on *A. castellanii* membrane as well as the decrease of their velocity are in accordance with reduction of F-actin (Liu et al. 2017) and with the host cytoskeleton disturbance by *L. pneumophila* (Guo et al. 2014; Rothmeier et al. 2013).

5. Conclusion

In the present study, we found that *Acanthamoeba* infected by *L. pneumophila* undergo a reduction of its velocity. This decreased mobility was associated to a slight disappearance of acanthopodia on the amoeba membrane. As adhesion and de-adhesion cycles are necessary for *Acanthamoeba* migration, disappearance of acanthopodia in infected cells could explain the lack of adherence and velocity.

Acknowledgments

We thank Anne CANTEREAU (STIM-ERL7368 CNRS, Université de Poitiers) for her help on analysis in video microscopy. We thank as well Emile BERE (LNEC UMR S1084, Université de Poitiers) for his assistance on scanning electron microscopy experiments. This work has benefited from the facilities and expertise of ImageUP platform (Université de Poitiers). We acknowledge Gilles BOSQUET for his help with the use of the software Aftereffect.

The funding is partly granted by the following 2015-2020 programs: the State-Region Planning Contracts (CPER) and the European Regional Development Fund (FEDER).

References

- Borella P, et al. (2004) Legionella infection risk from domestic hot water. *Emerging infectious diseases* 10(3):457-64 doi:10.3201/eid1003.020707
- Bowers B, Korn ED (1969) The fine structure of *Acanthamoeba castellanii* (Neff strain). II. Encystment. *The Journal of cell biology* 41(3):786-805
- Cazalet C, et al. (2004) Evidence in the *Legionella pneumophila* genome for exploitation of host cell functions and high genome plasticity. *Nature genetics* 36(11):1165-73 doi:10.1038/ng1447
- Chavez-Munguia B, Salazar-Villatoro L, Lagunes-Guillen A, Omana-Molina M, Espinosa-Cantellano M, Martinez-Palomo A (2013) *Acanthamoeba castellanii* cysts: new ultrastructural findings. *Parasitology research* 112(3):1125-30 doi:10.1007/s00436-012-3261-7
- Ensminger AW, Isberg RR (2009) *Legionella pneumophila* Dot/Icm translocated substrates: a sum of parts. *Current opinion in microbiology* 12(1):67-73 doi:10.1016/j.mib.2008.12.004
- Fouque E, Trouilhe MC, Thomas V, Hartemann P, Rodier MH, Hechard Y (2012) Cellular, biochemical, and molecular changes during encystment of free-living amoebae. *Eukaryotic cell* 11(4):382-7 doi:10.1128/EC.05301-11
- Gonzalez-Robles A, Salazar-Villatoro L, Omana-Molina M, Lorenzo-Morales J, Martinez-Palomo A (2013) *Acanthamoeba royreba*: morphological features and in vitro cytopathic effect. *Experimental parasitology* 133(4):369-75 doi:10.1016/j.exppara.2013.01.011
- Greub G, Raoult D (2004) Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clinical microbiology reviews* 17(2):413-33
- Guo Z, Stephenson R, Qiu J, Zheng S, Luo ZQ (2014) A *Legionella* effector modulates host cytoskeletal structure by inhibiting actin polymerization. *Microbes and infection* 16(3):225-36 doi:10.1016/j.micinf.2013.11.007
- Hilbi H, Hoffmann C, Harrison CF (2011) *Legionella* spp. outdoors: colonization, communication and persistence. *Environmental microbiology reports* 3(3):286-96 doi:10.1111/j.1758-2229.2011.00247.x
- Liu Y, Zhu W, Tan Y, Nakayasu ES, Staiger CJ, Luo ZQ (2017) A *Legionella* Effector Disrupts Host Cytoskeletal Structure by Cleaving Actin. *PLoS pathogens* 13(1):e1006186 doi:10.1371/journal.ppat.1006186

- Marciano-Cabral F, Cabral G (2003) *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clinical microbiology reviews* 16(2):273-307
- Mengue L, Regnacq M, Aucher W, Portier E, Hechard Y, Samba-Louaka A (2016) *Legionella pneumophila* prevents proliferation of its natural host *Acanthamoeba castellanii*. *Scientific reports* 6:36448 doi:10.1038/srep36448
- Newton HJ, Ang DK, van Driel IR, Hartland EL (2010) Molecular pathogenesis of infections caused by *Legionella pneumophila*. *Clinical microbiology reviews* 23(2):274-98 doi:10.1128/CMR.00052-09
- Nishigami Y, et al. (2013) Reconstruction of active regular motion in amoeba extract: dynamic cooperation between sol and gel states. *PloS one* 8(8):e70317 doi:10.1371/journal.pone.0070317
- Okude M, et al. (2012) Environmental chlamydiae alter the growth speed and motility of host acanthamoebae. *Microbes and environments / JSME* 27(4):423-9
- Preston TM, King CA (1984) Amoeboid locomotion of *Acanthamoeba castellanii* with special reference to cell-substratum interactions. *Journal of general microbiology* 130(9):2317-23 doi:10.1099/00221287-130-9-2317
- Preston TM, Richards H, Wotton RS (2001) Locomotion and feeding of *Acanthamoeba* at the water-air interface of ponds. *FEMS microbiology letters* 194(2):143-7
- Rothmeier E, et al. (2013) Activation of Ran GTPase by a *Legionella* effector promotes microtubule polymerization, pathogen vacuole motility and infection. *PLoS pathogens* 9(9):e1003598 doi:10.1371/journal.ppat.1003598
- Simon S, Hilbi H (2015) Subversion of Cell-Autonomous Immunity and Cell Migration by *Legionella pneumophila* Effectors. *Frontiers in immunology* 6:447 doi:10.3389/fimmu.2015.00447
- Simon S, Wagner MA, Rothmeier E, Muller-Taubenberger A, Hilbi H (2014) Icm/Dot-dependent inhibition of phagocyte migration by *Legionella* is antagonized by a translocated Ran GTPase activator. *Cellular microbiology* 16(7):977-92 doi:10.1111/cmi.12258

Discussion

L. pneumophila est capable de moduler la physiologie de son hôte *A. castellanii* afin de garantir sa réplication intracellulaire. Les acteurs impliqués dans ces mécanismes sont des effecteurs sécrétés notamment par son système de sécrétion de type IV, appelé Dot/Icm (Finsel and Hilbi, 2015; Simon and Hilbi, 2015). Parmi les fonctions de la cellule hôte modulées par *L. pneumophila* au travers de ses effecteurs, l'impact de cette bactérie sur le cycle cellulaire de son hôte n'a pas été décrit.

Nous avons réalisé une infection d'*A. castellanii* par *L. pneumophila* et évalué la prolifération des cellules amibiennes après infection. Dans notre étude, nous avons pu montrer que *L. pneumophila* arrête le cycle cellulaire de son hôte *A. castellanii*. En effet, à travers le comptage cellulaire, la vidéo-microscopie et l'analyse de l'incorporation de l'EdU nous avons observé que les cellules d'*A. castellanii* infectées par *L. pneumophila* ne se divisaient pas et ne dupliquaient pas leur ADN. Des études précédentes ont montré un effet inhibiteur de *L. pneumophila* sur la prolifération d'*Acanthamoeba* (Anacarso et al., 2010; Dey et al., 2009). Dey et ses collaborateurs ont associé cet effet à une lyse cellulaire provoquée par *L. pneumophila* (Dey et al., 2009). Dans notre étude, nous n'avons pas observé de lyse cellulaire d'*A. castellanii* co-cultivées avec *L. pneumophila* aux MOI de 1, 5, 10 et 20, jusqu'à 48 h post-infection. Contrairement à nous, Dey et ses collaborateurs ont réalisé une co-culture d'*A. castellanii* avec *L. pneumophila* à une MOI plus élevée (MOI de 50) et ont mesuré la lyse 3 jours plus tard. Anacarso et ses collaborateurs par contre ont réalisé une co-culture à MOI de 10 et n'ont pas observé de lyse au début de l'infection (Anacarso et al., 2010). Il est décrit que *L. pneumophila* induirait la lyse de la cellule hôte après sa multiplication intracellulaire pour pouvoir en sortir et infecter un nouvel hôte (Gao and Kwaik, 2000). L'effet cytotoxique de *L. pneumophila* survient plus rapidement à MOI plus élevée (Kirby et al., 1998).

Pour déterminer si l'arrêt de la prolifération était associé à un effecteur potentiel de *L. pneumophila*, nous avons réalisé des co-cultures d'*A. castellanii* en présence de *L.*

pneumophila chauffée à 65°C pendant 15 minutes ou en présence du mutant $\Delta dotA$ de *L. pneumophila*, défectueux pour le système de sécrétion Dot/Icm. Dans les deux conditions, nous n'avons pas observé un arrêt de la prolifération d'*A. castellanii*. Par rapport à ce résultat, nous avons suggéré que l'arrêt du cycle cellulaire d'*A. castellanii* par *L. pneumophila* serait induit par un ou plusieurs effecteurs sécrétés par l'appareil de sécrétion Dot/Icm. Plusieurs études ont démontré l'implication de toxines bactériennes dans la modulation du cycle cellulaire eucaryote. Ces toxines, appelées cyclomodulines, stimulent ou inhibent le cycle cellulaire de l'hôte par des mécanismes divers (Nougayrède et al., 2005; Oswald et al., 2005). Dans notre étude, nous avons observé une diminution de l'expression de *cdc2b* (un gène probablement impliqué dans le cycle cellulaire) dans les amibes infectées. Ce gène présente des similitudes avec le gène codant la Cdk1 chez les mammifères et Cdc28 chez *S. cerevisiae*. La complémentation génétique de *S. cerevisiae* Y838 par *cdc2b* ayant permis la restauration de la croissance de ce mutant à 34°C, nous avons suggéré que *cdc2b* coderait bien une Cdk. Cette Cdk, dont la cycline avec laquelle elle interagirait reste à déterminer, pourrait être une Cdk essentielle à la progression du cycle cellulaire. Nous avons aussi regardé l'impact de *L. pneumophila* sur l'expression de quelques cyclines putatives d'*A. castellanii*. Deux gènes de cyclines putatives d'*A. castellanii* (*ACA1_374430* et *ACA1_377210*) qui présentent des homologies de séquences avec les gènes des cyclines A et B humaines ont été sélectionnées. Comme pour *cdc2b*, *L. pneumophila* induit une baisse du niveau d'expression des gènes de ces cyclines putatives d'*A. castellanii*. Chez l'homme, la cycline B se fixe à la Cdk1 et forme le complexe cycline B/Cdk1 responsable de la progression du cycle cellulaire en G2 et de la transition en G2/M. Il serait intéressant de déterminer la fonctionnalité de ces cyclines, particulièrement de celle codée par le gène *ACA1_377210* qui présente des homologies de séquences avec la cycline B, et de vérifier si elle pourrait interagir avec la protéine *cdc2b*. Ainsi, *L. pneumophila* pourrait induire l'arrêt du cycle cellulaire d'*A. castellanii* à travers un

effecteur qui ciblerait l'expression de *cdc2b* et des gènes des cyclines. Il a été montré que l'effecteur RomA de *L. pneumophila* interagirait avec le noyau et induirait la répression de quelques gènes de la cellule hôte (Rolando et al., 2013). Il est possible que l'arrêt du cycle cellulaire d'*A. castellanii* par *L. pneumophila* soit un mécanisme qui mette en jeu l'action de plusieurs effecteurs. Toutefois, il serait intéressant de vérifier l'action de RomA sur le cycle cellulaire de l'hôte et de vérifier si l'arrêt du cycle cellulaire induit par *L. pneumophila* passe nécessairement par une diminution de l'expression de *cdc2b*.

Pour déterminer si *L. pneumophila* modifiait le contenu en ADN d'*A. castellanii*, ou si la bactérie arrêta le cycle cellulaire de son hôte à une phase précise, nous avons suivi l'évolution du contenu en ADN d'*A. castellanii* par cytométrie en flux. Nous avons observé une même intensité de fluorescence de l'iodure de propidium pour les amibes non infectées durant toute la cinétique. L'intensité de fluorescence de l'iodure de propidium correspond à la quantité d'ADN contenue dans les cellules. Les résultats obtenus indiquent la présence d'une phase prédominante dans le cycle cellulaire d'*A. castellanii* ATCC 30010. Cette amibe a été décrite comme ayant une phase G2 occupant plus de 90% de la durée totale de son cycle cellulaire (Stohr et al., 1987). Par rapport à ce résultat, nous avons supposé que la phase omniprésente que nous avons observée correspondrait à la phase G2. Les drogues que nous avons testées ne nous ont pas permis de vérifier ce résultat. Dans le cas des amibes infectées, l'intensité de fluorescence de l'ADN d'*A. castellanii* était la même que pour les cellules non infectées durant les trois premières heures de la cinétique. Cette intensité de fluorescence a augmenté 5 heures plus tard. Pour vérifier la pureté de nos échantillons, nous avons réalisé une infection d'*A. castellanii* ATCC 30010 par *L. pneumophila* Paris R_EP10 (exprimant la DsRed), puis procédé à l'extraction des noyaux. L'observation des échantillons au microscope a révélé la présence de bactéries (données non montrées). Nous avons donc suggéré que l'augmentation de fluorescence observée plus tard dans la cinétique proviendrait d'un ADN

contaminant de *L. pneumophila*. L'utilisation de la cytométrie pour observer la quantité d'ADN des cellules infectées doit se faire avec précautions car la multiplication intracellulaire des bactéries apporterait une quantité non négligeable d'ADN étranger à la cellule hôte. Dans notre cas, la méthode d'extraction des noyaux utilisée, décrite pour s'affranchir du biais de l'ADN mitochondrial au cours de l'analyse de la quantité d'ADN contenu dans le noyau, ne nous a pas permis de nous affranchir de l'ADN bactérien. Par rapport à ces résultats, nous avons supposé que *L. pneumophila* arrêterait le cycle cellulaire d'*A. castellanii* probablement en phase G2. Plusieurs cyclomodulines connues induisent un arrêt du cycle cellulaire en G2/M. Certaines d'entre elles agissent en tant que génotoxines et activent la voie de dommage et de réparation de l'ADN. C'est le cas des CDT (cytolethal distending toxins), de la toxine typhoïde et de la colibactine (Lara-Tejero and Galán, 2001; Nougayrede et al., 2006; Spanò et al., 2008). D'autres cyclomodulines ciblent directement des protéines nécessaires à la progression du cycle cellulaire. C'est le cas de l'effecteur IpaB (invasion plasmid antigen B), qui interagit avec la protéine Mad2L2 entraînant ainsi la dégradation de la cycline B1 (Iwai et al., 2007) et de Cif (cycle inhibiting factor), qui modifie et inactive les molécules impliquées dans la dégradation des CKIs p21 et p27 (Boh et al., 2011). L'effecteur CopN quant à lui se lie directement à la tubuline de l'hôte et la séquestre, empêchant ainsi la formation du fuseau mitotique au cours de la mitose (Archuleta et al., 2011). A la différence de ces cyclomodulines, *L. pneumophila*, à travers un de ses effecteurs, arrêterait le cycle cellulaire de son hôte par un mécanisme qui ciblerait directement l'expression des gènes de Cdks et peut être aussi des cyclines. Au niveau écologique, cela pourrait signifier que les amibes infectées par *L. pneumophila* ne se multiplient plus. Ce scénario ne serait possible que lorsque la température dépasse 25°C car il a été montré qu'en dessous de 20°C *L. pneumophila* est digérée par *A. castellanii* (Ohno et al., 2008).

A travers l'analyse des cellules par vidéo-microscopie, nous avons observé que *L. pneumophila* induit une modification de la forme d'*A. castellanii* dès les premières heures après l'infection. Les cellules infectées étaient arrondies, moins mobiles et semblaient se détacher du substrat. Une étude précédente a montré que la bactérie *Francisella tularensis* induit un rapide enkystement d'*A. castellanii* et que cette bactérie pourrait survivre au sein du kyste jusqu'à 3 semaines (El-Etr et al., 2009). Des études ont montré qu'en condition de stress, *L. pneumophila* pouvait survivre au sein des kystes d'*A. castellanii* (Kilvington and Price, 1990; Skinner et al., 1983). Dans nos conditions, nous n'avons pas observé de kystes pour les cellules infectées jusqu'à 24 heures d'incubation en tampon d'enkystement contrairement aux cellules non infectées. Au microscope électronique à balayage, nous avons remarqué que les cellules d'*A. castellanii* co-cultivées avec *L. pneumophila* présentaient moins d'acanthopodes à leur surface cellulaire par rapport aux cellules d'*A. castellanii* en culture seule. Après avoir marqué l'actine des cellules à la phalloïdine, nous avons observé que les amibes co-cultivées avec *L. pneumophila* présentaient de faibles extensions filamenteuses comparées aux amibes seules. Le processus d'enkystement est un mécanisme qui nécessite la participation du cytosquelette pour le transport des fibres afin de former la double paroi kystique (Chavez-Munguia et al., 2005). *L. pneumophila* à travers ses effecteurs LegK2 et Cag14 empêche la polymérisation de l'actine de l'hôte (Guo et al., 2014; Michard et al., 2015). Un autre mécanisme lié à l'enkystement d'*A. castellanii* est l'autophagie (Moon et al., 2009). Seulement, *L. pneumophila* entrave aussi ce mécanisme à travers son effecteur RavZ afin de permettre sa réplication intracellulaire (Choy et al., 2012). A l'instar de ces mécanismes, l'enkystement d'*A. castellanii* semble dépendant du cycle cellulaire car l'incubation dans un milieu carencé, provoque une accumulation des cellules en phase G2 (Jantzen et al., 1988; Stohr et al., 1987). La perte de la capacité d'*A. castellanii* à s'enkyser

pourrait être une conséquence de l'arrêt du cycle cellulaire causé par *L. pneumophila*. Dans l'environnement, ces amibes ne pourraient donc plus s'enkyster en réponse au stress.

Nous avons aussi évalué la vitesse d'*A. castellanii* en co-culture avec *L. pneumophila* et en culture seule. En condition de co-culture, la vitesse d'*A. castellanii* était nettement inférieure à la vitesse d'*A. castellanii* en culture seule. La mobilité des trophozoïtes fait intervenir des mouvements de contraction et d'extension des acanthopodes grâce à un cycle de polymérisation et de dépolymérisation de l'actine (Preston and King, 1984). Ces mouvements des acanthopodes sont possibles sur un support. Dans notre étude nous avons montré que *L. pneumophila* induit le détachement des cellules d'*A. castellanii*. La diminution des acanthopodes résultant du réarrangement du cytosquelette peuvent expliquer cette perte d'adhérence.

Tous ces résultats suggèrent que *L. pneumophila*, à travers l'action d'un de ses effecteurs, arrête le cycle cellulaire d'*A. castellanii*. L'action de ses effecteurs conduirait à une baisse du niveau d'expression du gène *cdc2b* d'*A. castellanii*. Ce phénotype est associé à une modification de la forme d'*A. castellanii* qui conduit à une perte d'adhérence et à une diminution de la vitesse de l'hôte amibien. Il serait intéressant de reproduire cette expérience sur d'autres modèles cellulaires présentant toutes les phases du cycle cellulaire comme certaines cellules de mammifères afin déterminer si *L. pneumophila* induit l'arrêt à une ou plusieurs phases du cycle cellulaire de son hôte. Notre modèle, *A. castellanii*, qui a un cycle cellulaire majoritairement constitué de la phase G2 ne nous a pas permis de clairement élucider la question de savoir quelle phase du cycle cellulaire serait ciblée par *L. pneumophila*.

Conclusion et Perspectives

L'objectif de cette thèse était d'étudier les effets de *L. pneumophila* sur la prolifération d'*A. castellanii* et de décrire les modifications physiologiques associées.

Dans cette étude, nous avons montré à travers l'absence de multiplication et de duplication de l'ADN, que *L. pneumophila* induit l'arrêt de la prolifération de son hôte *A. castellanii*. Le mutant $\Delta dotA$ de *L. pneumophila*, défectueux pour le système de sécrétion Dot/Icm, n'a pas arrêté la prolifération de l'amibe. Par conséquent, nous avons suggéré que ce phénotype serait médié par un effecteur de *L. pneumophila*. Au niveau moléculaire, nous avons observé une réduction de l'expression du gène *cdc2b*, codant une Cdk putative d'*A. castellanii*. Ce gène a permis, par complémentation génétique, de restaurer partiellement la croissance de *S. cerevisiae* Y838. Nous avons émis l'hypothèse que le gène *cdc2b*, qui présente des similitudes avec le gène *Cdk1* de l'homme, pourrait coder une Cdk essentielle d'*A. castellanii*. L'analyse du contenu en ADN d'*A. castellanii* par cytométrie en flux nous a permis de voir que les amibes infectées étaient en phase G2 du cycle cellulaire de même que les amibes non infectées. Avec un cycle cellulaire constitué à 90 % de la phase G2 pour une durée totale de 7 h de temps en moyenne, *A. castellanii* ne nous a pas permis de voir si *L. pneumophila* pourrait arrêter le cycle cellulaire à une autre phase autre que G2. Sur le plan morphologique, *L. pneumophila* a induit une modification de la forme d'*A. castellanii*. Les cellules infectées étaient arrondies, présentaient moins de pseudopodes à leur surface cellulaire et étaient détachées du substrat. En plus de ces changements morphologiques, nous avons observé que *L. pneumophila* induisait une diminution de la vitesse d'*A. castellanii*. Cette dernière fait intervenir des mouvements de l'actine et nécessite l'adhésion à un support. Nous avons suggéré que la baisse de vitesse observée pour les amibes infectées, serait due à un détachement d'*A. castellanii* du support. Ce détachement serait probablement la conséquence de la modification du cytosquelette induit par *L. pneumophila*. Sur le plan physiologique, *L. pneumophila* a induit une perte de la capacité d'*A. castellanii* à s'enkyster. A travers l'arrêt du

cycle cellulaire et l'inhibition de l'enkystement, *L. pneumophila* pourrait être considéré comme un régulateur de la croissance de la population amibienne dans les environnements où les températures favorisent la virulence de la bactérie.

Pour compléter cette étude, il serait intéressant d'étudier l'effet de *L. pneumophila* sur d'autres modèles présentant un cycle cellulaire classique comme celui des cellules de mammifères afin de déterminer à quelle phase du cycle *L. pneumophila* arrête la prolifération de son hôte. En réalisant des tests d'infection avec des mutants de différents effecteurs de *L. pneumophila*, il serait possible de rechercher les potentiels effecteurs impliqués dans ce phénotype d'arrêt du cycle cellulaire et d'étudier leur mode d'action. Ces données pourraient mettre en lumière de nouvelles pistes permettant de mieux cibler à la fois *L. pneumophila* et *A. castellanii* qui représentent un problème de santé publique.

Références Bibliographiques

- Abdel-Nour, M., Duncan, C., Prashar, A., Rao, C., Ginevra, C., Jarraud, S., et al. (2014). The *Legionella pneumophila* collagen-like protein mediates sedimentation, autoaggregation, and pathogen-phagocyte interactions. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 1441–54.
- Abu Kwaik, Y. (1996). The phagosome containing *Legionella pneumophila* within the protozoan *Hartmannella vermiformis* is surrounded by the rough endoplasmic reticulum. *Appl Env. Microbiol* 62, 2022–2028.
- Abu-Zant, A., Jones, S., Asare, R., Suttles, J., Price, C., Graham, J., et al. (2007). Anti-apoptotic signalling by the Dot/Icm secretion system of *L. pneumophila*. *Cell. Microbiol.* 9, 246–64.
- Abu-Zant, A., Santic, M., Molmeret, M., Jones, S., Helbig, J., and Abu Kwaik, Y. (2005). Incomplete activation of macrophage apoptosis during intracellular replication of *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* 73, 5339–49.
- Adl, S. M., Simpson, A. G. B., Lane, C. E., Lukeš, J., Bass, D., Bowser, S. S., et al. (2012). The revised classification of eukaryotes. *J. Eukaryot. Microbiol.* 59, 429–93.
- Albert-Weissenberger, C., Cazalet, C., and Buchrieser, C. (2007). *Legionella pneumophila* — a human pathogen that co-evolved with fresh water protozoa. *Cell. Mol. Life Sci.* 64, 432–448.
- Alby, F., Mazars, R., de Rycke, J., Guillou, E., Baldin, V., Darbon, J. M., et al. (2001). Study of the cytolethal distending toxin (CDT)-activated cell cycle checkpoint. Involvement of the CHK2 kinase. *FEBS Lett.* 491, 261–5.
- Al-Khodor, S., Price, C. T., Habyarimana, F., Kalia, A., and Abu Kwaik, Y. (2008). A Dot/Icm-translocated ankyrin protein of *Legionella pneumophila* is required for intracellular proliferation within human macrophages and protozoa. *Mol. Microbiol.* 70, 908–23.
- Al-Quadan, T., and Kwaik, Y. A. (2011). Molecular Characterization of Exploitation of the Polyubiquitination and Farnesylation Machineries of *Dictyostelium Discoideum* by the AnkB F-Box Effector of *Legionella Pneumophila*. *Front. Microbiol.* 2, 23.
- Amer, A. O. (2010). Modulation of caspases and their non-apoptotic functions by *Legionella pneumophila*. *Cell. Microbiol.* 12, 140–7.
- Amer, A. O., and Swanson, M. S. (2005). Autophagy is an immediate macrophage response to *Legionella pneumophila*. *Cell. Microbiol.* 7, 765–78.
- Anacarso, I., Guerrieri, E., Bondi, M., de Niederhäusern, S., Iseppi, R., Sabia, C., et al. (2010). Influence of *Legionella pneumophila* and other water bacteria on the survival and growth of *Acanthamoeba polyphaga*. *Arch. Microbiol.* 192, 877–82.
- Andreozzi, E., Di Cesare, A., Sabatini, L., Chessa, E., Sisti, D., Rocchi, M., et al. (2014). Role of Biofilm in Protection of the Replicative Form of *Legionella pneumophila*. *Curr. Microbiol.* 69, 769–774.
- Archuleta, T. L., Du, Y., English, C. A., Lory, S., Lesser, C., Ohi, M. D., et al. (2011). The Chlamydia effector chlamydial outer protein N (CopN) sequesters tubulin and prevents

- microtubule assembly. *J. Biol. Chem.* 286, 33992–8.
- Awasthi, P., Foiani, M., and Kumar, A. (2015). ATM and ATR signaling at a glance. *J. Cell Sci.* 128, 4255–4262.
- Bachman, M. A., and Swanson, M. S. (2001). RpoS co-operates with other factors to induce *Legionella pneumophila* virulence in the stationary phase. *Mol. Microbiol.* 40, 1201–1214.
- Bachman, M. A., and Swanson, M. S. (2004). Genetic Evidence that *Legionella pneumophila* RpoS Modulates Expression of the Transmission Phenotype in Both the Exponential Phase and the Stationary Phase. *Infect. Immun.* 72, 2468–2476.
- Baker Brachmann, C., Davies, A., Cost, G. J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., et al. (1998). Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: A useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* 14, 115–132.
- Bamforth, S. S. (1985). Symposium on “Protozoan Ecology”: The Role of Protozoa in Litters and Soils. *J. Protozool* 32, 404–409.
- Band, R. N., and Mohrlök, S. (1973). The cell cycle and induced amitosis in *Acanthamoeba*. *J. Protozool.* 20, 654–7.
- Bandyopadhyay, P., Liu, S., Gabbai, C. B., Venitelli, Z., and Steinman, H. M. (2007). Environmental mimics and the Lvh type IVA secretion system contribute to virulence-related phenotypes of *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* 75, 723–35.
- Banga, S., Gao, P., Shen, X., Fiscus, V., Zong, W.-X., Chen, L., et al. (2007). *Legionella pneumophila* inhibits macrophage apoptosis by targeting pro-death members of the Bcl2 protein family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 5121–6.
- Banin, S., Moyal, L., Shieh, S., Taya, Y., Anderson, C. W., Chessa, L., et al. (1998). Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science* 281, 1674–7.
- Bardill, J. P., Miller, J. L., and Vogel, J. P. (2005). IcmS-dependent translocation of SdeA into macrophages by the *Legionella pneumophila* type IV secretion system. *Mol. Microbiol.* 56, 90–103.
- Barker, J., and Brown, M. R. W. (1994). Trojan Horses of the microbial world: Protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. *Microbiology* 140, 1253–1259.
- Barnum, K. J., and O’Connell, M. J. (2014). Cell cycle regulation by checkpoints. *Methods Mol. Biol.* 1170, 29–40.
- Baskerville, A., Broster, M., Fitzgeorge, R. B., Hambleton, P., and Dennis, P. J. (1981). Experimental Transmission of Legionnaires’ Disease by Exposure Aerosols of *Legionella Pneumophila*. *Lancet* 318, 1389–1390.
- Bellinger-Kawahara, C., and Horwitz, M. A. (1990). Complement component C3 fixes selectively to the major outer membrane protein (MOMP) of *Legionella pneumophila*

- and mediates phagocytosis of liposome-MOMP complexes by human monocytes. *J. Exp. Med.* 172, 1201–10.
- Berger, K. H., and Isberg, R. R. (1993). Two distinct defects in intracellular growth complemented by a single genetic locus in *Legionella pneumophila*. *Mol. Microbiol.* 7, 7–19.
- Berk, S. G., Gunderson, J. H., Newsome, A. L., Farone, A. L., Hayes, B. J., Redding, K. S., et al. (2006). Occurrence of infected amoebae in cooling towers compared with natural aquatic environments: implications for emerging pathogens. *Environ. Sci. Technol.* 40, 7440–4.
- Berks, B. C., Palmer, T., and Sargent, F. (2003). The Tat protein translocation pathway and its role in microbial physiology. *Adv. Microb. Physiol.* 47, 187–254.
- Bitar, D. M., Molmeret, M., and Kwaik, Y. A. (2005). Structure–function analysis of the C-terminus of IcmT of *Legionella pneumophila* in pore formation-mediated egress from macrophages. *FEMS Microbiol. Lett.* 242, 177–84.
- Blagosklonny, M. V., and Pardee, A. B. (2002). The Restriction Point of the Cell Cycle. *Cell Cycle* 1, 102–109.
- Blocker, D., Berod, L., Fluhr, J. W., Orth, J., Idzko, M., Aktories, K., et al. (2006). *Pasteurella multocida* toxin (PMT) activates RhoGTPases, induces actin polymerization and inhibits migration of human dendritic cells, but does not influence macropinocytosis. *Int. Immunol.* 18, 459–464.
- Boh, B. K., Ng, M. Y., Leck, Y. C., Shaw, B., Long, J., Sun, G. W., et al. (2011). Inhibition of Cullin RING Ligases by Cycle Inhibiting Factor: Evidence for Interference with Nedd8-Induced Conformational Control. *J. Mol. Biol.* 413, 430–437.
- Borges, V., Nunes, A., Sampaio, D. A., Vieira, L., Machado, J., Simões, M. J., et al. (2016). *Legionella pneumophila* strain associated with the first evidence of person-to-person transmission of Legionnaires' disease: a unique mosaic genetic backbone. *Sci. Rep.* 6, 26261.
- Bornstein, G., Bloom, J., Sitry-Shevah, D., Nakayama, K., Pagano, M., and Hershko, A. (2003). Role of the SCFSkp2 ubiquitin ligase in the degradation of p21Cip1 in S phase. *J. Biol. Chem.* 278, 25752–7. doi:10.1074/jbc.M301774200.
- Bory de Saint-Vincent, J. B. G. M. (1826). *Essai d'une classification des animaux microscopiques*.
- Bouyer, S., Imbert, C., Rodier, M. H., and Héchar, Y. (2007). Long-term survival of *Legionella pneumophila* associated with *Acanthamoeba castellanii* vesicles: Brief report. *Environ. Microbiol.* 9, 1341–1344.
- Bowers, B. (1980). A morphological study of plasma and phagosome membranes during endocytosis in *Acanthamoeba*. *J. Cell Biol.* 84, 246–60.
- Bowers, B., and Korn, E. D. (1968). The fine structure of *Acanthamoeba* I. The Trophozoite. *J. Cell Biol.* 39, 95–111.

- Bowers, B., and Korn, E. D. (1969). The fine structure of *Acanthamoeba castellanii* (Neff strain). II. Encystment. *J. Cell Biol.* 41, 786–805.
- Bozue, J. A., and Johnson, W. (1996). Interaction of *Legionella pneumophila* with *Acanthamoeba castellanii*: uptake by coiling phagocytosis and inhibition of phagosome-lysosome fusion. *Infect Immun* 64, 668–673.
- Brenner, D. J., Steigerwalt, A. G., and McDade, J. E. (1979). Classification of the Legionnaires' disease bacterium: *Legionella pneumophila*, genus novum, species nova, of the family Legionellaceae, familia nova. *Ann. Intern. Med.* 90, 656–8.
- Brombacher, E., Urwyler, S., Ragaz, C., Weber, S. S., Kami, K., Overduin, M., et al. (2009). Rab1 guanine nucleotide exchange factor SidM is a major phosphatidylinositol 4-phosphate-binding effector protein of *Legionella pneumophila*. *J. Biol. Chem.* 284, 4846–56.
- Bruckert, W. M., Price, C. T., and Abu Kwaik, Y. (2014). Rapid nutritional remodeling of the host cell upon attachment of *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* 82, 72–82.
- De Buck, E., Lebeau, I., Maes, L., Geukens, N., Meyen, E., Van Mellaert, L., et al. (2004). A putative twin-arginine translocation pathway in *Legionella pneumophila*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 317, 654–661.
- De Buck, E., Maes, L., Meyen, E., Van Mellaert, L., Geukens, N., Anné, J., et al. (2005). *Legionella pneumophila* Philadelphia-1 tatB and tatC affect intracellular replication and biofilm formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331, 1413–1420.
- Buhl, A. M., Johnson, N. L., Dhanasekaran, N., and Johnson, G. L. (1995). Gα12 and Gα13 stimulate Rho-dependent stress fiber formation and focal adhesion assembly. *J. Biol. Chem.* 270, 24631–4.
- Byers, T. J. (1979). "Growth, Reproduction, and Differentiation in *Acanthamoeba*," in, 283–338.
- Byers, T. J., Kim, B. G., King, L. E., and Hugo, E. R. (1991). Molecular aspects of the cell cycle and encystment of *Acanthamoeba*. *Rev. Infect. Dis.* 13 Suppl 5, S373–84.
- Byrne, B., and Swanson, M. S. (1998). Expression of *Legionella pneumophila* virulence traits in response to growth conditions. *Infect. Immun.* 66, 3029–34.
- Campanacci, V., Mukherjee, S., Roy, C. R., and Cherfils, J. (2013). Structure of the *Legionella* effector AnkX reveals the mechanism of phosphocholine transfer by the FIC domain. *EMBO J.* 32, 1469–77.
- Cao, L., Chen, F., Yang, X., Xu, W., Xie, J., and Yu, L. (2014). Phylogenetic analysis of CDK and cyclin proteins in premetazoan lineages. *BMC Evol. Biol.* 14, 10.
- Cascales, E., and Christie, P. J. (2003). The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nat. Rev. Microbiol.* 1, 137–49.
- Castellani, A. (1930). An amoeba growing in cultures of a yeast: fourth note. *J. Trop. Med. Hyg* 33, 237.

- Cazalet, C., Rusniok, C., Brüggemann, H., Zidane, N., Magnier, A., Ma, L., et al. (2004). Evidence in the *Legionella pneumophila* genome for exploitation of host cell functions and high genome plasticity. *Nat. Genet.* 36, 1165–1173.
- Chang, B., Kura, F., Amemura-Maekawa, J., Koizumi, N., and Watanabe, H. (2005). Identification of a novel adhesion molecule involved in the virulence of *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* 73, 4272–80.
- Chavez-Munguia, B., Omana-Molina, M., Gonzalez-Lazaro, M., Gonzalez-Robles, A., Bonilla, P., and Martinez-Palomo, A. (2005). Ultrastructural Study of Encystation and Excystation in *Acanthamoeba castellanii*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 52, 153–158.
- Chavez-Munguia, B., Salazar-Villatoro, L., Lagunes-Guillen, A., Omana-Molina, M., Espinosa-Cantellano, M., and Martinez-Palomo, A. (2013). *Acanthamoeba castellanii* cysts: new ultrastructural findings. *Parasitol. Res.* 112, 1125–1130.
- Che, D. (2007). Les facteurs de risque de survenue des légionelloses sporadiques communautaires en France. Institut de veille sanitaire.
- Chen, J. (2016). The Cell-Cycle Arrest and Apoptotic Functions of p53 in Tumor Initiation and Progression. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 6, a026104.
- Chen, J., Felipe, K. S. De, Clarke, M., Lu, H., Anderson, O. R., Segal, G., et al. (2004). Effectors That Promote Nonlytic Release from Protozoa. 303, 1358–1362.
- Cho, S.-J., Kang, N.-S., Park, S.-Y., Kim, B.-O., Rhee, D.-K., and Pyo, S. (2003). Induction of apoptosis and expression of apoptosis related genes in human epithelial carcinoma cells by *Helicobacter pylori* VacA toxin. *Toxicon* 42, 601–11.
- Chong, A., Lima, C. A., Allan, D. S., Nasrallah, G. K., and Garduño, R. A. (2009). The purified and recombinant *Legionella pneumophila* chaperonin alters mitochondrial trafficking and microfilament organization. *Infect. Immun.* 77, 4724–39.
- Choy, A., Dancourt, J., Mugo, B., O'Connor, T. J., Isberg, R. R., Melia, T. J., et al. (2012). The *Legionella* effector RavZ inhibits host autophagy through irreversible Atg8 deconjugation. *Science* 338, 1072–6.
- Chynn, E. W., Lopez, M. A., Pavan-Langston, D., and Talamo, J. H. (1995). *Acanthamoeba* Keratitis: Contact Lens and Noncontact Lens Characteristics. *Ophthalmology* 102, 1369–1373.
- Cianciotto, N. P. (2005). Type II secretion: a protein secretion system for all seasons. *Trends Microbiol.* 13, 581–588.
- Cianciotto, N. P. (2009). Many substrates and functions of type II secretion: lessons learned from *Legionella pneumophila*. *Future Microbiol.* 4, 797–805.
- Cianciotto, N. P. (2013). “Type II Secretion and *Legionella* Virulence,” in *Current topics in microbiology and immunology*, 81–102.
- Cirillo, S. L. G., Lum, J., and Cirillo, J. D. (2000). Identification of novel loci involved in entry by *Legionella pneumophila*. *Microbiology*, 1345–1359.

- Cirillo, S. L. G., Yan, L., Littman, M., Samrakandi, M. M., and Cirillo, J. D. (2002). Role of the *Legionella pneumophila* rtxA gene in amoebae. *Microbiology* 148, 1667–1677.
- Clarholm, M. (1981). Protozoan grazing of bacteria in soil—impact and importance. *Microb. Ecol.* 7, 343–350. doi:10.1007/BF02341429.
- Clarke, M., Lohan, A. J., Liu, B., Lagkouvardos, I., Roy, S., Zafar, N., et al. (2013). Genome of *Acanthamoeba castellanii* highlights extensive lateral gene transfer and early evolution of tyrosine kinase signaling. *Genome Biol.* 14, R11.
- Claverie, J.-M., Ogata, H., Audic, S., Abergel, C., Suhre, K., and Fournier, P.-E. (2006). Mimivirus and the emerging concept of “giant” virus. *Virus Res.* 117, 133–144.
- Colson, P., Aherfi, S., La Scola, B., and Raoult, D. (2016). The role of giant viruses of amoebas in humans. *Curr. Opin. Microbiol.* 31, 199–208.
- Comayras, C., Tasca, C., Pérès, S. Y., Ducommun, B., Oswald, E., and De Rycke, J. (1997). Escherichia coli cytolethal distending toxin blocks the HeLa cell cycle at the G2/M transition by preventing cdc2 protein kinase dephosphorylation and activation. *Infect. Immun.* 65, 5088–95.
- Conover, G. M., Derré, I., Vogel, J. P., and Isberg, R. R. (2003). The *Legionella pneumophila* LidA protein: a translocated substrate of the Dot/Icm system associated with maintenance of bacterial integrity. *Mol. Microbiol.* 48, 305–21.
- Correia, A. M., Ferreira, J. S., Borges, V., Nunes, A., Gomes, B., Capucho, R., et al. (2016). Probable Person-to-Person Transmission of Legionnaires’ Disease. *N. Engl. J. Med.* 374, 497–498.
- Cortes-Bratti, X., Karlsson, C., Lagergard, T., Thelestam, M., and Frisan, T. (2001). The Haemophilus ducreyi Cytolethal Distending Toxin Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis via the DNA Damage Checkpoint Pathways. *J. Biol. Chem.* 276, 5296–5302.
- Creasey, E. A., and Isberg, R. R. (2012). The protein SdhA maintains the integrity of the *Legionella*-containing vacuole. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 3481–6.
- Dalebroux, Z. D., Edwards, R. L., and Swanson, M. S. (2009). SpoT governs *Legionella pneumophila* differentiation in host macrophages. *Mol. Microbiol.* 71, 640–658.
- DebRoy, S., Dao, J., Söderberg, M., Rossier, O., and Cianciotto, N. P. (2006). *Legionella pneumophila* type II secretome reveals unique exoproteins and a chitinase that promotes bacterial persistence in the lung. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 19146–51.
- Declerck, P., Behets, J., van Hoef, V., and Ollevier, F. (2007). Detection of *Legionella* spp. and some of their amoeba hosts in floating biofilms from anthropogenic and natural aquatic environments. *Water Res.* 41, 3159–3167.
- Declerck, P., Behets, J., Margineanu, A., van Hoef, V., De Keersmaecker, B., and Ollevier, F. (2009). Replication of *Legionella pneumophila* in biofilms of water distribution pipes. *Microbiol. Res.* 164, 593–603.
- Derré, I., and Isberg, R. R. (2005). LidA, a translocated substrate of the *Legionella*

- pneumophila* type IV secretion system, interferes with the early secretory pathway. *Infect. Immun.* 73, 4370–80.
- Dey, R., Bodennec, J., Mameri, M. O., and Pernin, P. (2009). Free-living freshwater amoebae differ in their susceptibility to the pathogenic bacterium *Legionella pneumophila*. *FEMS Microbiol. Lett.* 290, 10–17.
- Dudley, R., Alsam, S., and Khan, N. A. (2008). The role of proteases in the differentiation of *Acanthamoeba castellanii*. *FEMS Microbiol. Lett.* 286, 9–15.
- Duménil, G., Montminy, T. P., Tang, M., and Isberg, R. R. (2004). IcmR-regulated membrane insertion and efflux by the *Legionella pneumophila* IcmQ protein. *J. Biol. Chem.* 279, 4686–95.
- Duncan, C., Prashar, A., So, J., Tang, P., Low, D. E., Terebiznik, M., et al. (2011). Lcl of *Legionella pneumophila* is an immunogenic GAG binding adhesin that promotes interactions with lung epithelial cells and plays a crucial role in biofilm formation. *Infect. Immun.* 79, 2168–81.
- Duronio, R. J., and Xiong, Y. (2013). Signaling pathways that control cell proliferation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, a008904.
- Ehrenberg, C. G. (1830). *Organisation, Systematik und geographisches Verhältniss der Infusions-thierchen. Zwei verträge.* Abhandlungen der königlichen Akademie der Wissenschaften zu Berlin
- Eisenreich, W., and Heuner, K. (2016). The life stage-specific pathometabolism of *Legionella pneumophila*. *FEBS Lett.* 590, 3868–3886.
- El-Etr, S. H., Margolis, J. J., Monack, D., Robison, R. A., Cohen, M., Moore, E., et al. (2009). Francisella tularensis type A strains cause the rapid encystment of *Acanthamoeba castellanii* and survive in amoebal cysts for three weeks postinfection. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7488–500.
- Elliott, J. A., Winn, W. C., and Jr (1986). Treatment of alveolar macrophages with cytochalasin D inhibits uptake and subsequent growth of *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* 51, 31–6.
- Ensminger, A. W., and Isberg, R. R. (2009). Legionella pneumophila Dot/Icm translocated substrates: a sum of parts. *Curr. Opin. Microbiol.* 12, 67–73.
- Erdem, E., Evcil, Y., Yagmur, M., Eroglu, F., Koltas, S., and Ersoz, R. (2014). Non-contact lens use-related *Acanthamoeba* keratitis in southern Turkey: evaluation of risk factors and clinical features. *Eur J Ophthalmol.* 164–172.
- Escalas, N., Davezac, N., De Rycke, J., Baldin, V., Mazars, R., and Ducommun, B. (2000). Study of the Cytolethal Distending Toxin-Induced Cell Cycle Arrest in HeLa Cells: Involvement of the CDC25 Phosphatase. *Exp. Cell Res.* 257, 206–212.
- Escoll, P., Rolando, M., Gomez-Valero, L., and Buchrieser, C. (2013). From amoeba to macrophages: exploring the molecular mechanisms of *Legionella pneumophila* infection in both hosts. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 376, 1–34.

- Falzano, L., Filippini, P., Travaglione, S., Miraglia, A. G., Fabbri, A., and Fiorentini, C. (2006). *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor 1 blocks cell cycle G2/M transition in uroepithelial cells. *Infect. Immun.* 74, 3765–72.
- Fettes, P. S., Forsbach-Birk, V., Lynch, D., and Marre, R. (2001). Overexpression of a *Legionella pneumophila* homologue of the *E. coli* regulator *csrA* affects cell size, flagellation, and pigmentation. *Int. J. Med. Microbiol.* 291, 353–360.
- Fields, B. S., Benson, R. F., and Besser, R. E. (2002). *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 506–26.
- Finsel, I., and Hilbi, H. (2015). Formation of a pathogen vacuole according to *Legionella pneumophila*: how to kill one bird with many stones. *Cell. Microbiol.* 17, 935–950.
- Finsel, I., Ragaz, C., Hoffmann, C., Harrison, C. F., Weber, S., van Rahden, V. A., et al. (2013). The *Legionella* Effector RidL Inhibits Retrograde Trafficking to Promote Intracellular Replication. *Cell Host Microbe* 14, 38–50.
- Fischer, W., Haas, R., and Odenbreit, S. (2002). Type IV secretion systems in pathogenic bacteria. *Int. J. Med. Microbiol.* 292, 159–168.
- Franco, I. S., Shohdy, N., and Shuman, H. A. (2012). The *Legionella pneumophila* effector VipA is an actin nucleator that alters host cell organelle trafficking. *PLoS Pathog.* 8, e1002546.
- Fraser, D. W., Tsai, T. R., Orenstein, W., Parkin, W. E., Beecham, H. J., Sharrar, R. G., et al. (1977). Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. *N. Engl. J. Med.* 297, 1189–1197.
- Friedberg, E. C. (2003). DNA damage and repair. *Nature* 421, 436–440.
- Fritsche, T. R., Gautom, R. K., Seyedirashti, S., Bergeron, D. L., and Lindquist, T. D. (1993). Occurrence of bacterial endosymbionts in *Acanthamoeba* spp. isolated from corneal and environmental specimens and contact lenses. *J. Clin. Microbiol.* 31, 1122–6.
- Fritsche, T. R., Sobek, D., and Gautom, R. K. (1998). Enhancement of in vitro cytopathogenicity by *Acanthamoeba* spp. following acquisition of bacterial endosymbionts. *FEMS Microbiol. Lett.* 166, 231–6.
- Fuche, F., Vianney, A., Andrea, C., Doublet, P., and Gilbert, C. (2015). Functional type 1 secretion system involved in *Legionella pneumophila* virulence. *J. Bacteriol.* 197, 563–71.
- Gao, L. Y., and Abu Kwaik, Y. (1999a). Activation of caspase 3 during *Legionella pneumophila*-induced apoptosis. *Infect. Immun.* 67, 4886–94.
- Gao, L. Y., and Abu Kwaik, Y. (1999b). Apoptosis in macrophages and alveolar epithelial cells during early stages of infection by *Legionella pneumophila* and its role in cytopathogenicity. *Infect. Immun.* 67, 862–70.
- Gao, L. Y., and Kwaik, Y. A. (2000). The mechanism of killing and exiting the protozoan host *Acanthamoeba polyphaga* by *Legionella pneumophila*. *Env. Microbiol* 2, 79–90.

- Garduño, R. A., Chong, A., Nasrallah, G. K., and Allan, D. S. (2011). The *Legionella pneumophila* Chaperonin - An Unusual Multifunctional Protein in Unusual Locations. *Front. Microbiol.* 2, 122.
- Garduño, R. A., Faulkner, G., Trevors, M. A., Vats, N., and Hoffman, P. S. (1998a). Immunolocalization of Hsp60 in *Legionella pneumophila*. *J. Bacteriol.* 180, 505–13.
- Garduño, R. A., Garduño, E., and Hoffman, P. S. (1998b). Surface-associated hsp60 chaperonin of *Legionella pneumophila* mediates invasion in a HeLa cell model. *Infect. Immun.* 66, 4602–10.
- Ge, J., Xu, H., Li, T., Zhou, Y., Zhang, Z., Li, S., et al. (2009). A *Legionella* type IV effector activates the NF-kappaB pathway by phosphorylating the IkappaB family of inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 13725–30.
- Gebert, B., Fischer, W., Weiss, E., Hoffmann, R., and Haas, R. (2003). Helicobacter pylori Vacuolating Cytotoxin Inhibits T Lymphocyte Activation. *Science (80-)*. 301, 1099–1102.
- Gebran, S. J., Newton, C., Yamamoto, Y., Widen, R., Klein, T. W., and Friedman, H. (1994a). Macrophage permissiveness for *Legionella pneumophila* growth modulated by iron. *Infect. Immun.* 62, 564–8.
- Gebran, S. J., Yamamoto, Y., McHugh, S., Newton, C., Klein, T. W., and Friedman, H. (1994b). Differences and similarities in permissive A/J versus non-permissive BALB/c murine macrophages infected with *Legionella pneumophila*: the role of iron. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 9, 7–14.
- Gebran, S. J., Yamamoto, Y., Newton, C., Klein, T. W., and Friedman, H. (1994c). Inhibition of *Legionella pneumophila* growth by gamma interferon in permissive A/J mouse macrophages: role of reactive oxygen species, nitric oxide, tryptophan, and iron(III). *Infect. Immun.* 62, 3197–205.
- Gelman, B. B., Rauf, S. J., Nader, R., Popov, V., Borkowski, J., Chaljub, G., et al. (2001). Amoebic encephalitis due to *Sappinia diploidea*. *JAMA* 285, 2450–1.
- George, J. R., Pine, L., Reeves, M. W., and Harrell, W. K. (1980). Amino acid requirements of *Legionella pneumophila*. *J. Clin. Microbiol.* 11, 286–91.
- George, K. M., Chatterjee, D., Gunawardana, G., Welty, D., Hayman, J., Lee, R., et al. (1999). Mycolactone: a polyketide toxin from *Mycobacterium ulcerans* required for virulence. *Science* 283, 854–7.
- George, K. M., Pascopella, L., Welty, D. M., and Small, P. L. (2000). A *Mycobacterium ulcerans* toxin, mycolactone, causes apoptosis in guinea pig ulcers and tissue culture cells. *Infect. Immun.* 68, 877–83.
- Gérard, C., and Goldbeter, A. (2014). The balance between cell cycle arrest and cell proliferation: control by the extracellular matrix and by contact inhibition. *Interface Focus* 4, 20130075.
- Gérard, C., and Goldbeter, A. (2016). Dynamics of the mammalian cell cycle in physiological

- and pathological conditions. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 8, 140–156.
- Giamboi-Miraglia, A., Travaglione, S., Filippini, P., Fabbri, A., Fiorentini, C., and Falzano, L. (2007). A multinucleating *Escherichia coli* cytotoxin perturbs cell cycle in cultured epithelial cells. *Toxicol. Vitro.* 21, 235–239.
- Gietz, R. D., and Woods, R. A. (2006). “Yeast Transformation by the LiAc/SS Carrier DNA/PEG Method,” in *Yeast Protocols* (New Jersey: Humana Press), 107–120.
- Gorbsky, G. J. (2015). The spindle checkpoint and chromosome segregation in meiosis. *FEBS J.* 282, 2471–87.
- Greub, G., and Raoult, D. (2004). Microorganisms Resistant to Free-Living Amoebae. *Clin. Microbiol. Rev.* 17, 413–433.
- Guo, Z., Stephenson, R., Qiu, J., Zheng, S., and Luo, Z.-Q. (2014). A *Legionella* effector modulates host cytoskeletal structure by inhibiting actin polymerization. *Microbes Infect.* 16, 225–36.
- Habyarimana, F., Al-khodor, S., Kalia, A., Graham, J. E., Price, C. T., Garcia, M. T., et al. (2008). Role for the Ankyrin eukaryotic-like genes of *Legionella pneumophila* in parasitism of protozoan hosts and human macrophages. *Environ. Microbiol.* 10, 1460–1474.
- Habyarimana, F., Price, C. T., Santic, M., Al-Khodor, S., and Kwaik, Y. A. (2010). Molecular characterization of the Dot/Icm-translocated AnkH and AnkJ eukaryotic-like effectors of *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* 78, 1123–34.
- Hägele, S., Hacker, J., and Brand, B. C. (1998). *Legionella pneumophila* kills human phagocytes but not protozoan host cells by inducing apoptotic cell death. *FEMS Microbiol. Lett.* 169, 51–8.
- Hammer, B. K., and Swanson, M. S. (1999). Co-ordination of *Legionella pneumophila* virulence with entry into stationary phase by ppGpp. *Mol. Microbiol.* 33, 721–31.
- Hammer, B. K., Tateda, E. S., and Swanson, M. S. (2002). A two-component regulator induces the transmission phenotype of stationary-phase *Legionella pneumophila*. *Mol. Microbiol.* 44, 107–118.
- Harding, C. R., Mattheis, C., Mousnier, A., Oates, C. V., Hartland, E. L., Frankel, G., et al. (2013). LtpD is a novel *Legionella pneumophila* effector that binds phosphatidylinositol 3-phosphate and inositol monophosphatase IMPA1. *Infect. Immun.* 81, 4261–70.
- Harmey, D., Stenbeck, G., Nobes, C. D., Lax, A. J., and Grigoriadis, A. E. (2004). Regulation of Osteoblast Differentiation by *Pasteurella Multocida* Toxin (PMT): A Role for Rho GTPase in Bone Formation. *J. Bone Miner. Res.* 19, 661–670.
- Hartwell, L. H., and Weinert, T. A. (1989). Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246, 629–34.
- Häuslein, I., Manske, C., Goebel, W., Eisenreich, W., and Hilbi, H. (2016). Pathway analysis using 13 C-glycerol and other carbon tracers reveals a bipartite metabolism of *Legionella*

- pneumophila*. *Mol. Microbiol.* 100, 229–246.
- Henley, S. A., and Dick, F. A. (2012). The retinoblastoma family of proteins and their regulatory functions in the mammalian cell division cycle. *Cell Div.* 7, 10.
- Herrmann, V., Eidner, A., Rydzewski, K., Blädel, I., Jules, M., Buchrieser, C., et al. (2011). GamA is a eukaryotic-like glucoamylase responsible for glycogen- and starch-degrading activity of *Legionella pneumophila*. *Int. J. Med. Microbiol.* 301, 133–139.
- Hilbi, H., Rothmeier, E., Hoffmann, C., and Harrison, C. F. (2014). Beyond Rab GTPases *Legionella* activates the small GTPase Ran to promote microtubule polymerization, pathogen vacuole motility, and infection. *Small GTPases* 5, 1–6.
- Hirata, Y., Maeda, S., Mitsuno, Y., Akanuma, M., Yamaji, Y., Ogura, K., et al. (2001). *Helicobacter pylori* activates the cyclin D1 gene through mitogen-activated protein kinase pathway in gastric cancer cells. *Infect. Immun.* 69, 3965–71.
- Hirukawa, Y., Nakato, H., Izumi, S., Tsuruhara, T., and Tomino, S. (1998). Structure and expression of a cyst specific protein of *Acanthamoeba castellanii*. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* 1398, 47–56.
- Hoffman, P. S., and Garduno, R. A. (1999). Surface-associated heat shock proteins of *Legionella pneumophila* and *Helicobacter pylori*: roles in pathogenesis and immunity. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* 7, 58–63.
- Hoffmann, C., Harrison, C. F., and Hilbi, H. (2014). The natural alternative: protozoa as cellular models for *Legionella* infection. *Cell. Microbiol.* 16, 15–26.
- Horenkamp, F. A., Kauffman, K. J., Kohler, L. J., Sherwood, R. K., Krueger, K. P., Shteyn, V., et al. (2015). The *Legionella* Anti-autophagy Effector RavZ Targets the Autophagosome via PI3P- and Curvature-Sensing Motifs. *Dev. Cell* 34, 569–76.
- Horiguchi, Y. (2001). *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factors and *Bordetella* dermonecrotic toxin: the dermonecrosis-inducing toxins activating Rho small GTPases. *Toxicon* 39, 1619–27.
- Horwitz, M. (1984). Phagocytosis of the legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) occurs by a novel mechanism: Engulfment within a Pseudopod coil. *Cell* 36, 27–33.
- Horwitz, M. A. (1983). The Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes. *J. Exp. Med.* 158, 2108–26.
- Hu, D., Qiao, X., Wu, G., and Wan, Y. (2011). The emerging role of APC/CCdh1 in development. *Semin. Cell Dev. Biol.* 22, 579–85.
- Huang, J., Lesser, C. F., and Lory, S. (2008). The essential role of the CopN protein in *Chlamydia pneumoniae* intracellular growth. *Nature* 456, 112–5.
- Huelsensbeck, S. C., May, M., Schmidt, G., and Genth, H. (2009). Inhibition of cytokinesis by *Clostridium difficile* toxin B and cytotoxic necrotizing factors-reinforcing the critical role of RhoA in cytokinesis. *Cell Motil. Cytoskeleton* 66, 967–975.

- Ingmundson, A., Delprato, A., Lambright, D. G., and Roy, C. R. (2007). *Legionella pneumophila* proteins that regulate Rab1 membrane cycling. *Nature* 450, 365–369.
- Isaac, D. T., Laguna, R. K., Valtz, N., and Isberg, R. R. (2015). MavN is a *Legionella pneumophila* vacuole-associated protein required for efficient iron acquisition during intracellular growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, E5208–17.
- Isberg, R. R., O'Connor, T. J., and Heidtman, M. (2009). The *Legionella pneumophila* replication vacuole: making a cosy niche inside host cells. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 13–24.
- Iwai, H., Kim, M., Yoshikawa, Y., Ashida, H., Ogawa, M., Fujita, Y., et al. (2007). A bacterial effector targets Mad2L2, an APC inhibitor, to modulate host cell cycling. *Cell* 130, 611–23.
- Jackson, S. P., and Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461, 1071–8.
- Jacobi, S., and Heuner, K. (2003). Description of a putative type I secretion system in *Legionella pneumophila*. *Int. J. Med. Microbiol.* 293, 349–358.
- James, T. E., and Byers, T. J. (1967). The induction of multinuclearity in agitated and in aging cultures of *Acanthamoeba* sp. neff. *J. Cell. Physiol.* 70, 53–61.
- Jank, T., Böhmer, K. E., Tzivelekidis, T., Schwan, C., Belyi, Y., and Aktories, K. (2012). Domain organization of *Legionella* effector SetA. *Cell. Microbiol.* 14, 852–868.
- Jantzen, H. (1981). Control of actin synthesis during the development of *Acanthamoeba castellanii*. *Dev. Biol.* 82, 113–126.
- Jantzen, H., Schulze, I., and Stohr, M. (1988). Relationship between the timing of DNA replication and the developmental competence in *Acanthamoeba castellanii*. *J. Cell Sci.* 91, 389–399.
- Jantzen, H., Schulze, I., and Stohr, M. (1990). The importance of mitotic control for establishment of developmental competence in *Acanthamoeba castellanii*. *J. Cell Sci.* 97, 715–724.
- Jinadasa, R. N., Bloom, S. E., Weiss, R. S., and Duhamel, G. E. (2011). Cytolethal distending toxin: a conserved bacterial genotoxin that blocks cell cycle progression, leading to apoptosis of a broad range of mammalian cell lineages. *Microbiology* 157, 1851–75.
- De Jonckheere, J. F. (1991). Ecology of *Acanthamoeba*. *Clin. Infect. Dis.* 13, S385–S387.
- Jubelin, G., Chavez, C. V., Taieb, F., Banfield, M. J., Samba-Louaka, A., Nobe, R., et al. (2009). Cycle inhibiting factors (CIFs) are a growing family of functional cyclomodulins present in invertebrate and mammal bacterial pathogens. *PLoS One* 4, e4855.
- Jutras, I., and Desjardins, M. (2005). Phagocytosis: At the Crossroads of Innate and Adaptive Immunity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 511–27.
- Karin, M. (1995). The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* 270, 16483–6.

- de Keyzer, J., van der Does, C., and Driessen, A. J. M. (2003). The bacterial translocase: a dynamic protein channel complex. *Cell. Mol. Life Sci.* 60, 2034–2052.
- Khan, N. A. ed. (2015). *Acanthamoeba Biology and Pathogenesis*. second edi. Caister Academic.
- Kilvington, S., and Price, J. (1990). Survival of *Legionella pneumophila* within cysts of *Acanthamoeba polyphaga* following chlorine exposure. *J. Appl. Bacteriol.* 68, 519–25.
- King, C. H., Fields, B. S., Shotts, E. B., and White, E. H. (1991). Effects of Cytochalasin D and Methylamine on Intracellular Growth of *Legionella pneumophila* in Amoebae and Human Monocyte-Like Cells. *Infect. Immun.*, 758–763.
- Kirby, J. E., Vogel, J. P., Andrews, H. L., and Isberg, R. R. (1998). Evidence for pore-forming ability by *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol* 27, 323–36.
- Kjellstrand, P. (1968). The correspondence between growth, attachment and multinuclearity in *Acanthamoeba*. *Exp. Cell Res.* 53, 37–43.
- Kovacech, B., Nasmyth, K., and Schuster, T. (1996). EGT2 gene transcription is induced predominantly by Swi5 in early G1. *Mol. Cell. Biol.* 16, 3264–74.
- Kraft, C., Herzog, F., Gieffers, C., Mechtler, K., Hagting, A., Pines, J., et al. (2003). Mitotic regulation of the human anaphase-promoting complex by phosphorylation. *EMBO J.* 22, 6598–609.
- Krinos, C., High, A. S., and Rodgers, F. G. (1999). Role of the 25 kDa major outer membrane protein of *Legionella pneumophila* in attachment to U-937 cells and its potential as a virulence factor for chick embryos. *J. Appl. Microbiol.* 86, 237–44.
- Kubori, T., Koike, M., Bui, X. T., Higaki, S., Aizawa, S.-I., and Nagai, H. (2014). Native structure of a type IV secretion system core complex essential for *Legionella* pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 11804–9.
- Lacerda, H. M., Lax, A. J., and Rozengurt, E. (1996). *Pasteurella multocida* toxin, a potent intracellularly acting mitogen, induces p125FAK and paxillin tyrosine phosphorylation, actin stress fiber formation, and focal contact assembly in Swiss 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* 271, 439–45.
- Laguna, R. K., Creasey, E. A., Li, Z., Valtz, N., and Isberg, R. R. (2006). A *Legionella pneumophila*-translocated substrate that is required for growth within macrophages and protection from host cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 18745–50.
- Lammertyn, E., and Anné, J. (2004). Protein secretion in *Legionella pneumophila* and its relation to virulence. *FEMS Microbiol. Lett.* 238.
- Lara-Tejero, M., and Galán, J. E. (2001). CdtA, CdtB, and CdtC form a tripartite complex that is required for cytolethal distending toxin activity. *Infect. Immun.* 69, 4358–65.
- Lax, A. J., and Grigoriadis, A. E. (2001). *Pasteurella multocida* toxin: the mitogenic toxin that stimulates signalling cascades to regulate growth and differentiation. *Int. J. Med. Microbiol.* 291, 261–268.

- Lax, A. J., Pullinger, G. D., Baldwin, M. R., Harmey, D., Grigoriadis, A. E., and Lakey, J. H. (2004). The *Pasteurella multocida* toxin interacts with signalling pathways to perturb cell growth and differentiation. *Int. J. Med. Microbiol.* 293, 505–512.
- Legendre, M., Lartigue, A., Bertaux, L., Jeudy, S., Bartoli, J., Lescot, M., et al. (2015). In-depth study of Mollivirus sibericum, a new 30,000-y-old giant virus infecting *Acanthamoeba*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, E5327–35.
- Lesh, F. A. (1975). Massive development of amebas in the large intestine. Fedor Aleksandrovich Lesh (Lösch). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 24, 383–92.
- Li, Z., Pearlman, A. H., and Hsieh, P. (2016). DNA mismatch repair and the DNA damage response. *DNA Repair (Amst)*. 38, 94–101.
- Liles, M. R., Viswanathan, V. K., and Cianciotto, N. P. (1998). Identification and temperature regulation of *Legionella pneumophila* genes involved in type IV pilus biogenesis and type II protein secretion. *Infect. Immun.* 66, 1776–82.
- Lim, S., and Kaldis, P. (2013). Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development* 140, 3079–3093.
- Liu, F., Stanton, J. J., Wu, Z., and Piwnica-Worms, H. (1997). The human Myt1 kinase preferentially phosphorylates Cdc2 on threonine 14 and localizes to the endoplasmic reticulum and Golgi complex. *Mol. Cell. Biol.* 17, 571–83.
- Liu, M., Haenssler, E., Uehara, T., Losick, V. P., Park, J. T., and Isberg, R. R. (2012a). The *Legionella pneumophila* EnhC protein interferes with immunostimulatory muramyl peptide production to evade innate immunity. *Cell Host Microbe* 12, 166–76.
- Liu, R., Yu, Z., Guo, H., Liu, M., Zhang, H., and Yang, M. (2012b). Pyrosequencing analysis of eukaryotic and bacterial communities in faucet biofilms. *Sci. Total Environ.* 435, 124–131.
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402–8.
- Lorenzo-Morales, J., Kliescikova, J., Martinez-Carretero, E., De Pablos, L. M., Profotova, B., Nohynkova, E., et al. (2008). Glycogen phosphorylase in *Acanthamoeba* spp.: determining the role of the enzyme during the encystment process using RNA interference. *Eukaryot. Cell* 7, 509–17.
- Losick, V. P., Haenssler, E., Moy, M.-Y., and Isberg, R. R. (2010). LnaB: a *Legionella pneumophila* activator of NF-kappaB. *Cell. Microbiol.* 12, 1083–97.
- Losick, V. P., and Isberg, R. R. (2006). NF-kappaB translocation prevents host cell death after low-dose challenge by *Legionella pneumophila*. *J. Exp. Med.* 203, 2177–89.
- Lu, H., and Clarke, M. (2005). Dynamic properties of Legionella-containing phagosomes in Dictyostelium amoebae. *Cell. Microbiol.* 7, 995–1007.
- Lucas, C. E., Brown, E., and Fields, B. S. (2006). Type IV pili and type II secretion play a limited role in *Legionella pneumophila* biofilm colonization and retention. *Microbiology*

152, 3569–3573.

- Machner, M. P., and Isberg, R. R. (2006). Targeting of Host Rab GTPase Function by the Intravacuolar Pathogen *Legionella pneumophila*. *Dev. Cell* 11, 47–56.
- Malumbres, M. (2014). Cyclin-dependent kinases. *Genome Biol.* 15, 122.
- Manske, C., and Hilbi, H. (2014). Metabolism of the vacuolar pathogen *Legionella* and implications for virulence. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4, 125.
- Marchès, O., Ledger, T. N., Boury, M., Ohara, M., Tu, X., Goffaux, F., et al. (2003). Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* deliver a novel effector called Cif, which blocks cell cycle G2/M transition. *Mol. Microbiol.* 50, 1553–67.
- Marciano-Cabral, F., and Cabral, G. (2003). *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 273–307.
- Maréchal, A., and Zou, L. (2013). DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5.
- Marra, A., Blander, S. J., Horwitz, M. A., and Shuman, H. A. (1992). Identification of a *Legionella pneumophila* locus required for intracellular multiplication in human macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 9607–11.
- Martinez, A. J., and Visvesvara, G. S. (1997). Free-living, Amphizoic and Opportunistic Amebas. *Brain Pathol.* 7, 583–598.
- McCoy-Simandle, K., Stewart, C. R., Dao, J., DebRoy, S., Rossier, O., Bryce, P. J., et al. (2011). *Legionella pneumophila* type II secretion dampens the cytokine response of infected macrophages and epithelia. *Infect. Immun.* 79, 1984–97.
- McDade, J. E., Shepard, C. C., Fraser, D. W., Tsai, T. R., Redus, M. a, and Dowdle, W. R. (1977). Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *N. Engl. J. Med.* 297, 1197–1203.
- Mekkour, Driss, Tai, and Cohen (2013). *Legionella pneumophila*: An Environmental Organism and Accidental Pathogen. *Int. J. Sci. Technol.* 2, 187–196.
- Michard, C., Sperandio, D., Baïlo, N., Pizarro-Cerdá, J., LeClaire, L., Chadeau-Argaud, E., et al. (2015). The *Legionella* Kinase LegK2 Targets the ARP2/3 Complex To Inhibit Actin Nucleation on Phagosomes and Allow Bacterial Evasion of the Late Endocytic Pathway. *MBio* 6, e00354–15.
- Mine, T., Endo, C., Kushima, R., Kushima, W., Kobayashi, I., Muraoka, H., et al. (2000). The effects of water extracts of CagA positive or negative *Helicobacter pylori* on proliferation, apoptosis and connexin formation in acetic acid-induced gastric ulcer of rats. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 14 Suppl 1, 199–204.
- Mintz, C. S., Schultz, D. R., Arnold, P. I., and Johnson, W. (1992). *Legionella pneumophila* lipopolysaccharide activates the classical complement pathway. *Infect. Immun.* 60, 2769–76.

- Miraglia, A. G., Travaglione, S., Meschini, S., Falzano, L., Matarrese, P., Quaranta, M. G., et al. (2007). Cytotoxic necrotizing factor 1 prevents apoptosis via the Akt/IkappaB kinase pathway: role of nuclear factor-kappaB and Bcl-2. *Mol. Biol. Cell* 18, 2735–44.
- Moffat, J. F., and Tompkins, L. S. (1992). A quantitative model of intracellular growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii*. *Infect. Immun.* 60, 296–301.
- Molmeret, M., Alli, O. A. T., Radulic, M., Susa, M., Doric, M., and Kwaik, Y. A. (2002a). The C-terminus of IcmT is essential for pore formation and for intracellular trafficking of *Legionella pneumophila* within *Acanthamoeba polyphaga*. *Mol. Microbiol.* 43, 1139–50.
- Molmeret, M., Alli, O. A. T., Zink, S., Flieger, A., Cianciotto, N. P., and Kwaik, Y. A. (2002b). icmT is essential for pore formation-mediated egress of *Legionella pneumophila* from mammalian and protozoan cells. *Infect. Immun.* 70, 69–78.
- Molmeret, M., Alli, O. A., Zink, S., Flieger, A., Cianciotto, N. P., and Kwaik, Y. A. (2002c). icmT is essential for pore formation-mediated egress of *Legionella pneumophila* from mammalian and protozoan cells. *Infect Immun* 70, 69–78.
- Molofsky, A. B., and Swanson, M. S. (2003). *Legionella pneumophila* CsrA is a pivotal repressor of transmission traits and activator of replication. *Mol. Microbiol.* 50, 445–461.
- Molofsky, A. B., and Swanson, M. S. (2004). Differentiate to thrive: lessons from the *Legionella pneumophila* life cycle. *Mol. Microbiol.* 53, 29–40.
- Moon, E.-K., Chung, D.-I., Hong, Y.-C., and Kong, H.-H. (2009). Autophagy protein 8 mediating autophagosome in encysting *Acanthamoeba*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 168, 43–8.
- Moon, E.-K., Hong, Y., Chung, D.-I., and Kong, H.-H. (2012). Cysteine protease involving in autophagosomal degradation of mitochondria during encystation of *Acanthamoeba*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 185, 121–126.
- Morinaga, N., Yahiro, K., Matsuura, G., Moss, J., and Noda, M. (2008). Subtilase cytotoxin, produced by Shiga-toxicogenic *Escherichia coli*, transiently inhibits protein synthesis of Vero cells via degradation of BiP and induces cell cycle arrest at G1 by downregulation of cyclin D1. *Cell. Microbiol.* 10, 921–9.
- Moss, S. F., Sordillo, E. M., Abdalla, A. M., Makarov, V., Hanzely, Z., Perez-Perez, G. I., et al. (2001). Increased gastric epithelial cell apoptosis associated with colonization with cagA + *Helicobacter pylori* strains. *Cancer Res.* 61, 1406–11.
- Mukherjee, S., Liu, X., Arasaki, K., McDonough, J., Galán, J. E., and Roy, C. R. (2011). Modulation of Rab GTPase function by a protein phosphocholine transferase. *Nature* 477, 103–6.
- Müller, H., and Helin, K. (2000). The E2F transcription factors: key regulators of cell proliferation. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* 1470, M1–M12.
- Murata, T., Delprato, A., Ingmundson, A., Toomre, D. K., Lambright, D. G., and Roy, C. R. (2006). The *Legionella pneumophila* effector protein DrrA is a Rab1 guanine nucleotide-exchange factor. *Nat. Cell Biol.* 8, 971–977.

- Murga, R., Forster, T. S., Brown, E., Pruckler, J. M., Fields, B. S., and Donlan, R. M. (2001). Role of biofilms in the survival of *Legionella pneumophila* in a model potable-water system. *Microbiology* 147, 3121–6.
- Nagai, H., Kagan, J. C., Zhu, X., Kahn, R. A., and Roy, C. R. (2002). A Bacterial Guanine Nucleotide Exchange Factor Activates ARF on *Legionella* Phagosomes. *Science* (80-.). 295, 679–682.
- Nakayama, K., Nagahama, H., Minamishima, Y. A., Matsumoto, M., Nakamichi, I., Kitagawa, K., et al. (2000). Targeted disruption of Skp2 results in accumulation of cyclin E and p27(Kip1), polyploidy and centrosome overduplication. *EMBO J.* 19, 2069–81.
- Neff, R. J., Ray, S. A., Benton, W. F., and Wilborn, M. (1964). Chapter 4 Induction of Synchronous Encystment (Differentiation) in *Acanthamoeba* sp. *Methods Cell Biol.* 1, 55–83.
- Neunuebel, M. R., Chen, Y., Gaspar, A. H., Backlund, P. S., Yergey, A., Machner, M. P., et al. (2011). De-AMPylation of the small GTPase Rab1 by the pathogen *Legionella pneumophila*. *Science* 333, 453–6.
- Neunuebel, M. R., Mohammadi, S., Jarnik, M., and Machner, M. P. (2012). *Legionella pneumophila* LidA affects nucleotide binding and activity of the host GTPase Rab1. *J. Bacteriol.* 194, 1389–400.
- Newton, H. J., Sansom, F. M., Bennett-Wood, V., and Hartland, E. L. (2006). Identification of *Legionella pneumophila*-specific genes by genomic subtractive hybridization with *Legionella micdadei* and identification of lpnE, a gene required for efficient host cell entry. *Infect. Immun.* 74, 1683–91.
- Newton, H. J., Sansom, F. M., Dao, J., Cazalet, C., Bruggemann, H., Albert-Weissenberger, C., et al. (2008). Significant role for ladC in initiation of *Legionella pneumophila* infection. *Infect. Immun.* 76, 3075–85.
- Newton, H. J., Sansom, F. M., Dao, J., McAlister, A. D., Sloan, J., Cianciotto, N. P., et al. (2007). Sell repeat protein LpnE is a *Legionella pneumophila* virulence determinant that influences vacuolar trafficking. *Infect. Immun.* 75, 5575–85.
- Nishigami, Y., Ichikawa, M., Kazama, T., Kobayashi, R., Shimmen, T., Yoshikawa, K., et al. (2013). Reconstruction of Active Regular Motion in Amoeba Extract: Dynamic Cooperation between Sol and Gel States. *PLoS One* 8, e70317.
- Nougayrède, J. P., Taieb, F., De Rycke, J., and Oswald, E. (2005). Cyclomodulins: Bacterial effectors that modulate the eukaryotic cell cycle. *Trends Microbiol.* 13, 103–110.
- Nougayrède, J.-P., Homburg, S., Taieb, F., Boury, M., Brzuszkiewicz, E., Gottschalk, G., et al. (2006). *Escherichia coli* Induces DNA Double-Strand Breaks in Eukaryotic Cells. *Science* (80-.). 313, 848–851.
- Nougayrède, J.-P., Homburg, S., Taieb, F., Boury, M., Brzuszkiewicz, E., Gottschalk, G., et al. (2006). *Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. *Science* 313, 848–51.

- Ohno, A., Kato, N., Sakamoto, R., Kimura, S., and Yamaguchi, K. (2008). Temperature-dependent parasitic relationship between *Legionella pneumophila* and a free-living amoeba (*Acanthamoeba castellanii*). *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 4585–4588.
- Orth, J. H. C., Aktories, K., and Kubatzky, K. F. (2007). Modulation of host cell gene expression through activation of STAT transcription factors by *Pasteurella multocida* toxin. *J. Biol. Chem.* 282, 3050–7.
- Orth, J. H. C., Lang, S., Taniguchi, M., and Aktories, K. (2005). *Pasteurella multocida* toxin-induced activation of RhoA is mediated via two families of Gα proteins, Gαq and Gα12/13. *J. Biol. Chem.* 280, 36701–7.
- Oswald, E., Nougayrède, J.-P., Taieb, F., and Sugai, M. (2005). Bacterial toxins that modulate host cell-cycle progression. *Curr. Opin. Microbiol.* 8, 83–91.
- Page, F. C. (1967). Re-Definition of the Genus *Acanthamoeba* with Descriptions of Three Species. *J. Protozool.* 14, 709–724.
- Palusińska-Szyszk, M., Zdybicka-Barabas, A., Pawlikowska-Pawłęga, B., Mak, P., and Cytryńska, M. (2012). Anti-*Legionella dumoffii* Activity of *Galleria mellonella* Defensin and Apolipoprotein III. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 17048–17064. doi:10.3390/ijms131217048.
- Pardee, A. B. (1974). A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 71, 1286–90.
- Parker, L., and Piwnicka-Worms, H. (1992). Inactivation of the p34cdc2-cyclin B complex by the human WEE1 tyrosine kinase. *Science (80-)*. 257, 1955–1957.
- Peek, R. M., Blaser, M. J., Mays, D. J., Forsyth, M. H., Cover, T. L., Song, S. Y., et al. (1999). Helicobacter pylori Strain-specific Genotypes and Modulation of the Gastric Epithelial Cell Cycle. *Cancer Res.* 59.
- Pérès, S. Y., Marchès, O., Daigle, F., Nougayrède, J. P., Herault, F., Tasca, C., et al. (1997). A new cytolethal distending toxin (CDT) from *Escherichia coli* producing CNF2 blocks HeLa cell division in G2/M phase. *Mol. Microbiol.* 24, 1095–107.
- Peters, J.-M. (2006). The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 644–656.
- Portier, E., Zheng, H., Sahr, T., Burnside, D. M., Mallama, C., Buchrieser, C., et al. (2015). IroT/mavN, a new iron-regulated gene involved in *Legionella pneumophila* virulence against amoebae and macrophages. *Environ. Microbiol.* 17, 1338–50.
- Preston, T. M., and King, C. A. (1984). Amoeboid Locomotion of *Acanthamoeba castellanii* with Special Reference to Cell-Substratum Interactions. *Microbiology* 130, 2317–2323.
- Preuß, I., Hildebrand, D., Orth, J. H. C., Aktories, K., and Kubatzky, K. F. (2010). *Pasteurella multocida* toxin is a potent activator of anti-apoptotic signalling pathways. *Cell. Microbiol.* 12, 1174–1185.
- Price, C. T. D., Al-Khodori, S., Al-Quadani, T., and Abu Kwaik, Y. (2010). Indispensable role for the eukaryotic-like ankyrin domains of the ankyrin B effector of *Legionella*

- pneumophila* within macrophages and amoebae. *Infect. Immun.* 78, 2079–88.
- Price, C. T. D., Al-Quadani, T., Santic, M., Rosenshine, I., and Abu Kwaik, Y. (2011). Host Proteasomal Degradation Generates Amino Acids Essential for Intracellular Bacterial Growth. *Science* (80-.). 334, 1553–1557.
- Raychaudhury, S., Farelli, J. D., Montminy, T. P., Matthews, M., Ménétret, J.-F., Duménil, G., et al. (2009). Structure and function of interacting IcmR-IcmQ domains from a type IVb secretion system in *Legionella pneumophila*. *Structure* 17, 590–601.
- Reteno, D. G., Benamar, S., Khalil, J. B., Andreani, J., Armstrong, N., Klose, T., et al. (2015). Faustovirus, an asfarvirus-related new lineage of giant viruses infecting amoebae. *J. Virol.* 89, 6585–94.
- Richards, A. M., Von Dwingelo, J. E., Price, C. T., and Abu Kwaik, Y. (2013). Cellular microbiology and molecular ecology of *Legionella*-amoeba interaction. *Virulence* 4, 307–14.
- Ridenour, D. A., Cirillo, S. L. G., Feng, S., Samrakandi, M. M., and Cirillo, J. D. (2003). Identification of a gene that affects the efficiency of host cell infection by *Legionella pneumophila* in a temperature-dependent fashion. *Infect. Immun.* 71, 6256–63.
- Riley, T., Sontag, E., Chen, P., and Levine, A. (2008). Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 402–412.
- Rodgers, F. G. (1979). Ultrastructure of *Legionella pneumophila*. *J. Clin. Pathol.* 32, 1195–202.
- Rodgers, F. G., Greaves, P. W., Macrae, A. D., and Lewis, M. J. (1980). Electron microscopic evidence of flagella and pili on *Legionella pneumophila*. *J. Clin. Pathol.* 33, 1184–8.
- Rolando, M., Escoll, P., Nora, T., Botti, J., Boitez, V., Bedia, C., et al. (2016). *Legionella pneumophila* S1P-lyase targets host sphingolipid metabolism and restrains autophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 1901–6.
- Rolando, M., Sanulli, S., Rusniok, C., Gomez-Valero, L., Bertholet, C., Sahr, T., et al. (2013). *Legionella pneumophila* effector RomA uniquely modifies host chromatin to repress gene expression and promote intracellular bacterial replication. *Cell Host Microbe* 13, 395–405.
- Rosenhof, A. R. von (1755). *Der monatlich herausgegebenen Insecten-Belustigung*.
- Rossier, O., and Cianciotto, N. P. (2005). The *Legionella pneumophila* tatB gene facilitates secretion of phospholipase C, growth under iron-limiting conditions, and intracellular infection. *Infect. Immun.* 73, 2020–32.
- Rossier, O., Starkenburg, S. R., and Cianciotto, N. P. (2004). *Legionella pneumophila* type II protein secretion promotes virulence in the A/J mouse model of Legionnaires' disease pneumonia. *Infect. Immun.* 72, 310–21.
- Rothmeier, E., Pfaffinger, G., Hoffmann, C., Harrison, C. F., Grabmayr, H., Repnik, U., et al. (2013). Activation of Ran GTPase by a *Legionella* effector promotes microtubule

- polymerization, pathogen vacuole motility and infection. *PLoS Pathog.* 9, e1003598.
- Rowbotham, T. J. (1980). Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J. Clin. Pathol.* 33, 1179–1183.
- Roy, C. R., Berger, K. H., and 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, 663–74.
- Roy, C. R., and Isberg, R. R. (1997). Topology of *Legionella pneumophila* DotA: an inner membrane protein required for replication in macrophages. *Infect. Immun.* 65, 571–8.
- Rozengurt, E., Higgins, T., Chanter, N., Lax, A. J., and Staddon, J. M. (1990). *Pasteurella multocida* toxin: potent mitogen for cultured fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 123–7.
- Sahr, T., Brüggemann, H., Jules, M., Lomma, M., Albert-Weissenberger, C., Cazalet, C., et al. (2009). Two small ncRNAs jointly govern virulence and transmission in *Legionella pneumophila*. *Mol. Microbiol.* 72, 741–62.
- Saito, H., Yamaoka, Y., Ishizone, S., Maruta, F., Sugiyama, A., Graham, D. Y., et al. (2005). Roles of virD4 and cagG genes in the cag pathogenicity island of *Helicobacter pylori* using a Mongolian gerbil model. *Gut* 54, 584–90.
- Samba-Louaka, A., Nougayrède, J.-P., Watrin, C., Jubelin, G., Oswald, E., and Taieb, F. (2008). Bacterial cyclomodulin Cif blocks the host cell cycle by stabilizing the cyclin-dependent kinase inhibitors p21 waf1 and p27 kip1. *Cell. Microbiol.* 10, 2496–2508.
- Samba-Louaka, A., Nougayrède, J.-P., Watrin, C., Oswald, E., and Taieb, F. (2009). The enteropathogenic *Escherichia coli* effector Cif induces delayed apoptosis in epithelial cells. *Infect. Immun.* 77, 5471–7.
- Santamaría, D., Barrière, C., Cerqueira, A., Hunt, S., Tardy, C., Newton, K., et al. (2007). Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. *Nature* 448, 811–815.
- Sauer, J.-D., Bachman, M. A., and Swanson, M. S. (2005). The phagosomal transporter A couples threonine acquisition to differentiation and replication of *Legionella pneumophila* in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 9924–9.
- Scaturro, M., Meschini, S., Arancia, G., Stefano, F., and Ricci, M. L. (2009). Characterization of a spontaneous avirulent mutant of *Legionella pneumophila* Serogroup 6: Evidence of DotA and flagellin involvement in the loss of virulence. *J. Microbiol.* 47, 768–773.
- Schuster, F. L., and Levandowsky, M. (1996). Chemosensory Responses of *Acanthamoeba castellanii*: Visual Analysis of Random Movement and Responses to Chemical Signals. *J. Eukaryot. Microbiol.* 43, 150–158.
- Scola, B. L., Audic, S., Robert, C., Jungang, L., de Lamballerie, X., Drancourt, M., et al. (2003). A Giant Virus in Amoebae. *Science* (80-.). 299, 2033–2033.
- Segal, G., Russo, J. J., and Shuman, H. A. (1999). Relationships between a new type IV secretion system and the icm/dot virulence system of *Legionella pneumophila*. *Mol.*

- Microbiol.* 34, 799–809.
- Sexton, J. A., Miller, J. L., Yoneda, A., Kehl-Fie, T. E., and Vogel, J. P. (2004a). *Legionella pneumophila* DotU and IcmF are required for stability of the Dot/Icm complex. *Infect. Immun.* 72, 5983–92.
- Sexton, J. A., Pinkner, J. S., Roth, R., Heuser, J. E., Hultgren, S. J., and Vogel, J. P. (2004b). The *Legionella pneumophila* PilT homologue DotB exhibits ATPase activity that is critical for intracellular growth. *J. Bacteriol.* 186, 1658–66.
- Shaulian, E., and Karin, M. (2002). AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat. Cell Biol.* 4, E131–E136.
- Shenker, B. J., and Datar, S. (1995). *Fusobacterium nucleatum* inhibits human T-cell activation by arresting cells in the mid-G1 phase of the cell cycle. *Infect. Immun.* 63, 4830–6.
- Shenker, B. J., Hoffmaster, R. H., McKay, T. L., and Demuth, D. R. (2000). Expression of the Cytolethal Distending Toxin (Cdt) Operon in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: Evidence That the CdtB Protein Is Responsible for G2 Arrest of the Cell Cycle in Human T Cells. *J. Immunol.* 165, 2612–8.
- Sherr, C. J., and Roberts, J. M. (1995). Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* 9, 1149–63.
- Shevchuk, O., Jäger, J., and Steinert, M. (2011). Virulence properties of the *Legionella pneumophila* cell envelope. *Front. Microbiol.* 2, 74.
- Simon, S., and Hilbi, H. (2015). Subversion of Cell-Autonomous Immunity and Cell Migration by *Legionella pneumophila* Effectors. *Front. Immunol.* 6, 447.
- Skinner, A. R., Anand, C. M., Malic, A., and Kurtz, J. B. (1983). *Acanthamoebae* and environmental spread of *Legionella pneumophila*. *Lancet (London, England)* 2, 289–90.
- Söderberg, M. A., and Cianciotto, N. P. (2010). Mediators of Lipid A Modification, RNA Degradation, and Central Intermediary Metabolism Facilitate the Growth of *Legionella pneumophila* at Low Temperatures. *Curr. Microbiol.* 60, 59–65.
- Söderberg, M. A., Rossier, O., and Cianciotto, N. P. (2004). The Type II Protein Secretion System of *Legionella pneumophila* Promotes Growth at Low Temperatures. *J. Bacteriol.* 186, 3712–3720.
- Spanò, S., Ugalde, J. E., and Galán, J. E. (2008). Delivery of a Salmonella Typhi exotoxin from a host intracellular compartment. *Cell Host Microbe* 3, 30–8.
- Stark, G. R., and Taylor, W. R. (2006). Control of the G2/M Transition. *Mol. Biotechnol.* 32, 227–248.
- Steinert, M., Hentschel, U., and Hacker, J. (2002). *Legionella pneumophila*: an aquatic microbe goes astray. *FEMS Microbiol. Rev.* 26.
- Stohr, M., Bommert, K., Schulze, I., and Jantzen, H. (1987). The cell cycle and its

- relationship to development in *Acanthamoeba castellanii*. *J. Cell Sci.* 88, 579–589.
- Stone, B. J., and Abu Kwaik, Y. (1998). Expression of multiple pili by *Legionella pneumophila*: identification and characterization of a type IV pilin gene and its role in adherence to mammalian and protozoan cells. *Infect. Immun.* 66, 1768–75.
- Strickertsson, J. A. B., Desler, C., Martin-Bertelsen, T., Machado, A. M. D., Wadstrøm, T., Winther, O., et al. (2013). *Enterococcus faecalis* infection causes inflammation, intracellular oxphos-independent ROS production, and DNA damage in human gastric cancer cells. *PLoS One* 8, e63147.
- Sur, S., and Agrawal, D. K. (2016). Phosphatases and kinases regulating CDC25 activity in the cell cycle: clinical implications of CDC25 overexpression and potential treatment strategies. *Mol. Cell. Biochem.* 416, 33–46.
- Sutherland, M. C., Binder, K. A., Cualing, P. Y., and Vogel, J. P. (2013). Reassessing the Role of DotF in the *Legionella pneumophila* Type IV Secretion System. *PLoS One* 8.
- Sutherland, M. C., Nguyen, T. L., Tseng, V., Vogel, J. P., McDade, J., Shepard, C., et al. (2012). The *Legionella* IcmSW Complex Directly Interacts with DotL to Mediate Translocation of Adaptor-Dependent Substrates. *PLoS Pathog.* 8, e1002910.
- Suzan-Monti, M., La Scola, B., Barrassi, L., Espinosa, L., and Raoult, D. (2007). Ultrastructural characterization of the giant volcano-like virus factory of *Acanthamoeba polyphaga* Mimivirus. *PLoS One* 2, e328.
- Swanson, M. S., and Isberg, R. R. (1995). Association of *Legionella pneumophila* with the macrophage endoplasmic reticulum. *Infect. Immun.* 63, 3609–3620.
- Tan, Y., Arnold, R. J., and Luo, Z.-Q. (2011). *Legionella pneumophila* regulates the small GTPase Rab1 activity by reversible phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 21212–7.
- Tan, Y., and Luo, Z.-Q. (2011). *Legionella pneumophila* SidD is a deAMPyase that modifies Rab1. *Nature* 475, 506–9.
- Tesh, M. J., and Miller, R. D. (1981). Amino acid requirements for *Legionella pneumophila* growth. *J. Clin. Microbiol.* 13, 865–9.
- Thomas, R. J., and Brooks, T. J. (2004). Oligosaccharide receptor mimics inhibit *Legionella pneumophila* attachment to human respiratory epithelial cells. *Microb. Pathog.* 36, 83–92.
- Tilney, L. G., Harb, O. S., Connelly, P. S., Robinson, C. G., and Roy, C. R. (2001). How the parasitic bacterium *Legionella pneumophila* modifies its phagosome and transforms it into rough ER: implications for conversion of plasma membrane to the ER membrane. *J. Cell Sci.* 114, 4637–50.
- Toller, I. M., Neelsen, K. J., Steger, M., Hartung, M. L., Hottiger, M. O., Stucki, M., et al. (2011). Carcinogenic bacterial pathogen *Helicobacter pylori* triggers DNA double-strand breaks and a DNA damage response in its host cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 14944–9.

- Turner, N. a, Russell, a D., Furr, J. R., and Lloyd, D. (2000). Emergence of resistance to biocides during differentiation of *Acanthamoeba castellanii*. *J. Antimicrob. Chemother.* 46, 27–34.
- Vandersmissen, L., De Buck, E., Saels, V., Coil, D. A., and Anné, J. (2010). A *Legionella pneumophila* collagen-like protein encoded by a gene with a variable number of tandem repeats is involved in the adherence and invasion of host cells. *FEMS Microbiol. Lett.* 306, 168–176.
- Venkataraman, C., Gao, L. Y., Bondada, S., and Kwaik, Y. A. (1998). Identification of putative cytoskeletal protein homologues in the protozoan host *Hartmannella vermiformis* as substrates for induced tyrosine phosphatase activity upon attachment to the Legionnaires' disease bacterium, *Legionella pneumophila*. *J. Exp. Med.* 188, 505–14.
- Venkataraman, C., Haack, B. J., Bondada, S., and Abu Kwaik, Y. (1997). Identification of a Gal/GalNAc lectin in the protozoan *Hartmannella vermiformis* as a potential receptor for attachment and invasion by the Legionnaires' disease bacterium. *J. Exp. Med.* 186, 537–47.
- Vincent, C. D., Friedman, J. R., Jeong, K. C., Buford, E. C., Miller, J. L., and Vogel, J. P. (2006). Identification of the core transmembrane complex of the *Legionella* Dot/Icm type IV secretion system. *Mol. Microbiol.* 62, 1278–1291.
- Visvesvara, G. S., Moura, H., and Schuster, F. L. (2007). Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 50, 1–26.
- Vogt, S., Grosse, R., Schultz, G., and Offermanns, S. (2003). Receptor-dependent RhoA Activation in G12/G13 -deficient Cells. *J. Biol. Chem.* 278, 28743–28749.
- Volkonsky, M. (1931). *Hartmannella castellanii* Douglas, et classification des Hartmannelles. *Arch. Zool. Exp. Gen.* 72, 317–329.
- Wang, X., Allen, T. D., May, R. J., Lightfoot, S., Houchen, C. W., and Huycke, M. M. (2008). *Enterococcus faecalis* induces aneuploidy and tetraploidy in colonic epithelial cells through a bystander effect. *Cancer Res.* 68, 9909–17.
- Watnick, P., and Kolter, R. (2000). Biofilm, city of microbes. *J. Bacteriol.* 182, 2675–9.
- Weber, S. S., Ragaz, C., Reus, K., Nyfeler, Y., and Hilbi, H. (2006). *Legionella pneumophila* exploits PI(4)P to anchor secreted effector proteins to the replicative vacuole. *PLoS Pathog.* 2, e46.
- Wei, J., Noto, J., Zaika, E., Romero-Gallo, J., Correa, P., El-Rifai, W., et al. (2012). Pathogenic bacterium *Helicobacter pylori* alters the expression profile of p53 protein isoforms and p53 response to cellular stresses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, E2543–50.
- Weijer, C. J., Duschl, G., and David, C. N. (1984). A revision of the *Dictyostelium discoideum* cell cycle. *J. Cell Sci.* 70.
- Weinberg, R. A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81, 323–330.

- Whitehouse, C. A., Balbo, P. B., Pesci, E. C., Cottle, D. L., Mirabito, P. M., and Pickett, C. L. (1998). *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin causes a G2-phase cell cycle block. *Infect. Immun.* 66, 1934–40.
- Wieland, H., Ullrich, S., Lang, F., and Neumeister, B. (2005). Intracellular multiplication of *Legionella pneumophila* depends on host cell amino acid transporter SLC1A5. *Mol. Microbiol.* 55, 1528–1537.
- Winiiecka-Krusnell, J., and Linder, E. (2001). Bacterial infections of free-living amoebae. *Res. Microbiol.* 152, 613–619.
- Xu, L., and Luo, Z. Q. (2013). Cell biology of infection by *Legionella pneumophila*. *Microbes Infect.* 15, 157–167.
- Yahiro, K., Tsutsuki, H., Ogura, K., Nagasawa, S., Moss, J., and Noda, M. (2012). Regulation of subtilase cytotoxin-induced cell death by an RNA-dependent protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase-dependent proteasome pathway in HeLa cells. *Infect. Immun.* 80, 1803–14.
- Yu, H. (2007). Cdc20: a WD40 activator for a cell cycle degradation machine. *Mol. Cell* 27, 3–16.
- Yu, H. S., Jeong, H. J., Hong, Y.-C., Seol, S.-Y., Chung, D.-I., and Kong, H.-H. (2007). Natural occurrence of Mycobacterium as an endosymbiont of *Acanthamoeba* isolated from a contact lens storage case. *Korean J. Parasitol.* 45, 11–8.
- Yu, V. L., Plouffe, J. F., Pastoris, M. C., Stout, J. E., Schousboe, M., Widmer, A., et al. (2002). Distribution of *Legionella* Species and Serogroups Isolated by Culture in Patients with Sporadic Community-Acquired Legionellosis: An International Collaborative Survey. *J. Infect. Dis.* 186, 127–128.
- Zhan, X.-Y., Hu, C.-H., and Zhu, Q.-Y. (2015). *Legionella* Pathogenesis and Virulence Factors. *Ann. Clin. Lab. Res.* 3.
- Zhou, B.-B. S., and Elledge, S. J. (2000). The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 408, 433–439.
- Zhu, W., Hammad, L. A., Hsu, F., Mao, Y., and Luo, Z.-Q. (2013). Induction of caspase 3 activation by multiple *Legionella pneumophila* Dot/Icm substrates. *Cell. Microbiol.* 15, 1783–95.
- Zink, S. D., Pedersen, L., Cianciotto, N. P., and Abu-Kwaik, Y. (2002). The Dot/Icm type IV secretion system of *Legionella pneumophila* is essential for the induction of apoptosis in human macrophages. *Infect. Immun.* 70, 1657–1663.

Résumé : *Acanthamoeba castellanii* est une amibe libre ubiquiste de l'environnement. Elle se nourrit principalement de micro-organismes par phagocytose. Seulement, certains micro-organismes ont développé des mécanismes de résistances qui leur permettent d'échapper à la digestion et même de se multiplier à l'intérieur des amibes. C'est le cas de *Legionella pneumophila*, bactérie responsable de la légionellose. *Legionella pneumophila*, à travers son système de sécrétion Dot/Icm, injecte plusieurs effecteurs à l'intérieur de son hôte. Ces effecteurs interagissent avec les protéines de l'hôte, et induisent une modification de la physiologie de son hôte, à son avantage. Durant ma thèse, nous nous sommes intéressés aux effets de *Legionella pneumophila*, sur la prolifération de son hôte amibien. Nous avons montré que *Legionella pneumophila* arrête la prolifération d'*Acanthamoeba castellanii*. Ce phénotype était associé une modification de la forme, à une perte d'adhérence et à une baisse de motilité de l'amibe. Sur le plan moléculaire, *Legionella pneumophila* induit une baisse dans l'expression du gène *cdc2b*, qui présente des similarités avec le gène *cdk1* (cyclin dépendant kinase), codant pour la CDK essentielle au déroulement du cycle cellulaire chez les mammifères. L'arrêt de la prolifération d'*Acanthamoeba castellanii*, qui passe par une réduction d'expression de *cdc2b*, est certainement induit par un ou plusieurs effecteur(s) de *Legionella pneumophila*, car le mutant $\Delta dotA$ de *L. pneumophila*, déficient au niveau de l'appareil de sécrétion Dot/Icm, n'induit pas l'arrêt de la prolifération d'*Acanthamoeba castellanii*.

Mots clefs : *Acanthamoeba castellanii*, *Legionella pneumophila*, cycle cellulaire, manipulation des fonctions de l'hôte, motilité des amibes, kinases dépendante des cyclines.

Abstract : *Acanthamoeba castellanii* is an ubiquitous free-living amoeba of the environment. This amoeba feeds mainly on micro-organisms by phagocytosis. However, some micro-organisms have acquired resistances that allow them to escape digestion and even multiply inside amoebae. This is the case of *Legionella pneumophila*, the bacterium responsible for legionellosis. *Legionella pneumophila*, through its Dot/Icm secretion system, injects several effectors into its host. These effectors interact with the proteins of the host, and induce a modification of the physiology of its host, to its advantage. During my PhD, we were interested in the effects of *Legionella pneumophila* infection on the proliferation of its amoebic host. We showed that *Legionella pneumophila* prevents the proliferation of *Acanthamoeba castellanii*. This phenotype was associated with a modification of the shape, a loss of adhesion and a decrease in motility of the amoeba. On the molecular level, *Legionella pneumophila* induces a decrease in the expression of the *cdc2b* gene, which share similarities with the *cdk1* (cyclin dependent kinase) gene, coding for the major CDK of the mammalian cells cycle. The arrest of proliferation of *Acanthamoeba castellanii*, which involves a reduction in expression of *cdc2b*, is certainly induced by one or more effector (s) of *Legionella pneumophila*, because the mutant $\Delta dotA$ of *L. pneumophila*, defective in the Dot/Icm secretion apparatus, does not induce proliferation arrest of *Acanthamoeba castellanii*.

Key words: *Acanthamoeba castellanii*, *Legionella pneumophila*, cell cycle, manipulation of host functions, amoeba motility, cyclin-dependant kinases.