



HAL
open science

Étude comparée de la prolifération de *Legionella pneumophila* dans différents hôtes amibiens et de leurs inter - relations : implication potentielle de phospholipides aminés

Rafik Dey

► **To cite this version:**

Rafik Dey. Étude comparée de la prolifération de *Legionella pneumophila* dans différents hôtes amibiens et de leurs inter - relations : implication potentielle de phospholipides aminés. Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I, 2010. Français. NNT : 2010LYO10044 . tel-00650228

HAL Id: tel-00650228

<https://theses.hal.science/tel-00650228>

Submitted on 15 Dec 2011

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

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

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE

E.D.I.S.S

DIPLOME DE DOCTORAT

(Arrêté du 7 août 2006)

Soutenue publiquement le 25 mars 2010

Par

Mr. Rafik DEY

TITRE :

Etude comparée de la prolifération de *Legionella pneumophila* dans différents hôtes amibiens et de leurs inter - relations. Implication potentielle de phospholipides aminés.

Directeur de thèse : Dr Jacques Bodennec

JURY :

M. le Pr. Yann Voituron	Président
Mme. le Pr. Renée Grillot	Rapporteur
M. le Dr. Risso Jean-Jacques	Rapporteur
M. le Dr. Jacque Portoukalian	Examineur
M. le Pr. Jacques Bohatier	Examineur
M. le Dr. Jacques Bodennec	Directeur de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Vice-président du Conseil Scientifique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Secrétaire Général

M. le Professeur L. Collet

M. le Professeur J-F. Mornex

M. le Professeur G. Annat

M. le Professeur D. Simon

M. G. Gay

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine Lyon Sud – Charles Mérieux

UFR d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de Réadaptation

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur J. Etienne

Directeur : M. le Professeur F-N. Gilly

Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois

Directeur : M. le Professeur F. Locher

Directeur : M. le Professeur Y. Matillon

Directeur : M. le Professeur P. Farge

COMPOSANTES SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire de Lyon

Institut des Sciences et des Techniques de l'Ingénieur de Lyon

Institut Universitaire de Technologie A

Institut Universitaire de Technologie B

Institut de Science Financière et d'Assurance

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. Le Professeur F. Gieres

Directeur : M. C. Collignon

Directeur : M. B. Guiderdoni

Directeur : M. le Professeur J. Lieto

Directeur : M. le Professeur C. Coulet

Directeur : M. le Professeur R. Lamartine

Directeur : M. le Professeur J-C. Augros

Directeur : M R. Bernard

Remerciements

Je tiens à adresser mes sincères remerciements au Professeur Yann Voituron pour avoir accepté de présider ce jury, au Professeur Grillot Renée et Docteur Risso Jean-Jacques d'avoir accepté d'examiner ce manuscrit de thèse et de faire partie de mon jury.

Je remercie le Docteur Portoukalian Jacques et le Professeur Bohatier Jacques, d'avoir accepté de faire partie de mon jury.

Je tiens à remercier tout particulièrement le docteur Jacques Bodennec qui tout au long de ces quatre ans a su me conseiller et m'encourager dans les moments de doute. Au delà des techniques scientifiques, tu m'as surtout montré les qualités humaines que requièrent le métier de chercheur et notamment la curiosité, l'enthousiasme, la rigueur et la ténacité. Merci pour ta disponibilité, ta confiance et pour la grande liberté que tu m'as accordé. Merci enfin pour ton écoute et nos discussions scientifiques et personnelles passionnantes (et passionnées...!).

Une chose est sûre, travailler à tes côtés a été très enrichissant et jamais monotone.

Merci pour tout....

Je tiens également à exprimer toute ma reconnaissance au Pr. Pierre Pernin pour m'avoir accueillie au sein de son équipe pour mon stage de DEA et pour sa disponibilité pendant ma thèse.

Un grand merci à l'ensemble des membres actuels ou anciens du labo 5123 pour votre aide, votre écoute et votre soutien Tous mes encouragements aux futurs thésards.

Je souhaite enfin remercier ma famille et plus particulièrement mes parents pour leur amour et leur soutien inconditionnel. Et pour finir, un immense merci à toi, Marjorie, d'avoir cru en moi, de m'avoir soutenu (et supporté !) depuis le début. Sans toi, je n'y serai peut-être pas arrivé ou du moins pas de cette façon. Il n'y a pas de mots assez forts pour exprimer l'immensité de mon affection...

Production scientifique

Articles dans des journaux à comité de lecture

Articles publiés

- **Rafik Dey**, Jacques Bodennec, Mouh Ouladj Mameri, and Pierre Pernin

Free-living freshwater amoebae differ in their susceptibility to the pathogenic bacterium *Legionella pneumophila*. *FEMS Microbiology Letters* (2008).

Articles soumis

- * **Rafik Dey**, J. Bodennec, M. Mameri, and P. Pernin

Occurrence of phagocytosis between free-living amoebas and effect on *Legionella pneumophila* growth.

- * **Rafik Dey**, Pierre Pernin, and Jacques Bodennec

Endocannabinoids inhibit the growth of free-living amoebae.

- * Ahmed Athamena, Selena Trajkovic Bodennec, Mathieu Albert, **Rafik Dey**, Gérard Brichon, Valter Kozul and Jacques Bodennec

Solid phase extraction of sphingophosphonolipids on aminopropyl cartridges and separation by two-dimensional Thin Layer Chromatography.

Articles en préparation

Rafik Dey, Ahmed Athamena, Mouh Oulhadj Mameri, Gérard Brichon, Pierre Pernin and Jacques Bodennec

Willaertia magna, a *Legionella pneumophila* resistant free-living amoeba, differs in phospholipid composition compared to bacterium-permissive amoebic species

Rafik Dey, AM.Thiam, G. Brichon, JJ. Risso, JM. Péquignot, L. Bezin, J.Bodennec.

Isolation of endocannabinoids by solid phase extraction on aminopropyl cartridges

Brevet international

Novel method for biologically combating the proliferation of legionella pneumophila, and novel disinfecting agent containing amoebic protozoa of the willaertia genus.

Inventeurs: Bodennec, J., **Dey, R.**, Pernin, P. N° WO2008043969

Communications affichées :

- **R. Dey.**, P. Pernin., and J. Bodennec.

Willaertia as a biological combating the proliferation of Legionella

3ème Edition de Tremplin Recherche du SENAT, 2008. Paris-France « Lauréat du meilleur projet »

- **R. Dey.**, S. Trajkovic-Bodennec., A. Athamena., P. Pernin., and J. Bodennec.

Effects of endocannabinoids and 3-deazaadenozine on the growth of free-living amoebas and their phagocytosis activity

2 ème journée scientifique d'IMBL 2009. Marseille

- **R. Dey.**, M. O. Mameri., P. Pernin., and J. Bodennec.

Bactericidal and amoebicidal activities of the free living amoeba *Willaertia magna*

IIIrd International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology
Lisbonne (Portugal) 2009.

- **R. Dey.**, S. Trajkovic-Bodennec., A. Athamena., P. Pernin., and J. Bodennec.

Effects of endocannabinoids and 3-deazaadenozine on the growth of free-living amoebas and their phagocytosis activity. IIIrd International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology
Lisbonne (Portugal) 2009.

Sommaire

Sommaire

Introduction générale	19
Contexte scientifique	23
Partie I : Les amibes libres	24
Biologie amibienne	24
I.1.a. Morphologie générale des amibes libres	24
I.1.b. Alimentation	25
I.1.c. Distribution	25
I.1.d. Cycle vital des amibes libres	26
Partie II: Les légionelles	27
II.1. Les LLAP (Legionella-like amoeba pathogens)	27
II.2. Ecologie des légionelles	27
II.3. Association au biofilm	28
Partie III : Amibes et Légionelles: Des relations dangereuses	29
III.1. Processus d'infestation des amibes libres	30
III.2. Gènes impliqués dans les interactions Amibes-Légionelles	33
III.2. a. Le pore d'invasion et d'altération de la voie d'endocytose	33
III.1. b. Le pore de cytolysse et de libération de <i>L. pneumophila</i>	34
Partie IV: Les Phospholipides	34
IV.1. Structure des phospholipides	35
IV.2. Biosynthèse de l'acide phosphatidique	37
IV.3. Biosynthèse de la Phosphatidylsérine	37
IV.4. Biosynthèse de la Phosphatidyléthanolamine	38
IV.5. Biosynthèse de la Phosphatidylcholine	38
IV.6. Catabolisme des phospholipides	40
Partie V: Les endocannabinoides	41
V.1. Structure des endocannabinoides	42
V.1.a. L'anandamide	43
V.1.b. Le 2-AG	43

V.2. Biosynthèse des endocannabinoïdes -----	44
V.2.a. L'Anandamide -----	44
V.2.b. Le 2-AG-----	45
V.3. Catabolisme des Endocannabinoïdes -----	45
Partie VI: Rôle des lipides de structures dans les interactions cellule hôte-bactérie parasite -----	47
VI.1. Importance des phosphoinositides (PI) dans les interactions hôte-parasite -----	47
VI.2. Importance de la phosphatidylsérine (PS) dans la maturation phagosomale-----	49
VI.3. Les phospholipases de <i>L. pneumophila</i> -----	50
VI.4. Phospholipides aminés et dynamique membranaire lors de la fusion phagolysosomale	51
Matériels et méthodes -----	55
Partie I: Les Cocultures amibiennes -----	56
I. Souches utilisées -----	56
I.a . Amibes libres -----	56
I.b . Légionelles -----	57
I.1. Coculture monoamibienne de <i>L. pneumophila</i> -----	57
I.1. a. Réalisation des cocultures monoamibiennes : Etude cinétique des cocultures -----	57
I.1. b. Cytotoxicité de <i>L. pneumophila</i> vis-à-vis des différents genres amibiens -----	58
I.2. Coculture emboîtée (Tripartite) de <i>L. pneumophila</i> .-----	59
I.2. a. Etude cinétique de la phagocytose inter-amibienne <i>Hartmannella-Willaertia</i> . -----	59
I.2. b. Réalisation des cocultures emboîtées de <i>L. pneumophila</i> . -----	59
Partie II: Microscopie Electronique à Transmission -----	61
II.1. Fixation des cellules -----	61
II.2. Déshydrations et inclusion des cellules-----	61
II.3. Coupes cellulaires à l'ultra-microtome -----	62
II.4. Contraste et observation des coupes -----	62
Partie III: Analyses biochimiques -----	62
III.1. Extraction et purification des lipides-----	63
III.1.a. Premier lavage-----	63
III.1.b. Deuxième lavage -----	64

III.2. Analyse des phospholipides -----	64
III.2.a. La minéralisation -----	64
III.2.b. Dosage du phosphore lipidique -----	65
III.3. Fractionnement des classes de lipides par extraction en phase solide -----	65
III.4. Chromatographies sur Couche Mince -----	66
III.4.a. Séparation bidimensionnelle des phospholipides -----	66
III.4.b. Séparation des lipides neutres -----	67
III.4.c. Séparation des céramides libres -----	67
III.4.d. Séparation des glycosphingolipides neutres -----	68
III.4.e. Séparation des phospholipides -----	68
III.5. Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) -----	68
III.5.a. Méthylation des acides gras -----	68
III.5.b. Séparation des acides gras méthylés par CPG -----	69
III.6. Dosage des protéines -----	69
Partie IV: Effet des Endocannabinoides et du 3-deazaadenosine sur la croissance des amibes libres -----	70
IV.1. Effet des endocannabinoides -----	70
IV.2. Effet du 3-deazaadenosine -----	70
Résultats -----	73
Papier n°1 -----	75
Papier n°2 -----	103
Papier n°3 -----	129
Papier n°4 -----	155
Discussion générale -----	169
Partie I: Les différentes réponses des amibes libres aux légionelles -----	170
I.a. Cocultures mono-amibiennes -----	170
I.b. Absence de cytotoxicité de <i>L. pneumophila</i> vis-à-vis d'une souche de <i>Willaertia magna</i> -----	171
I.c. <i>L. pneumophila</i> et amibes du genre <i>Willaertia magna</i> C2c (mécanisme de croissance) -----	171
Partie II: Les interactions amibiennes et la transmission bactérienne -----	173
II.1. Le processus phagocytaire Inter-Amibien -----	173

II.1.a. Cinétique du processus de phagocytose inter-amibienne -----	173
II.1.b. Résultats des cocultures tripartites (bi-amibiennes) de <i>L. pneumophila</i> -	174
Partie III: Rôle des lipides de structures -----	175
III.1. Les Glycosphingolipides neutres et les phospholipides -----	176
III.2. Rapport PE/PC -----	176
III.2.a. L'importance de la voie de méthylation PE-PC -----	177
III.2.b. Effet de l'inhibiteur de la méthylation 3-dezaadenosine -----	177
III.3. Acides gras des phospholipides totaux -----	178
Partie IV: Effet des endocannabinoides -----	179
IV.1. Inhibition de la croissance amibienne en présence des endocannabinoides -----	179
Conclusions & Perspectives -----	181
<i>Conclusions illustrées</i> -----	182
<i>Perspectives</i> -----	185
I. <i>Willaertia magna</i> pour la lutte biologique contre les légionelles -----	185
II. <i>Willaertia magna</i> : un modèle cellulaire originale pour comprendre les mécanismes régulant les relations hôte / parasite -----	185
Références bibliographiques -----	189
Annexe -----	205

Liste des Figures

Fig. 1 : Caractéristiques générales communes aux amibes libres.

Fig. 2 : Trophozoite d'*Acanthamoeba castellanii* en coculture avec *L. pneumophila* observé in vivo en microscopie à contraste de phase.

Fig. 3 :

A. Processus et mécanisme de l'infestation amibienne par *L. pneumophila*

B. Observation en microscopie électronique de l'infestation d'*Acanthamoeba Castellani* par *Legionella pneumophila* Paris

Fig. 4 : Structure générale des glycérophospholipides.

Fig. 5 : Voies biosynthétiques des phospholipides.

Fig. 6 : Emplacements de l'action des phospholipases A1, A2, C et D.

Fig. 7 : Structure de l'Anandamide.

Fig. 8 : Structure du 2-Arachidonoylglycérol.

Fig. 9 : Biosynthèse des Endocannabinoïdes.

Glossaire

Glossaire

A

2-AG:	2- <i>O</i> -arachidonoylglycérol
2-AGether:	2- <i>O</i> -arachidonoylglycérol ether
AEA:	Anandamide (<i>N</i> -arachidonoyl éthanolamine)
ANSA:	8-Anilino-1-Naphtalene sulfonic Acid
AFSSET:	Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail

B

BCYE:	Buffered Charcoal Yeast Extract
--------------	---------------------------------

C

CB1:	Cannabinoid receptor 1
CB2:	Cannabinoid receptor 2
CCM:	Chromatographie sur couche mince
CoA :	Coenzyme A
COX2 :	Cyclooxygénase 2
CPG :	Chromatographie en phase gazeuse
CTP:	Phosphocholine cytidyltransférase
CTP:	Cytidine Triphosphate

D

DAG :	Diacylglycérol
DO :	Densité Optique
DPG :	Diphosphatidylglycérol

E**RE:** Réticulum Endoplasmique**F****F:** Fraction**FAAH:** Fatty Acid Amide Hydrolase**G****GalCer:** Galactosylcéramide**GalSph:** Galactosylsphingosine**GLC:** Gas Liquid Chromatography**GlcCer:** Glucosylcéramide**GlcCerases:** Glucocérébrosidase**GlcSph:** Glucosylsphingosine**GLSs:** Glycosphingolipids**H****HPLC :** High performance liquid chromatography**L****LacCer:** Lactosylcéramide**LacSph:** Lactosylsphingosine**LLAP:** Legionella-Like-Amoebal Pathogen**LPE:** Lysophosphatidyléthanolamine**LPS:** Lysophosphatidylsérine**Lyso-n-GSLs:** Lyso neutral Glycosphingolipids

M**MAG:** Monoacylglycérol**N****N-AcGal:** *N*-acétyl-D-galactosamine**NAPE:** *N*-acyl phosphatidyl éthanolamine**NNA:** Non Nutrient Agent**O****2-OG:** 2-*O*-oleylglycérol**P****PBS:** Phosphate Buffered Saline**PC:** Phosphatidylcholine**PE:** Phosphatidyléthanolamine**PL:** Phospholipides**PLA:** Phospholipase A**PLD:** Phospholipase D**PLC:** Phospholipase C**P lip:** Phosphore lipidique**PS:** Phosphatidylsérine**PSS I:** Phosphatidylsérine Synthase 1**PSS II:** Phosphatidylsérine Synthase 2**R****REG:** Réticulum Endoplasmique Granuleux

S

SCGYEM: Serum Casein Glucose Yeast Extract Medium

SD: Standard Deviation

SM: Sphingomyéline

SPE: Solid Phase Extraction

SVF: Sérum de Veau Foetal

T

THC: Tétrahydrocannabinol

TLC: Thin-layer chromatography

V

VIH: Virus de l'Immunodéficiéncie Humaine

Introduction Générale

“The higher animals, we learn from morphological studies, may be regarded as groups of amoebae peculiarly associated together ”¹

Les amibes libres sont des protozoaires qui représentent un modèle cellulaire particulièrement intéressant. En tant qu'eucaryotes, l'amibe est devenue un symbole commun de la cellule, et un matériel exemplaire pour beaucoup d'études biologiques, en raison de ses propriétés uniques. En effet comparée à beaucoup d'autres animaux, plantes ou protozoaires, elle possède l'avantage d'être cultivée et manipulée très facilement; certains auteurs ont pu supposer que c'était la forme la plus primitive des cellules connues ².

Les amibes « libres » sont ainsi appelées parce qu'il s'agit d'amibes qui, à la différence d'autres amibes parasitaires telle que *Entamoeba histolytica* (parasite strict de l'intestin humain) mènent habituellement une existence autonome dans l'environnement et sont totalement indépendantes de l'homme. Cependant, dans certaines circonstances favorisantes, certaines espèces d'amibes libres telles que *Naegleria fowleri*, ou différentes espèces d'*Acanthamoeba*, peuvent être responsables d'affections graves du système nerveux central et de la peau dont l'issue est souvent fatale ³.

En raison des similitudes existant entre les amibes et les cellules de mammifères, les amibes libres sont utilisées comme modèle pour analyser les mécanismes physiologiques gouvernant les grandes fonctions cellulaires ⁴⁻⁷.

En plus des similitudes dans le comportement et la signalisation intracellulaire, avec les cellules mammifères, les amibes libres sont des cellules phagocytaires et, comme les cellules mammifères, elles expriment un métabolisme lipidique très similaire ⁸. Ces similitudes font que les amibes libres sont utilisées de plus en plus comme modèle afin d'étudier la régulation du métabolisme eucaryotique ^{9, 10}. Le fait que les amibes soient des cellules présentant une capacité de phagocytose, elles sont souvent utilisées afin de comprendre les mécanismes mis en jeu lors de ces phénomènes chez d'autres espèces supérieures ¹¹.

Les amibes libres peuvent intervenir dans des relations de type symbiotique ou parasitaire avec certaines bactéries pathogènes, représentant ainsi un réservoir environnemental très important de germes. Plusieurs bactéries pathogènes sont effectivement connues pour les relations parasitaires qu'elles développent avec certaines amibes libres. C'est notamment le cas de *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescans*, les bactéries du genre *Pseudomonas*, *Yersinia*, *Shigella*, *Campilobacter* ³ et *Legionella*.

Dans le cas des bactéries appartenant à ce dernier genre, de nombreuses études se sont intéressées aux relations existantes entre les amibes libres et l'espèce *Legionella pneumophila*. Cet intérêt est naturellement conditionné par le problème de santé publique représenté par

cette bactérie pathogène, responsable de la maladie du légionnaire encore appelée légionellose. L'intérêt de la communauté scientifique vis-à-vis de cette bactérie est aussi lié aux coûts élevés que la prolifération de cette bactérie peut induire dans le cadre de certaines activités industrielles ¹². C'est Rowbotham qui en 1980, par analogie avec ce que l'on observe chez l'homme, a été le premier à supposer et à démontrer l'existence d'une multiplication intracellulaire de *Legionella pneumophila* dans des amibes libres ¹³. De nombreux travaux sont venus ensuite confirmer et étendre cette observation initiale ¹⁴⁻¹⁶. Toutes les études portant sur les relations amibes libres – *Legionella pneumophila* démontrent la capacité des amibes à favoriser la prolifération bactérienne. Toutefois, l'examen attentif des travaux publiés montre que l'ensemble de ces études a porté sur quelques espèces amibiennes, notamment les espèces appartenant aux genres *Acanthamoeba*, *Hartmannella* et *Naegleria*. Une étude récente montre toutefois une différence dans la capacité de 2 espèces amibiennes à soutenir la multiplication de *Legionella pneumophila* ¹⁷. Dans cette étude, les auteurs soulignent que, dans des conditions strictement identiques, l'espèce *Naegleria lovaniensis* montre une capacité de développement de *Legionella* inférieure à celle de l'espèce *Acanthamoeba castellanii*. Il apparaît donc clairement que certaines espèces amibiennes peuvent représenter de moins bons vecteurs que d'autres.

Les données de la littérature montrent à ce sujet un déficit évident de connaissances quand aux capacités comparées des différents hôtes amibiens à soutenir la croissance bactérienne. La connaissance de cet aspect de l'écologie microbienne est pourtant fondamentale si nous voulons mieux cerner les facteurs environnementaux pouvant expliquer l'émergence soudaine d'un « bloom » bactérien. Un milieu donné est effectivement une conjonction, entre autres, de différents facteurs trophiques, de conditions physico chimique changeantes, tous ces facteurs pouvant impacter la composition et la nature des populations microbiologiques habitant ce biotope. De surcroit, ces différentes populations microbiologiques interagissent entre elles, ne serait ce que par les phénomènes de prédatons pouvant intervenir entre certaines espèces. Il est donc logique de concevoir qu'il puisse exister des espèces d'amibes libres présentant un comportement différent de celui décrit dans les données scientifiques vis-à-vis de *Legionella pneumophila*. Lors de mon intégration au sein du laboratoire de Biologie Cellulaire dirigé par le Pr Pernin, j'ai pu bénéficier d'une souchothèque d'espèces d'amibes libres patiemment collectées et caractérisées au cours de sa carrière. Notre attention s'est particulièrement focalisée sur certaines espèces du genre

Willaertia pour lequel peu de données scientifiques étaient publiées. Aucune étude connue ne rapporte le comportement de *Willaertia* envers *Legionella pneumophila*.

Nous nous sommes donc particulièrement intéressés aux *Willaertia* que nous avons voulu comparer avec d'autres espèces amibiennes.

Objectifs de l'étude:

Le premier objectif de notre travail a donc été d'étudier la réplication de *L. pneumophila* chez *Willaertia magna*, que nous avons comparé avec d'autres espèces amibiennes, i.e., *Acanthamoeba castellanii* et *Hartmannella vermiformis* utilisées comme modèles amibiens de référence. Ces travaux nous ont permis, comme exposé dans ce manuscrit, de mettre en évidence les propriétés originales d'une souche de *Willaertia magna* vis-à-vis de *Legionella pneumophila* avec notamment une capacité de résistance et une capacité à contrôler la prolifération bactérienne. Ces études nous ont aussi permis de démontrer l'existence d'une phagocytose inter-amibienne, phénomène inconnu jusqu'à ce que nous ne le mettions en évidence.

Dans un deuxième objectif nous avons essayé d'évaluer les conséquences que pourrait avoir cette phagocytose interamibienne sur la réplication des légionelles.

Le troisième objectif que nous nous sommes fixé était d'apporter une piste qui nous permettrait d'expliquer en partie pourquoi une souche de *Willaertia magna* présente cette capacité de résistance mentionnée plus haut envers *Legionella pneumophila*. Nous nous sommes en particulier intéressés à la composante lipidique membranaire de ces cellules. L'*impetus* général pour cet intérêt repose sur le fait que les lipides de structure constituent d'importants éléments contrôlant les phénomènes de fusions et dynamiques membranaires nécessaires aux processus d'internalisation et de prolifération des bactéries parasites.

Contexte scientifique

Partie I. Les amibes libres

I.1. Biologie amibienne

I.1.a. Morphologie générale des amibes libres

Malgré une très grande diversité sur le plan morphologique, la plupart des amibes libres présentent une organisation générale commune. Le cytoplasme de ces protozoaires est généralement divisé en deux zones qui correspondent à un ectoplasme périphérique hyalin et à un endoplasme plus central qui apparaît granuleux du fait des nombreuses inclusions qu'il renferme. Les amibes libres partagent en outre les caractéristiques suivantes (Fig.1) :

- Elles possèdent un noyau qui contient un **nucléole central volumineux** occupant environ les deux-tiers de l'espace nucléaire.
- Outre la présence de **vacuoles digestives** en grand nombre, l'endoplasme montre la présence d'**une vacuole pulsatile** dont la fonction est d'expulser régulièrement l'excès d'eau absorbé par le cytoplasme de ces cellules qui vivent dans l'eau douce, donc dans un milieu hypotonique.
- Enfin, l'endoplasme montre la présence de mitochondries en grand nombre car les amibes libres sont des organismes aérobies à la différence des amibes parasites de l'intestin humain.

Ces caractéristiques les opposent aux amibes parasites du genre *Entamoeba* dont le noyau renferme un caryosome punctiforme, et qui sont dépourvues à la fois d'un système vacuolaire pulsatile ainsi que de mitochondries du fait de leur adaptation à un mode de vie parasitaire. Parmi la multitude de genres morphologiquement différents que comptent les amibes libres, certains tels que *Naegleria*, *Vahlkampfia*, *Acanthamoeba*, *Hartmannella*, *Nuclearia* sont plus fréquemment isolés lors des prélèvements d'eau et comportent des espèces thermophiles susceptibles de cohabiter dans les mêmes biotopes que les légionelles.

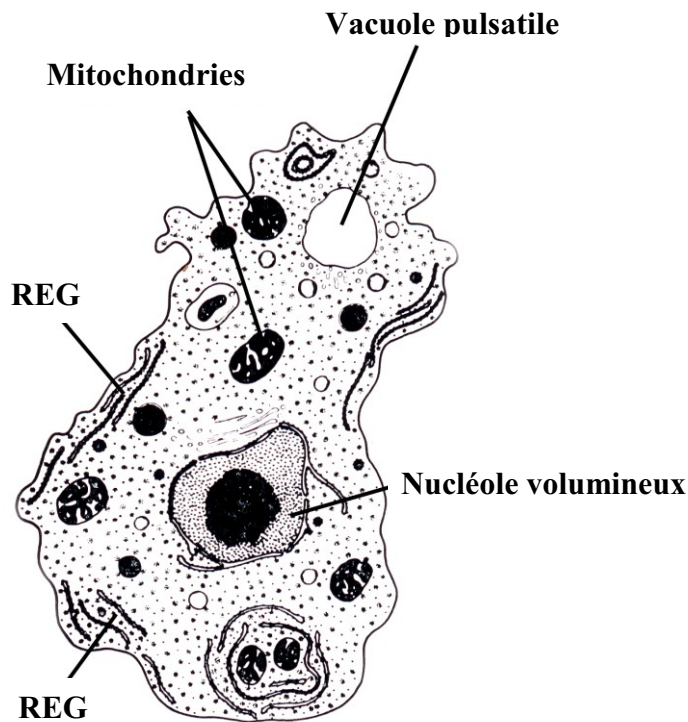


Fig.1: Caractéristiques générales communes aux amibes libres

1.1.b. Alimentation

Les trophozoïtes se nourrissent de bactéries (éventuellement de bactéries filamenteuses comme *Beggiatoa* spp.), de cyanobactéries, d'algues et de champignon¹⁸. Ce sont des brouteurs contribuant à la régulation des populations de microorganismes en particulier des populations bactériennes dans l'environnement. Les petites amibes libres sont considérées comme étant les principaux prédateurs des bactéries du sol.

1.1.c. Distribution

Les amibes libres sont largement réparties à travers le monde, elles sont ubiquitaires. On a pu en isoler dans l'air, et le sol (au niveau de la rhizosphère et en surface)¹⁹. A travers la prédation des bactéries, elles maintiennent un haut niveau de minéralisation de la matière organique.

L'attachement à un support est nécessaire pour leur alimentation ; la surface de contact disponible est très importante de ce point de vue. Elles auraient un rôle stimulateur sur la croissance des plantes qui pourrait s'expliquer par la consommation des bactéries et champignons.

L'eau et le vent contribuent à la dissémination amibienne, les conditions atmosphériques conditionnent donc ce phénomène. Les kystes et trophozoïtes sont fixés à des particules de matières. La lumière UV est à l'origine de la diminution de la viabilité des kystes.

Les amibes ont dernièrement pris une grande importance en raison des microorganismes qu'elles peuvent héberger, le plus connu étant *Legionella pneumophila*. D'autres espèces bactériennes parasites existent cependant comme mentionné précédemment et les amibes constituent des hôtes spécifiques pour l'isolement de nouvelles espèces bactériennes intracellulaires.

1.1.d. Cycle vital des amibes libres

Il comprend deux étapes : **une étape végétative** ou les amibes libres se multiplient par mitose ou promitose. Ces formes végétatives sont aussi appelées trophozoïtes. Le temps de division, bien que variable selon les genres, est d'environ une douzaine d'heures. La deuxième étape du cycle des amibes libres est **une étape kystique**. Celle-ci intervient lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables (déshydratation trop intense, appauvrissement du milieu nutritif). La cellule cesse progressivement de se déplacer et n'émet plus de pseudopodes, le cytoplasme s'arrondit en même temps qu'il se condense, se déshydrate et secrète une paroi kystique. Les kystes d'amibes libres peuvent être de forme et de taille très variables selon les genres étudiés, mais la plupart sont de formes arrondie-ovoïde et normalement uninucléées. Il n'existe pas de multiplication sous forme kystique. Le kyste peut redonner naissance à une forme végétative lorsque les conditions trophiques redeviennent favorables.

Certaines amibes comme *Naegleria* spp ou *Willaertia* spp, possèdent un stade supplémentaire : **la flagellation**²⁰ que l'on observe comme stade intermédiaire entre la forme enkystée et la forme végétative. Certaines amibes ne possèdent pas de formes kystiques connues comme *Vannella* spp ou *Thecamoeba* spp^{21,22}.

Partie II. Les légionelles

Les légionelles sont des bactéries Gram négatif, aérobies, non sporulées et non capsulées fréquemment retrouvées dans l'environnement, elles se développent dans les milieux hydriques ou humides. Elles vont également proliférer dans certains milieux hydriques artificiels (réseaux d'eau chaude sanitaire, réseaux de refroidissement de certains procédés industriels ou de système de climatisation...) pouvant être à l'origine d'épidémies ou de cas isolés de légionellose²³.

On dénombre à l'heure actuelle une cinquantaine d'espèces de légionelles avec plus de 70 sérogroupes distincts. L'espèce *Legionella pneumophila* comporte à elle seule 15 sérogroupes. Cette famille bactérienne est en constante évolution puisque sont régulièrement identifiées de nouvelles espèces²⁴. Mais c'est *Legionella pneumophila* séro groupe 1 qui est la plus souvent impliquée en pathologie humaine puisqu'elles sont responsables de plus de 90% des cas connus de légionellose²⁵.

II.1. Les LLAP (Legionella-like amoebal pathogens)

Des *Legionella* appelées « Legionella-like-amoebal pathogens » (LLAP) seraient également responsables d'infections humaines. Ce sont des légionelles à développement intracellulaire obligatoire, sans doute amibien, qui ne peuvent se développer sur les milieux habituels de culture des *Legionella* tel que le milieu BCYE (buffered charcoal -yeast extract agar)²⁶. On dénombre actuellement 12 souches de LLAP, qui sont non cultivables en absence d'amibes²⁷. Ces LLAPs pourraient être responsables de pneumonies. Le rôle des LLAPs comme agents pathogènes chez l'homme n'est pas complètement élucidé pour le moment, bien que la sérologie de patients ayant des pneumonies permette de penser que ces organismes aient un rôle dans les pneumopathies communautaires acquises²⁸.

II.2. Ecologie des légionelles

L'eau douce est le réservoir principal des légionelles, et on les retrouve dans presque tous les environnements aquatiques. Elles ne survivent pas dans des environnements secs. On les retrouve par culture dans plus de 40% des échantillons d'eau et dans plus de 80% par PCR²⁹. *Legionella longbeachae* fait toutefois exception puisque fréquemment isolée de

prélèvements de terre. Cette légionelle est la principale cause de légionellose en Australie et elle touche les jardiniers et les personnes exposées à la commercialisation des pots de terre ³⁰.

Les légionelles prolifèrent dans l'eau lorsque la température est comprise entre 25°C et 43°C. Elles sont détruites au-delà de 50°C et tolèrent une large gamme de pH. Elles sont sensibles à de nombreux désinfectants (chlore) et peuvent également être inactivées par des procédés physiques (choc thermique, rayonnements ultra violets, champs électriques pulsés) ³¹.

II.3. Association au biofilm

Dans les réseaux d'eau, la contamination biologique provient d'organismes tels que des bactéries mais aussi des algues, des moisissures, des protozoaires (amibes). Ces microorganismes peuvent coloniser les surfaces et former un biofilm qui favorise la prolifération des légionelles ²³.

La biomasse bactérienne fixée sur les parois des systèmes de distributions peut représenter jusqu'à 95% de biomasse totale dans ce réseau ²⁵. Le biofilm au sein des réseaux de distribution d'eau offre en effet un grand nombre d'avantages aux microorganismes. Les bactéries fixées sont beaucoup plus résistantes aux désinfectants, comme le chlore, que les bactéries planctoniques. De nombreuses molécules ne peuvent pas en effet pénétrer au sein de la matrice d'exopolysaccharides produite au niveau des biofilms; leurs charges électro-négatives protègent les cellules des biocides chargés positivement en les fixant, diminuant ainsi la perméabilité. Un nombre limité d'études a porté sur la caractérisation des interactions bactériennes dans cet environnement complexe. La caractérisation de ce phénomène, c'est-à-dire la multiplication de ces bactéries en dehors des cellules hôtes pourrait avoir une incidence sur le contrôle et la stratégie de lutte et de prévention de la légionellose. Schwartz et al., lors d'une étude de biofilm sur un réseau d'alimentation ont trouvé des *Legionella* spp. par PCR, mais pas par culture, sur BCYE α dans presque tous les biofilms et indépendamment du type de désinfection (chlore ou UV) ³². Au sein du biofilm, les légionelles peuvent trouver les nutriments nécessaires par l'intermédiaire d'une vie symbiotique avec des protozoaires et d'autres bactéries. La vie en communauté semble promouvoir la croissance de *Legionella pneumophila*, et ce type de symbiose semble expliquer leur résistance aux désinfectants et leur présence quasi permanente dans les biofilms de réseaux d'eau.

Partie III. Amibes et Légionelles: Des relations dangereuses

Comme déjà mentionné dans l'introduction de ce manuscrit, c'est Rowbotham qui en 1980 a été le premier à démontrer l'existence d'une multiplication intracellulaire de *Legionella pneumophila* dans des amibes libres¹³. Ce phénomène est illustré dans la Fig. 2. Ces observations ont été confirmées et étendues par les travaux ultérieurs d'autres auteurs¹⁴⁻¹⁶. Fields rapporte que 13 espèces d'amibes libres et 2 espèces de protozoaires ciliés sont capables de favoriser la multiplication de *Legionella pneumophila*³¹. L'examen attentif de la littérature révèle que toutes les études portant sur les relations amibes libres – *Legionella pneumophila* démontrent une capacité des amibes à favoriser la prolifération bactérienne. A plusieurs reprises, lors des épidémies de légionellose, des légionelles et des amibes libres ont pu être isolées simultanément à partir des eaux mises en cause^{33, 34}. Sanden et al., ont par ailleurs démontré que l'isolement des légionelles à partir de l'eau est fortement amélioré par une simple incubation des échantillons d'eau en présence d'amibes³⁵. Il a aussi été démontré que la présence d'amibes *Acanthamoeba castellanii* permettait de « résusciter » des souches de *Legionella pneumophila* dans le sens où des légionelles rendues viables mais non cultivables (état VBNC de la bactérie) par une période prolongée dans un milieu pauvre redevenaient cultivables en présence des amibes³⁶. Toutes ces données font que les amibes libres sont maintenant considérées comme étant le vecteur principal des légionelles dans l'environnement.

En plus de ce rôle de vecteur bactérien il apparaît de plus en plus nettement que les protozoaires représentent un terrain permettant à *Legionella pneumophila* d'acquérir ses mécanismes de virulence vis-à-vis des mammifères. Des expérimentations effectuées *in vivo* chez la souris montrent que le pouvoir invasif de la bactérie est fortement augmenté lorsque celle-ci a été au préalable cultivée en présence de l'amibe libre *Acanthamoeba castellanii*³⁷. D'après Cirillo et al., le passage préalable des légionelles en coculture avec des amibes augmente leur capacité d'invasion vis-à-vis des macrophages de mammifères³⁷. Des observations similaires ont été réalisées par d'autres auteurs toujours sur la souris^{38, 39}.

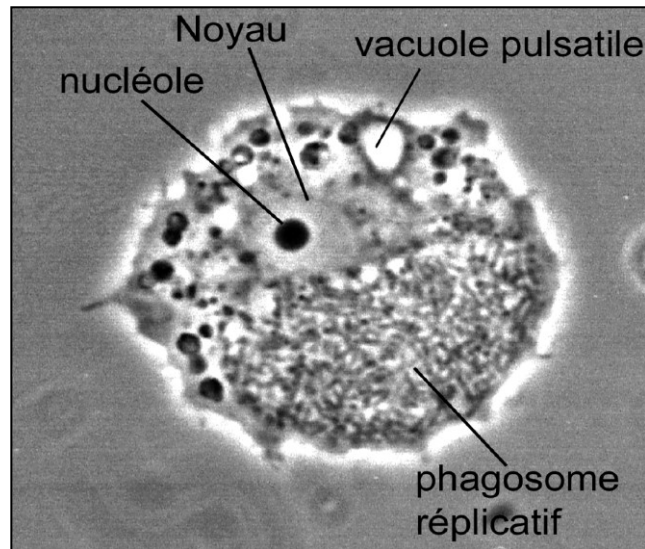


Fig. 2 : Trophozoite d'*Acanthamoeba castellanii* en coculture avec *L. pneumophila* observé en microscopie à contraste de phase. On remarque la présence d'un volumineux phagosome rempli de légionelles occupant la moitié de l'endoplasme de l'amibe.

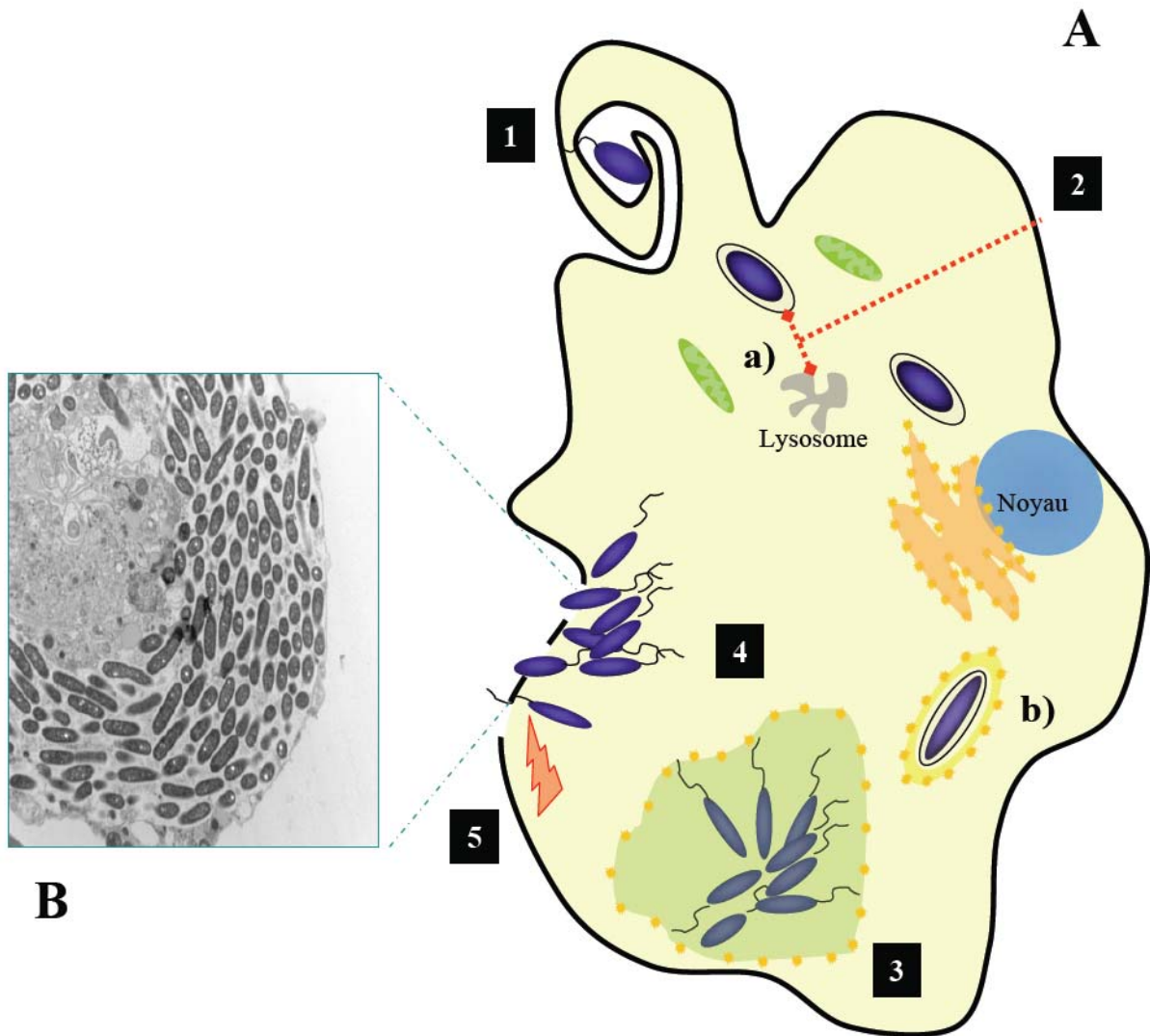
Il est donc vraisemblable que les amibes libres infestées par des légionelles jouent un rôle majeur dans l'étiologie de la légionellose³⁹. Pour certains auteurs, la légionellose dans sa forme clinique habituelle résulterait plutôt de l'inhalation d'amas bactérien condensés, que de l'inhalation de simples bactéries dispersées¹³. Or, il a été prouvé que les amibes libres infectées par les légionelles relarguent des microvésicules contenant de tels amas bactériens (plusieurs dizaines à plusieurs centaines de bactéries). Ces vésicules de 2 à 6 μ m gardent une taille suffisamment réduite pour atteindre les alvéoles pulmonaires (1 à 5 μ m)⁴⁰.

III.1. Processus d'infestation et de prolifération des légionelles dans leur hôte amibien

Legionella pneumophila pénètre dans l'amibe par phagocytose de la bactérie par le protozoaire. Le mécanisme d'adhésion cellulaire des légionelles aux amibes est différent de celui de l'adhésion aux macrophages: alors que l'attachement des légionelles aux macrophages dépend de récepteurs du complément, l'attachement des légionelles aux amibes se ferait par l'intermédiaire d'un récepteur amibien de type lectine pour le galactose ou la N-acétylgalactosamine^{41, 42}. L'adhérence de *Legionella pneumophila* à cette lectine amibienne induit une déphosphorylation généralisée des résidus tyrosine du récepteur ainsi que d'autres

protéines, appartenant au cytosquelette (telles que les protéines d'attachement entre actine et intégrine: paxilline, vinculine, FAK). Cette activité phosphatasique aboutit à la désorganisation du cytosquelette, et facilite la pénétration des bactéries^{23, 42}. Toutefois ce mécanisme d'attachement et de pénétration dans les amibes semble montrer des différences importantes selon les genres amibiens étudiés, par exemple entre l'*Hartmannella* et l'*Acanthamoeba*⁴³. Il existe un second mécanisme appelé "coiling" phagocytose ou phagocytose par "enroulement", au cours duquel un long pseudopode de la cellule hôte vient s'enrouler autour de la bactérie. Ce phénomène se produit en présence de bactéries tuées par la chaleur ou le formaldéhyde⁴⁴. Il est décrit presque exclusivement chez les légionelles et les spirochètes, ce phénomène étant ponctuel avec les autres bactéries⁴⁵.

Après son internalisation, la bactérie est contenue dans un phagosome entouré par des mitochondries et des vésicules de la cellule hôte durant les 2 ou 3 premières heures^{46, 47}. Au bout de 5 heures, le phagosome est entouré d'une membrane dérivée du reticulum endoplasmique granuleux (REG) et garnie de ribosomes (Fig 3). Alors que le phagosome évolue normalement en un phagolysosome à la suite de sa fusion avec un endosome tardif qui apporte avec son contenu les hydrolases lysosomales acides, la présence des légionelles dans les phagosomes inhibe la fusion normale de ceux-ci avec les endosomes tardifs ; on a alors affaire à un phagosome dont la maturation endosomale est bloquée avec notamment absence d'acidification (endosomal maturation blocked (EMB)-phagosome)⁴⁷. La multiplication bactérienne devient manifeste à partir de la 8^{ème} heure, et le phagosome demeure entouré d'une membrane garnie de ribosomes pendant les 15 heures qui suivent l'infestation. Les études immuno-cytochimiques montrent qu'il se produit une fusion entre ce phagosome et le REG comme en témoigne la présence dans ces phagosomes d'une quantité importante de marqueurs du RE comme la protéine Bip, et cela dès la 5^{ème} heure qui suit l'infestation⁴⁶.

**Fig. 3 :****A. Processus et mécanisme de l'infestation amibienne par *L. pneumophila***

La première étape de la multiplication intra-cellulaire des légionelles repose sur l'adhésion de ces bactéries aux cellules hôtes, et la pénétration par phagocytose [1].

La multiplication des légionelles après inhibition totale ou temporaire de la fusion phagosome/lysosome avec l'intervention du système Dot/Icm [2] et [3].

La sortie des légionelles surviendrait en deux temps : il y aurait tout d'abord libération des légionelles du phagosome répliatif vers le cytoplasme de la cellule hôte dans lequel elles continueraient à se multiplier, puis relargage des bactéries dans le milieu environnant par lyse de la cellule [4] et [5]. Une fois libérées, les légionelles peuvent infecter de nouvelles cellules. Un nouveau cycle cellulaire débute alors.

B. Observation en microscopie électronique de l'infestation d'*Acanthamoeba Castellani* par *Legionella pneumophila*.

D'importantes similitudes existent entre le processus d'invasion cellulaire des macrophages et celui qui est observé chez les amibes. On peut dès lors faire l'hypothèse que *L. pneumophila* a évolué comme un parasite des protozoaires dans l'environnement et que cette adaptation à des cellules phagocytaires primitives est alors devenue suffisante pour

évoluer et acquérir d'autres loci lui permettant de survivre et de se multiplier dans les cellules phagocytaires des mammifères supérieurs ¹⁵.

III.2. Gènes impliqués dans les interactions Amibes-Légionelles

Le système Dot/Icm (Defect in Organelle Trafficking/Intra-Cellular Multiplication) correspond à un ensemble de 25 gènes localisés sur deux régions distinctes de 22 kb du chromosome de *L. pneumophila* ⁴⁸⁻⁵⁰. La région chromosomique I contient les gènes *icmV*, *W*, *X* et *dotA*, *B*, *C* et *dotD*. La région chromosomique II contient les gènes *icmT*, *S*, *R*, *Q*, *P*, *O*, *N* (initialement appelé *lphA* pour lipoprotein homologue), *icmM*, *L*, *K*, *E*, *G*, *C*, *D*, *J*, *B*, *F*, et *icmH*. Entre *icmB* et *icmF*, se trouve localisé le gène *tphA* (transport protein homolog).

Ces gènes contrôlent vraisemblablement la synthèse et la régulation de complexes protéiques ayant un rôle fondamental dans l'infestation des cellules hôtes. Il apparaît que ces complexes forment deux types de pores selon le stade de l'infestation cellulaire, comme décrit ci-dessous.

III.2.a. Le pore d'invasion et d'altération de la voie d'endocytose

Des souches de légionelles mutées pour certains des gènes codant le système Dot/Icm présentent une évolution du phagosome de réplication différente de celle observée habituellement à la suite de l'infestation de la cellule hôte (macrophage ou amibe) par des souches sauvages de *L. pneumophila* ¹⁶.

Les produits des gènes *dot/icm* présentent des homologies et des similitudes de fonctionnement avec les appareils de translocation dits de type IV, qui aboutissent à la formation de pores dans la membrane de la cellule hôte eucaryote à la suite de son contact avec, comme par exemple, la protéine virB d'*Agrobacterium tumefaciens* ⁴⁸.

Grâce aux gènes *dot/icm* de ce système de transport, les souches sauvages de *L. pneumophila* provoquent l'insertion de pores dans la membrane plasmique de la cellule hôte qui faciliteraient la translocation de protéines effectrices, aboutissant ainsi à la biogenèse d'un organite qui ne fusionne plus avec les endosomes permettant au final la réplication intracellulaire de la bactérie ⁵¹.

III.2.b. Le pore de cytolysse et de libération de *L. pneumophila*.

Il correspond à un deuxième type de pore dont l'existence est démontrée par l'étude de mutants particuliers de *L. pneumophila* appelés mutants *rib* (release of intracellular bacteria)⁵¹⁻⁵³. Ces mutants *rib*, déficients pour l'activité formatrice de pores sont :

- Capables de réplication intracellulaire comme les souches sauvages normales de *L. pneumophila*.
- Mais sont incapables d'induire la nécrose de l'amibe et restent donc piégés à l'intérieur de la cellule hôte.

La synthèse de ces pores par *L. pneumophila* n'est pas exprimée au cours de la phase exponentielle de réplication intracellulaire, mais cette activité est déclenchée au cours du passage en phase de croissance post-exponentielle aboutissant dans un premier temps à l'insertion d'un pore dans la membrane du phagosome, ce qui entraîne sa rupture. Cette phase est suivie de l'insertion de pores dans la membrane plasmique conduisant à la lyse osmotique et nécrotique de la cellule hôte (Fig. 3). La mise en place de cette activité formatrice de pores aboutit chez les amibes à une lyse cellulaire par nécrose (et non par apoptose à la différence des macrophages) qui est essentielle pour permettre la sortie et la diffusion des légionelles^{15, 52}.

Partie IV. Les Phospholipides

Les phospholipides sont d'un point de vue quantitatif les constituants principaux des membranes biologiques chez tous les organismes vivants. Leur nature amphiphile fait que ces lipides assurent le ciment moléculaire et la structure des bicouches membranaires. En plus de cette fonction structurale, les phospholipides constituent une importante classe de lipides impliqués dans les phénomènes de signalisation cellulaire, à l'intérieur en tant que seconds messagers et à l'extérieur dans les phénomènes de signalisation paracrine par exemple. Ces phospholipides sont effectivement un réservoir pour des métabolites bioactifs en réponse aux messages extra- et intra-cellulaires régulant l'homéostasie générale d'une cellule ou d'un organisme. Ils sont impliqués dans les mécanismes de prolifération, de différenciation, ou de mort cellulaires⁵⁴.

Les phospholipides (ceci est aussi vrai pour tous les lipides de structure) ont aussi d'importantes fonctions dans la modulation de l'activité des protéines membranaires et des

protéines amphitropiques de par les interactions à faible énergie (liaisons de Van Der Waals par exemple) ou à forte énergie (liaisons covalentes) que ces molécules peuvent développer entre elles. Il n'est pas dans l'optique de ces rappels bibliographiques de développer cet aspect, au demeurant bien illustré dans de nombreux articles de synthèse sur le sujet ⁵⁵⁻⁵⁷. Toutefois, nous ferons un rappel des structures et des principales voies de biosynthèse des phospholipides principalement exprimés chez les protozoaires et chez les mammifères.

IV.1. Structure des phospholipides

Tous les phospholipides connus (excepté les sphingophospholipides tels que les sphingomyélines qui ont une partie céramide) sont constitués d'acide phosphatidique qui représente la base structurale de cette classe lipidique. La plupart des phospholipides ont un acide gras saturé sur le carbone *sn*-1 et un acide gras insaturé sur le carbone *sn*-2 du glycérol. Le groupement phosphate sur le carbone du glycérol peut être lié à différentes bases (figure 4), qui selon la nature définissent un groupe particulier de phospholipide. Ainsi, l'acide phosphatidique peut être liée avec de la sérine, de l'éthanolamine, de la choline ou de l'inositol, donnant lieu respectivement à la phosphatidylsérine, la phosphatidyléthanolamine, la phosphatidylcholine et le phosphatidyl-inositol, qui forment les groupes de glycérophospholipides les plus abondants chez les eucaryotes.

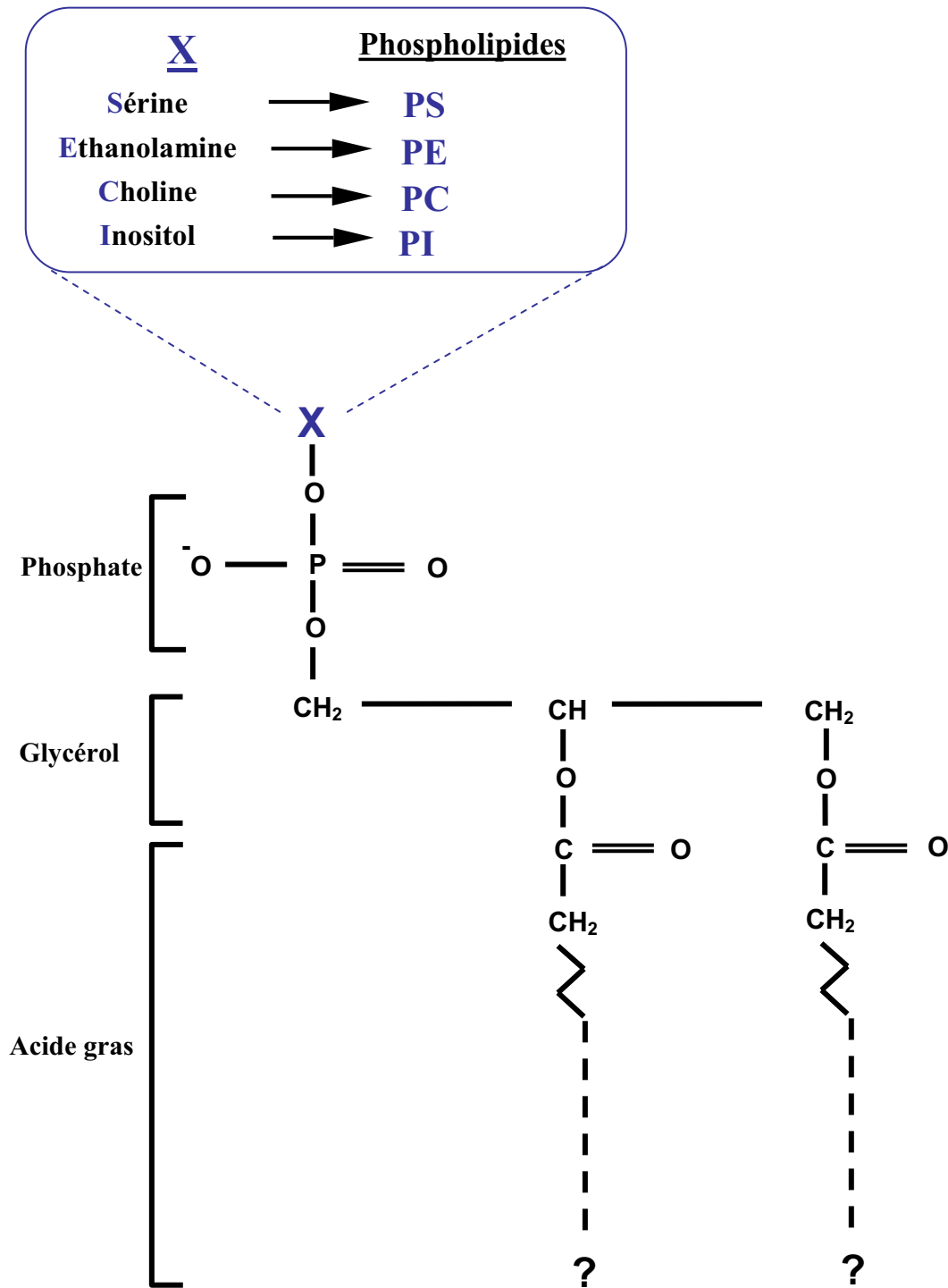


Fig.4: Structure générale des glycérophospholipides.

IV.2. Biosynthèse de l'acide phosphatidique

Les principales voies de biosynthèse des phospholipides chez les amibes libres, sont semblables à celles décrites chez les mammifères ^{8,9,58}.

Deux voies ont été décrites pour la biosynthèse de l'acide phosphatidique ⁵⁵. La première voie emploie le glycérol comme précurseur tandis que la deuxième voie emploie le dihydroxyacétone-phosphate. Le glycérol est converti en acide phosphatidique par les acyltransferases de glycerol-3-phosphate qui catalysent l'addition d'une partie grasse d'acyle sur les deux premiers carbones de la partie glycérol. Ces enzymes ont également la propriété de catalyser l'acylation du dihydroxyacétone phosphate en acide phosphatidique. L'acyltransférase de dihydroxyacétone-phosphate catalyse l'acylation du dihydroxyacétone phosphate mais n'utilise pas le glycérol-3-phosphate comme substrat. L'acide phosphatidique qui a été synthétisé par ces voies est le précurseur des différentes classes de phospholipides. Cependant, l'acide phosphatidique est métabolisé dans deux voies différentes qui résultent dans la biosynthèse de deux précurseurs différents des phospholipides. L'acide phosphatidique peut être métabolisé en diacylglycerol sous l'action de phosphatases (hydrolyse des phosphatidates) ou en CDP-Diacylglycérol. Chez les mammifères, la voie du diacylglycérol est utilisée pour la synthèse de la phosphatidylcholine et de la phosphatidyléthanolamine tandis que la voie CDP-Diacylglycérol est impliquée dans la synthèse de la phosphatidylsérine, du phosphatidylglycérol et des phosphatidyinositols ⁵⁵.

IV.3. Biosynthèse de la Phosphatidylsérine

Chez certaines espèces, comme la levure *Saccharomyces cerevisiae*, la biosynthèse de ce phospholipide est assurée par le transfert d'un groupe phosphatidique à partir de CDP-Diacylglycérol⁵⁹, ou par un mécanisme d'échange de bases dans les mammifères dans lequel la PS résulte du remplacement des groupes principaux d'éthanolamines et de choline (PE et PC) par au moins deux enzymes différentes: la phosphatidylsérine synthase I (PSS I) qui emploie la PC et probablement la PE comme substrat, et la PSS II (Phosphatidylsérine synthase II) qui emploie la PE comme substrat (fig. 5) ⁶⁰.

Il a été démontré que ces activités d'échange de base et la synthèse de PS, sont localisées dans un sous-compartiment du réticulum endoplasmique appelé la fraction MAM (Mitochondria Associated Membranes) ⁶¹.

IV.4. Biosynthèse de la Phosphatidyléthanolamine

Chez les eucaryotes la biosynthèse de PE se produit par décarboxylation de la PS ou par la voie CDP-Ethanolamine ⁵⁵. Chez les mammifères, la contribution de chaque voie semble dépendre du type de cellules. La voie de CDP-Ethanolamine est analogue à la voie principale dans la synthèse de PC et elle implique trois étapes : phosphorylation de l'éthanolamine par l'éthanolamine kinase ⁵⁵, conversion de la phosphoéthanolamine en CDP-éthanolamine par la PCT (phosphoéthanolamine cytidylyltransférase), et formation de la PE en présence de DAG par la CDP : diacylglycérol-1,2 éthanolamine –phosphotransférase ⁶². Les voies CDP-éthanolamine et de décarboxylation de la PS ont des topologies subcellulaires différentes, respectivement dans le réticulum endoplasmique et la mitochondrie.

IV.5. Biosynthèse de la Phosphatidylcholine

Chez les eucaryotes la biosynthèse de la PC est assurée soit par la méthylation de la PE, soit par la voie CDP-Choline (fig. 5). Les bactéries réalisent la biosynthèse de PC exclusivement par méthylation de la PE ⁶³, les levures pouvant employer l'une ou l'autre voie ⁶⁴.

La voie CDP-choline comporte trois étapes métaboliques: la phosphorylation de la choline en phosphorylcholine catalysée par la choline kinase, conversion de la phosphorylcholine en CDP-Choline par la PCT (Phosphocholine-Cytidylyltransférase), et puis la synthèse de la PC par le transfert de phosphocholine à la DAG-1,2 étape catalysée par le phosphocholinetransférase (PCT) ⁵⁵. La voie CDP-choline est localisée au niveau du réticulum endoplasmique ^{65, 66}.

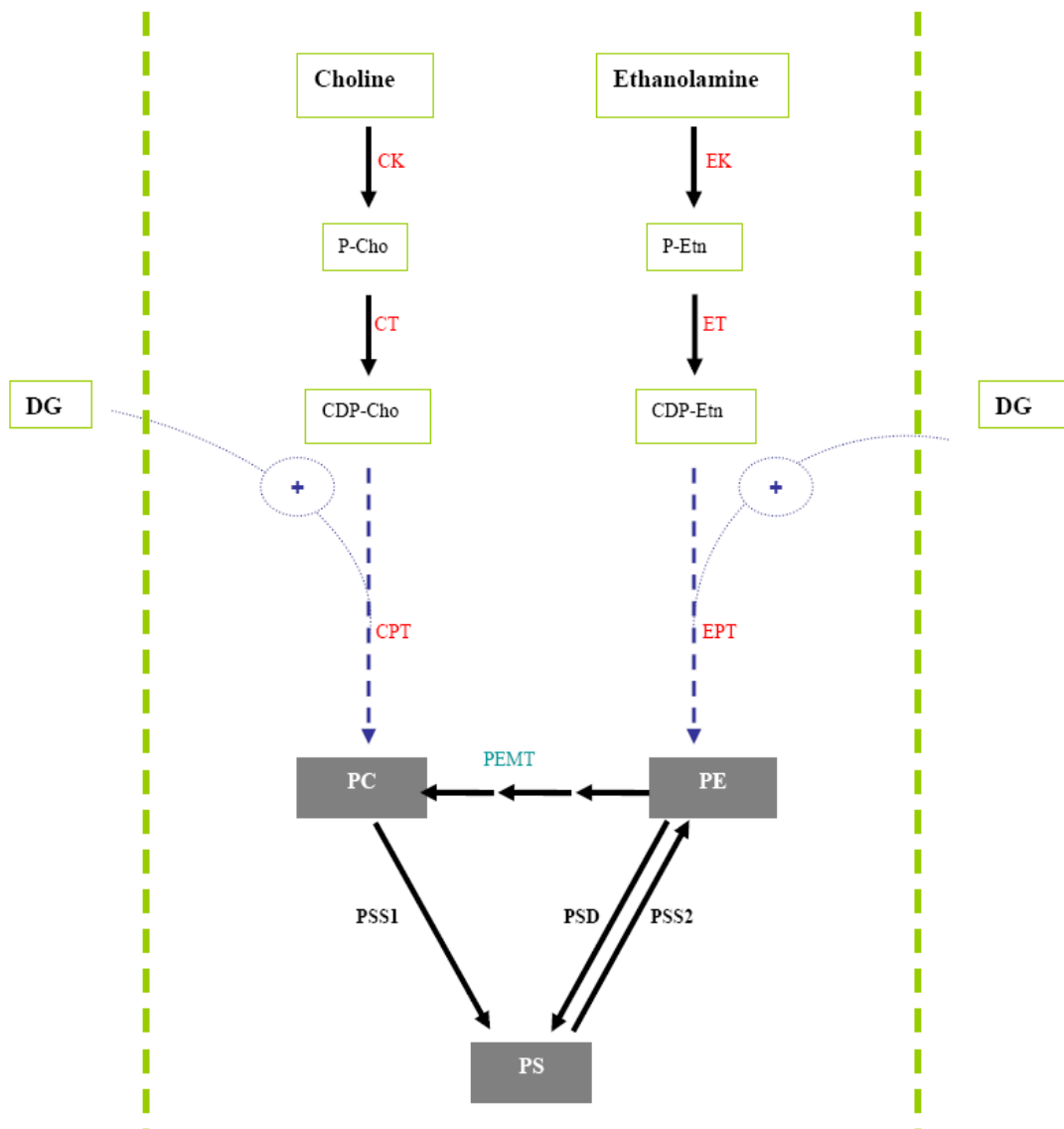


Fig. 5 : Voies biosynthétiques des phospholipides.

La phosphatidylcholine (PC) peut être formée par l'intermédiaire de deux voies importantes, de la voie de CDP-Choline et de la voie de méthylation. Dans la première voie, la choline est phosphorylée en phosphorylcholine qui est encore métabolisée à la PDC-Choline par la PCT : phosphocholine-cytidylyltransférase, la CDP-Choline est alors employée comme précurseur direct du PC. Dans la voie de méthylation, le PC est formé après trois transferts successifs des groupes méthyliques [CH₃] à partir de la S-adenosyl-méthionine (qui résulte du métabolisme de la méthionine) au groupe principal polaire de phosphatidylethanolamine (PE) par les transférases méthyliques de la PE (PEMT). La phosphatidylsérine est synthétisée par l'échange de la sérine avec les groupes principaux de la choline et l'éthanolamine respectivement, des réactions catalysées par les synthases 1 et 2 de la phosphatidylsérine (PSS1 et PSS2). Développer l'explication A et B

IV.6. Catabolisme des phospholipides chez les amibes

Les phospholipides sont catabolisés sous l'action de différentes phospholipases qui peuvent cliver la molécule en plusieurs endroits (voir Fig. 6). Les phospholipases D vont hydrolyser la liaison ester phosphorique liant la base de la tête polaire de la molécule à l'atome de phosphore. Les phospholipides peuvent aussi être clivés sous l'action de phospholipases C qui coupent le lipide entre la base polaire phosphorylée et la partie hydrophobe diacylglycérol. Les acides gras fixés en position *sn-1* et *sn-2* du glycérol peuvent être libérés du phospholipide sous l'action respective des phospholipases A1 et A2.

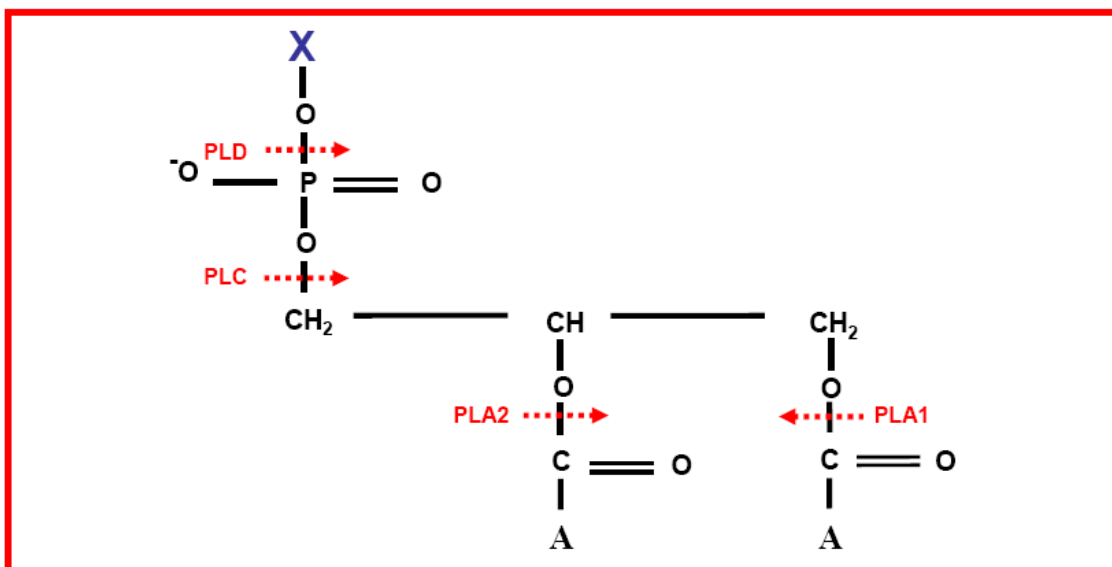


Fig. 6 : Emplacements de l'action des phospholipases A1, A2, C et D.

Ces activités phospholipasiques assurent des fonctions importantes dans les phénomènes de signalisation cellulaire, avec la formation de molécules signaux résultant de l'action enzymatique. C'est ainsi que les phospholipases D sont responsables de la formation d'acide phosphatidique, second messenger impliqué dans les phénomènes de division cellulaire et en réponse à certains stress physiologiques. Les phospholipases C peuvent aussi être impliquées dans la synthèse de diacylglycérol, messenger ayant des activités de signalisation via notamment l'activation de certains isotypes de Protéine Kinase C (PKC). L'action des phospholipases A2 est aussi importante pour la synthèse de molécules signaux, comme par

exemple la libération l'acide arachidonique (précurseurs d'eicosanoïdes) et de lysophospholipides qui possèdent une activité intrinsèque de signalisation via des récepteurs spécifiques^{67,68}.

Plusieurs études indiquent que les amibes expriment des activités phospholipases. Il est probable que certaines de ces enzymes soient impliquées dans la pathogénie des maladies amibiennes. Par exemple, Barbour et Marciano-Cabral (2001) montrent que *Naegleria fowleri* sécrète une Phospholipase A2 (PLA2) qui est analogue à la PLA2s (forme sécrétée de PLA2) des macrophages causant la cytolysse des cellules nerveuses.⁶⁹

Des travaux montrent aussi qu'une activité PLA2 pourrait réguler la quantité et la composition des phospholipides dans les membranes d'amibes. Les fonctions biologiques dans lesquels les PLA2 amibiennes sont impliquées restent toutefois méconnues⁷⁰. La distribution d'acide gras sur le carbone *sn*-1 et le carbone *sn*-2 du glycérol dans les phospholipides change continuellement, cela dû à la dégradation des phospholipides qui résulte de l'action des phospholipases. La dynamique d'expression des groupements acylés sur les phospholipides est le résultat de l'action des phospholipases et des biosynthèses *de novo* permettant l'expression de nouveaux phospholipides membranaires.

Partie V. Les endocannabinoïdes

Les endocannabinoïdes (ou cannabinoïdes endogènes) constituent une classe de molécules lipidiques impliquée dans de nombreux phénomènes de signalisation. Les endocannabinoïdes ont été découverts et caractérisés au début des années 1990. Ces molécules sont ainsi dénommées de part leurs actions cannabimimétiques sur les récepteurs cibles des cannabinoïdes d'origines végétales (cas du Δ^9 -tétrahydrocannabinol) ayant des propriétés psychoactives.

Deux grandes classes d'endocannabinoïdes ont été caractérisées : les dérivés *N*-acylés de l'éthanolamine et les dérivés 2-*O*-acylés du glycérol. Ces molécules agissent sur des récepteurs spécifiques appelés CB1 et CB2. Le récepteur CB1 est principalement localisé dans le système nerveux central (SNC), même s'il est aussi exprimé dans quelques tissus périphériques comme les gonades^{71, 72}. Le récepteur CB2 est lui particulièrement exprimé dans les tissus périphériques et notamment au niveau des cellules immunocompétentes, en particulier les monocytes / macrophages. CB2 ne semble pas exprimé à l'état basal dans le système nerveux central, bien que de rares études ont démontré un réveil phénotypique lors de

situation pathophysiologiques ⁷³. Plusieurs données, notamment pharmacologiques, laissent à penser que d'autres récepteurs à ces molécules existent probablement. Ils n'ont toutefois pas été caractérisés à ce jour. Une action de certains endocannabinoïdes a toutefois été rapportée sur les récepteurs vanilloïdes ⁷⁴, et il est aussi démontré que l'anandamide (*N*-arachidonoyl éthanolamine) présente une activité inhibitrice sur certaines céramidases ⁷⁵. Les endocannabinoïdes sont des médiateurs lipidiques impliqués dans de nombreux phénomènes physiologiques, en particulier la modulation de la neurotransmission et de l'activité du système immunitaire ^{76,77}.

V. 1. Structure des endocannabinoïdes

Comme mentionné précédemment, deux grandes classes d'endocannabinoïdes ont été décrites. Les dérivés *N*-acylés de l'éthanolamine et les dérivés 2-*O*-acylés du glycérol. Ces deux grandes classes représentent potentiellement plusieurs dizaines de molécules pouvant être retrouvées dans des échantillons biologiques, en fonction de l'identité des acides gras liés à la fonction aminée de l'éthanolamine ou au groupement hydroxyl en position *sn*-2 du glycérol. Toutefois, les activités biologiques de la plupart de ces molécules ne sont que très peu connues, voir totalement inconnues. Des travaux ont par ailleurs démontré l'existence endogène de molécules très proches structurellement des deux classes d'endocannabinoïdes mentionnées ci-dessus. Des dérivés *N*-acylés de la glycine, de la dopamine ou de la sérotonine ont par exemple été caractérisés dans les tissus cérébraux de certains mammifères ^{78, 79}. L'existence de dérivés 2-*O*-acyles glycérols éther a aussi été démontrée, molécules où l'acide gras est fixé au glycérol via une liaison éther en lieu et place d'une liaison ester ⁸⁰.

Les agonistes endogènes des récepteurs CB1 et CB2 les mieux caractérisés sont en fait l'arachidonoyl Éthanolamide (AEA) (*N*-arachidonoyl éthanolamine, communément appelé anandamide), et le 2-*O*-arachidonoyl glycérol (2-AG) ^{81, 82}. Nous présenterons donc plus en détails leurs structures et métabolismes dans le paragraphe suivant.

V.1.a. L'Anandamide

L'Anandamide appartient à la famille des Éthanolamides (ou bien *N*-acyléthanolamides, NAEs) qui incluent des molécules cannabimimétiques et non-

cannabimimétiques présentes dans la plupart des tissus d'eucaryotes. L'anandamide possède de l'acide arachidonique fixée sur le groupement aminé de l'éthanolamine (Fig.7).

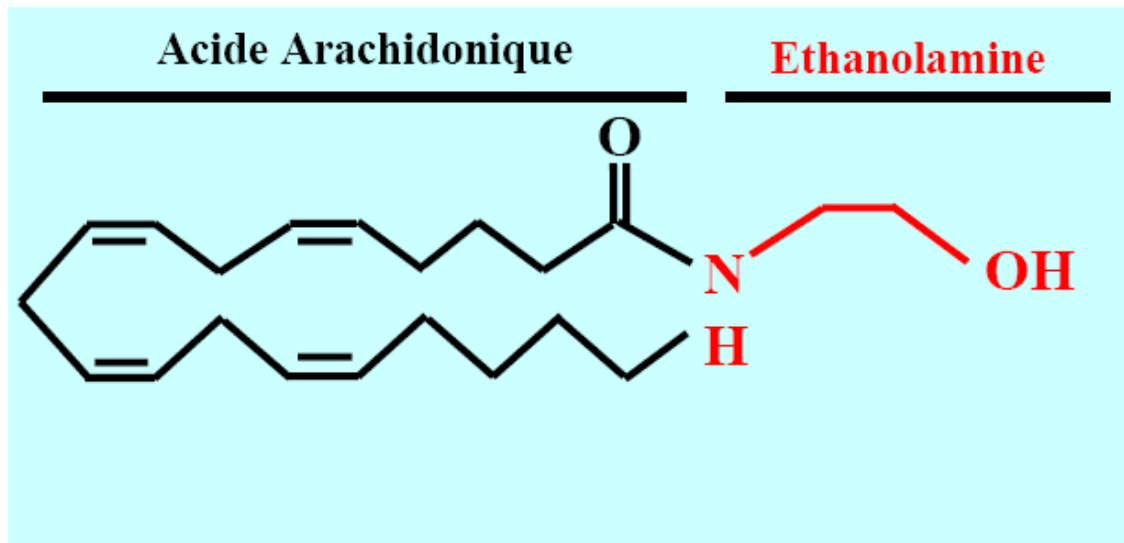


Fig.7 : Structure de l'Anandamide

V. 1.b. Le 2-AG

La formation du 2-AG, nécessite la génération de l'acide arachidonique contenant les DAGs (les dérivés 2-acylés du glycérol) et les lysoglycérophospholipide (Fig.8). D'autres dérivés *O*-acylés du glycérol sont exprimés de façon endogène, la nature de l'acide gras déterminant celle de l'endocannabinoïde.

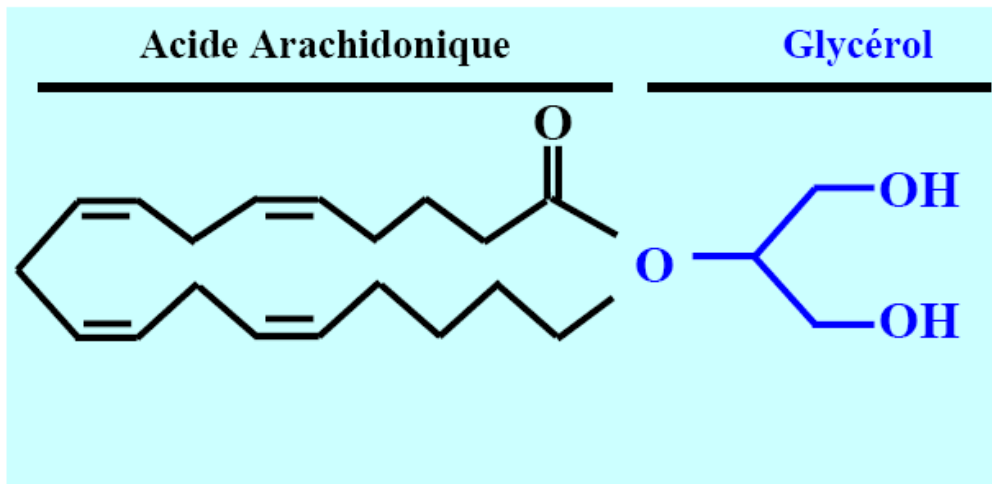


Fig.8 : Structure du 2-Arachidonoylglycérol

V.2. Biosynthèse des endocannabinoides

V. 4.a. L'Anandamide

L'Anandamide est biosynthétisé par l'hydrolyse d'un glycérophospholipide précurseur en réponse à certains stimuli. Ce glycérophospholipide précurseur est le *N*-arachidonoyl-phosphatidyléthanolamine (NAPE) qui est clivé par une phospholipase D spécifique, la NAPE-PLD. La NAPE est synthétisée par transfert d'un acide arachidonique à partir de la position *sn-1* de la phosphatidylcholine à l'amine primaire de la phosphatidyléthanolamine⁸³⁻⁸⁶. Cette réaction est catalysée par une *N*-acyltransferase (NAT), qui peut également être impliquée dans la biosynthèse de la PE⁸⁷ (fig. 9).

Trois voies biochimiques distinctes ont été proposées pour la formation de l'anandamide (fig. 9) : (1) une hydrolyse de la NAPE par la NAPE-PLD^{83, 88} ; (2) l'hydrolyse de la NAPE par une phospholipase A2 suivie du clivage de la lyso-NAPE ainsi formée par la NAPE-PLD^{89, 90} ; (3) une hydrolyse de la NAPE par une phospholipase C. Le phosphoanandamide ainsi formé peut ensuite être clivé par une phosphatase^{91, 92}. L'importance physiologique de ces deux dernières voies n'est pas connue à ce jour.

V. 4.b. Le 2-AG

Différentes voies biosynthétiques ont été décrites pour la formation du 2-AG (fig. 9) : (1) l'hydrolyse de diacylglycérols par une diacylglycérol lipase (DGL)⁹³; (2) l'hydrolyse de lysophospholipides par une lyso-PLC (2-arachidonoyl phosphatidylcholine)⁹⁴; (3) l'action d'une phosphatase sur l'acide 2-arachidonoyl-lysophosphatidique (LPA)⁹⁵.

V. 3. Catabolisme des Endocannabinoides

La dégradation de l'Anandamide exige d'abord son transport à travers la membrane plasmique via un transporteur spécifique^{96, 97}. Une fois internalisé, l'anandamide est hydrolysé en acide arachidonique et en éthanolamine par la Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH)^{98, 99} (Fig. 9). L'Anandamide peut aussi être métabolisé par les Cyclooxygénase-2 (Cox-2) et lipoxygénase-15 (Lox 15) en prostamides^{100, 101}. Ces derniers composés sont impliqués dans de nombreux phénomènes de signalisation cellulaire. La plupart des prostamides ont une faible affinité pour les récepteurs aux cannabinoïdes et comme inhibiteurs de la FAAH.

Le 2-AG est catabolisé par l'action de monoacylglycérol lipases (MGL). Des études ont montré que dans le cerveau murin 85% du 2-AG est hydrolysé par les monoacylglycérols lipases^{102, 103}. Comme l'anandamide, le 2-AG peut être aussi métabolisé par l'activité des Cox et Lox^{100, 104, 105}. L'hydrolyse des dérivés oxygénés du 2-AG pourrait contribuer à la mobilisation d'autres eicosanoïdes (Prostaglandine, et certains dérivés de l'acide arachidonique)^{100, 106, 107}.

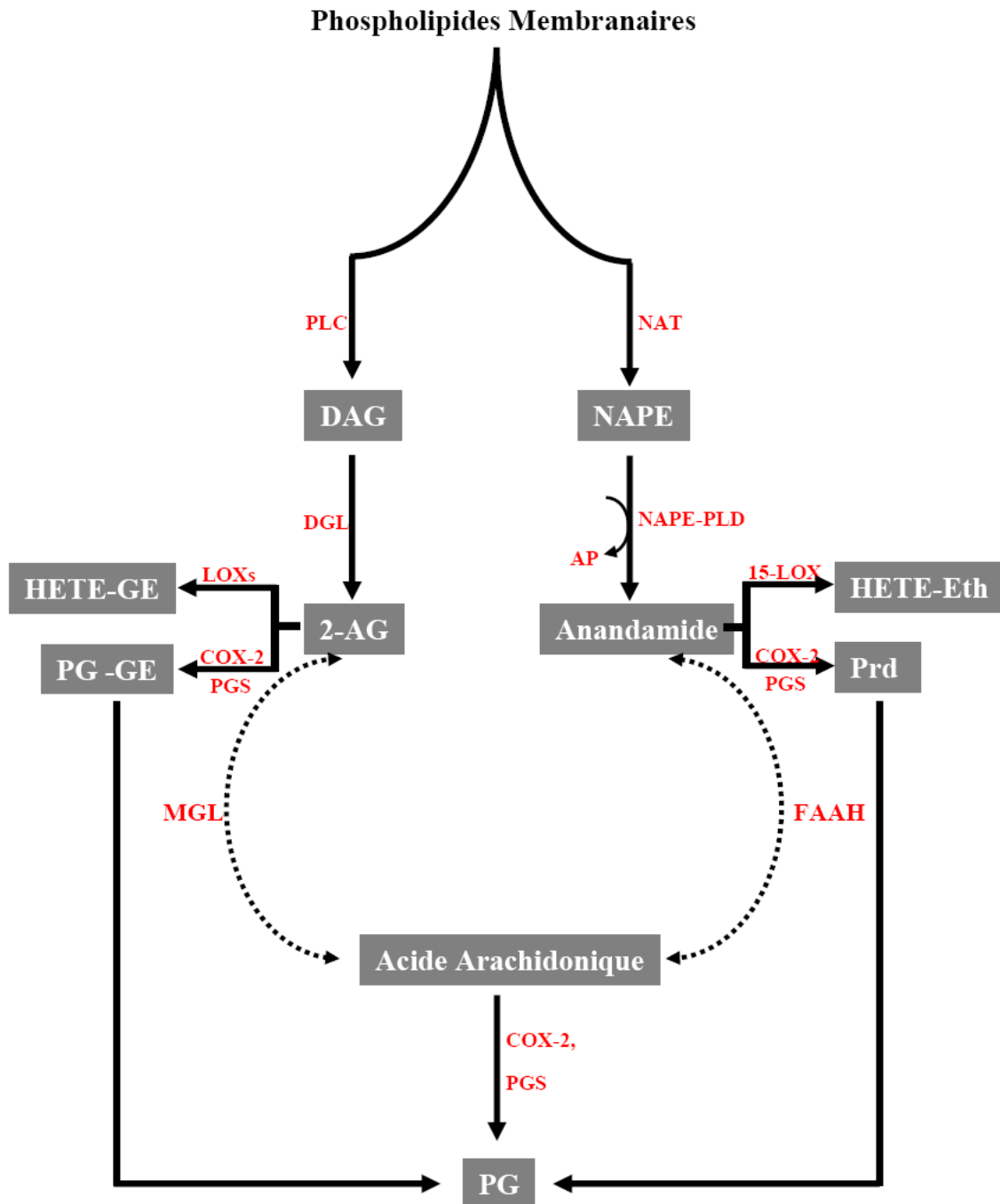


Fig 9. Biosynthèse des Endocannabinoides :

Abbreviations: NAT, *N*-acyl transférase; AP, acide phosphatidique; NAPE, *N*-acyl-phosphatidyléthanolamine; NAPE-PLD, NAPE phospholipase D; DAG, diacylglycérol PLC, phospholipase C; FAAH, fatty-acid amide hydrolase; PG, prostaglandin; HETE, hydroxyeicosatetraenoic acid; Cox, cyclooxygénase; PGS, prostaglandin synthase; Lox, lipoxygénase; DGL, diacylglycérol lipase ; MGL, monoacylglycérol lipase; PG-GE, prostaglandin glycérol ester ; Prd , prostamide.

Partie VI. Rôle des Lipides de structures dans les interactions cellule hôte – bactérie parasite

Il est maintenant bien établi que les lipides de structure et leurs dérivés métaboliques assurent des fonctions cruciales dans les interactions se développant entre la cellule hôte et les bactéries parasites. Hormis les phénomènes de chémoattractivité, les premières interactions se déroulant entre une cellule hôte et une bactérie parasite sont des phénomènes de contacts cellulaires mettant en jeu des mécanismes membranaires de reconnaissance antigénique. Il est donc évident que les compositions même des membranes externes respectives de la cellule hôte et de la bactérie vont déterminer en partie la capacité de cette bactérie à infester la cellule cible. Il est aussi évident que les lipides de structure assurent des fonctions importantes lors de ces phénomènes puisque ces lipides assurent la trame des membranes biologiques et qu'ils représentent la majeure partie des molécules qui y sont exprimées.

Lors de l'infestation de la cellule hôte par la bactérie, celle-ci va se retrouver internalisée dans un phagosome. Lors de la formation de cette structure la membrane du phagosome présente une composition lipidique similaire à la membrane cytoplasmique de la cellule hôte d'où elle est dérivée. La composition du milieu intraphagosomal est aussi similaire à celle du milieu environnant de la cellule. Toutefois, et cela très rapidement au cours de la formation du phagosome, la composition lipidique de la membrane subit des changements très importants. Parmi ces changements, l'expression de deux classes de phospholipides ont été particulièrement étudiées. Les phosphoinositides et la phosphatidylsérine.

VI. 1. Importance des phosphoinositides (PI) dans les interactions hôte/parasite

Les phosphoinositides jouent un rôle crucial dans la signalisation cellulaire, la régulation de l'architecture du cytosquelette et de la dynamique membranaire. Ces phosphoinositides consistent en une classe de phospholipides ayant du *myo*-inositol 1-phosphate estérifié sur la base acide phosphatidique de la molécule. Une portion mineure des phosphoinositides est phosphorylée de façon réversible sur les carbones 3, 4 et/ou 5 de l'inositol, générant ainsi sept phosphoinositides différents qui sont tous exprimés *in vivo*¹⁰⁸,¹⁰⁹. L'expression de ces molécules est régulée par l'action concertée des phospholipases, des PI kinases et de phosphatases. Les distributions spatiale et temporelle de ces

phosphoinositides sont finement régulées. Ainsi, le PI2P qui est présent dans la membrane cytoplasmique des cellules, s'accumule très rapidement à l'extrémité des pseudopodes en début de phagocytose, puis disparaît de façon abrupte dans le phagosome naissant. Le PI3P est synthétisé au cours du contact cellulaire hôte/parasite et disparaît très rapidement après la fusion des deux extrémités du phagosome¹¹⁰. Ces phénomènes ont été démontrés à la fois dans des macrophages de mammifères et dans des modèles amibiens.

Les phosphoinositides étant polyanioniques, ces changements biochimiques sont associés à une réduction nette des charges négatives sur la surface cytosolique du phagosome naissant. Ces changements de charge en surface déterminent les interactions de protéines avec des domaines polycationiques et polybasiques¹¹¹. Les PI sont particulièrement présents dans le feuillet interne de la membrane cytoplasmique où de concert avec des GTPases ils peuvent recruter des protéines effectrices via des motifs de reconnaissance spécifiques comme les domaines PH, PX, FYVE ou FERM¹⁰⁸. Il a été démontré que la capacité de répllication intracellulaire de *L. pneumophila* est dépendante de l'action des PI3 kinases de classe 1¹⁰⁹. Il est aussi clairement établi que des protéines bactériennes transloquées par le système Dot/Icm vont se fixer sur la membrane du phagosome par une interaction directe avec les phosphoinositides PI4P et PI3P¹¹². C'est notamment les cas des protéines bactériennes SidC et SidM qui se fixent sur PI4P et des protéines LidA et LpnE qui interagissent avec le PI3P¹¹³. Ces interactions se font sur les régions P4C et P4M (P4C and P4M binding domains) des protéines. C'est aussi le cas de la protéine Rab1/GEF (guanine nucleotide exchange factor) de *L. pneumophila* qui se lie au PI4P¹¹⁴. Ces protéines assurent des fonctions vitales aux mécanismes d'action du système Dot/Icm qui permet à la bactérie de détourner à son profit le trafic intracellulaire et le métabolisme de la cellule hôte. De nombreuses autres protéines interagissant directement avec ces phosphoinositides ont aussi été caractérisées chez d'autres microbes parasites pathogènes comme *Shigella flexneri*, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis* et *Yersinia* spp.¹⁰⁹. L'importance des phosphoinositides dans les relations hôte/parasite est clairement illustrée dans deux articles de synthèse publiés récemment.

VI. 2. Importance de la phosphatidylsérine (PS) dans la maturation phagosomale

La PS est l'un des phospholipides anionique les plus abondants. Ce phospholipide est distribué de façon assymétrique entre les feuillettes internes et externes de la membrane cytoplasmique, la majeure partie de la PS étant localisée dans le feuillet cytosolique. A ce titre la PS est considérée comme un contributeur majeur de charges au niveau du feuillet interne. Il a été démontré que ce phospholipide est exprimé dans la membrane des phagosomes où il joue une fonction importante de recrutement de protéines ayant des motifs cationiques avec domaine C2 ¹¹⁵. C'est le cas d'isoformes de Protéine Kinases C, de certaines Phospholipases C et des synaptotagmines qui assurent des fonctions importantes dans les mécanismes de fusion membranaire. Les petites GTPases des superfamilles Rab et Rho qui participent à la formation des phagosomes et à leur maturation se fixent aussi à la PS ¹¹⁵. Certains pathogènes comme *L. pneumophila* et *Chlamydia trachomatis* sont capables de modifier l'expression de la PS dans la membrane du phagosome. Ainsi la PS disparaît totalement des phagosomes lorsque des macrophages RAW 264.7 sont infectés par *L. pneumophila*. Les mécanismes expliquant cette disparition de la PS dans les phagosomes en présence de *L. pneumophila* ne sont pas clairement établis. Toutefois les conséquences fonctionnelles de cette disparition sont aisées à deviner étant donné l'importance de l'aminophospholipide dans le recrutement de protéines ayant des fonctions importantes dans le phénomène de fusion phagolysosomale.

Deux facteurs principaux peuvent expliquer ces changements de composition lipidique :

Le *premier facteur* est l'action de la bactérie phagocytée qui en sécrétant différentes molécules vont modifier la membrane phagolysosomale. Parmi ces facteurs, la bactérie va produire en particulier de nombreuses phospholipases dont les activités participent clairement à la capacité de virulence de la bactérie parasite ¹⁰⁸. De plus les modifications importantes de la dynamique des organelles subcellulaires et l'inhibition de certains mécanismes de fusions membranaires (fusion phago-lysosomale par exemple) provoquées par la bactérie induisent une altération importante de la composition des phagosomes.

Le *second facteur* est directement lié aux perturbations du métabolisme lipidique de la cellule hôte induit par la bactérie phagocytée. Ces perturbations peuvent au final engendrer des modifications de la membrane du phagosome ¹¹⁶.

Les mécanismes sous-jacent le second facteur sont moins bien caractérisés que pour le premier facteur, i.e., l'action de la bactérie *per se*, notamment l'activité des phospholipases sécrétées.

VI. 3. Les phospholipases de *L. pneumophila*

Les bactéries pathogènes sécrètent ou contiennent dans la membrane externe des activités de type phospholipases. Dans le cas de *Legionella pneumophila* il est établi que les phospholipases contribuent à la virulence bactérienne via différentes interactions avec les cellules hôtes. La formation de pores et de lysophospholipides par les phospholipases perturbent l'intégrité des membranes biologiques et permettent à la bactérie de s'échapper de la cellule parasitée. Les lysophospholipides formés altèrent aussi les mécanismes d'apoptose de la cellule hôte et peuvent induire une prolifération, une différenciation et le recrutement par chémoattractisme de cellules immunocompétentes. Les phospholipases bactériennes pourraient aussi avoir des fonctions importantes dans les modifications de la composition en phospholipides du phagosome de la cellule hôte décrits dans les deux paragraphes précédents.

Chez *L. pneumophila* les phospholipases les mieux caractérisées sont les phospholipases A. Trois familles de ces phospholipases ont été décrites chez cette bactérie avec une topologie membranaire ou qui peuvent être sécrétées. Le premier groupe de phospholipases A comprend les PlaA, PlaC et PlaD¹¹⁷. Ces enzymes ont une activité de type PLA1 et PLA2 et sont en plus capables d'utiliser des lysophospholipides comme substrats. Un second groupe de phospholipases membranaires est constitué des PLA/LPLA et PlaB. La troisième famille de phospholipases A est constituée des protéines « patatine-like » qui comprends plusieurs membres. La protéine PatA/VipD appartenant à cette famille à une activité phospholipasique de type A et lysophospholipasique. La plupart de ces protéines peuvent être sécrétées par le système de sécrétion de type II et par le système de sécrétion de type IV Dot/Icm¹¹⁸. L'existence de phospholipases C sécrétées chez *L. pneumophila* est moins bien caractérisée que chez d'autres espèces de bactéries. Toutefois il a été démontré que le gène *plcA* code une protéine présentant une forte homologie avec une phospholipase C de *Pseudomonas fluorescens*. De plus la protéine est capable d'hydrolyser le pNPPC (*p*-nitrophénylphosphorylcholine) un substrat utilisé pour déterminer certaines activités de type PLC. Toutefois cette enzyme ne semble pas être nécessaire à la capacité d'infestation de *L. pneumophila* chez l'amibe *H. vermiformis* et dans des macrophages humains. Les activités

phospholipases C sont donc très mal caractérisées chez *L. pneumophila*. Toutefois, comme mentionné par Aragon et al., il est probable que cette bactérie est capable de synthétiser plusieurs PLC, les bases de données génétiques montrant la présence de plusieurs gènes candidats ¹¹⁹.

VI.4. Phospholipides aminés et dynamique membranaire lors de la fusion phagolysosomale

Les phospholipides aminés retrouvés dans les cellules eukaryotes sont représentés par la phosphatidyléthanolamine (PE) et la phosphatidylsérine (PS) et dans une moindre proportion par leurs lyso-dérivés. Ces phospholipides présentent une caractéristique structurale qui leur confère des propriétés particulières ⁵⁵. La PS et la PE possèdent effectivement un groupe aminé terminal au niveau de leurs têtes polaires. La présence de ce groupe aminé fait que ces phospholipides ont la capacité d'interagir directement avec certaines protéines en établissant des liaisons covalentes, notamment au niveau d'acides aminés glycines. Ainsi la PE est capable d'interagir directement avec certaines protéines de la famille Atg, dont la protéine Atg8 ¹²⁰. Ces protéines assurent des fonctions importantes dans les dynamiques membranaires et dans les phénomènes de fusion membranaire et de formation des autophagosomes. Il a aussi été démontré que la PE peut être fixée de façon covalente à la protéine LC3 (microtubule-associated protéine 1 light chain 3) chez le rat. Ces conjugaisons sont essentielles à la fonction protéique qui est perdue lorsque le phospholipide n'est pas présent dans l'environnement immédiat de la protéine. La Phosphatidylsérine est aussi capable d'établir des liaisons à haute énergie de ce type avec certaines protéines. Ces phospholipides assurent donc des fonctions cruciales dans l'activité de protéines impliquées dans la formation et la maturation des phagosomes.

Les phospholipides aminés, la PE notamment, possèdent des propriétés physicochimiques particulières qui font que ces molécules assurent des fonctions importantes dans les phénomènes de fusions membranaires qui se déroulent normalement lors de la formation du phagolysosome observée chez un phagocyte ayant ingéré une proie. Des études en biophysique ont montré que la PE est un phospholipide non-lamellaire ayant une forme de cône due à la présence d'une tête polaire très hydrophile et à une partie hydrophobe de section importante ^{121, 122}. A l'opposé la PC est considéré comme un phospholipide lamellaire (forme bâton). Ces différentes propriétés physicochimiques font que les membranes biologiques sont

particulièrement enrichies en PE dans les endroits de fortes courbatures et à l'inverse pauvres en PC. Ces données font que la PE est considéré comme un lipide fusogène. Les fortes courbatures membranaires sont notamment observées aux points de contacts de deux membranes biologiques fusionnant entre elles. Chez l'amibe sociale *Tetrahymena thermophila*, il a ainsi été démontré par spectrométrie de masse couplée à l'analyse d'images que la PE est fortement concentrée aux points de contacts et de fusions membranaires¹²³. De plus cette étude avait démontré que la PE concentrée aux points de fusion membranaires comporte un groupe aminoéthylphosphonate en lieu et place du groupe phosphoryléthanolamine composant la tête polaire du phospholipide. Ces phospholipides comprenant ce type de liaisons directes carbone phosphore en lieu et place de la liaison ester phosphorique sont appelés phosphonolipides. Les fonctions biologiques de ces phosphonolipides ne sont pas clairement établies mais ils pourraient conférer une résistance particulière aux membranes des organismes exprimant ces composés. Les phosphonolipides sont d'ailleurs particulièrement abondants chez les organismes dont les tissus sont directement en contact avec leur milieu environnant, comme les mollusques bivalves marins, les éponges, les cnidaires et les protozoaires dont les amibes libres. Cette résistance particulière s'explique par le fait que ces molécules sont insensibles à l'activité catalytique des phospholipases D et moins sensibles aux phospholipases C.

L'ensemble des données rapportées ci-dessus et des observations que certains phospholipides assurent des fonctions cruciales dans la dynamique membranaire font que la composition lipidique des cellules hôtes pourrait déterminer en partie la capacité d'infestation et de réplication de *L. pneumophila*. A l'inverse, la bactérie en modulant l'expression et le métabolisme lipidique des cellules hôtes pourrait favoriser sa survie et réplication dans le phagosome et ses devenir. On a déjà vu précédemment que dans les phagosomes de cellules infestées par *L. pneumophila* on observe une disparition de la PS¹¹⁵. Cette disparition a des conséquences importantes sur l'homéostasie de cet organite intracellulaire, le recrutement de certaines protéines n'étant plus possible de part l'absence de l'aminophospholipide. La composition en lipides de structure peut donc influencer le devenir intracellulaire de la bactérie. La capacité de résistance d'une amibe envers la bactérie pathogène peut donc aussi dépendre en partie de la capacité que l'amibe possède à moduler son propre métabolisme phospholipidique.

L'expression des aminophospholipides PS et PE dans l'amibe pourrait dépendre de plusieurs facteurs : l'activité de biosynthèse, l'intensité catabolique assurée par les

phospholipases. Ainsi l'inhibition de l'expression de PS au niveau des phagosomes par *L. pneumophila* pourrait-être due à une baisse d'activité de la biosynthèse et/ou à une hydrolyse complète sous l'action de phospholipases. Toutefois des données suggèrent que ces mécanismes ne peuvent expliquer la disparition de la PS. Cette disparition de la PS des phagosomes est observée seulement quelques minutes après l'internalisation de *L. pneumophila*, un délai trop court permettant d'expliquer qu'une inhibition de la biosynthèse de PS soit à l'origine de ce phénomène. Une hydrolyse totale de la PS sous l'action de phospholipases semble aussi peu probable. Les dérivés cataboliques de ce catabolisme sont très toxiques et une action ciblée des enzymes bactériennes sur la PS est difficilement conciliable avec cette hypothèse étant donné le large spectre de substrats utilisés par ces enzymes chez *L. pneumophila*.

Toutefois d'autres hypothèses pourraient expliquer la disparition de la PS. Cette dernière pourrait être rapidement décarboxylée en PE sous l'action de PS décarboxylases. La PS pourrait aussi être acylée sur l'amine terminale de la sérine, donnant ainsi naissance à de la *N*-acyle phosphatidylsérine, un phospholipide similaire au précurseur connu des endocannabinoïdes, la *N*-acyle phosphatidyléthanolamine. Il est d'ailleurs intéressant de noter que l'existence d'un tel phospholipide, i.e., la *N*-acyle phosphatidylsérine, a été récemment découvert dans des phagocytes ¹²⁴. Toutefois, le métabolisme de cette molécule n'est pas connu tout comme l'expression de cette molécule au niveau amibien. Cependant des données existent sur les amibes concernant l'expression et le métabolisme de la *N*-acyle phosphatidyléthanolamine, molécule très apparentée à la *N*-acyle phosphatidylsérine ¹²⁵. Il a ainsi été démontré chez le protozoaire *Dictyostelium discoideum* que la *N*-acyle phosphatidyléthanolamine peut représenter jusqu'à 15% des phospholipides totaux chez cette espèce ¹²⁶. De plus des études biochimiques couplées à un subfractionnement cellulaire ont montré que ce phospholipide est presque exclusivement localisé au niveau des phagolysosomes. D'autres données montrent que l'expression de la *N*-acyle phosphatidyléthanolamine est liée à celle des phagolysosomes, car il a été démontré une corrélation entre l'expression de ce phospholipide et la formation des phagolysosomes. En effet, la *N*-acyle phosphatidyléthanolamine disparaît totalement de la cellule lorsque les phagolysosomes sont expulsés ¹²⁷. Il est donc vraisemblable que ce phospholipide assure des fonctions particulières dans l'homéostasie des phagosomes, structure pivot de l'infection par *L. pneumophila*. Les observations rapportées ci-dessus sont particulièrement intéressantes au regard des fonctions connues assurées par les aminophospholipides. La *N*-acylation de la PS

et de la PE permet de masquer respectivement l'amine terminale de la sérine et de l'éthanolamine, qui comme nous l'avons vu est indispensable à l'activité de protéines régulant la fusion phagolysosomale. Cette *N*-acylation bloquerait effectivement la capacité du phospholipide à établir des liaisons covalentes avec les protéines amphitropes. De façon similaire, la *N*-méthylation de la PE en PC bloquera aussi ces interactions potentielles. Les phénomènes de *N*-méthylation et de *N*-acylation des aminophospholipides pourraient donc constituer un mécanisme physiologique régulant l'interaction potentielle de ces phospholipides avec certaines protéines. Ceci est une hypothèse que nous émettons, aucuns travaux n'ayant à notre connaissance abordé cette possibilité.

A notre connaissance, l'expression des phospholipides *N*-acylés chez d'autres genres amibiens n'est pas connue. Certaines études ont rapporté la composition en phospholipides chez différentes espèces d'amibes y compris chez *Acanthamoeba castellanii* utilisée dans nos études. Ces travaux montrent que les espèces d'amibes étudiées expriment globalement les phospholipides les plus communément retrouvés chez les eukaryotes, les phospholipides majoritaires étant la PC et la PE suivis de la PS et du PI. La présence de sphingomyéline est rapportée chez le pathogène humain *Entamoeba histolytica*¹²⁸. Ces travaux ont aussi démontré l'existence d'un sphingophospholipide particulier, le céramide aminoéthylphosphonate que l'on retrouve de manière particulièrement abondante chez les mollusques et les cnidaires¹²⁹. L'ensemble de ces travaux semble montrer qu'une part importante des phospholipides chez les amibes sont des éther phosphonolipides (phosphonolipides ayant des acides gras liés aux carbone *sn*-1 et/ou *sn*-2 du glycérol par des liaisons éther au lieu de liaisons ester)⁹.

Toutefois l'ensemble de ces études est très fragmentaire et la composition en phospholipides de l'espèce *W. magna* utilisée ici n'est pas connue. Connaissant l'importance de ces lipides de structure dans les relations hôte – parasite nous avons donc entrepris une étude comparée de la composition en phospholipides chez les différentes espèces amibiennes utilisées lors de nos études.

Matériels et méthodes

Partie I. Les cocultures amibiennes

I. Souches utilisées

I. a. Amibes libres : les amibes libres utilisées lors de nos études appartiennent à trois genres amibiens différents:

Le genre Acanthamoeba: *Acanthamoeba castellanii*, souche **BY**

Les *Acanthamoeba* sont parmi les protozoaires les plus répandus dans l'environnement. Elles sont distribuées sur toute la terre et ont été isolées à partir du sol, de la poussière, de l'air, de l'eau naturelle et traitée ¹³⁰. La prépondérance d'*Acanthamoeba* au sein des amibes libres dans l'environnement est due en partie à la structure de sa paroi kystique qui contient de la cellulose. Les kystes des autres protozoaires contiennent surtout de la chitine. Les *Acanthamoeba* ont aussi été isolées à partir de tissus cérébraux et pulmonaires infectés, de liaisons cutanées de patients immunodéprimés et de tissus cornéens de patients présentant des kératites.

Le genre Hartmannella : *Hartmannella vermiformis*, souche **Ax.5.2.e4b**

Il s'agit d'une amibe de forme allongée appartenant à la famille des Hartmannellidae. Cette amibe présente toujours une zone hyaline à l'extrémité antérieure et généralement plus d'une vacuole contractile. Les kystes sont ronds ou légèrement ovoïdes d'un diamètre de 4 à 9,5 µm avec un ectokyste faiblement séparé. La forme végétative mesure de 16 à 33 µm ¹³¹. Cette amibe ne possède pas d'extension filamenteuse, ni de bulbe uroïde. Cette amibe est considérée comme non pathogène par la majorité des auteurs.

Le genre Willaertia : *Willaertia magna*

Deux souches de *Willaertia magna* ont été utilisées dans nos études. La première souche, **Z503** a été obtenue à partir de l'**American Tissue Culture Collection (ATCC 50035)**. La deuxième souche de *W. magna* (**C2c Maky**) a été isolée dans notre laboratoire et déposée à l'**ATCC** (N° **PTA-7824**).

Willaertia magna est une amibe thermophile proche de *Naegleria* spp. C'est une amibe de grande taille : 50 à 100 µm de diamètre pour les trophozoïtes et autour de 20 µm pour les kystes. Les pseudopodes des formes végétatives sont éruptifs ce qui les rattache à la famille des Vahlkampfiidae. Le noyau est vésiculaire avec un large nucléole et des granules lipidiques. On observe des mitochondries allongées ou sphériques ainsi que des saccules. La division nucléaire des *Willaertia* est promitotique (comme chez les *Naegleria*) et caractérisée

par l'absence d'un espace interzonal. Les kystes possèdent plusieurs pores proéminents en culture sur des bactéries, ils sont ronds mais peuvent être polygonaux en microculture. *Willaertia* possède un stade de flagellation et les flagelles sont au nombre de 4. Ces amibes ne semblent pas être pathogènes ni pour l'homme, ni pour des modèles murins²⁰.

Ces quatre souches sont cultivées axéniquement, en présence de 10% de sérum de veau fœtal, sur milieu SCGYEM, réparties en tubes FALCON® (3033) à raison de 3ml par tube. En entretien, les formes végétatives sont repiquées tous les 5-6 jours. Pour les cocultures, on utilise des repiquages de 3 à 4 jours de manière à disposer de trophozoïtes en pleine phase de croissance exponentielle.

I. b. Légionnelles: différentes souches de *Legionella pneumophila* séro-groupe 1 ont été utilisées dans le cadre de notre étude [souches **Lens** (CIP 108286), **Paris** (CIP 107629) et **Philadelphia** (ATCC 33152)]. Nous avons utilisé ces souches car elles sont responsables de la plupart des cas de légionelloses décrits et sont les souches les plus virulentes connues. Elles sont entretenues sur gélose en pente BCYE à raison d'un repiquage toutes les trois semaines. Les souches sont ensemencées en stries larges sur boîte de gélose BCYE (AES®) et incubée 3 à 4 jours à 37°C avant la réalisation des cocultures de manière à disposer de bactéries en phase post-exponentielle.

I. 1. Coculture monoamibienne de *L. pneumophila*.

Préparation de l'inoculum bactérien:

A partir d'une culture de 3 à 4 jours sur gélose BCYE, on prépare une suspension de *L. pneumophila* dans de l'eau distillée stérile de façon à obtenir 1 unité de DO à 550nm correspondant à une concentration de 10⁹ UFC/ml.

I. 1. a. Réalisation des cocultures monoamibiennes

Les cocultures sont réalisées dans des tubes pour cultures cellulaires (FALCON® 3033) contenant 3 ml de milieu SCGYEM. L'ensemencement des tubes se fait à raison de 5,5.10⁴ amibes/ml, à partir d'une suspension amibienne axénique préalablement dénombrée sur cellule de Thoma ou de Malassez. L'infestation des amibes par *L. pneumophila* est réalisée en fixant un ratio *L. pneumophila* / amibe de 50. Aussitôt après l'infestation, les tubes de cocultures sont centrifugés à faible vitesse (1000g pendant 5 min) afin de favoriser le contact

entre amibes et bactéries. Après 15 min, les tubes sont remis en suspension manuellement et sont incubés en position inclinée à 37°C.

Etude cinétique des cocultures

Les cocultures sont suivies pendant au moins 5 jours après l'infestation bactérienne. A chaque intervalle de temps, un tube est prélevé et examiné à la fois du point de vue amibien et bactérien après agitation vigoureuse au vortex afin de détacher les amibes des parois. Pour chaque tube examiné:

- La numération des amibes s'effectue directement sur cellule de Thoma ou de Malassez.
- Le dénombrement des légionelles totales est effectué par étalement direct du milieu de culture sur gélose BCYE (AES®) après dilution de 10 en 10 en eau distillée stérile, dans des microtubes Eppendorf. Chaque dilution est étalée en triplicat sur gélose BCYE à raison de 100µl par boîte. Les boîtes sont alors mises à incuber à 37°C pendant 6 jours au minimum. Une première lecture des étalements s'effectue à partir du 4^{ème} jour en dénombrant les colonies; elle est suivie d'une deuxième lecture au 6^{ème} jour pour confirmation. Le nombre de *L. pneumophila* est exprimé en UFC/ml en tenant compte du facteur de dilution et en supposant que chaque colonie correspond à 1 bactérie initialement présente dans la suspension diluée.

Pour chaque genre amibien, les courbes de croissance de *L. pneumophila*, sont représentées en fonction du temps et correspondent à la moyenne de N-essais indépendants avec les écarts-types correspondants comme indiqué sur les figures de résultats. En raison de la lenteur du développement des colonies de *L. pneumophila* en culture, l'obtention de l'ensemble des résultats pour une manipulation de ce type demande un délai d'au moins 11 jours.

I. 1. b. Cytotoxicité de *L. pneumophila* vis-à-vis des différents genres amibiens

Des cocultures des trois genres amibiens ont également été réalisées dans des microplaques de 24 puits contenant 5.10^4 amibes/puits, infestées avec un ratio *L. pneumophila* / amibes de 50, afin d'observer microscopiquement les monocouches cellulaires et de fournir une évaluation qualitative de l'effet cytopathogène de la bactérie vis-à-vis de l'amibe.

La cytotoxicité a également été déterminée au bout de 48 et de 72 heures de coculture par un test d'exclusion au bleu Trypan sur les genres *Acanthamoeba* et *Willaertia*. Les amibes

sont récupérées par centrifugation douce des tubes de cocultures, puis resuspendues dans 200µl de milieu SCGYEM avant mélange avec le bleu Trypan selon un ratio 4/1. Les cellules sont examinées à l'hématimètre et on détermine pour chaque genre amibien le pourcentage de cellules apparaissant colorées en bleu.

I. 2. Coculture emboîtée (Tripartite) de *L. pneumophila*.

L'objectif de cette partie du travail est d'étudier les répercussions possibles des interactions entre différents genres amibiens, et notamment de la phagocytose inter-amibienne, sur la croissance des légionelles. Dans un premier temps, nous avons d'abord suivi la cinétique du processus de phagocytose inter-amibienne entre *Hartmannella/Willaertia* et *Hartmannella/Acanthamoeba*, puis nous avons procédé à la réalisation de cocultures emboîtées de *L. pneumophila* mettant en jeu deux hôtes amibiens successifs.

I. 2. a. Etude cinétique de la phagocytose inter-amibienne *Hartmannella / Willaertia*.

A partir des cultures axéniques respectives, on prépare une série de tubes de milieu SCGYEM contenant à la fois des amibes *Hartmannella* et des amibes *Willaertia* ou *Acanthamoeba* selon un ratio fixé à 15 *Hartmannella* pour une *Willaertia* ou *Acanthamoeba*. Le processus phagocytaire est observé par microscopie en contraste de phase. Les différences de taille et d'aspect entre les différents genres amibiens permettent de suivre l'évolution du processus de phagocytose et d'effectuer une numération des deux populations amibiennes en coculture à différents intervalles de temps.

I. 2.b. Réalisation des cocultures emboîtées de *L. pneumophila*.

Dans ce but, nous avons utilisé le protocole expérimental suivant:

- ✓ une première étape correspondant, comme dans les cocultures mono-amibiennes, à l'infestation d'un premier hôte amibien par *L. pneumophila*. Cette étape est réalisée 24 heures (J-1) avant l'étape suivante.
- ✓ une deuxième étape consistant, après élimination des légionelles extracellulaires, à introduire dans la coculture un deuxième genre amibien.

Ces deux étapes sont décrites en détail ci-dessous :

Première étape : infestation du premier hôte amibien à J-1 :

H. vermiformis est utilisé comme premier hôte amibien. L'infestation de ce premier hôte par *L. pneumophila* est réalisée en tubes FALCON dans des conditions analogues à celles indiquées précédemment dans le paragraphe I.1.a. Les seules différences portent sur la concentration amibienne de départ qui est fixée à 2.10^5 *Hartmannella*/ml et sur le ratio d'infestation *L. pneumophila*/*Hartmannella* qui est de 20. Les tubes sont incubés en position inclinée pendant 24 heures à 37°C.

Deuxième étape : addition du deuxième hôte amibien à J0.

Les légionelles extracellulaires sont éliminées par un traitement à la gentamicine avant l'ajout du 2^{ème} genre amibien.

✓ *Elimination des légionelles extracellulaires*

A l'issue du temps d'incubation destiné à assurer l'infestation du premier hôte amibien, les légionelles extracellulaires sont éliminées par traitement des cocultures à la gentamicine à raison de 50µg/ml pendant 1 heure à 37°C¹³². Après centrifugation à 2000 g pendant 10min, l'antibiotique est éliminé par décantation du milieu de culture et le culot cellulaire d'*Hartmannella* est lavé à deux reprises avec 2 ml de milieu SCGYEM sans sérum pour éliminer les traces d'antibiotique. Après le dernier lavage, le culot amibien de chaque tube est remis en suspension dans 3ml de milieu SCGYEM. On procède à une numération (J0), à la fois des *Hartmannella* et des légionelles comme décrit au paragraphe I.1.a. précédent.

✓ *Inoculation du deuxième hôte amibien (Willaertia ou Acanthamoeba)*

Parallèlement, on prépare une suspension amibienne du deuxième hôte à partir d'une culture axénique. Après dénombrement à la cellule de Thoma, on calcule le volume nécessaire de suspension à introduire dans les tubes de cocultures constituant la série « essai » de façon à obtenir un rapport cellulaire 1^{er} hôte amibien (*Hartmannella*) / 2^{ème} hôte amibien (*Willaertia* ou *Acanthamoeba*) voisin de 15. Une série de tubes « témoins » ne reçoit pas le 2^{ème} hôte amibien après le traitement à la gentamicine.

✓ *Suivi des cocultures de J0 à J+4.*

Les cocultures sont dénombrées tous les jours à la fois du point de vue amibien et bactérien:

- La numération des trophozoïtes de chaque genre amibien est effectuée sur cellule de Thoma ou de Malassez.

- Le dénombrement des légionelles est effectué comme dans le cas des mono-cocultures par étalement sur gélose BCYE des dilutions du milieu de culture en eau distillée stérile. Une seule manipulation demande un délai d'une douzaine de jours pour être interprétée.

Partie II. Microscopie Electronique à Transmission

Les observations en microscopie électronique ont été réalisées au CECIL (Centre Commun d'Imagerie de la Faculté de Médecine de Laënnec). Une série de pré-traitements est réalisée sur les cocultures tripartites amibiennes afin d'observer les cellules par microscopie électronique. Cette observation par microscopie électronique est réalisée sur les cocultures amibes – *L. pneumophila* et sur les cocultures tripartites.

II. 1. Fixation des cellules

Cette fixation a pour but d'immobiliser, et de conserver le matériel cellulaire. Nous utilisons pour cela trois composants. Le glutaraldéhyde a pour but d'établir des liaisons covalentes intermoléculaires. Le tétr oxyde d'osmium (OsO_4) stabilise quant à lui la membrane des cellules en se fixant sur les doubles couches lipidiques. Cette fixation est réalisée comme suit : après décantation des suspensions cellulaires, les cellules sont fixées à température ambiante en présence de milieu SCGYEM contenant 0.2% de glutaraldéhyde pendant 20 min. La fixation est poursuivie pendant 30 min dans un tampon cacodylate (0.1 M ; pH 7.4). Les cellules sont ensuite lavées et incubées pendant 40 min dans un tampon 0.15 M de cacodylate contenant 0.1 % de OsO_4 . Les cellules ainsi traitées sont ensuite déshydratées.

II. 2. Déshydratation et inclusion des cellules

La déshydratation des cellules s'effectue par transfert successif dans des bains d'éthanol de concentrations croissantes (50°, 70°, 90°, 95° et $2 \times 100^\circ$). Les cellules sont ensuite incluses dans une résine (EPON), en association avec un accélérateur (DMP 30) entraînant après chauffage le durcissement du matériel cellulaire. Le bloc rigide de cellules imprégnées dans la résine ainsi obtenu, est utilisé pour les coupes à l'ultra-microtome.

II. 3. Coupes cellulaires à l'ultra-microtome

Les coupes ultrafines réalisées ont une épaisseur de 75nm. Ces coupes s'effectuent avec un couteau en diamant et sont ensuite placées sur des grilles circulaires en cuivre pour séchage.

II.4. Contraste et observation des coupes

Ce traitement permet de donner du relief aux cellules permettant ainsi une observation plus aisée, car les électrons traversent les cellules non contrastées de façon uniforme. Le contraste consiste en la saturation des cellules en osmium, acétate d'uranyle et citrate de plomb, qui se fixent respectivement sur les lipides, les protéines et les sucres. Ces composants apparaissent alors de couleur sombre à travers le microscope, ainsi que les membranes les entourant. Enfin, les coupes sont examinées en utilisant un microscope électronique JEOL 1200 CX à 80 kilovolts. Un minimum de 100 cellules est observé systématiquement pour chaque expérience en cocultures.

Partie III. Analyses biochimiques

Tous les solvants utilisés sont de grade analytique et ont été achetés chez SDS (Peypin, France) ou chez Carlo Erba (Milan, Italie). Les lipides standards utilisés (céramide type III et type IV, cholestérol, cholestérol monooléine, trioléine, dioléine, monooléine, glucosylcéramide, lactosylcéramide, céramide tri-hexoside, globosides, sphingomyéline, phosphatidyléthanolamine et phosphatidylcholine) au cours de notre étude proviennent tous de chez Sigma ou de chez Matreya (Pleasant Gap, PA, USA) de même que les divers produits chimiques utilisés pour les analyses (Saint Quentin Fallavier, France). L'ensemble des standards d'endocannabinoides utilisés provient de chez Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI).

Les plaques de chromatographie sur couche mince en gel de silice G60 (0.25 mm d'épaisseur de gel de silice) sans indicateur de fluorescence sont de chez Merck (Darmstadt, Allemagne). Les colonnes aminopropyle (LC-NH₂ – 100 mg et 500 mg) d'extraction en phase solide proviennent de chez Supelco (Saint Quentin Fallavier, France).

De façon à obtenir suffisamment de matériel biologique pour réaliser les analyses biochimiques, les cellules, sontensemencées à 30°C dans des boîtes FALCON® (75 cm²)

contenant du milieu SCGYEM en présence d'air atmosphérique stérile. Après 4 jours en culture, les amibes sont lavées et recueillies comme suit :

Les boîtes sont placées sur glace, le milieu éliminé et les cellules lavées par ajout de PBS pH 7.4. Les boîtes sont vortexées de façon à décoller les amibes. La suspension cellulaire est transférée dans un tube en polypropylène de 15 ml et centrifugée de façon à culotter les amibes.

III. 1. Extraction et purification des lipides

L'extraction et la purification des lipides est réalisée suivant la méthode de Folch ¹³³. Brièvement, le culot cellulaire est resuspendu dans 20 ml de méthanol. La suspension méthanolique est soniquée durant 5 mn à l'aide d'un bain à ultra sons. Puis 40 ml de chloroforme sont ajoutés à l'homogénat cellulaire, de façon à réaliser l'extraction des lipides dans un mélange de solvants aux proportions de chloroforme – méthanol (2:1, v/v). L'extraction des lipides est poursuivie pendant la nuit à -20° C. Après extraction, les lipides sont purifiés de la façon suivante.

Les flacons contenant l'homogénat cellulaire en chloroforme – méthanol (2:1, v/v) sont sortis du congélateur et laissés sur la pailleuse pendant 1 heure de façon à équilibrer leur température avec celle du laboratoire. Différents aliquots de l'homogénat sont prélevés pour le dosage ultérieur des protéines, comme décrit ci-après dans le paragraphe III.6.). Les homogénats sont filtrés sur papier filtre sans cendre et le culot cellulaire rincé par 10 ml de chloroforme – méthanol (2:1, v/v). Les contaminants non lipidiques du filtrat chloroforme – méthanol (2:1, v/v) sont éliminés par partition de phases en réalisant 2 lavages successifs de la façon suivante :

III.1.a. Premier lavage

Il est réalisé par addition d'une solution aqueuse de KCL à 0,25%, à raison de ¼ du volume total de filtrat. Après agitation, et passage au bain marie à 50°C, deux phases distinctes se forment:

- Une phase inférieure contenant les lipides dans le chloroforme.
- Une phase supérieure contenant essentiellement l'eau, le méthanol et les contaminants non lipidiques. Cette dernière est collectée pour l'analyse ultérieure de glycolipides complexes.

III.1.b. Deuxième lavage

Les proportions initiales de chloroforme - méthanol (2:1, v/v) sont restaurées par addition de méthanol (1/3 du volume de l'homogénat filtré) à la phase chloroformique. Le second lavage est alors effectué avec de l'eau désionisée, dans les mêmes proportions que le premier. La phase supérieure est éliminée à l'aide d'une trompe à vide. Au cours des deux étapes de purification, la séparation des phases est facilitée par un passage bref au bain marie à 50° C. La phase chloroformique contenant les lipides purifiés est transférée dans des ballons de 250 ml préalablement tarés et les solvants évaporés à 60° C à l'aide d'un Rotavapor Buchi. De façon à éliminer les traces d'eau restantes dans le ballon, deux évaporations successives sont effectuées après ajout de 20 ml d'éthanol absolu. Ceci permet l'élimination de l'eau résiduelle par formation d'un azéotrope éthanol - eau. La déshydratation est achevée à température ambiante sous vide plus poussé obtenu à l'aide d'une pompe à vide Speedvac. La quantité totale de lipides purifiés est finalement déterminée par pesée, après équilibrage thermique des ballons. Les lipides sont ensuite remis en solution dans un volume déterminé de benzène - méthanol (2:1, v/v), un solvant permettant une bonne dissolution des lipides et permettant une excellente conservation sous congélation à -30°C, même pendant de longues durées. Les manipulations sont effectuées sous sorbonne chimique compte tenu de la toxicité des solvants.

III. 2. Analyse des phospholipides

Le dosage des phospholipides est réalisé sur un échantillon des lipides totaux extraits d'amibes (détermination des teneurs en phospholipides totaux) et sur les phospholipides individuels séparés par chromatographie sur couche mince (dosage des phospholipides individuels – voir paragraphe III.4.a). Les phospholipides sont dosés suivant la procédure décrite par Fisk et Subbarow ¹³⁴, modifiée par (Abdul-Malak N, 1978 ; Meister R, 1980 ; Brichon G, 1984) ¹³⁵⁻¹³⁷. Elle est basée sur la réduction de l'acide phosphomolybdique par l'acide 1-amino-2-naphtol-4-sulfonique, en milieu sulfurique. Elle comprend deux étapes :

- la libération du phosphore lipidique, par minéralisation acide
- le dosage du phosphore libéré.

III.2.a. La minéralisation

Des aliquots des lipides totaux conservés dans la solution de benzène – méthanol (2 :1, v/v) (voir paragraphe III.1.b) sont prélevés dans un tube à essai et évaporés sous azote afin

d'éliminer toute trace de benzène dans le tube. Le phosphore lipidique est libéré après addition de 0.25 ml d'un mélange acide sulfurique - acide perchlorique (2:1, v/v) contenant 1g/l de tétrahydroxyde de vanadium comme catalyseur. L'opération est effectuée sous hotte, par chauffage pendant environ 20 secondes sur bec Mecker, jusqu'à apparition de fumées blanches. Une gamme étalon contenant 0 ; 3 ; 6 ; 9 ; 12 µg de phosphore (solution standard de phosphate monopotassique) est aussi traitée de façon similaire et en parallèle aux échantillons lipidiques d'amibes.

III.2.b. Dosage du phosphore lipidique

Il est effectué sur l'échantillon minéralisé, directement dans les tubes, en présence de 5 ml par tube du réactif suivant qui est préparé extemporanément. La solution réactionnelle est préparée en ajoutant pour 100 ml d'eau distillée les produits suivants:

Mélange ANSA (0.63 g)

Heptamolybdate d'ammonium (0.2 g)

Le mélange ANSA est obtenu en homogénéisant dans un mortier en porcelaine:

60 g de métabisulfite de sodium

2 g de sulfite de sodium

1 g d'acide amino naphthol sulfonique

Après addition de la solution réactionnelle et agitation au vortex, la réaction colorée se développe après 8 min de chauffage à 100°C au bain marie. L'intensité de la coloration (bleu de molybdène) est mesurée au spectrophotomètre à 830 nm, soit directement sur les échantillons de lipides totaux, soit sur les phospholipides individuels séparés par CCM bidimensionnelle (cf paragraphe suivant). Dans ce cas, le gel de silice provenant de la plaque de chromatographie est éliminé par centrifugation à 500 g_{av} pendant 10 min avant la lecture au spectrophotomètre.

III.3. Fractionnement des classes de lipides par extraction en phase solide

Les lipides totaux purifiés à partir des différentes souches d'amibes sont fractionnés par extraction en phase solide sur colonnes aminopropyl¹³⁸. Brièvement, la procédure suivie est la suivante:

Des aliquots de lipides totaux, correspondant à des quantités équivalentes de protéines, sont évaporés sous azote puis remis en suspension dans 200 µl de chloroforme.

L'échantillon est ainsi déposé par gravité sur une colonne aminopropyle de 100 mg préalablement conditionnée par 4 ml d'hexane et placée sur un appareil d'extraction à vide (Vaccum Miniprep Apparatus, Supelco).

Puis les lipides sont élués (le débit d'élution est fixé à une goutte par seconde) par différents systèmes de solvants et collectés dans différentes fractions comme décrit ci-dessous :

Fraction 1 : les lipides neutres (stérol, esters de stérols, acide gras méthylés, triacylglycérols, diacylglycérols) sont élués avec 1,4 ml d'hexane - éthyle acétate (85:15, v/v)

Fraction 2 : Les céramides sont élués dans cette fraction par 1,6 ml de chloroforme - méthanol (23:1, v/v).

Fraction 3 : les acides gras libres sont élués par 1,8 ml de diisopropyl éther - acide acétique (98:5, v/v). Cette fraction est éluee dans le même tube ayant servi à collecter la fraction 1.

Fraction 4 : Les glycolipides neutres sont élués par 2,1 ml d'acétone - méthanol (9:1.35, v/v).

Fraction 5 : 2 ml de chloroforme - méthanol (2:1, v/v) permettent d'éluer les phospholipides neutres.

Fraction 6 : Les phospholipides acides sont élués par 2 ml de méthanol. Cette fraction est parfois poolée avec les phospholipides de la fraction 5.

Après évaporation des solvants sous azote, les différentes fractions ainsi obtenues sont déposées sur plaque de chromatographie sur couche mince afin de séparer les différentes classes de lipides élués de la colonne. Les lipides sont déposés sur CCM dans 60 µl de chloroforme – méthanol (2 :1, v/v), et séparés à l'aide des systèmes de solvants décrits dans le paragraphe suivant.

III. 4. Chromatographies sur Couche Mince

III.4.a. Séparation bidimensionnelle des phospholipides

Dans le but de doser les différents phospholipides, ceux-ci sont séparés par CCM bidimensionnelle. Cette séparation des phospholipides est réalisée selon la technique décrite par Portoukalian et al., sur des plaques de 10 ×10 cm¹³⁹. Un aliquot des lipides totaux, correspondant à ≈ 10-15 µg de phosphore lipidique, est déposé dans un angle de la plaque à 1.5 cm environ de chacun des bords. La séparation des divers phospholipides est réalisée après migration de la plaque dans 2 systèmes successifs de solvants.

Le premier système de solvant utilisé est le tétrahydrofurane – acétone – méthanol – eau (50:20:40:6, v/v/v/v). La migration est arrêtée à 1 cm du bord de la plaque qui est ensuite séchée sous courant d'air chaud. Puis la plaque est placée perpendiculairement à la direction du premier système de solvant dans un deuxième système, chloroforme – acétone – méthanol – acide acétique – eau (50:20:10:15:5, v/v/v/v/v) dont le développement se fait sur toute la longueur de plaque. Après séchage de celle-ci, les phospholipides sont révélés par le réactif de Dittmer et Lester qui donne une coloration bleu spécifique des groupements phosphorés¹⁴⁰. Dans certains cas, une révélation à la ninhydrine est réalisée avant la révélation par le réactif de Dittmer et Lester. La ninhydrine permet de caractériser les lipides contenant un groupement aminé¹⁴¹. Il donne une coloration pourpre caractéristique des groupements aminés libres et permet de visualiser PS, PE et leurs dérivés lyso (LPS, LPE). La coloration apparaît après quelques minutes de chauffage à 110°C et disparaît spontanément en quelques heures. Cette procédure chromatographique bidimensionnelle permet de séparer sur une même plaque CCM les différentes espèces de phospholipides des lipides neutres qui migrent au niveau du front de solvant.

III.4.b. Séparation des lipides neutres

Les lipides neutres élués des colonnes aminopropyles (Fractions 1 et 3 poolées) sont séparés sur CCM mono-dimension par deux systèmes de solvants qui sont utilisés successivement. Une première migration dans l'hexane – diéyle éther - acide acétique (80:20:1, v/v/v) est réalisée sur toute la longueur de la plaque (10 cm). Après séchage, celle-ci est développée jusqu'à ¼ de sa longueur dans l'éther de pétrole - diéyle éther - acide acétique (40:60:0.1, v/v/v) comme système de solvant. Des standards de lipides neutres sont déposés sur la même plaque de CCM afin d'identifier les spots lipidiques observés après révélation du chromatogramme. La révélation est réalisée après pulvérisation d'une solution d'acide phosphorique à 8% contenant 3% d'acétate de cuivre et chauffage de la plaque pendant 10 mn à ~ 180°C. Les lipides apparaissent alors sous forme de spots noirs sur fond blanc.

III.4.c. Séparation des céramides libres

Les tubes contenant les fractions 2 éluées des colonnes aminopropyles sont évaporés sous azote et les lipides (céramides) déposés sur CCM en parallèle avec des standards de céramide. La plaque est développée dans du chloroforme – méthanol (50:5, v/v) comme système de solvant. Ce système permet une bonne séparation des différentes espèces

moléculaires de céramide en fonction du degré d'hydroxylation et de la position des groupements hydroxylés portés sur la molécule ¹⁴². Après séchage de la plaque, les lipides sont révélés par carbonisation comme décrit au paragraphe précédent.

III.4.d. Séparation des glycosphingolipides neutres

Les glycosphingolipides neutres élués des colonnes aminopropyles dans la fraction 4 sont séparés, en parallèle avec des standards de glucosylcéramide et lactosylcéramide, en mono-dimension dans le système de solvant chloroforme – méthanol – eau (65:25:4, v/v/v). Après séchage de la plaque CCM, les glycosphingolipides sont révélés à l'orcinol.

III.4.e. Séparation des phospholipides

Les phospholipides élués dans les fractions 5 et 6 sont parfois séparés par CCM mono-dimensionnelle à l'aide du système chloroforme – acétone – méthanol – acide acétique – eau (50 :20 :10 :15 :5, v/v/v/v/v). Après séchage de la plaque, les phospholipides sont révélés par carbonisation après pulvérisation d'une solution d'acétate de cuivre à 3% dans l'acide phosphorique. Parfois, les lipides sont révélés après exposition aux vapeurs d'iode. C'est une technique non destructive où après contact avec une atmosphère saturée en vapeurs d'iode les différents composés lipidiques se révèlent en jaune plus en moins intense par fixation réversible de l'iode sur les doubles liaisons.

III. 5. Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)

La composition en acides gras des phospholipides totaux a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse ¹⁴³. Dans ce but, les acides gras des phospholipides sont d'abord méthylés comme décrit ci-dessous.

III.5.a. Méthylation des acides gras

Un échantillon de lipides totaux (correspondant à 30 µg de phosphore lipidique total) à analyser est déposé sur une CCM 10 × 5 cm préalablement lavée par migration dans l'éther diisopropylique. Les lipides neutres sont séparés des phospholipides par migration dans ce même solvant. Le dépôt, contenant les phospholipides qui ne migrent pas dans l'éther, est gratté dans un tube en verre de 15 ml équipé d'un bouchon téfloné.

La méthylation des acides gras est réalisée à l'aide d'une solution de chlorure d'acétyle en milieu acide et anhydre. Cette opération consiste à couper la liaison ester unissant

les acides gras au groupement glycérol des phospholipides. Les acides gras ainsi libérés subissent en même temps une méthylation en début de chaîne permettant d'augmenter la volatilité de la molécule et de diminuer leur interaction avec la phase stationnaire de la colonne capillaire du chromatographe.

Ces deux opérations s'effectuent directement sur le gel de silice où sont adsorbés les phospholipides à l'issue de la purification par CCM. Pour cela, 500 µl de benzène – chlorure d'acétyle (2 :1, v/v) sont ajoutés dans le tube ainsi que 2.5 ml de méthanol HCl 0.5 M. La méthylation est réalisée à 85°C pendant 2 heures. En fin de réaction, 5 ml d'hexane sont ajoutés dans le tube préalablement refroidi à température ambiante. Après agitation, la phase hexane est récupérée dans un autre tube. Une deuxième extraction des acides gras méthylés est réalisée par 5 ml d'hexane qui sont poolés avec le premier extrait. La phase hexane est ensuite lavée par ajout de 2.5 ml d'eau distillée. Après agitation, la phase aqueuse inférieure est éliminée. Cette dernière étape est réalisée deux fois afin d'assurer un bon lavage de la phase hexane. Puis le solvant est évaporé sous azote et les acides gras méthylés sont resuspendus dans un volume de 30 µl d'hexane d'où un aliquot de 5-7 µl sera utilisé pour analyse par CPG.

III.5.b. Séparation des acides gras méthylés par CPG

La séparation des acides gras méthylés est réalisée sur un chromatographe Chrompack CP 9001 (Les Ulys, France) équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et d'une colonne capillaire (0.5×30 m) omegawax (Supelco – Saint Quentin Fallavier, France). Les températures de l'injecteur et du détecteur sont réglées sur 250 °C. Les acides gras sont séparés à l'aide du protocole suivant : 10 min à 180 °C, suivi d'une montée en température jusqu'à 190 °C à 1 °C/min. Cette montée est suivie d'un plateau à 190 °C pendant 10 min puis d'une augmentation de 2 °C/min jusqu'à 220 °C. La température du four est ensuite conservée à ce niveau pendant 30 min. Le gaz vecteur utilisé est l'azote. L'intégration des résultats se fait à l'aide du logiciel d'acquisition Maestro de Chrompack.

III. 6. Dosage des protéines

Les protéines sont dosées sur des aliquots prélevés à partir de l'homogénat tissulaire obtenu après extraction des lipides (voir paragraphe III.1). Le dosage est réalisé suivant la méthode de Bradford ¹⁴⁴, une solution d'albumine sérique bovine étant utilisée pour la gamme étalon.

Partie IV. Effet des endocannabinoïdes et du 3-deazaadenosine sur la croissance des amibes libres

IV.1. Effet des endocannabinoïdes

L'effet de différents endocannabinoïdes sur la croissance des souches amibiennes a été étudié comme décrit ci-dessous. Les endocannabinoïdes utilisés (*N*-arachidonoyl éthanolamine, 2-*O*-arachidonoylglycérol, et le 2-*O*-arachidonoylglycérol éther) proviennent de chez Cayman Chemical (Ann Arbor, MI). Avant emploi les molécules sont dissoutes dans de l'éthanol absolu (1:1, v/v) à une concentration stock de 5 mg/ml.

Les essais sont réalisés à 37 °C dans des tubes pour culture cellulaire (FALCON® 3033) contenant 1 ml de milieu SCGYEM. L'ensemencement des tubes se fait à raison de 2×10^5 amibes/ml, à partir d'une suspension amibienne axénique préalablement dénombrée sur cellule de Thoma (trophozoites en pleine phase de croissance exponentielle). Différentes concentrations d'endocannabinoïdes (0, 5, 10 et 20 µg/ml) dans le milieu ont été testées. Les tubes témoins comprennent aussi le solvant utilisé pour dissoudre les endocannabinoïdes (concentration finale en éthanol de 0.05 %). L'effet des endocannabinoïdes sur la croissance amibienne est contrôlée quotidiennement pendant au moins 3 jours en réalisant une numération des amibes sur cellule de Thomas. Les courbes de croissance sont représentées en fonction du temps et correspondent à la moyenne de *n*-essais indépendants avec les écarts-types correspondants.

Ces expériences ont aussi été réalisées en plaques de 24 puits de façon à tester l'effet des endocannabinoïdes sur la capacité des amibes à former des monocouches. Les cultures sont observées en microscopie à contraste de phase.

IV.2. Effet du 3-deazaadenosine

Nous avons aussi testé l'effet d'un inhibiteur connu de la voie de méthylation de la PE en PC, le 3-deazaadenosine (3-DAA)^{145, 146}. Deux concentrations de 3-DAA dans le milieu d'incubation (10 et 100 µM) ont été testées. Les solutions mères de 3-DAA sont préparées extemporanément dans le milieu SCGYEM d'incubation. L'effet du 3-DAA sur la croissance des différents genres amibiens est évalué suivant le même protocole que celui suivi pour tester l'effet des endocannabinoïdes au paragraphe IV.1 précédent.

L'effet du 3-DAA sur la composition en phospholipide des amibes a aussi été étudié. Dans ce but, et afin d'obtenir suffisamment de matériel pour effectuer les analyses lipidiques, les amibes sont incubées dans des boîtes de culture de 175 cm² contenant ou non le 3-DAA à la concentration de 10 µM dans le milieu SCGYEM. Les cellules sont lavées après 48 heures d'incubation et les lipides extraits et analysés comme décrit dans la partie III des matériels et méthodes.

Résultats

Les résultats obtenus lors de nos recherches sont exposés en quatre parties distinctes sous forme d'articles déjà publiés, soumis ou en cours de soumission.

Le premier article présente les résultats obtenus lors des études qui visaient à répondre au **premier objectif** que nous nous étions fixé à savoir déterminer la capacité de réplication de *L. pneumophila* chez *W. magna* une espèce d'amibe très peu étudiée jusqu'à présent. Nous avons comparé cette capacité de réplication chez *W. magna* à la réplication de la bactérie pathogène chez d'autres espèces d'amibes.

Le deuxième article démontre l'existence d'une phagocytose entre amibes. L'impact de cette phagocytose entre amibes sur la réplication de *L. pneumophila* est aussi présenté. Ces études répondent au **second objectif** fixé.

Le troisième article démontre que que la composition en lipides de structure diffère considérablement entre l'amibe *W. magna* et les autres espèces d'amibes, i.e., *H. vermiformis* et *A. castellanii* utilisées dans nos études. Les observations rapportées dans cette partie du manuscrit répondent au **troisième objectif** fixé.

Le quatrième article démontre l'impact des endocannabinoides sur la croissance amibienne.

Résultats-papier n°1

Les résultats obtenus lors des expériences de cocultures amibes / *L. pneumophila* sont présentés dans la partie suivante. Les résultats exposés sous forme d'article répondent au premier objectif que nous nous étions fixé au début de ces études (voir partie introduction), à savoir, caractériser la capacité potentielle des amibes *Willaertia magna* à servir de vecteur aux légionelles. Pour cela nous avons comparé la croissance de différentes souches de *L. pneumophila* appartenant au séro groupe 1 en coculture avec différentes espèces d'amibes libres : deux souches d'amibes libres appartenant aux espèces *Hartmannella vermiformis* et *Acanthamoeba castellanii* et deux souches appartenant à l'espèce *Willaertia magna* (Une souche isolée et caractérisée dans notre laboratoire (souche C2c) et une souche (Z503) obtenue auprès d'ATCC).

Les résultats marquants obtenus lors de ces études sont les suivants :

- La croissance des légionelles en coculture avec les amibes dépend à la fois de la souche de légionelle et de l'espèce ou de la souche d'amibe. Les cocultures mono-amibiennes ont effectivement montré une croissance des Légionelles en présence des amibes *Hartmannella*, *Acanthamoeba* et *Willaertia magna* Z503. A l'inverse, une absence de développement significatif des bactéries notamment *L. pneumophila* Paris est observée en présence de *Willaertia magna* C2c.
- Toutes les souches de *L. pneumophila* induisent une inhibition de la croissance des amibes *A. Castellani*, *H. Vermiformis*. Cette inhibition de croissance est expliquée par la cytotoxicité induite par la bactérie. La croissance amibienne est différemment affectée en fonction de l'espèce, les souches de *W. magna* étant beaucoup moins sensibles que les autres espèces amibiennes. De plus la souche C2c de *W. magna* est particulièrement résistante par rapport à la souche Z503 dans le sens où elle résiste à la bactérie pathogène jusqu'à 7 jours en coculture.
- Les observations en microscopie électronique démontrent la formation de nombreux phagosomes réplicatifs chez l'*Acanthamoeba* et l'*Hartmannella*. Cette formation est très rarement observée chez *W. magna* c2c. Ces données suggèrent fortement que les légionelles ne sont pas capables de former des phagosomes réplicatifs chez *W. magna* c2c, peut être par leur incapacité à inhiber la fusion phago-lysosomale qui se déroule normalement dans les cellules parasitées.

Ces observations montrent que toutes les amibes libres ne sont pas permissives à *L. pneumophila*. *W. magna* C2c, étudiée ici pour la première fois, fait effectivement exception à la règle puisqu'elle est particulièrement résistante aux Légionelles. Ces observations basiques pourraient avoir des répercussions importantes dans la compréhension de l'écologie des légionelles. Ces résultats ont été publiés dans FEMS Microbiol Lett. [*FEMS Microbiol Lett.* 290(1), 10-17 (2009)].

Free-living freshwater amoebae differ in their susceptibility to the pathogenic bacterium

Legionella pneumophila

Rafik Dey^{1,2}, Jacques Bodennec,² Mouh Oulhadj Mameri,¹

and Pierre Pernin.^{1*}

Running title:

L. pneumophila multiplication within different free-living amoebae

⁽¹⁾ Université de Lyon, Lyon, F-69003, France ; Université Lyon 1 ; CNRS, UMR5240 laboratoire de Biologie Cellulaire, ISPB, 8, Avenue Rockefeller, F-69373, France.

⁽²⁾ Université de Lyon, Lyon, F-69003, France ; Université Lyon 1 ; CNRS, UMR5123, laboratoire de Physiologie Intégrative Cellulaire et Moléculaire, Villeurbanne, F-69622, France.

* To whom correspondence should be addressed: pernin@recherche.univ-lyon1.fr

ABSTRACT

Legionella pneumophila is known as a facultative intracellular parasite of free-living soil and freshwater amoebae of which several species have been shown to support the growth of the pathogenic bacteria. We report for the first time the behaviour of two strains (c2c and Z503) of the amoeba *Willaertia magna* towards different strains of *L. pneumophila* serogroup 1 and compared it with *Acanthamoeba castellanii* and *Hartmannella vermiformis*, known to be *L. pneumophila* permissive. In contrast to the results seen with other amoebae, *W. magna* c2c inhibited the growth of one strain of Legionella (*L. pneumophila*, Paris), but not of others belonging to the same serogroup (*L. pneumophila*, Philadelphia and *L. pneumophila*, Lens). Also, the different *L. pneumophila* inhibited cell growth and induced cell death in *A. castellanii*, *H. vermiformis* and *W. magna* Z503 within 3-4 days while *W. magna* c2c strain remained unaffected even up to 7 days. Electron microscopy demonstrated that the formation of numerous replicative phagosomes observed within *Acanthamoeba* and *Hartmannella* is rarely seen in *Willaertia* cocultured with *L. pneumophila*. Moreover, morphological differences were observed between *L. pneumophila* cultured either with *Willaertia* or other amoebae. These observations show that amoebae are not all equally permissive to *L. pneumophila* and highlight *W. magna* c2c as particularly resistant towards some strains of this bacteria.

Key-words: *Willaertia magna*, *Legionella pneumophila*, free-living amoebae, protozoa-bacterial interactions.

INTRODUCTION

The gram negative bacterium *Legionella pneumophila*, the causative agent of Legionnaire's disease, can grow facultatively within macrophages, monocytes or epithelial cells (Horwitz, 1983b). *L. pneumophila* is found ubiquitously in freshwater environments where it may replicate within protozoa such as ciliates and free-living amoebae (M. Molmeret, D.M. Bitar, L. Han and Y.A. Kwaik. , 2004) (M. Molmeret, M. Horn, M. Wagner, M. Santic, and Y. A. Kwaik, 2005). Within phagocytic cells, the genes of the *L. pneumophila dot/icm* system are essential for evading endocytic maturation and inhibition of phagosome lysosome-fusion in the cytoplasm of their diverse host cells (Roy, 2002). Intracellular multiplication of *Legionella* in free-living amoebae, discovered by Rowbotham (Rowbotham, 1980a), has since been confirmed by numerous other studies. For instance, co-culture experiments in liquid media have shown that amoebae exert an important growth promoting effect on *L. pneumophila*. During outbreaks of Legionnaire's disease, the water bodies concerned are usually found to contain significant numbers of free-living amoebae; furthermore, high numbers of *Legionella* species are found when concentrations of amoebae are high (J. M. Barbaree, B. S. Fields, J. C. Feeley, G. W. Gorman, and W. T. Martin, 1986). Moreover, the isolation of *L. pneumophila* from water is more successful if amoebae are added (G. N. Sanden, W. E. Morrill, B. S. Fields, R. F. Breiman, and J. M. Barbaree, 1992). Also, the presence of amoebae can trigger the revival of *Legionella* strains that became non-cultivable (VBNC state) following a prolonged period in poor medium such as distilled water (Steinert, 1997).

Although Fields reported that 13 species of amoebae and 2 species of ciliated protozoa can support intracellular replication of *L. pneumophila* (B. S. Fields, 1996), most *in vitro* experiments have been performed with only two genera of amoebae - *Acanthamoeba* and *Hartmannella*. So far there have been few attempts to test whether other

genera of amoebae can act as hosts for *L. pneumophila* strains. In order to compare the ability of different common freshwater amoebae (*Acanthamoeba castellanii*, *Hartmannella vermiformis* and two strains of *Willaertia magna*) to support *L. pneumophila* growth, we performed coculture experiments of them with different *L. pneumophila* strains belonging to the same serogroup 1.

MATERIAL AND METHODS

Strains

The different strains of *L. pneumophila* serogroup 1 (Lens CIP 108 286, Paris CIP 107 629T and Philadelphia (ATCC 33152) were cultured at 37°C for 3 to 4 days on buffered charcoal yeast extract (BCYE) agar before coculture experiments (L. Y. Gao, and Y. Abu Kwaik, 2000).

The amoebae used in this study were *Acanthamoeba castellanii* (By 02.2.4) and *Hartmannella vermiformis* (Ax.5.2e4b), two species known to support *L. pneumophila* and two strains of *Willaertia* genus, hitherto untested : *W. magna*, Z 503 (ATCC 50035) and c2c Maky (ATCC PTA-7824). All amoebae were grown at 30°C on a lawn of *Escherichia coli* on non nutrient agar (NNA) and were established in axenic culture at 37°C in Serum Casein Glucose Yeast Extract Medium (SCGYEM) (J. F. De Jonckheere, 1977).

Coculture of L. pneumophila with amoebae

Tubes (FALCON® 3033) containing 3 ml of SCGYEM medium were seeded with 5.5×10^4 trophozoites/ml of the different amoebae maintained in exponential growth phase by subculture every 3-4 days. On day 0, the different strains of *L. pneumophila*, grown on BCYE medium, were suspended in sterile distilled water at 10^9 /ml (1 OD (Optical Density) unit at 550 nm), and inoculated into the amoebic cultures at a multiplicity of infection (MOI) of 50. Low speed centrifugation (5 min at 1000 x g) was used to initiate physical interaction between bacteria and amoebae. After 15 min, the pellet was resuspended and the

tubes were incubated at 37°C in a slanting position in order to increase medium to air exchange surface. The cocultures were analyzed at 24 hr intervals from day 0 to day 4 with the following objectives:

1°) First, effect of the strains of *L. pneumophila* on the growth of different amoebae in cocultures. At each time point (see figures), tubes were placed on ice for 6 min to detach cells from the walls (that method was preferred to the use of cell scraper, because it did not induce mechanical stress) and the cultured micro-organisms were re-suspended by vortexing. The number of amoebae was determined by counting re-suspended cells per unit volume with a hemacytometer. Control values of amoebae grown without bacteria were obtained in the same manner.

2°) Simultaneously, the growth of *L. pneumophila* in coculture with the different amoebic genera was determined from the same tubes by the number of total *L. pneumophila* (intra- and extracellular), expressed in CFU/ml, after serial 10 fold dilutions of the coculture medium with sterile H₂O that were spread in triplicate on BCYE plates and incubated at 37°C for at least 6 days.

Data were analyzed by means of Student's t-test and are means \pm sem of up to 8 independent experiments (see details in figure legends).

Cytotoxicity of L. pneumophila

Firstly, the cytotoxicity of *L. pneumophila* strains towards this panel of amoebae was studied qualitatively by phase-contrast microscopy. The effects on amoebal monolayer formation in 24-well plates containing 5×10^4 amoebae/well infected with the bacterium at an MOI of 50 were recorded after 3 and 7 days.

Bacterial cytotoxicity for *Acanthamoeba* and *Willaertia* species was also checked by a trypan blue exclusion test. At 48 and 72 hr of infection (MOI 50), following resuspension after agitation, amoebae were pelleted by low-speed centrifugation and re-suspended in 200

µl of a trypan blue-SCGYEM medium (4:1 v/v) mix. Cell death was determined as the percentage of trypan blue positive cells. Due the high cytotoxicity of *L. pneumophila* 72 hr after infection this assay could not be performed with *H. vermiformis*. Trypan blue exclusion tests were also performed on control cultures of amoebae without bacteria. Statistical differences were addressed using Student's t-test.

Transmission electron microscopy

Axenic cultures of *H. vermiformis*, *A. castellanii* and *W. magna* c2c Maky were infected for 36 hr with *L. pneumophila* Paris at a MOI of 50 and 100. After decantation of the medium, amoebae were fixed (at room temperature) with 2% glutaraldehyde, successively in serum-free SCGYEM medium (20 min) and then in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.4; 30 min). The cells were washed and post-fixed for 40 min with 1% OsO₄ in 0.15 M sodium cacodylate buffer. After dehydration in ethanol solutions (50°, 70°, 90°, 95°, 2 x 100°), amoebae were embedded in EPON resin. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate followed by lead citrate and examined using a JEOL 1200 CX electron microscope at 80 kV. A minimum of more than 100 cells was observed and the percentage of amoebae displaying a replicative phagosome (i.e vacuoles filled with several bacteria) determined. Electron microscopy was also performed on the two strains of *W. magna* infected with *L. pneumophila* Lens and Philadelphia in order to compare their morphology with *W. magna* c2c Maky infected with *L. pneumophila* Paris.

RESULTS

We first screened the impact on the growth of the different free-living amoebae that the strain *L. pneumophila* Paris had when cocultured at an MOI of 50 for up to 4 days (Fig. 1A). Cocultures with *L. pneumophila* resulted in a strong reduction in the growth of *H. vermiformis* (~ 82 and ~ 88 % decrease at day 3 and day 4 respectively) and of *A.*

castellanii (~ 93 and ~ 95 % at day 3 and day 4 respectively) when compared to controls. On the other hand, the growth of both strains of *W. magna* was unaffected by *L. pneumophila* Paris since no significant difference was observed in the number of amoebae grown with or without this bacterium.

With regard to the cytotoxicity of *L. pneumophila* for different amoebae, phase-contrast microscopy revealed that a disruption of monolayer formation was induced in *A. castellanii* and *H. vermiformis* after 72 hr of bacterial infection, while *W. magna* c2c was unaffected (Fig. 1B) whatever the strain of *L. pneumophila* used in these experiments. Moreover, 28.4 ± 3.6 %, 11.01 ± 1.1 % and 10.9 ± 2.6 % of the few remaining *A. castellanii* on day 3 of coculture with respectively *L. pneumophila* Paris, Lens and Philadelphia were trypan blue positive; for *W. magna* c2c it was only 3.8 ± 0.4 %, 2.9 ± 0.9 % and 3.2 ± 0.7 % respectively. In control cultures of amoebae, devoid of bacteria, the percentage of trypan blue positive cells was <1 %. Similar to what was observed with c2c, the monolayer formation of Z503 was not affected by *L. pneumophila* Paris. With *L. pneumophila* Lens and Philadelphia, Z503 monolayers started to shrink with the presence of numerous floating rounded cells. The percentage of Z503 trypan blue positive cells was ~ 3 times higher than what was observed with the c2c strain. These observations indicated that the *W. magna* c2c strain is less sensitive to bacteria than the Z503 strain. This difference between the two *W. magna* is even more obvious when amoebas are cultured up to 7 days with the *L. pneumophila* strains. Effectively, Fig. 1C demonstrates a disruption of *W. magna* Z503 monolayer at the opposite of the c2c that remain unaffected whatever the used *L. pneumophila* strain.

From these preliminary results, we focused our attention on the combination of *L. pneumophila* Paris and *W. magna*. We compared the growth kinetics of this bacterium in coculture with *W. magna* c2c and Z503, with that displayed in the presence of *A. castellanii*

and *H. vermiformis*. As expected, the bacterium grew in *H. vermiformis* and *A. castellanii* with a respective increase of 1.3 and 1.5 log in CFU/ml after 3 days of infection (Fig. 2A). Unlike with these two permissive amoebae, bacterial growth, being reduced markedly during the same period, was not favoured in coculture with *W. magna* (c2c Maky and Z503). A significant (~ 2.3 - 2.6 log) difference in bacterial yield was recorded at days 2-3 post-infection between the *Hartmannella-Acanthamoeba* species and the *W. magna* c2c (Fig. 2A). In contrast, when we examined the ability of the *L. pneumophila* strains Lens and Philadelphia to grow at day 3 and 4 in the presence of *H. vermiformis* and *W. magna*, the bacteria grew up to 4 days in all cases (Fig. 2B), although at different extent (a difference of ~ 2 log CFU/ml was observed after 3 days of *L. pneumophila* Philadelphia cocultured with *W. magna* c2c and other amoeba^a).

We determined next whether the defective growth of *L. pneumophila* Paris in the presence of *W. magna* c2c could be due to a fault in intracellular replication. Ultrastructural examination showed that the number of *Acanthamoeba* and *Hartmannella* displaying replicative phagosomes at 36 hr post infection was very high, i.e., 36 % to 51% according to the MOI (Table 1). In contrast, replicative phagosomes were not detected in *Willaertia* c2c amoebae infected at a MOI of 50. When cocultures of *W. magna* c2c were infected at a higher ratio (MOI of 100), few amoebae displayed a replicative phagosome (1.5% i.e 2/133 amoebae) - a very low level compared to *Acanthamoeba* and *Hartmannella* (Table 1), although some rare bacteria were sometimes observed as demonstrated in figure 3B. We also found that *W. magna* Z503 strain displayed more replicative phagosomes than the c2c strain. 7 % of *W. magna* Z503 cells displayed a replicative phagosome when cocultured

^a This difference in bacterial growth when cocultured with *W. magna* c2c or other amoebas is also strengthened by visual observations of the 24 well plates that were used to study the effect of *L. pneumophila* strains on monolayer formation (Fig. 1B and 1C). In presence of *L. pneumophila* Lens and Philadelphia an intense bacterial proliferation was observed with *W. magna* Z503 (the culture medium was “cloudy” due to the high bacterial density). This phenomenon was never observed when the different bacteria were cocultured with *W. magna* c2c.

with *L. pneumophila* Lens and 13 % with *L. pneumophila* Philadelphia. All the stages of infection could be observed ultrastructurally in *A. castellanii* and *H. vermiformis*. Shortly after infection, *L. pneumophila* Paris appeared in these two species as isolated bacteria in a vacuole-like structure (Fig. 3A) surrounded by rough endoplasmic reticulum (RER) as previously described (Y. Abu Kwaik, 1996). More pronounced invasion led to the formation of distended replicative phagosomes containing numerous bacteria and finally to necrosis of these heavily infected amoebae. Nevertheless, even in such amoebae, the contractile vacuole was still evident (Fig. 3D).

In contrast, out of the few *W. magna* c2c displaying intracellular bacteria (only 1,5% at a MOI of 100), the replicative phagosome was different to those observed in *Acanthamoeba* or *Hartmannella* in lacking a clearly delimiting membrane. Additionally the bacteria inside contained numerous vacuoles usually described as polyhydroxybutyrate granules (Fig. 3E and 3H). In *Acanthamoeba* and *Hartmannella*, the bacteria displayed the characteristic morphology of the typical gram-negative cell envelope composed of a wavy outer membrane around a clear periplasmic space (Fig. 3G), while the *L. pneumophila* observed within the two infested *Willaertia* c2c appeared as short stubby rods with a dense cytoplasm delimited by a thick laminar outer layer (Fig. 3H). Fig. 3C shows a *Willaertia* Z503 with a replicative phagosome filled with *L. pneumophila* Lens. The bacteria are contained within a vacuole-like structure with a clear delimiting membrane and a periplasm (see Fig. 3C and 3I) at the difference of what was observed with the *Willaertia* c2c strain. In *W. magna* Z503, bacterial morphology recapitulated the one observed within the c2c strain, with vacuoles usually described as polyhydroxybutyrate granules (compare Fig. 3F and 3I with Fig. 3E and 3H). Similar observations were performed when *W. magna* Z503 were infected with *L. pneumophila* Philadelphia (not shown).

DISCUSSION

Numerous studies have reported the multiplication of *L. pneumophila* within various protozoa such as amoebae, ciliates (B. S. Fields, 1996) or cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* (Hagele, 2000) (J. M. Solomon, A. Rupper, J. A. Cardelli, and R. R. Isberg, 2000) which has led to free-living amoebae being considered as natural reservoirs for this pathogen. But out of the five amoebic genera reported by Fields (B. S. Fields, 1996) as able to support the intracellular growth of *L. pneumophila*, only two (*Acanthamoeba* and *Hartmannella*) have been repeatedly tested in coculture with *L. pneumophila* (Y. Abu Kwaik, L. Y. Gao, B. J. Stone, C. Venkataraman, and O. S. Harb, 1998) (M. Molmeret, D.M. Bitar, L. Han and Y.A. Kwaik. , 2004) (M. Molmeret, M. Horn, M. Wagner, M. Santic, and Y. A. Kwaik, 2005). As far as we are aware, this study is the first to consider the interactions between *Willaertia magna* amoebae and *L. pneumophila* systematically.

The main and unexpected finding is that, among the different amoebae tested, *W. magna* is an inefficient vector for the strain *L. pneumophila* Paris when compared to *A. castellanii* and *H. vermiformis*. Indeed, these last two permissive amoebae displayed a 2.3 log greater ability to support bacterial growth than *W. magna* tested exactly under the same conditions. Furthermore the different *L. pneumophila* strains did not display any obvious cytotoxicity towards the *W. magna* c2c. Taken together these results demonstrate that *W. magna* c2c displays a particular resistance against *L. pneumophila* Paris- growth and the different *L. pneumophila* strains-induced cytotoxicity. Interestingly, the results also demonstrate that *W. magna* c2c strain is particularly resistant towards *L. pneumophila* strains-induced cytotoxicity when compared to Z503 belonging to the same genus.

The particular resistance of *W. magna* c2c may be accounted for by factors relating to the bacterium or the amoeba. Until now, in all studies that reported a defect of *L.*

pneumophila growth in coculture with macrophages and/or amoebae, the underlying mechanism results from the use of two main categories of bacterial mutant strains. First, several mutants of the *dot/icm* system are defective in evasion of phagolysosomal fusion and consequently, have lost their capacity of intracellular replication (M. S. a. R. R. I. Swanson, 1996) (L. Y. Gao, O. S. Harb, and Y. Abu Kwaik, 1997) (J. Coers, Kagan, J. C., Matthews, M., Nagai, H., Zuckman, M and C. R. Roy, 2000). In contrast, the *rib* mutants are defective in their cytotoxic effect and are unable to escape from the phagocytic cell despite an active intracellular replication (Alli, 2000). *Willaertia* c2c may reduce *L. pneumophila* Paris growth in coculture either by inhibiting intracellular replication and/or by blocking bacterial-induced lysis. Another explanation to the observed defective replication of *L. pneumophila* Paris in c2c amoebae is that the bacterial strain is specifically lacking in factors that are needed for its growth in this particular host. Differences in the membrane composition of amoebae may also result in a lower efficiency of bacterial internalization within *W. magna* c2c. Although none of these hypotheses may be presently excluded, our ultrastructural observations, especially the scarcity of replicative phagosomes in *W. magna* c2c compared to the situation with *Acanthamoeba* and *Hartmannella*., favour defective replication of *L. pneumophila* Paris in *W. magna*. To test if the fusion of phagosome with lysosomes is not inhibited by *L. pneumophila* within *Willaertia* c2c amoebae, colocalisation studies of *L. pneumophila*, with late endosomal and lysosomal markers such as acid phosphatase or LAMP-1 glycoprotein could be performed. Moreover, the expression of replicative phagosomes occurring only for the highest MOI (i.e 100), in very few *W. magna* c2c (2/133), suggests that the cell defence mechanisms of *Willaertia* amoebae may be partially overwhelmed at this bacterial concentration. Interestingly, this replicative phagosome appeared not as clearly delimited as those in other permissive amoebic species (*Hartmannella* and *Acanthamoeba*) and the bacteria observed within recall

the “cyst-like” or mature intracellular form described in HELA cells by Garduno et al. who suggested that it could be metabolically dormant *L. pneumophila* (R. A. Garduno, E. Garduno, M. Hiltz, and P. S. Hoffman, 2002). This bacterial morphology was also observed within the *W. magna* Z503 strain when infected with *L. pneumophila* Lens and Philadelphia. It is thus possible that this particular bacterial morphology may be an adaptation phenotype to some cellular environment such as amoebas of the *Willaertia* genus. All these ultrastructural observations suggest that the replication of *L. pneumophila* Paris cannot occur properly within *W. magna* and may explain why bacterial growth is inhibited in presence of this amoeba.

Overall, our results demonstrate the marked resistance of one strain of *W. magna* towards *L. pneumophila*. They are in agreement with a recent publication (P. Declerck, J. Behets, Y. Delaedt, A. Margineanu, E. Lammertyn, and F. Ollevier, 2005) showing that the amoeba *Naegleria lovaniensis* is clearly less permissive than *A. castellanii* to invasion and replication of *L. pneumophila*. This observation seems perfectly coherent with our own results since *Naegleria* and *Willaertia* are related genera of the family *Vahlkampfiidae* (J. F. De Jonckheere, D. Dive, M. Pussard, and K. Vickerman, 1984) (F. C. Page, 1987) (J. F. De Jonckheere, 1997). Indeed, these genera share several characteristics (eruptive pseudopods, division by promitosis) that clearly differentiate them from *Hartmannella* and *Acanthamoeba*.

In conclusion, our observations show that growth of *L. pneumophila* depends both on bacterial strain itself and on the species of host amoebae. More precisely, our results demonstrate that all free-living amoebae are not equally permissive to *L. pneumophila*, since at least one strain of the bacterium (*L. pneumophila* Paris) was inhibited when cocultured with *W. magna* c2c. Consequently, the distribution and the density of the pathogenic bacterium in the environment may be subject to variations according to the

composition and the evolution of the amoebic population in the biotope with potential implications on the occurrence of outbreaks of Legionnaire's disease. Our results also suggest that *W. magna* may be a useful model to study the mechanisms of host resistance to *L. pneumophila*.

Acknowledgments: This work was supported by a grant from the French "Direction Générale de la Santé". We thank Christine Vernet for her technical assistance.

REFERENCES

- [1] Horwitz, M.A. (1983) The Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes. *J. Exp. Med.* 158, 2108-2126.
- [2] Molmeret, M., D.M. Bitar, L. Han and Y.A. Kwaik. (2004) Cell biology of the intracellular infection by *Legionella pneumophila*. *Microbes and Infection* 6, 129-139.
- [3] Molmeret, M., M. Horn, M. Wagner, M. Santic, and Y. A. Kwaik (2005) Amoebae as training grounds for intracellular bacterial pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 20-28.
- [4] Roy, C.R. (2002) The dot/Icm transporter of *Legionella pneumophila*: a bacterial conductor of vesicle trafficking that orchestrates the establishment of a replicative organelle in eukaryotic hosts. *Int. J. Med. Microbiol.* 291, 463-467.
- [5] Rowbotham, T.J. (1980) Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J. Clin. Pathol.* 33, 1179-1183.
- [6] Barbaree, J.M., B. S. Fields, J. C. Feeley, G. W. Gorman, and W. T. Martin (1986) Isolation of protozoa from water associated with a legionellosis outbreak and demonstration of intracellular multiplication of *Legionella pneumophila*. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 422-424.
- [7] Sanden, G.N., W. E. Morrill, B. S. Fields, R. F. Breiman, and J. M. Barbaree (1992) Incubation of water samples containing amoebae improves detection of legionellae by the culture method. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2001-2004.
- [8] Steinert, M., L. Emody, R. Amann, and J. Hacker (1997) Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2047-2053.
- [9] Fields, B.S. (1996) The molecular ecology of legionellae. *Trends Microbiol.* 4, 286-290.

- [10] Gao, L.Y., and Y. Abu Kwaik (2000) The mechanism of killing and exiting the protozoan host *Acanthamoeba polyphaga* by *Legionella pneumophila*. Environ. Microbiol. 2, 79-90.
- [11] De Jonckheere, J.F. (1977) Use of an axenic medium for differentiation between pathogenic and nonpathogenic *Naegleria fowleri* isolate. Appl. Environ. Microbiol 33, 751-757.
- [12] Abu Kwaik, Y. (1996) The phagosome containing *Legionella pneumophila* within the protozoan *Hartmannella vermiformis* is surrounded by the rough endoplasmic reticulum. Appl. Environ. Microbiol. 62, 2022-2028.
- [13] Hagele, S., R. Kohler, H. Merkert, M. Schleicher, J. Hacker, and M. Steinert (2000) *Dictyostelium discoideum*: a new host model system for intracellular pathogens of the genus *Legionella*. Cell. Microbiol. 2, 165-171.
- [14] Solomon, J.M., A. Rupper, J. A. Cardelli, and R. R. Isberg (2000) Intracellular growth of *Legionella pneumophila* in *Dictyostelium discoideum*, a system for genetic analysis of host-pathogen interactions. Infect. Immun. 68, 2939-2947.
- [15] Abu Kwaik, Y., L. Y. Gao, B. J. Stone, C. Venkataraman, and O. S. Harb (1998) Invasion of Protozoa by *Legionella pneumophila* and its role in bacterial ecology and pathogenesis. Appl. Environ. Microbiol. 64, 3127-3133.
- [16] Swanson, M.S.a.R.R.I. (1996) Identification of *Legionella pneumophila* mutants that have aberrant intracellular fates. Infect. Immun. 64, 2585-2594.
- [17] Gao, L.Y., O. S. Harb, and Y. Abu Kwaik (1997) Utilization of similar mechanisms by *Legionella pneumophila* to parasitize two evolutionarily distant host cells, mammalian macrophages and protozoa. Infect. Immun. 65, 4738-4746.
- [18] Coers, J., Kagan, J. C., Matthews, M., Nagai, H., Zuckman, M and C. R. Roy (2000) Identification of icm protein complexes that play distinct roles in the biogenesis of an

organelle permissive for *Legionella pneumophila* intracellular growth. Mol. Microbiol. 38, 719-736.

[19] Alli, O.A., Gao, L. Y., Pedersen, L. L., Zink, S., Radulic, M., Doric, M and Y. Abu Kwaik (2000) Temporal pore formation-mediated egress from macrophages and alveolar epithelial cells by *Legionella pneumophila*. Infect. Immun. 68, 6431-6440.

[20] Garduno, R.A., E. Garduno, M. Hiltz, and P. S. Hoffman (2002) Intracellular growth of *Legionella pneumophila* gives rise to a differentiated form dissimilar to stationary-phase forms. Infect. Immun. 70, 6273-6283.

[21] Declerck, P., J. Behets, Y. Delaedt, A. Margineanu, E. Lammertyn, and F. Ollevier (2005) Impact of non-*Legionella* bacteria on the uptake and intracellular replication of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* and *Naegleria lovaniensis*. Microb. Ecol. 50, 536-549.

[22] De Jonckheere, J.F., D. Dive, M. Pussard, and K. Vickerman (1984) *Willaertia magna* gen. nov., sp. nov. (*Vahlkampfiidae*), a thermophilic amoeba found in different habitats. Protistologica 20, 5-13.

[23] Page, F.C. (1987) The classification of "naked" amoebae (Phylum Rhizopoda). Arch. Protistenkd. 133, 199-217.

[24] De Jonckheere, J.F. (1997) The phylogenetic position of the amoeboflagellate *Willaertia* deduced from SSUrDNA sequences. Europ. J. Protistol. 33, 72-76.

Table. 1 : Occurrence of replicative phagosomes within amoebae

	<i>Acanthamoeba</i> <i>castellanii</i>	<i>Hartmannella</i> <i>vermiformis</i>	<i>Willaertia</i> <i>magna c2c</i> Maky
MOI = 50	36 %	42%	0 %
MOI = 100	51 %	ND	1,5 %

Amoebae were cocultured for 36 hours with *L. pneumophila* Paris at a MOI of 50 or 100, fixed and processed for electron microscopy. Results are expressed as the percentage of cells displaying a replicative phagosome sampled from more than 100 cells. In *H. vermiformis* phagosome occurrence at a MOI of 100 could not be determined because of too many bacterial-induced lysed cells (ND: not determined).

Fig. 1. Effect of *L. pneumophila* on the growth of different amoebae in coculture

A. Effect of the bacterial infection on the growth of amoebae.

The different amoebae were cultured at 37°C for up to 4 days (d3 and d4 are respectively day 3 and day 4 in culture) either with (grey bars) or without (black bars) *L. pneumophila* Paris at an MOI of 50. White bars represent the number of amoebae on day 0 of experiments. The data are expressed as the number of amoebae/ml of medium and are the mean \pm sem of 4 to 8 independent experiments. Statistical differences (Student's t-test) between the growth of amoebae cultured either with or without bacteria are indicated (*: $P < 0.01$; **: $P < 0.001$).

B and C. Effect of *L. pneumophila* on monolayer formation by amoebae.

Representative phase-contrast images of the different amoebae cultured in 24-well plates either with or without the strains of *L. pneumophila* at a MOI of 50 for 3 days (**B**) or 7 days (**C**). Note the destruction of monolayers of *Hartmannella* and *Acanthamoeba* cultured in the presence of the bacteria when compared to controls and also the relative resistance of *W. magna* (strain c2c). Also note the destruction of monolayers of *W. magna* Z503 cultured in the presence of the bacteria for 7 days when compared to controls and the c2c strain.

Fig. 2. Growth of *L. pneumophila* in coculture with the different amoebae.

A: Kinetic growth of *L. pneumophila* Paris cocultured at 37°C for up to 4 days in the presence of different amoebae at a MOI of 50. The data are the average \pm sem of 4 [*W. magna* Z503 (closed circles)], 6 [*H. vermiformis* (closed squares)] or 8 independent experiments [*W. magna* c2c Maky (closed triangles) and *A. castellanii* (open circles)] performed in triplicate. Statistical differences (Student's t-test) in the growth of bacteria co-

cultured either with *W. magna* strain c2c Maky or *A. castellanii* at day 1 (*: P<0.05) and between *W. magna* c2c Maky and other two amoebic species between day 2 to day 4 (**: P<0.001) are indicated. Statistical differences in the growth of bacteria between *W. magna* strain Z503 and *A. castellanii* or *H. vermiformis* are indicated (#: P<0.05 ##: P<0.001).

B: Growth of *L. pneumophila* Lens and Philadelphia cocultured at a MOI of 50 with *H. vermiformis* and *W. magna* species. Cocultures were performed for up to 4 days and bacterial growth was determined as described in methods (white bars represent the number of *L. pneumophila* on day 0 of experiments, black and grey bars are respectively day 3 and day 4 of coculture). The data are the average \pm sem of 4-7 independent experiments performed in triplicate.

Fig. 3. Ultrastructure of *A. castellanii* and *W. magna* infected by *L. pneumophila* after 36 hr in coculture.

Panels A, D and G show different stages of *A. castellanii* infection by the *L. pneumophila* Paris. The micrographs B, E and H show the few cells (see Table 1 for details) of *W. magna* c2c that were found to be infected by *L. pneumophila* Paris. Panels C, F and I show typical *W. magna* Z503 infected by *L. pneumophila* Lens. **Panel A** : first stage of *A. castellanii* infection: the bacteria are contained in phagosomes surrounded by rough endoplasmic reticulum (**rer**). **Panel B** : single *L. pneumophila* not surrounded by rer in *W. magna* c2c. **Panel C** : *W. magna* Z503 displaying a clearly delimited replicative phagosome with large periplasm filled with *L. pneumophila* Lens. **Panel D** : massively infected pre-lytic *A. castellanii* displaying a contractile vacuole (**CV**). **N**: nucleus. **Panel E** shows one of the two *W. magna* (2/133 cells observed) displaying a replicative phagosome. **Panel F**: massively infected pre-lytic *W. magna* Z503. **Panels G, H and I** respectively show the different morphological aspects of *L. pneumophila* Paris internalized within *Acanthamoeba* and

Willaertia c2c and of *L. pneumophila* Lens within *Willaertia* Z503. Bacteria are indicated by arrows on panels B, C, F, G, H and I.

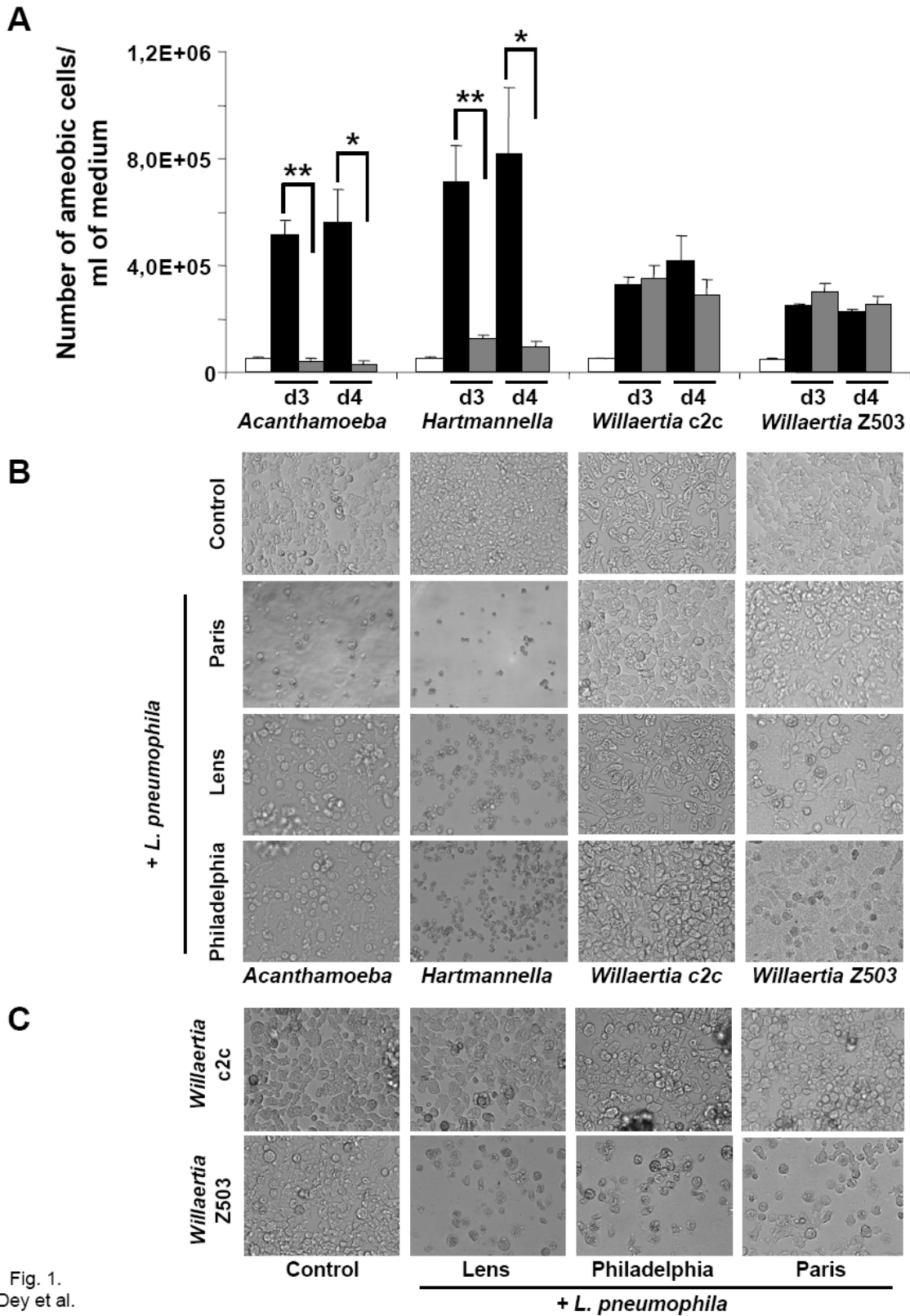


Fig. 1.
Dey et al.

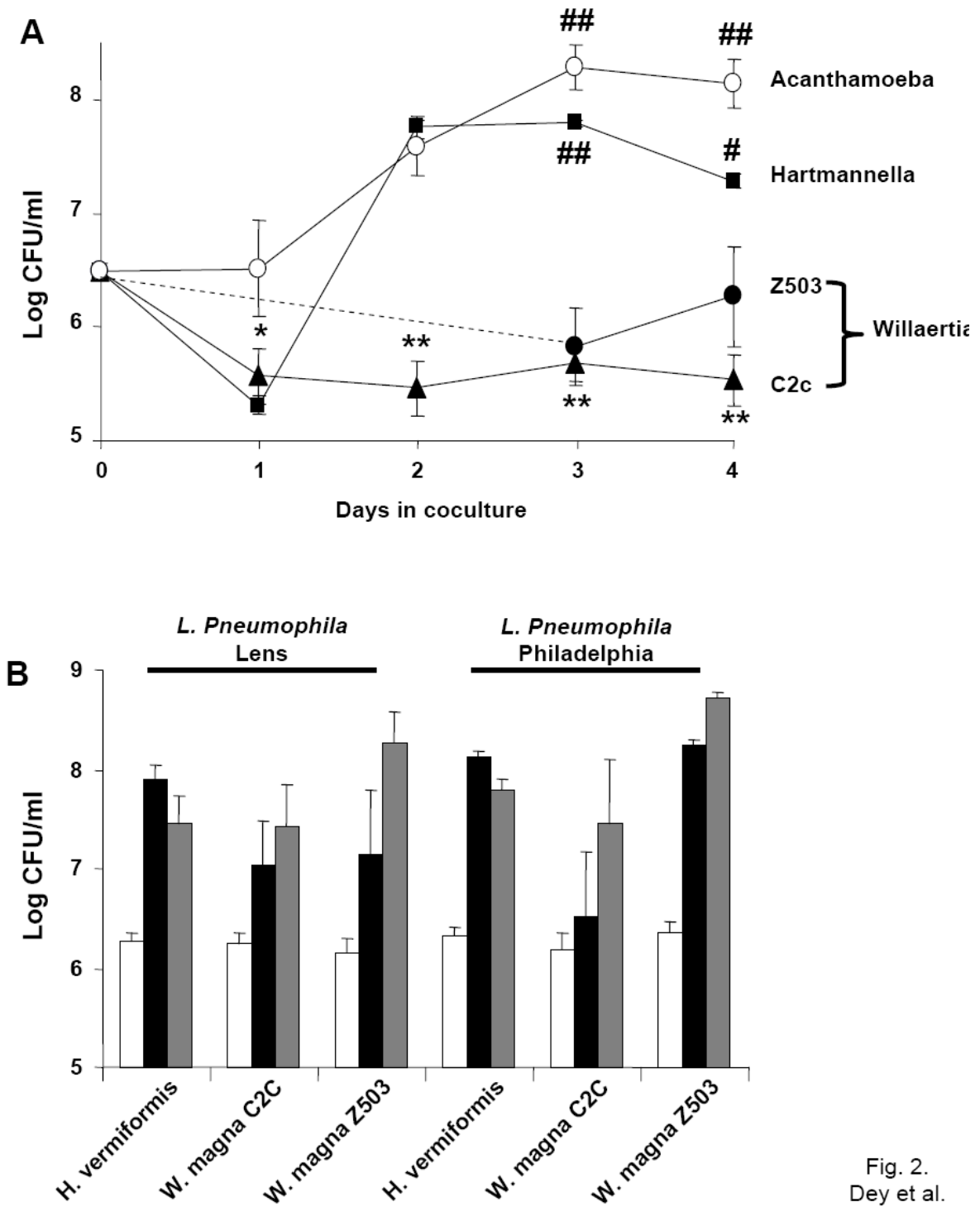


Fig. 2.
Dey et al.

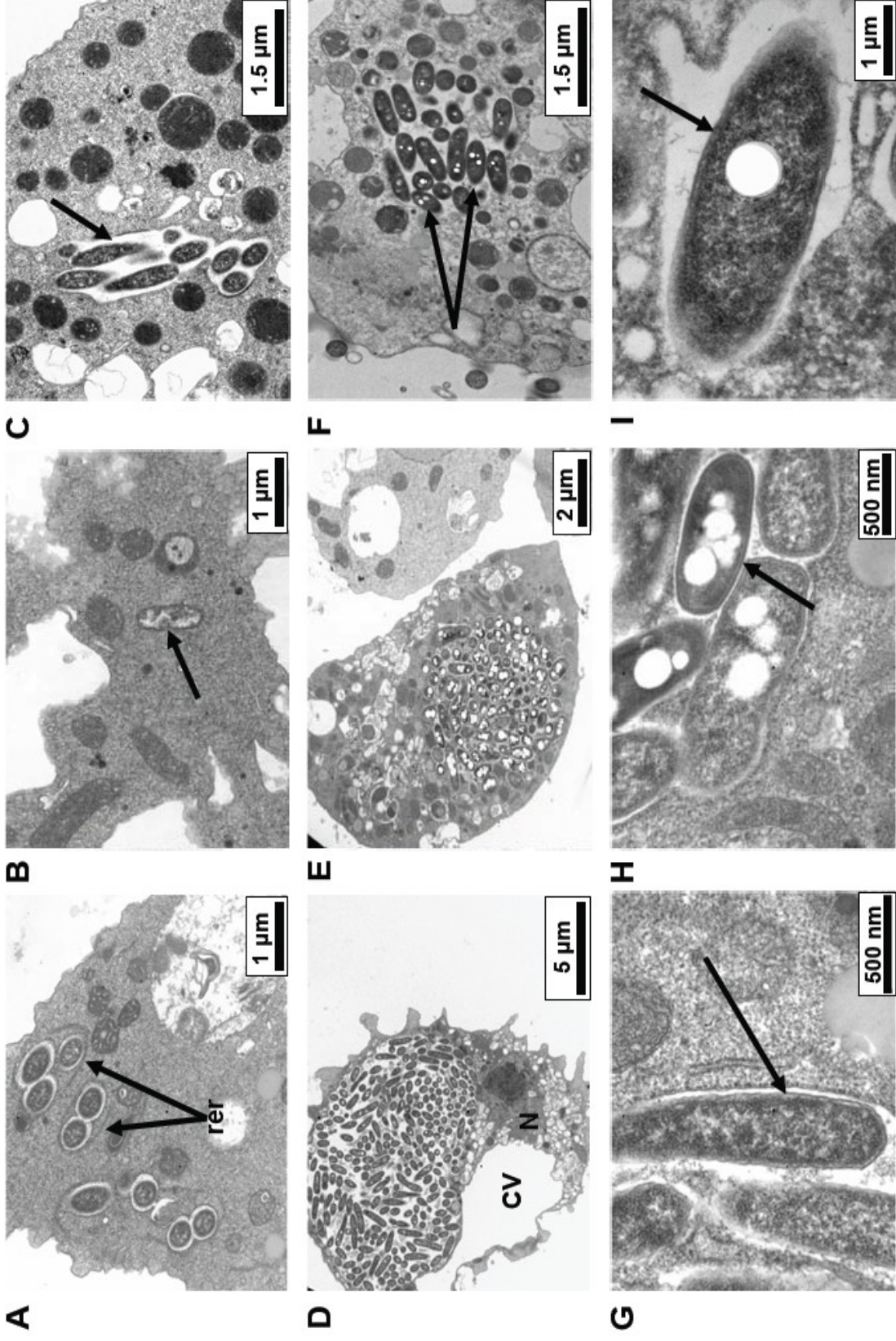


Fig. 3.
Dey et al.

Résultats-papier n°2

Les expériences décrites dans la partie précédente démontrent que toutes les amibes libres ne montrent pas la même capacité à servir de cellule hôte à *L. pneumophila*. Au cours d'expériences préliminaires nous avons pu observer sous microscope que l'amibe *W. magna* C2c possède la capacité de phagocyter des amibes appartenant à l'espèce *H. vermiformis*. Cette observation est particulièrement originale car la littérature récente sur les protozoaires ne mentionne aucunement un tel phénomène. S'il est bien établi que les amibes libres possèdent la capacité de phagocyter des champignons et des bactéries^{23, 147}, la phagocytose inter-amibienne n'a pas été caractérisée. Pourtant un tel phénomène de prédation entre amibes devrait avoir un impact important sur la prolifération de *L. pneumophila* dans l'environnement étant donné que toutes les amibes libres ne possèdent pas la même capacité à favoriser la croissance bactérienne, et que cette dernière dépend dont en partie de la composition amibienne d'un biotope donné.

Sur la base des observations préliminaires nous avons donc étudié de façon systématique le phénomène de la phagocytose interamibienne et son impact éventuel sur la prolifération des légionelles. Dans ce but nous avons :

a) déterminé la croissance de *H. vermiformis* en coculture soit avec *W. magna* C2c soit avec *A. castellanii*.

b) déterminé l'effet d'une préinfestation de *H. vermiformis* par *L. pneumophila* Paris sur la phagocytose de cette amibe par *W. magna* C2c ou par *A. castellanii* et l'impact de cette phagocytose sur la croissance bactérienne. Le choix de la souche *L. pneumophila* Paris a été dicté par le fait que nous avons observé une croissance différente de cette souche en présence de *W. magna* C2c ou *A. castellanii*.

Les résultats obtenus lors de ces expériences sont exposés dans l'article n° 2 et démontrent :

- ➡ L'existence d'une phagocytose des amibes *H. vermiformis* par les amibes du genre *W. magna* et *A. castellanii*.
- ➡ Que ce phénomène de phagocytose est conservé lorsque l'amibe prédatée est préinfestée par *L. pneumophila*.
- ➡ Que la croissance de *L. pneumophila* dans le milieu est dépendante de la capacité de l'amibe prédatrice à servir d'hôte à la bactérie pathogène.

Occurrence of phagocytosis between free-living amoebas and effect on *Legionella pneumophila* growth

Rafik Dey^{1,2}, Jacques Bodennec,^{1,2} Mouh Oulhadj Mameri,¹ and Pierre Pernin.^{1,3} *

Running title:

Amoebic interactions and *Legionella pneumophila* replication

⁽¹⁾ Université de Lyon, Lyon, F-69003, France.

⁽²⁾ Université Lyon 1 ; CNRS, UMR5123, laboratoire de Physiologie Intégrative Cellulaire et Moléculaire, Villeurbanne, F-69622, France.

⁽³⁾ Université Lyon 1 ; CNRS, UMR5240 laboratoire de Biologie Cellulaire, ISPB, 8, Avenue Rockefeller, F-69373, France.

• To whom correspondence should be addressed:

Université Lyon 1 ; CNRS, UMR5240 laboratoire de Biologie Cellulaire, ISPB, 8, Avenue Rockefeller, F-69373, France

pierre.pernin@recherche.univ-lyon1.fr

Tel: +(33) 478 777 108

Fax: +(33) 472 431 172

ABSTRACT

Free-living amoebas are known to favour the growth of the pathogenic bacterium

Legionella pneumophila in fresh water environment. However, we previously demonstrated that some free-living amoebas of the *Willaertia magna* species are particularly resistant to the bacterium and differ in their ability to support its growth. It is thus reasonable to believe that *Legionella pneumophila* growth depends on the amoebic composition of environment and on the particular interactions that may occur between the different amoebas. We tested this hypothesis by studying the growths of the bacterium and of a permissive free-living amoeba, *Hartmannella vermiformis*, in coculture either with or without other free-living amoebas (*Acanthamoeba castellanii* and *Willaertia magna*). We demonstrate the occurrence of inter amoebic phagocytosis with *Acanthamoeba castellanii* and *Willaertia magna* being able to ingest *Hartmannella vermiformis* infected or not with *Legionella pneumophila*. We also demonstrate that bacterial growth outcome depends on the ability of the dominant predator free-living amoeba to support it, showing that *Legionella pneumophila* proliferation is controlled, at least in part, by amoebic host interactions.

INTRODUCTION

The free-living amoebas are known to favour the multiplication of *Legionella pneumophila* in environment and colonization of biofilms (15, 16). Most of the free-living amoebas that were tested in coculture with *L. pneumophila* effectively promoted bacterial growth (3, 7). However, we previously demonstrated the different susceptibility of some free living amoebas to the pathogenic bacterium (6), clearly showing particular resistance of some *Willaertia magna* strains when compared to other amoebic species such as *Acanthamoeba castellanii* and *Hartmannella vermiformis*. This study has also demonstrated that the ability of free-living amoebas to sustain bacterial growth depends both on the amoebic and the *L. pneumophila* strains. Hence, *L. pneumophila* strain Paris was able to grow when cocultured with *A. castellanii* and *H. vermiformis*, while its multiplication was inhibited when cocultured with *W. magna* c2c Maky (6).

In environment, microbial composition of water is a complex mixture of different bacteria and diverse free-living amoebas among other protozoa. It is thus reasonable to hypothesize that the growth of *L. pneumophila* in environment is dependent on the presence of different amoebic genera and their putative interactions. It has been shown that amoebas are able to phagocytose not only numerous bacterial species (9, 19) but also fungal species (17) that are suspected to acquire their virulence in their amoebic hosts, like *L. pneumophila* (9, 18). However, it is still unclear if inter-amoebic phagocytosis commonly occurs and if it may have an impact on the growth of bacterial preys. According to our knowledge, only one study done at the beginning of the 20th century has reported the occurrence of phagocytic processes between amoebic species living together inside the protozoan microfauna (13). Since then, this phenomenon did not receive much attention from the scientific community. Moreover, no study has considered the complex and

intricate interactions between different amoebic genera on legionella multiplication outcome. These complex interactions may have two opposite effects on the multiplication of *L. pneumophila* in environment with either its activation or on the contrary its inhibition. We studied putative interactions between two different amoebic hosts of the bacterium in order to determine the impact these interactions might have on the amoebic growth and, at the same time, on the *L. pneumophila* replication. In our experiments we used species of amoebas that were shown to display different sensitivity towards *L. pneumophila* (6). We also used the Paris strain of *L. pneumophila* serogroup 1 because of its particularly high prevalence in legionellosis outbreaks (4), and because of previous observations that demonstrated that the growth of this bacterial strain is dependant on the amoebic strain (6).

MATERIAL AND METHODS

Strains

The *L. pneumophila* used in this study was the Paris strain belonging to the serogroup 1 (CIP 107 629T). Before experiments, the bacteria were cultured at 37°C for 3 to 4 days (in order to be in post-exponential phase (8)) on buffered charcoal yeast extract (BCYE) agar.

Willaertia magna c2c Maky (ATCC PTA-7824), *Hartmannella vermiformis* (Ax.5.2e4b) and *Acanthamoeba castellanii* (By 02.2.4) are three amoebic environmental strains isolated from a French thermal spa by filtration of water, and grown at 30°C on non nutrient agar overlaid with a thin film of *Escherichia coli*. These three strains were established in axenic cultures on Serum Casein Glucose Yeast Extract Medium (SCGYEM) at 37°C with 10% of foetal calf serum (5). Prior to experiments, subcultures of amoebas were performed every 3-4 days to be in exponential growth phase.

Study of the phagocytosis between amoebas

Hartmannella (H) amoebas were mixed at day 0 either with *Willaertia* (W) or *Acanthamoeba* (A) amoebas at H/W or H/A ratios of ~ 15. Owing to obvious morphological differences (size, pseudopods and locomotive form) between these amoebic genera, the phagocytic process could be observed by *in vivo* phase contrast microscopy, and its kinetic could be followed using a haematocytometer in order to count each amoebic population at 24h intervals.

Tripartite cocultures

Tripartite cocultures (cocultures of *H. vermiformis* pre-infected with *L. pneumophila* in presence of *A. castellanii* or *W. magna*) were performed as shown in Fig. 1 and as follows.

Briefly, infection of *H. vermiformis* by *L. pneumophila* was performed 24 h (D-1) prior addition of *A. castellanii* or *W. magna* to the former amoebic species. Culture tubes (FALCON® 3033) containing 3 ml of SCGYEM medium were seeded at D-1 with an initial amoebic concentration of $2 \cdot 10^5$ *Hartmannella*/ml. *L. pneumophila* Paris, suspended in sterile distilled water at approximately 10^9 /ml (i.e. 1 OD unit at 550 nm) was inoculated at a MOI (Multiplicity Of Infection *L. pneumophila*/*Hartmannella*) of 20 (i.e. $4 \cdot 10^6$ bacteria/ml). Immediately after infection, the coculture tubes were centrifuged at low speed (5 min at 1000gav) to favour the interaction between legionella and amoebas. After 15 min, the pellet was resuspended and the tubes were incubated for 24 h in a slanting position at 37°C. At this time (D0), extracellular legionella were eliminated by a gentamycin treatment of the coculture (50 µg/ml) during 1 h at 37°C (8, 14). After centrifugation (10 min at 2500_{gav}) the medium was removed and the *Hartmannella* pellet was washed twice in serum-free SCGYEM medium in order to eliminate traces of gentamycin. Amoebas were resuspended in 3 ml of SCGYEM medium and the concentrations of *H. vermiformis* and *L. pneumophila* determined at day 0 (D0) (see below).

Then, the second amoebic species (*A. castellanii* or *W. magna*) was added to the infected *H. vermiformis* suspension at *Hartmannella/Acanthamoeba* (H/A) or *Hartmannella/Willaertia* (H/W) ratios of 20. Another set of control *Hartmannella* tubes was treated exactly in the same manner, except that it did not receive the second amoebic species after the gentamycin treatment on day 0. The concentrations of the different amoebas and of *L. pneumophila* were determined at 24 h intervals as described thereafter.

Quantitative determination of amoebas and *L. pneumophila*

Tubes (controls and assays) were removed at 24 h intervals (see Fig. 1 for details), placed on ice for 6 min in order to reduce cell adherence and agitated.

The evolution of each amoebic population was determined using a haematocytometer. The quantification of the total *L. pneumophila* was performed in triplicate by plating on BCYE medium 0.1 ml of serial 10-fold dilutions of the coculture medium in sterile H₂O. After four and six days of incubation at 37°C, the number of bacteria (expressed in CFU/ml of coculture medium) was determined.

Data were analyzed by means of Student t-test and are average \pm SEM (see figures for details).

Transmission electron microscopy (TEM)

The tripartite cocultures were performed as mentioned above and examined in TEM, fifteen hours after the addition of the second amoeba. The medium was removed, amoebas were fixed (at room temperature) successively in serum-free SCGYEM medium (20 min) and in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.4; 30 min), both containing 2% glutaraldehyde. The cells were washed and postfixed for 40 min with 1% OsO₄ in 0.15 M sodium cacodylate buffer. After dehydration in ethanol solutions (50°, 70°, 90°, 95° and 2 x 100°), amoebas were embedded in EPON resin. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate, followed by lead citrate, and examined using a JEOL 1200 CX electron microscope at 80 kV.

RESULTS

Preliminary observations showed that some amoebic species display a phagocytic ability towards other amoebic genera. Hence phagocytosis of *H. vermiformis* by *W. magna* or *A. castellanii* amoebas was observed, as shown in Fig. 2. This phenomenon started immediately after mixing of the two species. Fig. 2A and 2B show the early stage of *H. vermiformis* phagocytosis by respectively *W. magna* and *A. castellanii*. Complete ingestions of *Hartmannella* by *W. magna* or *A. castellanii* are clearly shown in Fig. 2 (C to F), and several *H. vermiformis* were often detected within a same *W. magna* or a same *A. castellanii* trophozoïte (Fig. 2C-D and 2F). Moreover, Fig. 2F illustrates different stages of *H. vermiformis* phagocytosis by an *A. castellanii* amoeba displaying a completely engulfed prey and another prey being surrounded by phagocytic pseudopods.

We then determined quantitatively the respective outcome of different amoebic species when cultured together without bacterium as described in methods. When *H. vermiformis* were placed in culture with *A. castellanii* or *W. magna* at a ratio of ~ 15 , the *Hartmannella* population showed a very rapid decrease and fell below 14 % of its initial value in 3 days. Simultaneously, the predatory *Willaertia* and *Acanthamoeba* populations increased respectively by ~ 1 and ~ 1.6 log in 3 days: consequently, the H/W and H/A ratios were totally inverted and shifted from ~ 15 at D0 to below 0.24 at D3 (Table 1).

We next examined the impact of inter-amoebas phagocytosis on the outcome of the preinfected *H. vermiformis* and on the evolution of bacterial growth (see Fig. 1 and methods). The number of infected control *H. vermiformis* declined from D1 to D4 (Fig. 3), due to the bacterial cytolytic effect (6). When placed at D0 in presence of *A. castellanii* or *W. magna*, the number of infected *H. vermiformis* strongly and more rapidly declined when compared to the same infected

H. vermiformis controls ($P < 0.001$; Fig. 3) due to the observed inter-amoebic phagocytosis phenomenon (Fig. 2 and Table 1). Further, 24 h (D1) after the addition of *A. castellanii* or *W. magna* to the *L. pneumophila*-infected *H. vermiformis*, a respective $\sim 82\%$ and $\sim 86\%$ decrease in *H. vermiformis* number was observed in the medium. Meanwhile, increases in the number of *A. castellanii* and, at a lesser extent ($P < 0.05$ at Day 2; $P < 0.01$ at Day 3), of *W. magna* were observed when these amoebas were added at D0 (Fig. 3).

Effectively, the concentrations of *A. castellanii* and *W. magna* were increased respectively by ~ 12.7 and ~ 6.5 times at D3 when compared to D0. Correlatively, the H/A and H/W ratios were completely inverted, shifting in 48 h from ~ 20 to below ~ 0.35 .

We also determined the growth of *L. pneumophila* after pre-infection of *H. vermiformis* alone or after pre-infection of *H. vermiformis* in presence of *A. castellanii* or *W. magna* (Fig. 4). *L. pneumophila* displayed an increase of ~ 3 log in 48 h when cocultured in presence of *H. vermiformis* alone. Similarly, a ~ 2.6 log increase in bacterial concentration was observed from D0 to D4 when pre-infected *H. vermiformis* was grown together with *A. castellanii*. However, *L. pneumophila* growth was statistically ($P < 0.05$ at Day 1 and $P < 0.01$ at Day 2) delayed when the infected *H. vermiformis* was cultured in association with *A. castellanii* comparatively to its growth in presence of *H. vermiformis* alone (a delay of 24 h was necessary to reach the same ~ 7.3 log UFC/ml when *L. pneumophila* was cultured with *H. vermiformis* / *A. castellanii* and when compared to *H. vermiformis* alone; – Fig. 4). At the opposite, when infected *H. vermiformis* was cultured in presence of *W. magna*, the *L. pneumophila* growth was strongly decreased with a ~ 2 log inhibition at D2 compared to its growth in presence of infected *H. vermiformis* alone ($P < 0.001$).

DISCUSSION

The main observation of this study is the existence of phagocytosis events between different amoebas and their impacts on *L. pneumophila* growth. Except for one study dating from the beginning of the last century, this is the first work showing inter-amoebic phagocytosis. In addition our work demonstrates an impact of this inter-amoebic phagocytosis on *L. pneumophila* replication. Lapage showed in 1922 the occurrence of inter-amoebic phagocytosis, with *Amoeba vespertilio* being able to ingest other amoebic species, although the identity of latter species was not clearly established (13). More recently, Kusch demonstrated that *Amoeba proteus* is able to develop a predation strategy towards some other protozoa such as ciliate of the *Euplotes* genus (12). Our observations highlight a phenomenon that may be more widespread than suspected in an environment where known amoebic vectors of *L. pneumophila* may interact. The phagocytosis of *H. vermiformis* by *A. castellanii* or *W. magna* is clearly illustrated in Fig. 2. This phagocytosis resulted in an almost disappearance of *H. vermiformis* from the culture medium in ~ 24 h (Fig. 3 and Table 1). *H. vermiformis* is a known vector of *L. pneumophila* and it has been shown to favour bacterial growth (1-3, 10, 11), including the growth of *L. pneumophila* Paris strain that we used in the present experiments (6). When *H. vermiformis* were cocultured with *L. pneumophila*, amoebic number strongly decreased after 2 days, due to the previously reported cytotoxic effect of the bacteria towards the amoebic host (6, 8). The clearance of infected *H. vermiformis* from the culture medium in tripartite cocultures is more rapid than the clearance of the infected *H. vermiformis* grown alone. Indeed, the phagocytosis exerted by the second amoebic species effectively prevailed compared to the necrosis of pre-infected *H. vermiformis*. We then studied the impact of phagocytosis of *H. vermiformis* by *A. castellanii* or *W. magna* on the pathogenic bacterium proliferation. This effect is clearly demonstrated in our tripartite coculture experiments

since the outcome of bacterial proliferation 221 is highly dependant on the amoebic species present in culture medium (Fig. 4).

In our experimental tripartite conditions, legionella transmission from *H. vermiformis* to the second amoeba may have occurred through two simultaneous processes:

- First, by a “direct” transmission of Legionella through the active phagocytosis of the pre-infected *H. vermiformis* by the second amoebic cell as observed in Fig. 2. This possibility may occur since extracellular *L. pneumophila* were removed at D0 by the gentamycin treatment (Fig. 1) and since TEM observations (Fig. 2E) demonstrated that *W. magna* is able to engulf pre-infected *H. vermiformis* displaying replicative phagosomes filled with *L. pneumophila*. However, we do not know if the bacteria within the replicative phagosomes of phagocytized *H. vermiformis* are able to subsequently infect the second amoebic host.
- Secondly, via an “indirect” transmission of free bacteria released consecutively to the necrotic lysis of infected *H. vermiformis* cells before they are phagocytized. We effectively reported previously a cytolytic effect of *L. pneumophila* Paris towards *H. vermiformis* (6) consistent with other reported observations (8). It is reasonable to hypothesize that this possibility mainly occur during the first 24 h of the tripartite cocultures since most of *H. vermiformis* disappeared from the culture medium after that time (Fig. 3).

Therefore, on account of these two simultaneous possibilities, an amplification or, at least a maintenance, of legionella replication should be expected as we effectively observed for the couple *Hartmannella-Acanthamoeba* (Fig. 4). But, surprisingly, we observed that introduction of the strain c2c Maky of *W. magna* in the cocultures and the consecutive phagocytosis of pre-infected *H. vermiformis*, stopped the multiplication of the bacteria when compared to the control

cocultures of *H. vermiformis* (Fig. 4). This inhibition of *L. pneumophila* growth from D1 matches up with the spectacular disappearance of *H. vermiformis* population during the first 24 h in the nested cocultures. A slight increase in *L. pneumophila* concentrations was observed during the first 24 h following the addition of *W. magna* to the infected *H. vermiformis*. Similar observations were not performed when *W. magna* were cocultured alone with *L. pneumophila* Paris (6). That difference may be due to the fact that during the first 24 h the residual concentrations of *H. vermiformis*, although its rapid phagocytosis by *W. magna*, remains high enough to maintain *L. pneumophila* replication. This result obtained in the conditions of the tripartite nested cocultures confirms a suppressive effect of the *W. magna* strain c2c Maky against the replication of *L. pneumophila* Paris as previously reported in mono-amoebic cocultures (6).

Nested tripartite cocultures involving successively two distinct amoebas show that all genera of free-living amoebas do not have the same susceptibility to infection by *L. pneumophila*. These results confirm our previous data (6) and demonstrate that some strains of *W. magna* display the ability to reduce *L. pneumophila* replication. Owing to the phagocytosis exerted against one of the main hosts of *L. pneumophila*, these amoebas could be tested in a perspective of biological struggle to reduce the degree of contamination of aquatic medium by *L. pneumophila*. Globally, these results shed some lights on the interactions between different taxa of amoebic microfauna that, within a trophic chain, may impact the density and the distribution of the pathogenic bacteria in aquatic environment.

Acknowledgments: We thank Simone Peyrol for technical assistance in Electron Microscopy experiments. We thank “Direction Générale de la Santé” for supporting this work.

BIBLIOGRAPHY

1. **Abu Kwaik, Y.** 1996. The phagosome containing *Legionella pneumophila* within the protozoan *Hartmannella vermiformis* is surrounded by the rough endoplasmic reticulum. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:2022-2028.
2. **Abu Kwaik, Y., B. S. Fields, and N. C. Engleberg.** 1994. Protein expression by the protozoan *Hartmannella vermiformis* upon contact with its bacterial parasite *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* **62**:1860-1866.
3. **Abu Kwaik, Y., L. Y. Gao, B. J. Stone, C. Venkataraman, and O. S. Harb.** 1998. Invasion of Protozoa by *Legionella pneumophila* and its role in bacterial ecology and pathogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:3127-3133.
4. **Cazalet, C., S. Jarraud, Y. Ghavi-Helm, F. Kunst, P. Glaser, J. Etienne, and C. Buchrieser.** 2008. Multigenome analysis identifies a worldwide distributed epidemic *Legionella pneumophila* clone that emerged within a highly diverse species. *Genome Res.* **18**:431-441.
5. **De Jonckheere, J. F.** 1977. Use of an axenic medium for differentiation between pathogenic and nonpathogenic *Naegleria fowleri* isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**:751-757.
6. **Dey, R., J. Bodennec, M. O. Mameri, and P. Pernin.** 2008. Free-living freshwater amoebae differ in their susceptibility to the pathogenic bacterium *Legionella pneumophila*. *FEMS Microbiol. Lett.*
7. **Fields, B. S.** 1996. The molecular ecology of legionellae. *Trends Microbiol.* **4**:286-289.

8. **Gao, L. Y., and Y. Abu Kwaik.** 2000. The mechanism of killing and exiting the protozoan host *Acanthamoeba polyphaga* by *Legionella pneumophila*. Environ. Microbiol. **2**:79-90.
9. **Greub, G., and D. Raoult.** 2004. Microorganisms resistant to free-living amoebae. Clin. Microbiol. Rev. **17**:413-433.
10. **Harb, O. S., C. Venkataraman, B. J. Haack, L. Y. Gao, and Y. A. Kwaik.** 1998. Heterogeneity in the attachment and uptake mechanisms of the Legionnaires' disease bacterium, *Legionella pneumophila*, by protozoan hosts. Appl. Environ. Microbiol. **64**:126-132.
11. **King, C. H., B. S. Fields, E. B. J. Shotts, and E. H. White.** 1991. Effects of cytochalasin D and methylamine on intracellular growth of *Legionella pneumophila* in amoebae and human monocyte-like cells. Infect. Immun. **59**:758-763.
12. **Kusch, J.** 1993. Behavioural and morphological changes in ciliates induced by predator *Amoeba proteus*. Oecologia **96**:354-359.
13. **Lapage, G.** 1922. Memoirs: cannibalism in *Amoeba vespertilio* (Penard). Q. J. Microsc. Sci. **264**:669-710.
14. **Moffat, J. F., and L. S. Tompkins.** 1992. A quantitative model of intracellular growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii*. Infect. Immun. **60**:296-301.
15. **Molmeret, M., D.M. Bitar, L. Han and Y.A. Kwaik.** . 2004. Cell biology of the intracellular infection by *Legionella pneumophila*. Microbes and Infection **6**:129-139.
16. **Molmeret, M., M. Horn, M. Wagner, M. Santic, and Y. A. Kwaik.** 2005. Amoebae as training grounds for intracellular bacterial pathogens. Appl. Environ. Microbiol. **71**:20-28.

17. **Steenbergen, J. N., J. D. Nosanchuk, S. D. Malliaris, and A. Casadevall.** 2004. Interaction of *Blastomyces dermatitidis*, *Sporothrix schenckii*, and *Histoplasma capsulatum* with *Acanthamoeba castellanii*. *Infect. Immun.* **72**:3478-3488.
18. **Steenbergen, J. N., H. A. Shuman, and A. Casadevall.** 2001. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **98**:15245-15250.
19. **Steinert, M., K. Birkness, E. White, B. Fields, and F. Quinn.** 1998. *Mycobacterium avium* bacilli grow saprozoically in coculture with *Acanthamoeba polyphaga* and survive within cyst walls. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:2256-2261.

Table. 1. Evolution of amoebic populations cultured together without *L. pneumophila*.

	Days in coculture			
	D0	D1	D2	D3
<i>H. vermiformis</i>	4,33E+05 ± 9,17E+03	1,35E+05 ± 8,45E+03	4,28E+04 ± 2,70E+03	1,75E+04 ± 5,00E+02
<i>A. castellanii</i>	2,760E+04 1,47E+03	2,39E+05 2,08E+04	7,01E+05 2,01E+04	1,23E+06 2,94E+04
Ratio <i>H. vermiformis</i> / <i>A. castellanii</i>	15,57 ± 0,54	0,566 ± 0,0810	0,0610±0,0053	0,0047±0,0029
<i>H. vermiformis</i>	3,57E+05 ± Erreur ! Liaison incorrecte.	1,17E+05 ± 2,14E+04	8,72E+04 ± 1,32E+04	4,91E+04 ± 8,01E+03
<i>W. magna</i>	2,48E+04 ± 1,09E+03	1,50E+05 ± 9,96E+03	2,51E+05 ± 3,88E+04	2,02E+05 ± 1,54E+04
Ratio <i>H. vermiformis</i> / <i>W. magna</i>	14,376 ± 0,985	0,775 ± 0,163	0,347 ± 0,095	0,243 ± 0,051

H. vermiformis were mixed in culture at day 0 (D0) with *A. castellanii* or *W. magna* at a ratio of 15. The cell number of each amoebic species was determined after 1, 2 or 3 days (D1, D2 and D3 respectively) in culture using a haematocytometer. The data are expressed as the ratio of *H. vermiformis* number to *A. castellanii* (H/A) or *W. magna* (H/W) number and are mean ± sem of 3 to 6 independent experiments.

FIGURE LEGENDS**Fig. 1. Schematic diagram of tripartite cocultures.**

See text for details.

Fig. 2. Inter-amoebic phagocytosis.

H. vermiformis were cultured in presence of *W. magna* (panels A and C) or *A. castellanii* (panels B and D) at a ratio of 15 as described in methods. *In vivo* phase contrast photomicrographs were taken after 24 h of culture. Panels A and B show early stages of *H. vermiformis* phagocytosis by respectively *W. magna* and *A. castellanii*. Panels C and D illustrate *W. magna* and *A. castellanii* that both engulfed two *H. vermiformis* amoebas. The predatory amoebas are indicated by black arrows and *H. vermiformis* by white tips. Note on panel A two *W. magna* individuals (black arrows) fighting over the same *H. vermiformis* prey (upper white tip). The white scale bars on panels A to D represent 20µm. Panels E and F show Transmission Electron Microscopic observations of tripartite cocultures (see methods for details). Panel E: *L. pneumophila* pre-infected *H. vermiformis* (white tips) phagocytized by *W. magna*. Note the *L. pneumophila* (L. pn – black arrows) inside the *H. vermiformis* (white tip) engulfed by *W. magna*. Panel F: one *H. vermiformis* totally phagocytized (lower white tip) and another one being surrounded by *A. castellanii* phagocytic pseudopods (upper white tip).

Fig. 3. Effects of *W. magna* and *A. castellanii* on the growth of *L. pneumophila* infected-*H. vermiformis* in tripartite cocultures.

H. vermiformis (H) were cocultured for 24 h with *L. pneumophila* at a MOI of 20 prior to gentamycin treatment and addition at day 0 of the second amoebic species [*W. magna* (W) or *A.*

castellanii (A)] at H/W or H/A ratios of ~ 20. From Day 0, the concentrations of amoebic species were determined at 24 h intervals (see text and Fig. 1. for details). Open squares and triangles show the evolution of *L. pneumophila*-infected *H. vermiformis* concentrations in presence of respectively *W. magna* and *A. castellanii*. Control cultures of *L. pneumophila* infected *H. vermiformis* (without addition of *W. magna* or *A. castellanii* at Day 0) are indicated with open circles. The concentrations of *W. magna* and *A. castellanii* in the tripartite cocultures are shown respectively with closed squares and triangles. The data are average \pm SEM of 4 to 12 independent experiments. Statistical differences between the growth of *H. vermiformis* controls or in presence of *W. magna* or *A. castellanii* are indicated (## P<0.001). Statistical differences between the growth of *A. castellanii* and *W. magna* are also indicated (* P<0.05; ** P<0.01).

Fig. 4. *L. pneumophila* growth in tripartite cocultures.

L. pneumophila were cocultured for 24 h with *H. vermiformis* (H) at a MOI of 20 prior to gentamycin treatment and addition at day 0 of the second amoebic species [*W. magna* (W) or *A. castellanii* (A)] at H/W or H/A ratios of ~ 20. From day 0, the concentrations of *L. pneumophila* were determined at 24 h intervals (see text and Fig. 1. for details). Open circles show *L. pneumophila* growth when cocultured with *H. vermiformis* alone (controls). Open triangles and open squares respectively show *L. pneumophila* growths when *A. castellanii* or *W. magna* were added at day 0 after the gentamycin treatment of the bacterium pre-infected *H. vermiformis*. Data are average \pm SEM of 4 to 11 independent experiments performed in triplicate. Statistical differences in the growth of *L. pneumophila* when cocultured with *H. vermiformis* alone (controls) or in presence of *A. castellanii* († P<0.05; †† P<0.01) or *W. magna* (## P<0.001) are

indicated. Statistical differences in the growth of *L. pneumophila* in the tripartite cocultures containing either *A. castellanii* or *W. magna* are shown (* P<0.05; ** P<0.001).

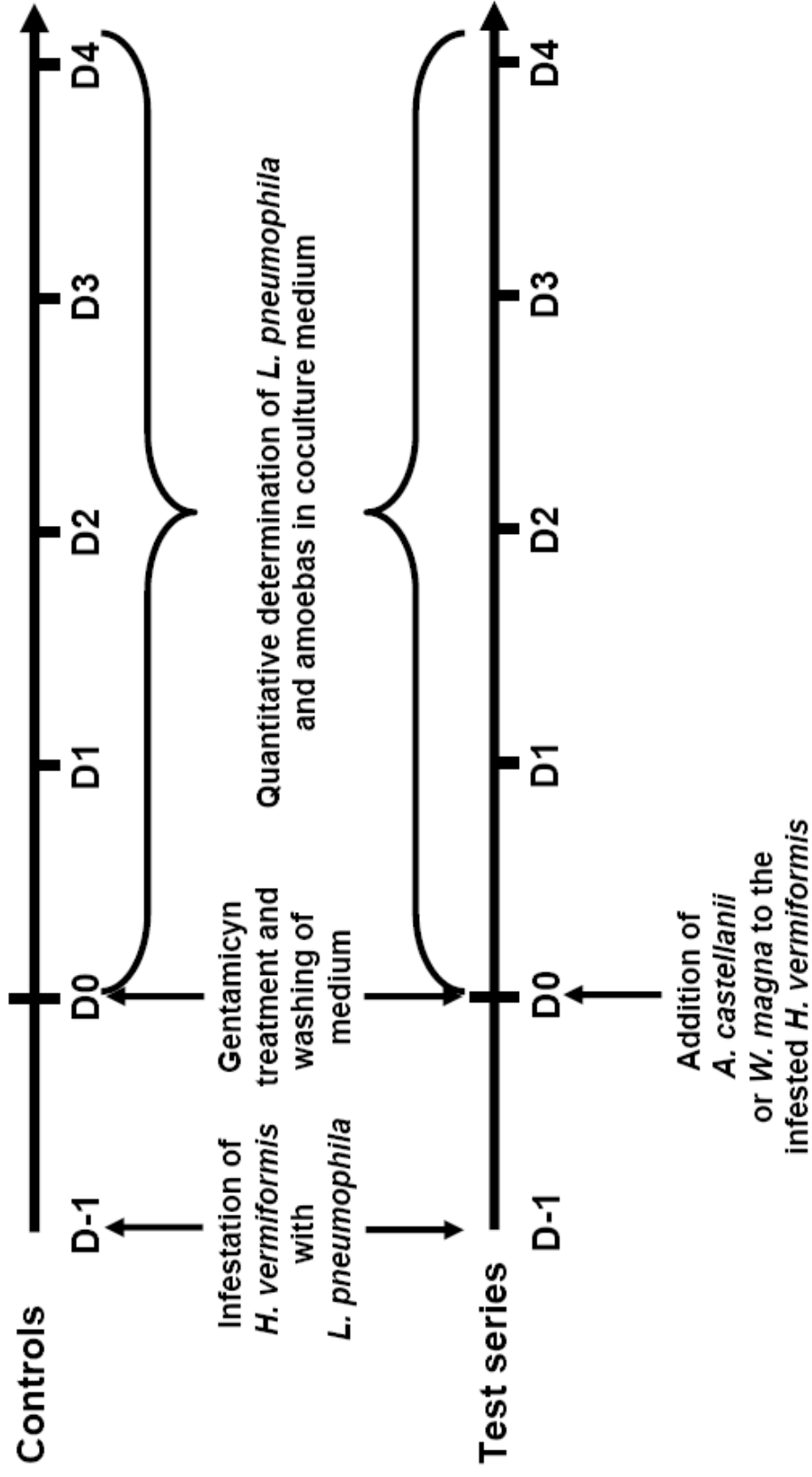


Fig. 1 Dey et al.,

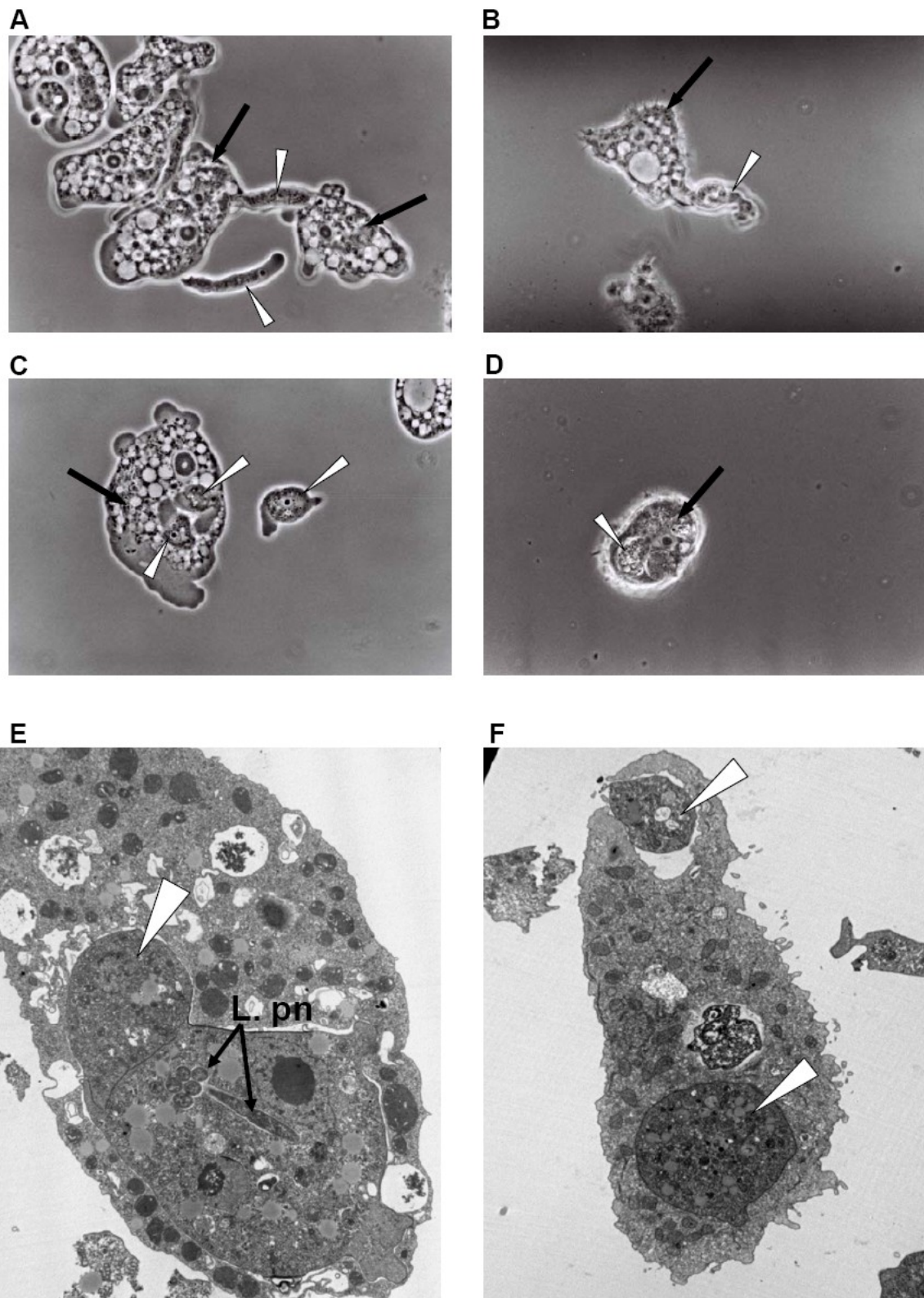


Fig. 2 Dey et al.,

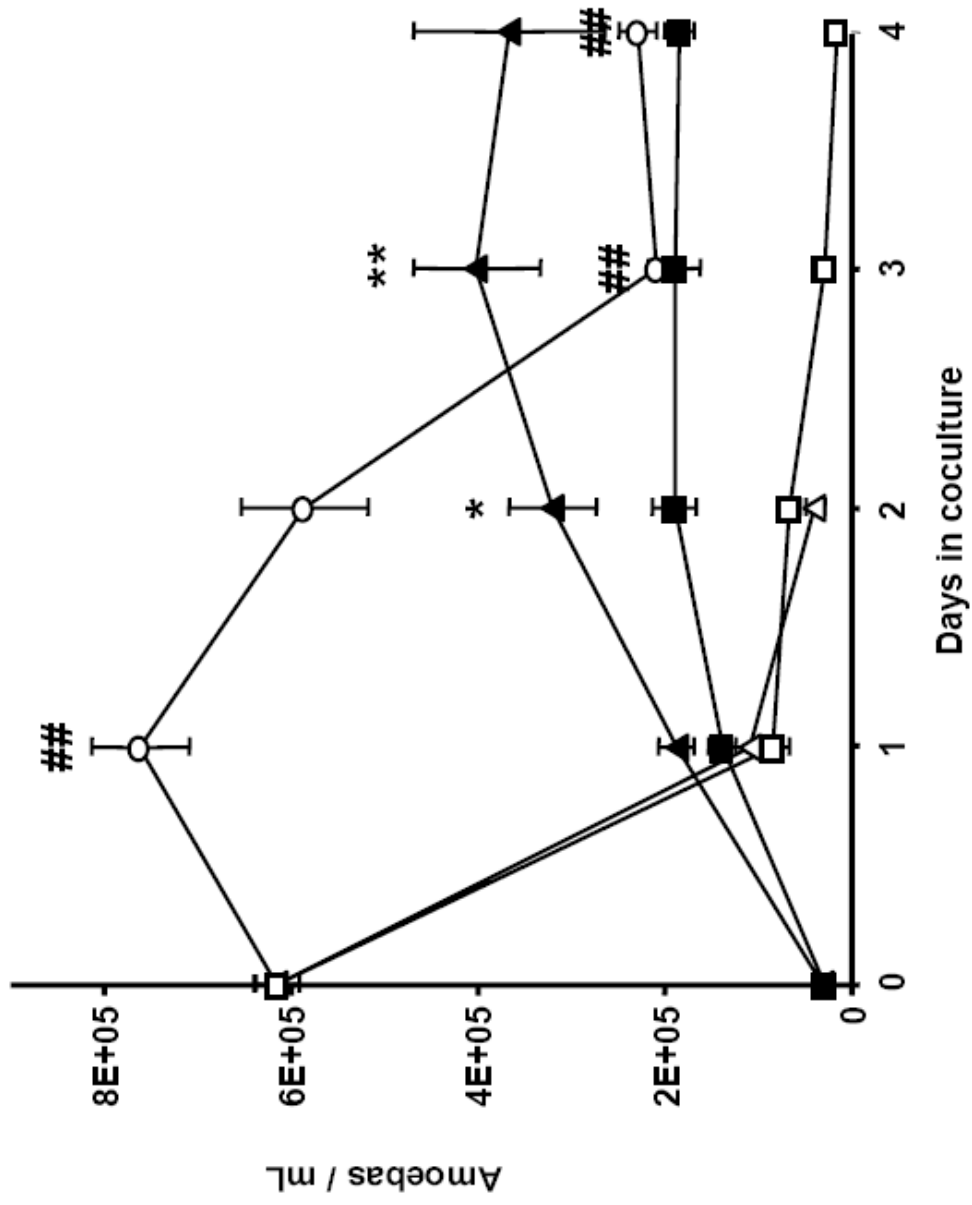


Fig. 3 Dey et al.,

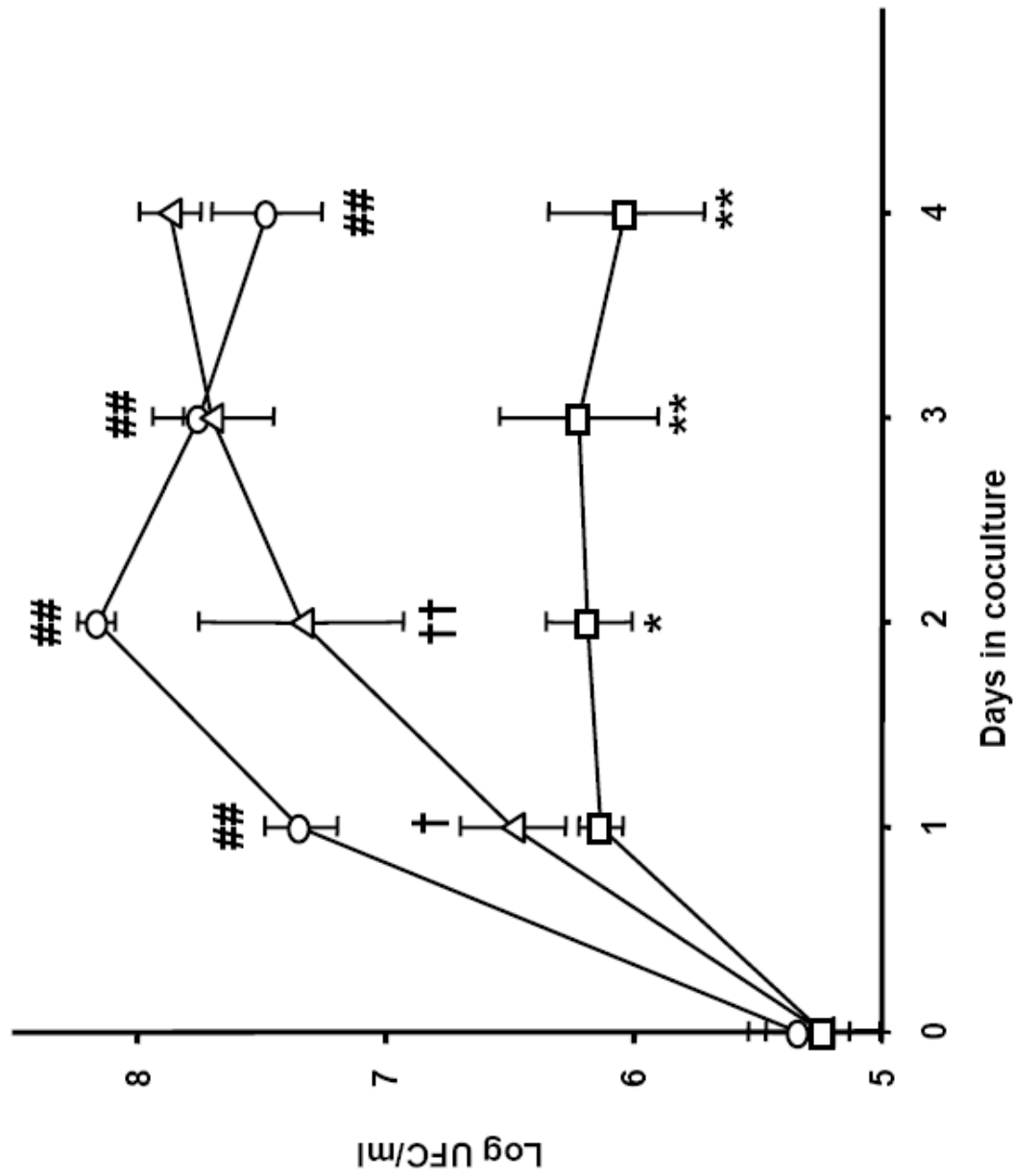


Fig. 4 Dey et al.,

Résultats-papier n°3

Comme mentionné dans la partie VI du contexte scientifique, les phospholipides sont impliqués dans les mécanismes contrôlant la maturation des phagosomes et leur devenir. Les données concernant la composition en lipides de structure des amibes libres étant relativement disparate nous avons voulu déterminer cette composition dans les modèles d'amibes libres utilisées dans nos études. L'*Impetus* pour cette étude est que la composition en phospholipides conditionne certainement en partie la sensibilité d'une amibe à son parasite, et donc la capacité de celui-ci à utiliser sa cellule hôte

Néanmoins, nous avons précédemment démontré que quelques amibes libres du genre *Willaertia magna* sont particulièrement résistantes à la bactérie, et que ce genre présente également un pouvoir phagocytaire vis-à-vis d'autres espèces amibiennes susceptibles d'être elles mêmes infestées par la bactérie (Papier n°1 ; Papier n°2).

Nous rapportons pour la première fois la composition lipidique de la souche *Willaertia magna* C2c (espèce résistante à l'infection par les légionelles) et nous pouvons donc la comparer à celle observé chez les genres *Acanthamoeba* et *Hartmannella* (espèces favorisant la réplication des légionelles).

Nous montrons que :

- ➡ La souche *W.magna* C2c exprime très nettement un glycosphingolipide qui n'est pas exprimé chez les autres espèces.
- ➡ En plus de ce glycosphingolipide neutre, la *W.magna* C2c exprime un autre glycolipide qui migre comme un céramide monohexoside, et qui n'est pas exprimé chez les autres espèces.
- ➡ Des différences importantes existent dans l'expression des phospholipides.
Chez *Willaertia*, la phosphatidylcholine représente ≈ 50 % des phospholipides totaux contre ≈ 30 à 35% pour les autres espèces. La phosphatidyléthanolamine est le phospholipide majoritairement exprimé chez *Acanthamoeba* et *Hartmannella*. Il ne représente plus que ≈ 25 % des phospholipides totaux chez *Willaertia*. En effet, *Willaertia* semble exprimer plus de PC que de PE, alors que chez les autres espèces les quantités respectives de ces phospholipides sont identiques.

- ➡ Nos données indiquent aussi que, la voie de méthylation de la phosphatidyléthanolamine (PE) en phosphatidylcholine (PC) est sans doute très active chez *Willaertia*, ce qui expliquerait pourquoi les niveaux de la PE sont faibles chez cette espèce.
- ➡ Les phospholipides totaux ont une composition en acide gras très différente suivant les espèces considérées. En effet le 18 :1 ω 9 est l'acide gras majoritairement exprimé chez *Hartmanella* et *Acanthamoeba* alors que chez *Willaertia* le 18 :2 ω 6 est majoritaire.
- ➡ Enfin, l'inhibiteur de la méthylation utilisé (3-DAA) exerce un effet suppressif sur la croissance amibienne.

Dans cette étude, nous montrons des différences spécifiques dans la composition lipidique de la souche *Willaertia C2c* comparée aux souches/espèces d'amibes « permissives » à la bactérie. Une découverte qui pourrait expliquer, du moins en partie, les différences observées quant au pouvoir infectieux des légionelles vis à vis des différentes amibes précédemment citées. Une hypothèse qui permet de constituer une base intéressante d'expériences futures qui, au-delà de l'aspect fondamental intrinsèque à ce type d'investigation, pourrait permettre l'émergence de nouvelles stratégies prophylaxique et/ou thérapeutiques visant à contrecarrer le pouvoir infectieux des légionelles.

***Willaertia magna*, a *Legionella pneumophila* resistant free-living amoeba, differs in its phospholipid composition compared to bacterium-permissive amoebic species**

Rafik Dey ¹, Ahmed Athamena^{1,3}, Mouh Oulhadj Mameri¹, Gérard Brichon³, Pierre Pernin ²
and Jacques Bodennec ^{1*}

Running title: Lipids in different free-living amoebas

⁽¹⁾ Université de Lyon, Lyon, F-69003, France ; Université Lyon 1 ; CNRS, UMR5123, laboratoire de Physiologie Intégrative Cellulaire et Moléculaire, Villeurbanne, F-69622 France.

⁽²⁾ Université de Lyon, Lyon, F-69003, France ; Université Lyon 1 ; Laboratoire de Biologie Cellulaire, ISPB, 8, Avenue Rockefeller, F-69373, France.

⁽³⁾ Université de Lyon, Lyon, F-69003, France ; Université Lyon 1 ; Institut Michel Pacha, La Seyne Sur Mer, F83500, France.

*To whom correspondence should be addressed:

jacques.bodennec@adm.univ-lyon1.fr

Tel: +(33) 472 431 171

Fax: +(33) 472 431 172

INTRODUCTION

The free living amoebas are universally widespread in our environment where they are known to interact with the microbiota. Some bacteria use free-living amoebas as host cells and vectors for their proliferation. Hence *Legionella pneumophila*, a gram-negative bacterium responsible of Legionnaire's disease, has been shown to infect and multiply in a variety of amoebic hosts, mainly species belonging to the genera *Acanthamoeba*, *Hartmannella* and *Naegleria* (Declerck, Behets, van Hoef, & Ollevier, 2007). These amoebas contribute to the propagation and distribution of *Legionella pneumophila* in natural and man-made water systems (Abu Kwaik, Gao, Stone, Venkataraman, & Harb, 1998) (Adeleke et al., 1996).

We recently characterized a strain of the free living-amoeba *Williaertia magna* that displays the unique ability to resist the infection by *Legionella pneumophila* inasmuch some strains of the bacterium were unable to proliferate and were unable to kill this amoeba (Dey, Bodennec, Mameri, & Pernin, 2009). The mechanisms underlying this particular resistance are not known but probably lies within the amoebic host since the same *Legionella pneumophila* strains were able to proliferate within other amoebic species.

Structural lipids such as phospholipids are known to play important functions in membrane fusion mechanisms that take place during the phagolysosomal formation that is normally inhibited by internalized *Legionella pneumophila* (Anes et al., 2003; Flieger et al., 2000; Flieger, Rydzewski, Banerji, Broich, & Heuner, 2004; Yeung et al., 2006). The bacterium is known to produce and to release several phospholipases that will degrade phospholipids of the host cells, events that have been shown to play a critical role in the bacterium virulence (Schunder et al., 2010). It has also been shown both in macrophages and amoebas that the phospholipids composition of phagosomes changes rapidly after internalization of *Legionella pneumophila* (Hilbi, 2006; S. S. Weber, Ragaz, & Hilbi, 2009b; Yeung et al., 2009). Hence, phosphatidylserine disappears from the phagosome membrane

shortly after the bacterium engulfment (Yeung et al., 2009). Important changes in the expression of phosphoinositides have also been documented during phagocytosis (Hilbi, 2006; S. S. Weber et al., 2009b). These host phospholipids interact with several bacterial effector proteins such as SidC, SdcA and Lpn E that are involved in replicative phagosome maturation (Murata et al., 2006; S. S. Weber, Ragaz, & Hilbi, 2009a; S. S. Weber, Ragaz, Reus, Nyfeler, & Hilbi, 2006). Glycerophospholipids also play critical functions in the membrane fusion processes that take place during replicative phagosome maturation inasmuch recruitment of host subcellular organelles to the nascent phagosome occur upon bacterium control. In *Tetrahymena thermophila* PE is known to concentrate to the contact sites of membranes that undergo fusion process and it has been shown to covalently bind to some proteins that are regulating phagosome maturation (Ichimura et al., 2000; Kabeya et al., 2004; Ostrowski, Van Bell, Winograd, & Ewing, 2004). Thus phospholipid composition of host cell membranes must determine at least in part the ability of a parasite bacterium to grow within free-living amoeba. It is then possible that host cells displaying resistance to *Legionella pneumophila* may express different structural lipids compared to the cells that are not resistant. We thus determined the composition in structural lipids of different amoebic species.

MATERIAL AND METHODS

Materials

All solvents were of analytical grade and were from SDS (Peypin, France) or Sigma (Saint Quentin Fallavier, France). The standard lipids (ceramide standard type III and type IV, cholesterol, cholesterol monooleine, triolein, dioleine, monooleine, glucosylceramide, lactosylceramids, sphingomyelin, phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine) were from Sigma or Matreya (Pleasant Gap, PA). Silica gel G60 TLC plates (0.25 mm thickness) were from Merck (Darmstadt, Germany) and solid phase extraction aminopropyl columns (LC-NH₂ - 100 mg) were from Supelco (Fallavier Saint Quentin, France).

Cells

Willaertia magna (deposit of this strain was performed at ATCC under the number PTA-7824), *Hartmannella vermiformis* (Ax.5.2e4b) and *Acanthamoeba castellanii* (By 02.2.4) amoebas are environmental strains isolated from a French thermal spa by filtration of water, and grown at 30°C on non nutrient agar (NNA) overlaid with a thin film of *Escherichia coli*. These three strains were established in axenic culture at 37°C in SCGYEM liquid medium containing 10% of foetal calf serum. The cells were grown in culture flasks of 75 cm² containing 50 ml of SCGYEM medium.

Lipid analysis

One day before confluence, the cells were washed three times in PBS pH 7.4 by low speed centrifugations. The lipids were extracted and purified according to Folch's procedure (Folch, Lees, & Sloane Stanley, 1957). Protein levels were determined on aliquots of the homogenate according to Bradford (Bradford, 1976). The purified lipids were stored in benzene – methanol (2:1,v/v) at -30°C until further analysis.

Solid phase extractions

The lipids extracted from amoebas were fractionated on aminopropyl columns as previously described (Bodenec J, et al., 2000). Briefly, lipids from amoebas dissolved in 200µl of chloroform were loaded onto a 100mg aminopropyl LC-NH₂ cartridge preconditioned with 4ml of hexane, and placed onto a vacuum manifold apparatus [12 ports Visiprep (Supelco)]. Neutral lipids (sterol, esters of sterols, methyl fatty acid, triglycerides, and diglycerids) were eluted in a first fraction with 1.4ml hexane - ethyl acetate (85:15, v/v). Ceramides were eluted in a second fraction with 1.6ml chloroform - methanol (23:1, v/v). Free fatty acids were eluted in the same tube as fraction 1 with 1.8 ml diisopropyl ether - acetic acid (98:5, v/v). Neutral glycolipids were eluted (fraction 4) with 2.1 ml acetone - methanol (9:1.35, v/v) and phospholipids in a last fraction using 4 ml methanol. The fractions eluted from the column were dried under N₂ and applied on thin-layer chromatography (TLC) to separate lipids as described thereafter.

Thin Layer Chromatography

Neutral lipids eluted in column fraction 1 were separated along with authentic standards on monodimensional TLC using two successive solvents systems: the first system was hexane – diethyl ether - acetic acid (80:20:1, v/v/v) that was run on the full-length of the plate. After air drying, a second migration in the same direction with ether petrol - diethyl ether - acetic acid (40:60:0,1, v/v/v) was performed until ¼ the length of the TLC plate. The TLC plate air-dried, sprayed with 8% phosphoric acid containing 3% copper acetate and charred at 180°C for 10 min to visualize the lipid spots.

Ceramides eluted in fraction 2 were separated in chloroform– methanol (50:5, v/v) (Bodenec, J., et al., 1997). After development the plate was air dried and charred at 180°C for 10 min.

Lipids eluted in fraction 3 (neutral glycosphingolipids) were spotted on TLC along with authentic standards, separated with chloroform – methanol – deionized water (65:25:4, v/v/v) and revealed using orcinol reagent.

Individual phospholipids were quantified after their two-dimensional TLC separation as follows. An aliquot of total lipids corresponding to 15 µg of phospholipids was spotted on the left hand corner of a 10 × 10 cm TLC plate. The TLC plate was developed in the first direction using tetrahydrofuran – acetone – methanol - deionised water (50:20:40:6, v/v/v/v), air-dried and developed in the second direction with chloroform – acetone – methanol - acetic acid - deionised water (50:20:10:15:5, v/v/v/v/v). After drying, phospholipids were detected using Dittmer and Lester reagent (Dittmer & Lester, 1964). Sometime ninhydrine spray was also used to detect aminophospholipids.

The phospholipid spots were scrapped into test tubes and mineralized using 250 µl of sulfuric acid - perchloric acid (2:1,v/v) containing 0.1% of V₂O₄. Phosphate determination was performed according to Bartlett (Bartlett, 1959).

Gas chromatography

Fatty acid composition of phospholipids was performed by gas-liquid chromatography of methyl esters prepared as follows. Briefly, aliquots of total lipids were spotted onto TLC plate that was run first in diisopropyl-ether as solvent in order to separate neutral lipids from phospholipids. The phospholipids that remained at the deposit were scraped into Teflon screw-capped tubes. Methylation of fatty acid was performed at 85°C for 2 hours in methanol – HCl as previously described. (Vaisman et al., 2008; J. M. Weber, Brichon, Bodenne, & Zwingelstein, 2002). After cooling, the fatty acid methyl esters were extracted twice with 5ml hexane and washed twice 2.5 ml of deionized water. After drying under N₂ fatty acid methyl esters were re-suspended in 30 µl hexane and an aliquot was analyzed using a gas-liquid chromatograph Chrompack CP 9001 (Les Ulys, France) with omegawax 250 capillary column

(0.5×30 m – Supelco, Saint Quentin Fallavier, France). The injector and detector were set at 250°C. Results are expressed as percent of total fatty acid.

Effect of 3-deazaadenosine on amoebic growth

On day 0 of experiments, amoebas were seeded in culture tubes at a concentration of 2.10^5 cells / ml of SCGYEM medium containing different concentrations of 3-deazaadenosine (10 μ M and 100 μ M) or not (controls). The tubes were placed at 37°C in a slanting position and the cell concentrations determined after 3 days using a haemocytometer. Similar experiments were also performed in 24 well plates for phase contrast microscopic examination.

RESULTS AND DISCUSSION

We first studied if differences may occur in the expression of neutral lipids between the three different species of amoeba. As shown in Fig. 1A differences in the level of neutral lipids could be observed, mainly in triacylglycerol that were particularly high in *H. vermiformis* when compared to other species. Concomitantly, the levels of free fatty acids were higher in other species (compare the spots of free fatty acids in *A. castellanii* and *H. vermiformis*, Fig. 1A). The profile of free ceramides did not show major differences between the three species (See Fig. 1B). In all amoebic species the major ceramide spot runs like ceramide type III standard, i.e., indicating that ceramide species in these amoebic species are mainly made of sphingosine and/or dihydrosphingosine linked to non hydroxylated fatty acids (Bodennec, Brichon, Portoukalian, & Zwingelstein, 1999).

Neutral glycosphingolipids were also isolated by solid phase extraction and separated by TLC (Fig. 1C). Major differences were observed between the different amoebic species when the TLC plate was revealed with orcinol, a reagent used to detect hexose containing glycolipids. Hence two orcinol positive spots were detected in *W. magna* specie and one in *H. vermiformis* (see Fig. 1C). The upper orcinol positive spot in *W. magna* and the one detected in *H. vermiformis* migrated slower than glucosylceramide standard but faster than lactosylceramide. A major orcinol positive spot was detected in *W. magna*. This spot migrated slower than phosphatidylcholine at a same R_f as globoside standards. This spot in *W. magna* was never detected in other amoebic species and we found that it was alkali resistant and contained sphingoid bases (not shown). This shows that the orcinol positive spots in Fig. 1C are glycosphingolipids, but their exact identities are not known. The occurrence of specific glycosphingolipids may have important implications for bacterium – host cells relationships since these glycolipids are known to play important functions in cell contacts and differentiation (Riboni, Viani, Bassi, Prinetti, & Tettamanti, 1997).

In addition to these orcinol positive spots in Fig. 1C, two major spots were detected after charring the plate. These spots that are negative to orcinol were positive to Dittmer and Lester reagent for phospholipids detection (Dittmer & Lester, 1964). The two spots correspond to phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine that were eluted in the same tube where glycolipids were collected from aminopropyl columns. The relative composition in these phospholipids appears to be very different between the amoebic species; inasmuch *W. magna* expressed more PC than PE while the opposite could be observed in *H. vermiformis* (compare the relative intensity of PE and PC spots in both species, Fig. 1C).

Thus, we next determined the phospholipid composition of the amoebic species. The lipids were resolved by two-dimensional TLC. Five major spots were detected by Dittmer and Lester reagent: phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylserine (PS), diphosphatidylglycerol (DPG) and sphingomyelin (SM). In the three amoebic species used in our study we did not find the sphingophosphonolipid ceramide aminoethylphosphonate that has been shown to occur at some extent in protozoan species such as *Tetrahymena pyriformis* and *Entamoeba histolytica* (Aley, Scott, & Cohn, 1980; Viswanathan & Rosenberg, 1973). Each spots were quantified based on phosphorous determination (see Fig. 2). The data confirms the observation made on the TLC phospholipids profile (fig. 1.C.), i.e., that the phospholipids composition is very different when we compare the different amoebic species. The percentage of PC and PE was not different between *A. castellanii* and *H. vermiformis*, but this latter specie shows statistically less SM and more PS than the former. *W. magna* also express less PS than *H. vermiformis*. The major difference observed in phospholipids composition was in the quantities of PE and PC detected in *W. magna* when compared to the other two species with *W. magna* displaying a particularly high PC/PE ratio. This difference in phospholipids composition may have implications in the particular resistance of *W. magna* to *L. pneumophila* (Dey et al., 2009). Indeed PE is

considered as a fusogenic lipid and as such is involved in membrane fusion mechanisms (Haque, 2001; Ostrowski et al., 2004). Moreover, this phospholipid is involved in the functional regulation of proteins involved in phagocytosis and the phagosome maturation. This is the case of some proteins of the Apg family that bind covalently to PE through its amino group (Ichimura et al., 2000). Thus, it is tempting to speculate that the high PC/PE ratio observed in *W. magna* may have an impact on such protein activity that in turn could modulate the ability of *L. pneumophila* to hijack the host cellular machinery.

The particularly high PC/PE ratio in *W. magna* may have several explanations: a higher activity of PC biosynthetic pathways in *W. magna* when compared to other amoebic species, a reduced catabolic activity for PC in *W. magna* or a combination of both. In eukaryotic cells PC is known to be synthesized by two different pathways: the CDP-choline pathway that uses choline as a precursor, and the PE methylation pathway where PE is metabolized to PC after three successive *N*-methylations (Kent, 1995). The high ratio of PC/PE suggests that the PE methylation pathway may be active in *W. magna*. This hypothesis is further strengthened by the observation that *W. magna* displays the lower amount of PS, a phospholipid that can be decarboxylated to PE. Thus we can hypothesize that the low amount of PS and PE in *W. magna* when compared to other amoebic species may be due to a strong activity in PS decarboxylation to PE that is further methylated to PC.

In order to test this hypothesis we treated the amoebic species with 3-deazaadenosine a known inhibitor of the PE methylation pathway for PC biosynthesis (Vance, 1990). When treated with 10 μ M of 3-deazaadenosine for 48 hours a fall in PC/PE ratio was observed in *W. magna* (from ~ 2 in control to ~ 1.03 with 3-deazaadenosine) while in other amoebic species the ratio was almost not affected [*A. castellanii* (from ~ 0.94 in control to ~ 0.90 with 3-deazaadenosine) and *H. vermiformis* (from ~ 0.84 in controls to ~ 0.87 with 3-deazaadenosine)]. These data strongly support the hypothesis that the PE methylation

pathway is particularly expressed in the free-living amoeba *W. magna*. This is further strengthened by our observations that *W. magna* cell fate are highly sensitive to the PE methylation inhibitor. Indeed, when treated with 3-deazaadenosine, *W. magna* growth was strongly inhibited when compared to *H. vermiformis* and *A. castellanii* (Fig. 3). In presence of 10 μ M of 3-deazaadenosine the growth of *W. magna* was inhibited by 90 % while the impacts on *H. vermiformis* and *A. castellanii* were respectively 27% and 36%. The growth of *W. magna* was completely inhibited with 3-deazaadenosine at 100 μ M. Others have shown a similar growth suppressive effect of 3-deazaadenosine in *Tetrahymena* and in human cells (Chiang, 1998; Smith & Ledoux, 1990). This growth inhibition was correlated to the inhibition of PE methylation pathway. Our observations that *W. magna* may have an active PE methylation pathway is particularly interesting in light of what is known about S-adenosyl methionine synthases, the enzymes catalysing the synthesis of the methyl donors in PE methylation pathway. S-adenosyl methionine synthases (3-deazaadenosine is an inhibitor of these enzymes) regulate growth and cellular division (Kim et al., 2003; Mato, Corrales, Lu, & Avila, 2002) and were shown to regulate the bacterium/host relationships in *Amoeba proteus* infested by some bacteria gram-negative (Friz, 1968; Jeon, 2008).

We finally determined the phospholipid fatty acid composition. The *impetus* was that, although the different species were grown in the same medium, differences may occur since the phospholipid expression was very different between the amoebic species. Table 1 shows that this is indeed the case with 18:2 ω 6 being the most abundant fatty acid in *W. magna*, i.e., ~ 2 to ~ 6.4 times more than in *H. vermiformis* and *A. castellanii* respectively. At the opposite the latter species are expressing ~ 2.5 times more 18:1 ω 9 than *W. magna*. Our observations are very similar to the one published by Thomas et al. whom studied the fatty acid composition of phospholipids in *Acanthamoeba castellanii* (Thomas, Rutter, Suller, Harwood, & Lloyd, 1998). It was shown that in *Acanthamoeba* species, the PE is mainly composed of

18:1 ω 9 fatty acid, whereas the PC expressed much less of this fatty acid (Ulsamer, Smith, & Korn, 1969). The difference in 18:1 ω 9 composition between amoebic species may thus be explained by the different PC/PE ratio that we observed between amoebic species. These major differences may also highlight specific fatty acid metabolic activities in *W. magna* that could determine the fate of this amoeba cocultured with *L. pneumophila*. Effectively it is known that this bacterium diverts and uses host fatty acid metabolism to achieve its own growth and replication. Finally, this descriptive study sheds new light on amoebic lipid expression and paves the way to further study the putative roles that these host molecules may play in bacterium infection and growth.

Table.1. Phospholipids fatty acid profile

Fatty Acids	<i>Willaertia</i>	<i>Hartmanella</i>	<i>Acanthamoeba</i>
16:0	12.72 ± 5.82	15.31 ± 3.2	3.3 ± 1.75
16:1 ω7	3.67 ± 1.22	6.86 ± 1.68	0.26 ± 0.46
18:0	15.14 ± 3.64	** 6.23 ± 0.77	11.85 ± 2.35
18:1 ω9	** 14.03 ± 2.63	31.84 ± 3.29	38.22 ± 1.44
18:1 ω7	5.53 ± 3	12.08 ± 0.83	0.31 ± 0.54
18:2 ω6	** 27.87 ± 3.53	13.35 ± 1.19	4.34 ± 2.01
18:2 ω4	0.14 ± 0.28	1.43 ± 1.24	1.24 ± 1.08
18:3 ω3	1.75 ± 0.29	1.87 ± 0.32	0
20:0	0.69 ± 0.8	3.17 ± 0.14	0
20:2 ω6	1.2 ± 0.65	0.32 ± 0.28	** 15.4 ± 1.31
20:3 ω6	3.22 ± 0.94	1.53 ± 0.29	4.31 ± 0.15
20:4 ω6	6.95 ± 1.78	2.51 ± 0.74	** 16.73 ± 2.52
20:5 ω3	3.04 ± 1.6	2.32 ± 1.42	2.81 ± 1.66
22:1 ω6	1.21 ± 1.21	1.18 ± 0.27	1.22 ± 1.13

Phospholipids purified from the different amoebic species were transesterified and analysed by gas chromatography as described in methods. The results are expressed in percent of total

fatty-acids in phospholipids and are the average \pm SD of 3-4 independent experiments.

Statistical differences (Student t-test) between the different amoebas are indicated (* $P < 0.01$;

** $P < 0.001$).

Figure legends**Fig.1. neutral lipids and glycosphingolipids from amoeba**

Lipids were extracted and purified from *A. castellanii* (Acan), *W. magna* (Will) and *H. vermiformis* (Hart), and separated on LC-NH₂ columns as described in methods. The different fractions eluted from the column were spotted on TLC to separate the lipids along with authentic standards. **A:** separation of neutral lipids eluted in fractions 1 and 3. **B:** separation of free ceramides eluted in fraction 2. **C:** separation of neutral glycosphingolipids and phospholipids eluted in fractions 3 and 5. Plates A and B were revealed after spraying with cupric sulphate reagent and charring at 180°C for 10 min. Plate C was sprayed with orcinol reagent to stain neutral glycosphingolipids and kept at 140°C for 10 min to reveal phospholipids by charring. The asterisks on plate C show orcinol positive spots. **Esters St:** sterol esters; **FFAm:** methylated fatty acids; **TG:** triacylglycerol; **FFA:** free fatty acids; **Cer III:** ceramide type III standard; **Cer IV:** ceramide type IV standard; **GlcCer:** glucosylceramide; **LacCer:** lactosylceramide; **PE:** phosphatidylethanolamine; **PC:** phosphatidylcholine. **Std:** standards.

Fig.2. Distribution of phospholipids in amoebic species

Phospholipids extracted from the different amoebic species [*A. castellanii* (**Acan**), *W. magna* (**Will**) and *H. vermiformis* (**Hart**)] were separated by two dimensional TLC and phosphorus determined as described in methods. **DPG:** diphosphatidylglycerol; **PC:** phosphatidylcholine; **PE:** phosphatidylethanolamine; **PS:** phosphatidylserine; **SM:** sphingomyelin. The data are expressed as the percentage of total lipid phosphorus and are the average \pm SEM of four independent experiments. Statistical differences (Student t-test) between the different amoebic species are indicated (* $P < 0.01$; ** $P < 0.001$).

Fig. 3. Effects of the 3-deazaadenosine on the amoebic growth

A. Effect of the 3-deazaadenosine on the growth of amoebae. The different amoebae were cultured at 37°C for 3 days either with (grey and white bars) or without (black bars) 3-deazaadenosine at concentrations of 10 µM and 100 µM as described in methods. The data are expressed as the number of amoebae / ml of medium and are the average ± SEM of four independent experiments performed in triplicate. Statistical differences (Student t-test) between the growth of amoebae cultured either with or without 3-deazaadenosine are indicated (* $P < 0.01$; ** $P < 0.001$). After 72 hours in presence of 100 µM of 3-deazaadenosine the number of *W. magna* was too low to be accurately determined due to toxic effect at that concentration.

B. Effect of 3-deazaadenosine on monolayer formation by amoebae. Representative phase-contrast images of the different amoebae cultured in 24-well plates either with or without the 3-deazaadenosine at concentrations of 10 µM and 100 µM for 3 days. Note the inhibition of amoebic monolayer formation in presence of 3-deazaadenosine when compared with controls.

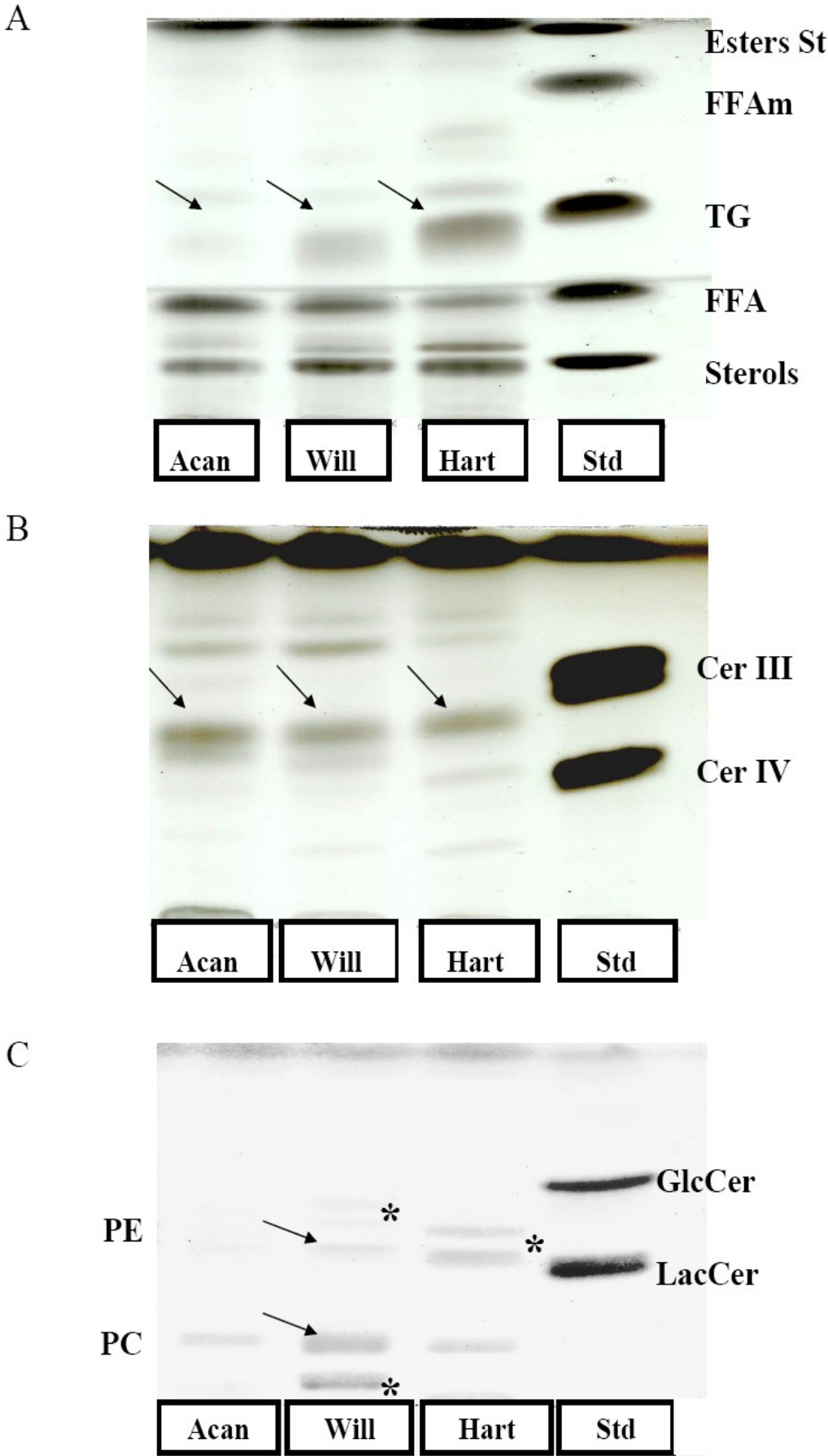


Fig. 1. Dey et al.

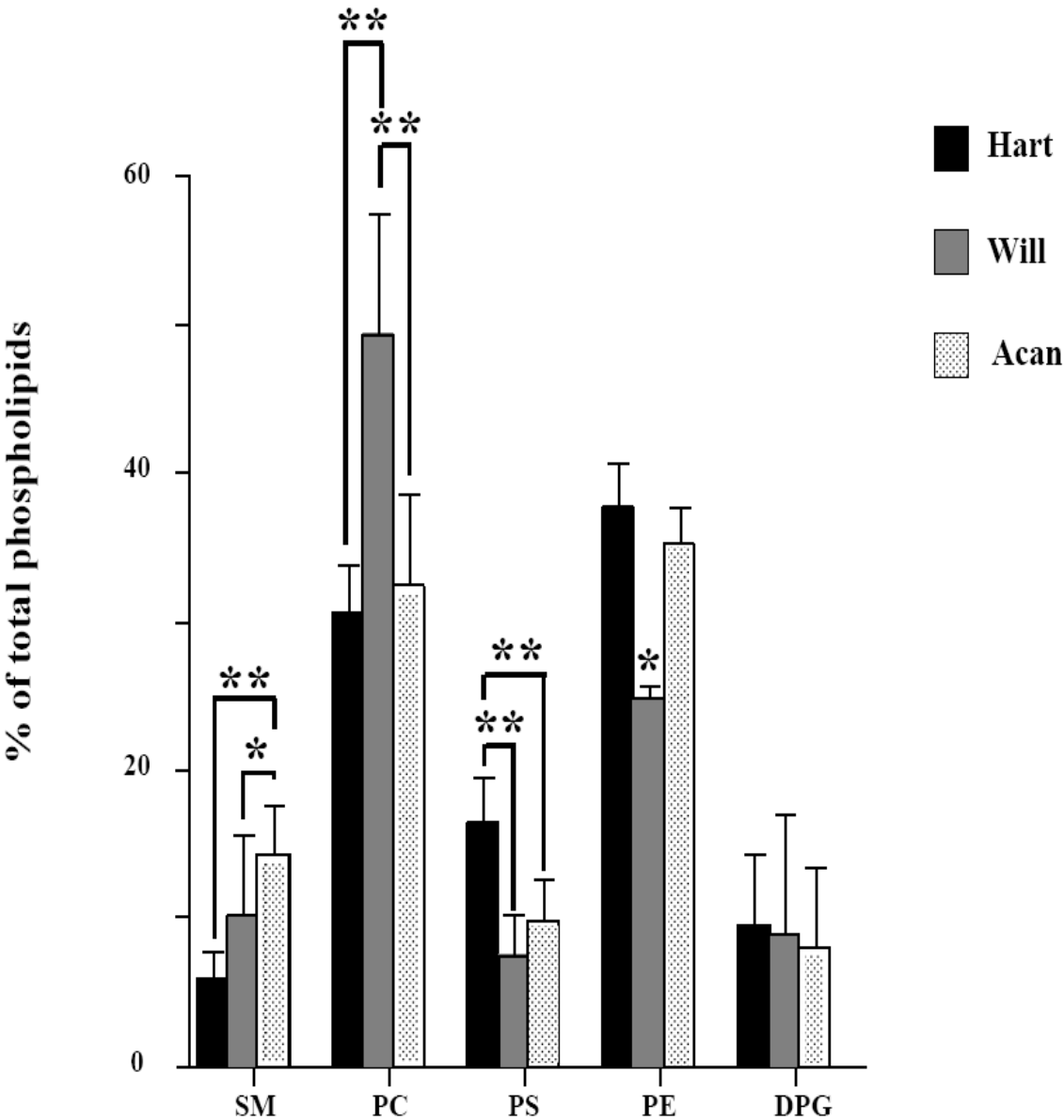


Fig. 2. Dey et al.

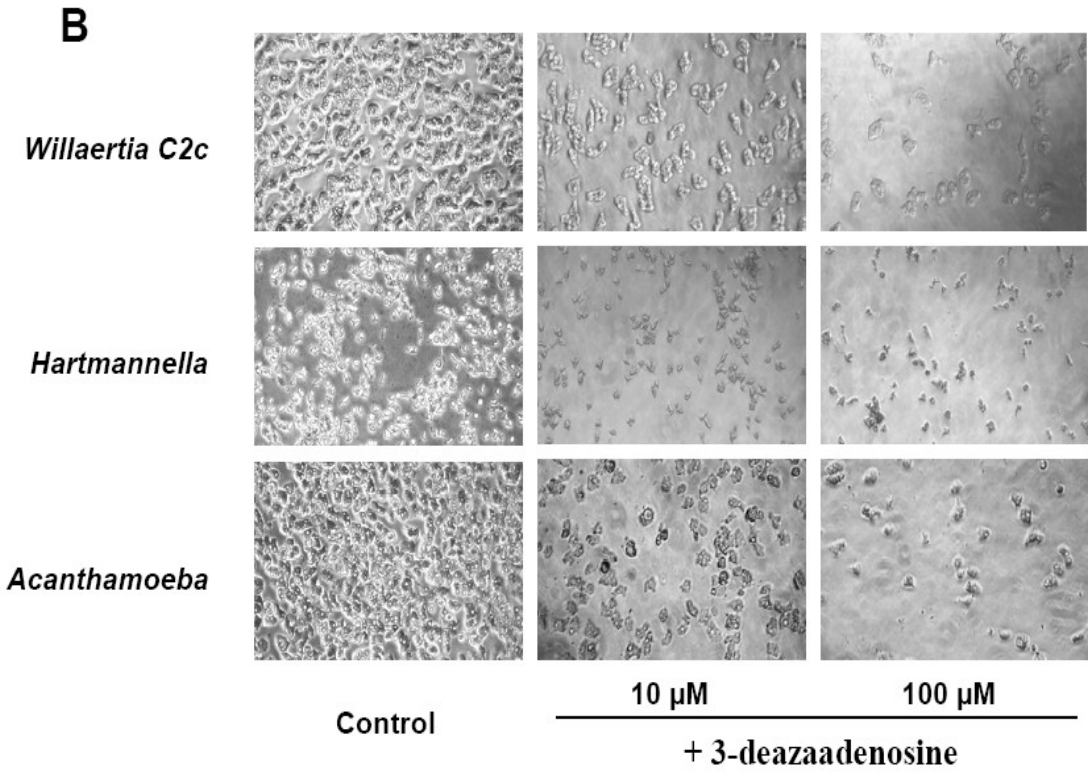
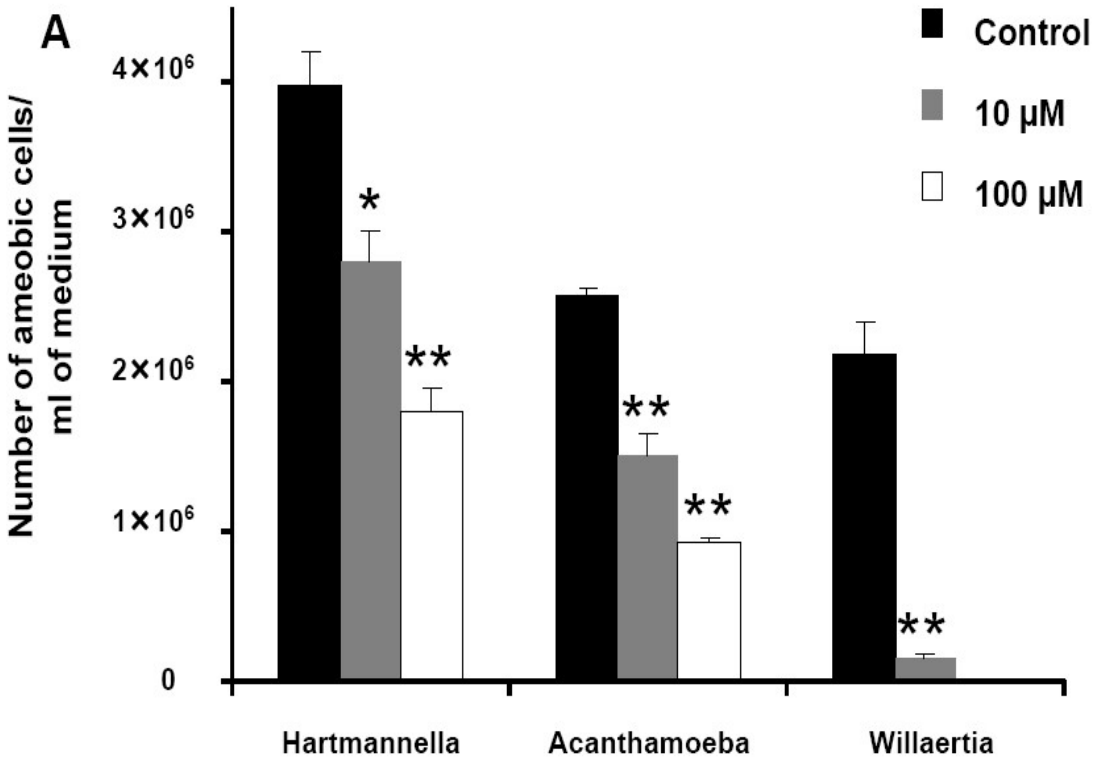


Fig. 3. Dey et al.

BIBLIOGRAPHY

- Abu Kwaik, Y., Gao, L. Y., Stone, B. J., Venkataraman, C., & Harb, O. S. (1998). Invasion of protozoa by *Legionella pneumophila* and its role in bacterial ecology and pathogenesis. *Appl Environ Microbiol*, 64(9), 3127-3133.
- Adeleke, A., Pruckler, J., Benson, R., Rowbotham, T., Halablab, M., & Fields, B. (1996). Legionella-like amebal pathogens--phylogenetic status and possible role in respiratory disease. *Emerg Infect Dis*, 2(3), 225-230.
- Aley, S. B., Scott, W. A., & Cohn, Z. A. (1980). Plasma membrane of *Entamoeba histolytica*. *J Exp Med*, 152(2), 391-404.
- Anes, E., Kuhnel, M. P., Bos, E., Moniz-Pereira, J., Habermann, A., & Griffiths, G. (2003). Selected lipids activate phagosome actin assembly and maturation resulting in killing of pathogenic mycobacteria. *Nat Cell Biol*, 5(9), 793-802.
- Bartlett, G. R. (1959). Phosphorus assay in column chromatography. *J Biol Chem*, 234(3), 466-468.
- Bodennec, J., Brichon, G., Portoukalian, J., & Zwingelstein, G. (1999). Improved methods for the simultaneous separation of free diacylglycerol species from ceramides containing phytosphingosine and sphingosine bases with non hydroxy and alpha-hydroxy fatty acids. *J. Liq. Chromatogr.Rel. Technol*, 22, 1493-1502.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254.
- Chiang, P. K. (1998). Biological effects of inhibitors of S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Pharmacol Ther*, 77(2), 115-134.
- Declerck, P., Behets, J., van Hoef, V., & 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(14), 3159-3167.
- Dey, R., Bodennec, J., Mameri, M. O., & Pernin, P. (2009). Free-living freshwater amoebae differ in their susceptibility to the pathogenic bacterium *Legionella pneumophila*. *FEMS Microbiol Lett*, 290(1), 10-17.
- Dittmer, J. C., & Lester, R. L. (1964). A Simple, Specific Spray for the Detection of Phospholipids on Thin-Layer Chromatograms. *J Lipid Res*, 15, 126-127.
- Flieger, A., Gongab, S., Faigle, M., Mayer, H. A., Kehrer, U., Mussotter, J., et al. (2000). Phospholipase A secreted by *Legionella pneumophila* destroys alveolar surfactant phospholipids. *FEMS Microbiol Lett*, 188(2), 129-133.
- Flieger, A., Rydzewski, K., Banerji, S., Broich, M., & Heuner, K. (2004). Cloning and characterization of the gene encoding the major cell-associated phospholipase A of

- Legionella pneumophila*, plaB, exhibiting hemolytic activity. *Infect Immun*, 72(5), 2648-2658.
- Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem*, 226(1), 497-509.
- Friz, C. T. (1968). The biochemical composition of the free-living amoebae *Chaos chaos*, *Amoeba dubia* and *Amoeba proteus*. *Comp Biochem Physiol*, 26(1), 81-90.
- Haque, E., McIntosh, T. J., and Lentz, B. R. (2001). Influence of lipids composition on physical properties and PEG-mediated fusion of curved and uncurved model membrane vesicles: «nature's own» fisogenic lipid bilayer. *Biochemistry*, 40, 4340 - 4348.
- Hilbi, H. (2006). Modulation of phosphoinositide metabolism by pathogenic bacteria. *Cell Microbiol*, 8(11), 1697-1706.
- Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimonishi, Y., Ishihara, N., et al. (2000). A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature*, 408(6811), 488-492.
- Jeon, T. J. (2008). DNA adenine methylation of *sams1* gene in symbiont-bearing *Amoeba proteus*. *J Microbiol*, 46(5), 564-570.
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Yamamoto, A., Oshitani-Okamoto, S., Ohsumi, Y., & Yoshimori, T. (2004). LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J Cell Sci*, 117(Pt 13), 2805-2812.
- Kent, C. (1995). Eukaryotic phospholipid biosynthesis. *Annu Rev Biochem*, 64, 315-343.
- Kim, D. J., Huh, J. H., Yang, Y. Y., Kang, C. M., Lee, I. H., Hyun, C. G., et al. (2003). Accumulation of S-adenosyl-L-methionine enhances production of actinorhodin but inhibits sporulation in *Streptomyces lividans* TK23. *J Bacteriol*, 185(2), 592-600.
- Mato, J. M., Corrales, F. J., Lu, S. C., & Avila, M. A. (2002). S-Adenosylmethionine: a control switch that regulates liver function. *Faseb J*, 16(1), 15-26.
- Murata, T., Delprato, A., Ingmundson, A., Toomre, D. K., Lambright, D. G., & Roy, C. R. (2006). The *Legionella pneumophila* effector protein DrrA is a Rab1 guanine nucleotide-exchange factor. *Nat Cell Biol*, 8(9), 971-977.
- Ostrowski, S. G., Van Bell, C. T., Winograd, N., & Ewing, A. G. (2004). Mass spectrometric imaging of highly curved membranes during *Tetrahymena* mating. *Science*, 305(5680), 71-73.
- Riboni, L., Viani, P., Bassi, R., Prinetti, A., & Tettamanti, G. (1997). The role of sphingolipids in the process of signal transduction. *Prog Lipid Res*, 36(2-3), 153-195.
- Schunder, E., Adam, P., Higa, F., Remer, K. A., Lorenz, U., Bender, J., et al. (2010). Phospholipase PlaB is a new virulence factor of *Legionella pneumophila*. *Int J Med Microbiol*.

- Smith, J. D., & Ledoux, D. N. (1990). Effect of the methylation inhibitors 3-deazaadenosine and 3-deazaaristeromycin on phosphatidylcholine formation in *Tetrahymena*. *Biochim Biophys Acta*, 1047(3), 290-293.
- Thomas, K., Rutter, A., Suller, M., Harwood, J., & Lloyd, D. (1998). Oxygen induces fatty acid (n-6)-desaturation independently of temperature in *Acanthamoeba castellanii*. *FEBS Lett*, 425(1), 171-174.
- Ulsamer, A. G., Smith, F. R., & Korn, E. D. (1969). Lipids of *Acanthamoeba castellanii*. Composition and effects of phagocytosis on incorporation of radioactive precursors. *J Cell Biol*, 43(1), 105-114.
- Vaisman, N., Kaysar, N., Zaruk-Adasha, Y., Pelled, D., Brichon, G., Zwingelstein, G., et al. (2008). Correlation between changes in blood fatty acid composition and visual sustained attention performance in children with inattention: effect of dietary n-3 fatty acids containing phospholipids. *Am J Clin Nutr*, 87(5), 1170-1180.
- Vance, J. E. (1990). Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria. *J. Biol. Chem*, 7248-7256.
- Viswanathan, C. V., & Rosenberg, H. (1973). Isolation of ceramide-monomethylaminoethylphosphonate from the lipids of *Tetrahymena pyriformis* W. *J Lipid Res*, 14(3), 327-330.
- Weber, J. M., Brichon, G., Bodennec, J., & Zwingelstein, G. (2002). Palmitate and oleate metabolism of rainbow trout in vivo. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 131(2), 409-416.
- Weber, S. S., Ragaz, C., & Hilbi, H. (2009a). The inositol polyphosphate 5-phosphatase OCRL1 restricts intracellular growth of *Legionella*, localizes to the replicative vacuole and binds to the bacterial effector LpnE. *Cell Microbiol*, 11(3), 442-460.
- Weber, S. S., Ragaz, C., & Hilbi, H. (2009b). Pathogen trafficking pathways and host phosphoinositide metabolism. *Mol Microbiol*, 71(6), 1341-1352.
- Weber, S. S., Ragaz, C., Reus, K., Nyfeler, Y., & Hilbi, H. (2006). *Legionella pneumophila* exploits PI(4)P to anchor secreted effector proteins to the replicative vacuole. *PLoS Pathog*, 2(5), e46.
- Yeung, T., Heit, B., Dubuisson, J. F., Fairn, G. D., Chiu, B., Inman, R., et al. (2009). Contribution of phosphatidylserine to membrane surface charge and protein targeting during phagosome maturation. *J Cell Biol*, 185(5), 917-928.
- Yeung, T., Terebiznik, M., Yu, L., Silvius, J., Abidi, W. M., Philips, M., et al. (2006). Receptor activation alters inner surface potential during phagocytosis. *Science*, 313(5785), 347-351.

Résultats-papier n°4

Les observations réalisées dans la partie précédente suggèrent fortement que la voie de méthylation de la PE est particulièrement active chez l'amibe *W. magna*. L'inhibition de cette voie de biosynthèse de la PE impacte d'ailleurs fortement la croissance de l'amibe. Comme indiqué précédemment dans la partie VI du paragraphe « contexte scientifique », une des conséquences de l'activité de la voie de *N*-méthylation de la PE est de masquer l'amine terminale de l'éthanolamine estérifiée sur le groupement acide phosphatidique de la molécule. La « neutralisation » de cette fonction aminée peu avoir d'importantes répercussions sur l'activité de protéines nécessitant la PE pour assurer leurs fonctions. C'est le cas de certaines protéines de la famille Atg impliquées dans les mécanismes de maturation phagosomales.

Il existe toutefois une autre voie métabolique qui permet aussi de « neutraliser » la fonction aminée de la PE, empêchant, comme pour la méthylation, l'interaction du phospholipide avec ses protéines cibles. Cette voie est la *N*-acylation qui génère un phospholipide (la NAPE, *N*-acylphosphatidyléthanolamine) qui sous l'action d'une phospholipase D spécifique peu produire une classe d'endocannabinoïdes, les dérivés *N*-acylés de l'éthanolamine dont le prototype est l'anandamide (se reporter à la partie V du paragraphe « Contexte Scientifique »).

Hors, une activité anandamide amidohydrolase a été décrite chez l'eucaryote unicellulaire *Tetrahymena pyriformis* qui possède la capacité à sécréter l'enzyme ¹⁴⁸. Comme déjà mentionné dans ce manuscrit, il a été démontré que la *N*-acyle phosphatidyléthanolamine est exprimée chez le protozoaire *Dictyostelium discoideum* où elle représente jusqu'à 15% des phospholipides totaux chez cette espèce. Des études biochimiques couplées à un subfractionnement cellulaire ont montré que ce phospholipide est presque exclusivement localisé au niveau des phagolysosomes. En effet, la *N*-acyle phosphatidyléthanolamine disparaît totalement de la cellule lorsque les phagolysosomes sont expulsés. Il est donc vraisemblable que ce phospholipide assure des fonctions particulières pour l'homéostasie des phagosomes, structure pivot de l'infection par *L. pneumophila*. Il est donc clair que les protozoaires sont pourvus d'un système endocannabinoïde, bien que ce dernier soit mal caractérisé chez ces eukaryotes.

D'autres études ont rapporté que le Δ^9 -tétrahydrocannabinol (THC) (un cannabinoïde végétal agissant sur les mêmes récepteurs que les cannabinoïdes endogènes) a un effet sur le mouvement, la croissance et la division cellulaire de *Dictyostelium discoideum* ¹⁴⁹, *Tetrahymena pyriformis* ¹⁵⁰ et *Naegleria fowleri* ¹⁴⁷. Arata et al., ont également montré que le THC pouvait moduler la croissance des légionelles ¹⁵¹⁻¹⁵³. Il a aussi été montré que le récepteur CB1 joue un rôle important durant l'infection des macrophages par les microbes pathogènes intracellulaires du genre *Brucella* ¹⁵⁴. En revanche, l'effet des cannabinoïdes

endogènes sur les amibes libres reste inconnu. Nous avons testé les effets potentiels de différents endocannabinoïdes sur le devenir des amibes libres *W. magna*, *A. castellanii* et *H. Vermiformis*.

Nos résultats montrent que les endocannabinoïdes inhibent la croissance de toutes les amibes libres testées.

Endocannabinoids inhibit the growth of free-living amoebae

Rafik Dey¹, Pierre Pernin¹, and Jacques Bodennec^{1*}

Running title:

Endocannabinoids and pathogenic amoebae

⁽¹⁾ Université de Lyon, Lyon, F-69003, France; Université Lyon 1; CNRS, UMR5123, Laboratoire de Physiologie Intégrative Cellulaire et Moléculaire, Villeurbanne, F-69622, France.

* Corresponding author: jacques.bodennec@adm.univ-lyon1.fr

ABSTRACT:

The cannabinoid Δ^9 -tetrahydrocannabinol inhibits the growth of some pathogenic amoebae in vitro and exacerbates amoebic encephalitis in animal models. However, the effects of endogenous cannabinoids on amoebae remain unknown. Therefore, we tested several endocannabinoids (*N*-acyl ethanolamines and 2-*O*-acyl glycerol) on different genera of amoebae. The results showed that all tested endocannabinoids inhibit amoebic growth. A nonhydrolysable endocannabinoid had similar effects, showing that the inhibition results from endocannabinoids *per se* rather than from a catabolic product.

Some free-living amoebae such as *Acanthamoeba* and *Naegleria* are responsible for severe encephalitis and dermatitis of increasing prevalence, especially in immune-compromised patients (2, 8, 9). In addition to numerous side effects such as seizures, nausea and vomiting, Granulomatous Amebic Encephalitis (GAE) is usually fatal to patients who do not have access to efficient therapeutic approaches (8). The plant-derived psychoactive cannabinoid Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) was shown to inhibit the growth of the pathogenic *Naegleria fowleri* in vitro (10). However, this cannabinoid also shows an immunosuppressive activity, and exacerbates encephalitis with opportunistic amoebae in a mouse model of GAE by inhibiting the macrophage-like cell activity (1, 2). Unlike Δ^9 -THC, the endogenous cannabinoid 2-*O*-arachidonoyl glycerol (2-AG) (one of the two prototypic endocannabinoids along with *N*-arachidonoyl ethanolamine) activates immune responses, including chemotaxis of macrophages and microglial cells (2, 12) but its effects on free-living amoebae remain unknown. Some observations showed that amoebae display an active endocannabinoid system inasmuch *N*-acyl phosphatidylethanolamine (the precursor of the *N*-acyl ethanolamine endocannabinoids) is expressed in a regulated fashion during the development of the *Dictyostelium discoideum* amoeba (5). Moreover, arachidonoyl ethanolamine is metabolized in *Tetrahymena pyriformis* through fatty acid amide hydrolase activity (4, 6). Endocannabinoids may therefore impact amoebic cell fate. Therefore, we tested the effect of several endocannabinoids (*N*-arachidonoyl ethanolamine, 2-*O*-arachidonoylglycerol and 2-*O*-arachidonoylglycerol ether from Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) on different genera of amoebae.

The amoebae used in this study were *Acanthamoeba castellanii* (By 02.2.4), *Hartmannella vermiformis* (Ax.5.2e4b) and *Willaertia magna* c2c Maky (ATCC PTA-7824). Cells were grown at 30°C on a lawn of *Escherichia coli* on non-nutrient agar (NNA) and were

established in axenic culture at 37°C in Serum Casein Glucose Yeast Extract Medium (SCGYEM) (3).

On day 0 of experiments, amoebae were seeded in culture tubes at a concentration of $2 \cdot 10^5$ cells/ml of SCGYEM which either contained various concentrations of endocannabinoids (see figures for details) or did not (controls). Endocannabinoids were added to the medium in ethanol solution (ethanol to a final concentration of 0.05%). Control tubes also contained ethanol (vehicle). The tubes were placed at 37°C in a slanting position and the cell concentrations were determined on a daily basis up to day 3 using a hemocytometer. Exposure of different free-living amoebae to *N*-arachidonoyl ethanolamine at a concentration of 10 µg/ml enabled to inhibit the growth of all amoebic species (Fig.1A). After 3 days, the growth of *A. castellanii*, *W. magna* and *H. vermiformis* was reduced by 68%, 58% and 96% respectively, as compared to controls. Inhibition of amoebic growth was also observed with lower doses (2 and 5 µg/ml) of *N*-arachidonoyl ethanolamine (data not shown). This growth inhibition is further illustrated in Fig. 1B, showing that anandamide prevented the formation of amoebic cell monolayers. This effect was also obtained using endocannabinoids of the 2-*O*-acyl glycerol class (Fig. 1B). A toxic effect was observed at a concentration of 20 µg/ml, as shown by the decrease in viable cell concentrations as compared to the number of cells seeded at day 0 (Fig. 1A). These effects may result from a direct action of endocannabinoids on amoebae or from the action of one of their catabolic products. In order to test that possibility, we compared the inhibitory effect of 2-*O*-arachidonoyl glycerol with a non-hydrolysable analogue (7), i.e. 2-*O*-arachidonoyl glycerol ether (Table 1). Both molecules had similar effects on the various amoebae although *H. vermiformis* proved to be more sensitive than the other two species at our concentration level (Table 1 compares the percentage of inhibition/control). This observation strongly suggests that the inhibition of cell growth results from endocannabinoids *per se* rather than from a catabolic product.

These results showed that endocannabinoids displayed similar effects to the one reported for Δ^9 -tetrahydrocannabinol on amoebic growth (10). Moreover the inhibitory effects of endocannabinoids were observed at doses lower or similar to the pharmacological concentrations used in animal studies (11). These observations are particularly interesting since unlike Δ^9 -tetrahydrocannabinol, some endocannabinoids such as 2-*O*-arachidonoyl glycerol are known to stimulate the immune response, including macrophage activity (2) (12). This property, taken together with our observations that endocannabinoids strongly inhibit the growth of free-living amoebae, suggests that modulation of the endocannabinoid system may be used in designing therapeutic approaches for pathogenic amoeba infections.

REFERENCES

1. **Cabral, G. A., and F. Marciano-Cabral.** 2004. Cannabinoid-mediated exacerbation of brain infection by opportunistic amoebae. *J Neuroimmunol* **147**:127-30.
2. **Cabral, G. A., E. S. Raborn, L. Griffin, J. Dennis, and F. Marciano-Cabral.** 2008. CB2 receptors in the brain: role in central immune function. *Br J Pharmacol* **153**:240-51.
3. **De Jonckheere, J.** 1977. Use of an axenic medium for differentiation between pathogenic and nonpathogenic *Naegleria fowleri* isolates. *Appl Environ Microbiol* **33**:751-7.
4. **Ellingson, J. S.** 1980. Identification of N-acylethanolamine phosphoglycerides and acylphosphatidylglycerol as the phospholipids which disappear as *Dictyostelium discoideum* cells aggregate. *Biochemistry* **19**:6176-82.
5. **Ellingson, J. S., and H. C. Dischinger.** 1985. Concurrent disappearance of N-acylethanolamine glycerophospholipids and phagolysosomes enriched in N-acylethanolamine glycerophospholipids as *Dictyostelium discoideum* cells aggregate. *Biochim Biophys Acta* **812**:255-260.
6. **Karava, V., P. M. Zafiriou, L. Fasia, D. Anagnostopoulos, E. Boutou, C. E. Vorgias, M. Maccarrone, and A. Sifaka-Kapadai.** 2005. Anandamide metabolism by *Tetrahymena pyriformis* in vitro. Characterization and identification of a 66 kDa fatty acid amidohydrolase. *Biochimie* **87**:967-74.
7. **Kishimoto, S., S. Oka, M. Gokoh, and T. Sugiura.** 2006. Chemotaxis of human peripheral blood eosinophils to 2-arachidonoylglycerol: comparison with other eosinophil chemoattractants. *Int Arch Allergy Immunol* **140 Suppl 1**:3-7.
8. **Marciano-Cabral, F., and G. Cabral.** 2003. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease

- in humans. *Clin Microbiol Rev* **16**:273-307.
9. **Marciano-Cabral, F., R. Puffenbarger, and G. A. Cabral.** 2000. The increasing importance of *Acanthamoeba* infections. *J Eukaryot Microbiol* **47**:29-36.
 10. **Pringle, H. L., S. G. Bradley, and L. S. Harris.** 1979. Susceptibility of *Naegleria fowleri* to delta 9-tetrahydrocannabinol. *Antimicrob Agents Chemother* **16**:674-9.
 11. **Smith, P. B., D. R. Compton, S. P. Welch, R. K. Razdan, R. Mechoulam, and B. R. Martin.** 1994. The pharmacological activity of anandamide, a putative endogenous cannabinoid, in mice. *J Pharmacol Exp Ther* **270**:219-27.
 12. **Sugiura, T., S. Kishimoto, S. Oka, and M. Gokoh.** 2006. Biochemistry, pharmacology and physiology of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand. *Prog Lipid Res* **45**:405-46.

Table 1. Effect of a non-hydrolysable endocannabinoid on amoebic growth.

Treatment	<i>A. castellanii</i>		<i>W. magna</i>		<i>H. vermiformis</i>	
	($\times 10^3$ cell / ml)	% of decrease / control	($\times 10^3$ cell / ml)	% of decrease / control	($\times 10^3$ cell / ml)	% of decrease / control
Control (vehicle)	1940 \pm 25	-	1790 \pm 116	-	2790 \pm 130	-
2- <i>O</i> -arachidonoyl glycerol	482** \pm 14	75.2	775** \pm 42	56.6	124** \pm 15	95.6
2- <i>O</i> -arachidonoyl glycerol ether	477** \pm 14	75.4	783** \pm 42	56.2	340** \pm 128	87.8

Cells were cultured up to 3 days either with or without endocannabinoids (10 μ g/ml). Cell concentrations were determined after 3 days in culture. The data are the average \pm SEM of cell concentrations obtained in four independent experiments performed in triplicate.

Statistical differences (Student's t-test) between the growth of amoebae cultured either with or without endocannabinoids are mentioned (** $P < 0.001$). The percentage of decrease in the number of amoebic cells as compared to controls is also shown.

Fig. 1. Effect of endocannabinoids on amoebic growth

A: Effect of *N*-arachidonoyl ethanolamine on amoebic growth. Cells were cultured up to 3 days either with (white bars: 10µg/ml, grey bars: 20 µg/ml) or without (black bars) endocannabinoids. Cell concentrations were determined on a daily basis. The data are the average ± SEM of four independent experiments performed in triplicate. Statistical differences (Student's t-test) between the growth of amoebae cultured either with or without *N*-arachidonoyl ethanolamine are mentioned (** $P < 0.001$). **B:** Representative phase-contrast images of the different amoebae cultured in 24-well plates either with or without different endocannabinoids were taken after 3 days in culture.

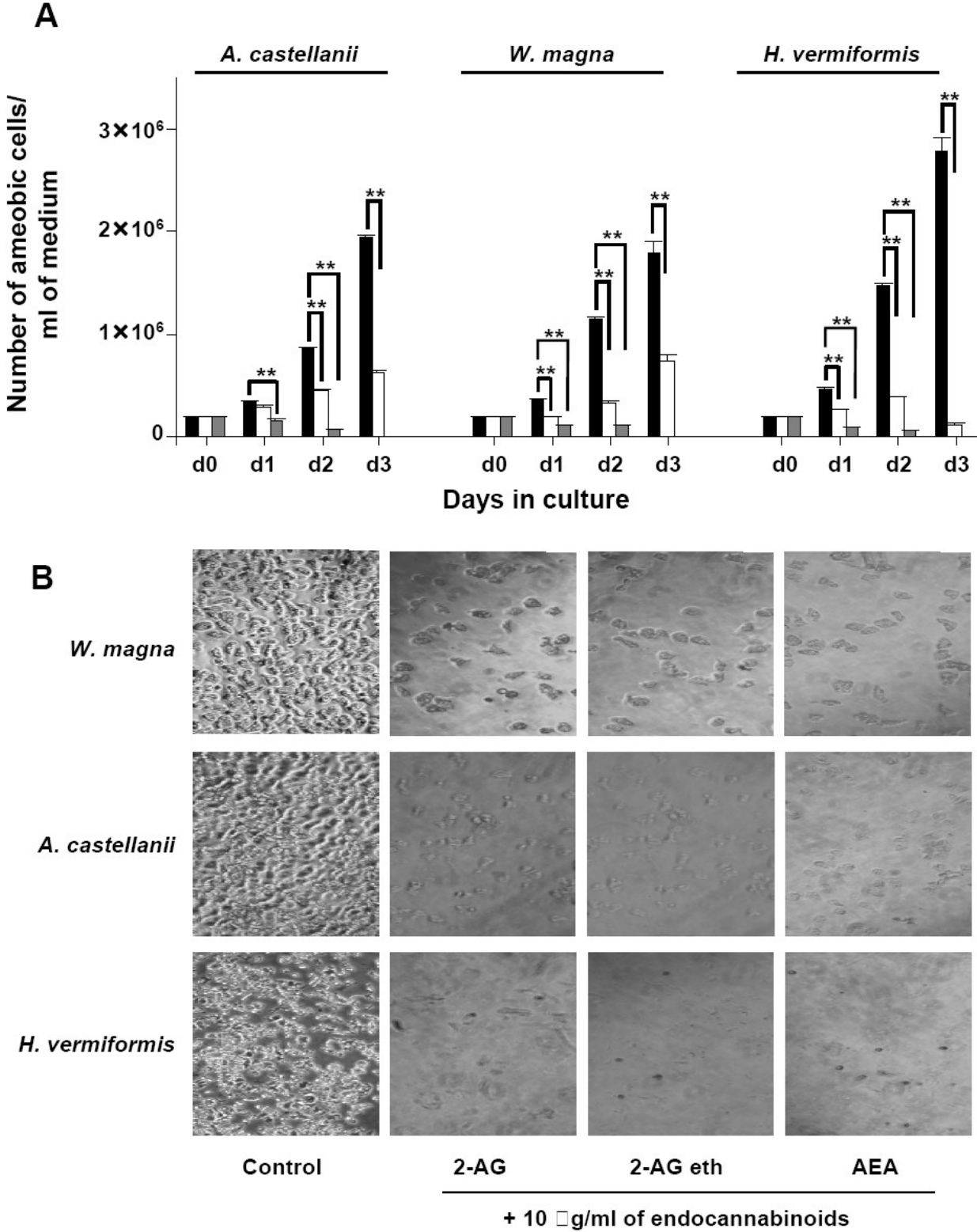


Fig. 1. Dey et al.

Discussion générale

Partie I. Les différentes réponses des amibes libres aux légionelles

I. a. Cocultures mono-amibiennes

Les résultats obtenus en coculture monoamibienne avec les genres *Hartmannella* et *Acanthamoeba*, utilisés comme amibes de référence, montrent un développement de *L. pneumophila* Paris qui atteint jusqu'à 2.3 Log en 4 jours. Ces résultats sont comparables à ceux publiés par d'autres auteurs^{31, 51, 53, 155-157}. L'examen de ces amibes par microscopie électronique a permis de visualiser une intense multiplication des légionelles dans les phagosomes réplicatifs de ces amibes.

A l'opposé, en présence de *W. magna* C2c la croissance de *L. pneumophila* Paris est totalement inhibée. Ce résultat original est à notre connaissance la première observation rapportant qu'une amibe libre présente la capacité de ne pas supporter la croissance de la bactérie pathogène. Toutefois, lorsque d'autres souches (Lens et Philadelphia) de *L. pneumophila*, appartenant au même séro groupe que la souche Paris, ont été testées en coculture, une croissance bactérienne a pu être démontrée en présence de tous les genres amibiens (voir la Fig 2b dans la première partie des résultats). Toutefois la croissance de la souche Philadelphia semble moins rapide et moins importante chez *W. magna* C2c qu'en présence des autres amibes. De plus, les examens visuel et microscopique des cocultures amibes / *L. pneumophila* montrent qu'une très forte prolifération bactérienne était systématiquement observée en présence d'*H. vermiformis*, *A. castellanii* et de la souche *W. magna* Z503 et cela quel que soit la souche de légionelle utilisée. La prolifération bactérienne était tellement importante que le milieu de culture devenait opaque et nuageux. Un tel phénomène, rapporté dans les résultats du premier article publié, n'a jamais été observé en présence de la souche de *W. magna* C2c. Il semble donc qu'il existe une dissonance entre la quantification des légionelles obtenue par la méthode de culture sur milieu BCYE et l'observation visuelle des tubes et boîtes de cocultures (bien que ce dernier critère soit subjectif et non quantitatif). Il est en effet possible qu'une partie non négligeable des légionelles retrouvées dans les milieux de coculture représentent une forme viable mais non cultivable (VBNC : Viable But Non Cultivable). L'examen par microscopie électronique des amibes infestées de légionelles montre que l'aspect des bactéries diffère chez *A. castellanii* de celui retrouvé chez *W. magna*, notamment dans la souche C2c (voir Fig. 3, première partie des résultats). Cette morphologie bactérienne rappelle beaucoup celle décrite par Garduno pour qui elle représente une forme de dormance de *L. pneumophila*¹⁵⁸. Il serait donc

particulièrement intéressant de réaliser des expériences similaires à celles réalisées ici et où l'évolution de la population bactérienne serait déterminée par PCR quantitative. Une comparaison des résultats obtenus par cette méthode et ceux obtenus par culture permettrait sans doute de répondre à la question posée. Une observation majeure réalisée lors de nos essais est que l'amibe *W. magna* C2c présente la capacité surprenante de résister à la cytotoxicité bactérienne.

I. b. Absence de cytotoxicité de *L. pneumophila* vis-à-vis d'une souche de *Willaertia magna*

L'effet cytotoxique des différentes souches de *L. pneumophila* sur les amibes a été examiné par l'observation en microscopie à contraste de phase des cocultures en microplaques. Dans ces conditions on a pu constater que *L. pneumophila* détruit complètement les monocouches et/ou inhibe la formation de celles-ci chez *Hartmannella* et *Acanthamoeba* (Fig.1b ; Papier n°1). A l'opposer, dans les mêmes conditions de culture et un même ratio d'infestation les monocouches de *W. magna* C2c demeurent intactes et prolifèrent aussi bien que dans les puits témoins en absence de légionelles. De plus, l'observation des cocultures en microplaques après 7 jours d'incubation, montre que la souche *W. magna* c2c a résisté à la cytotoxicité induite par les différentes souches de *L. pneumophila*. Dans le même laps de temps une autre souche de *W. magna*, la Z503 est complètement lysée (Fig.1c ; Papier n°1).

Ces résultats montrent chez *W. magna* c2c une résistance particulière contre *L. pneumophila*. Ces observations ont été confirmées par la réalisation d'un test d'exclusion au bleu Trypan sur les cocultures d'*Acanthamoeba* et de *Willaertia* C2c. Les résultats montrent que $28.4 \pm 3.6\%$, $11.01 \pm 1.1\%$ et $10.9 \pm 2.6\%$ des rares cellules d'*Acanthamoeba* sp. encore présentes au bout de 72 heures sont tuées lorsque respectivement cultivées en présence des souches de *L. pneumophila* Paris, Lens et Philadelphia. Pour *W. magna* C2c seulement $3.8 \pm 0.4\%$, $2.9 \pm 0.9\%$ et $3.2 \pm 0.7\%$ des cellules étaient positive au bleu trypan. Cette résistance particulière de *W. magna* C2c en fait un modèle d'étude très original.

I. c. *L. pneumophila* et amibes du genre *W. magna* C2c (mécanisme de croissance)

La résistance particulière de la *W. magna* c2c peut être expliquée par des facteurs concernant la bactérie et l'amibe elle même. On sait que le mécanisme par lequel *L. pneumophila* échappe à la digestion cellulaire et qui lui permet de se multiplier activement au sein des cellules phagocytaires implique une inhibition de la fusion phagolysosomale,

phénomène démontré par plusieurs auteurs^{47, 159}. Cette inhibition est sous la dépendance du système *dot/icm* de la bactérie qui induit la formation d'un pore invasif dans la membrane de la cellule hôte et la production de molécules effectrices perturbant la maturation endosomale du phagosome¹⁶⁰. La bactérie peut alors se multiplier à l'intérieur des phagosomes réplicatifs qui vont présenter plusieurs caractéristiques morphologiques communes avec le Réticulum Endoplasmique Granuleux. Jusqu'ici, toutes les études qui ont montré un défaut de croissance de *L. pneumophila* au sein des macrophages et/ou des amibes, étaient le fait de mutants bactériens du système Dot/Icm^{15, 160-162}. Jusqu'à présent aucune publication n'a démontré l'existence d'amibes résistant à l'infestation par *L. pneumophila*. En fait, parmi les cinq genres cités par Fields, seuls les deux genres *Hartmannella* et *Acanthamoeba* ont fait l'objet d'expérimentations approfondies et répétées³¹, alors que le genre *Willaertia* étudié ici n'avait jamais été testé pour ses capacités de réplication bactériennes.

Nos résultats montrant une absence de développement notamment de *L. pneumophila* Paris en présence de l'amibe *Willaertia magna* C2c sont donc particulièrement originales. Le caractère apparemment "réfractaire" des *Willaertia* à l'infestation par les *L. pneumophila* pourrait résulter du fait que la bactérie manque spécifiquement des facteurs qui sont nécessaires pour sa croissance au sein de cette amibe. Les observations par microscopie électronique démontrent en effet que la formation de phagosomes réplicatifs par les légionelles est peu fréquente chez *W. magna* C2c.

Les différences observées dans la composition en phospholipides des membranes de *W. magna* pourraient également avoir pour conséquence une efficacité inférieure d'intériorisation bactérienne. La microscopie électronique a démontré la formation de nombreux phagosomes réplicatifs chez *Acanthamoeba* et *Hartmannella* (Table1 ; Papier N°1), mais rarement chez *W. magna* c2c. Des différences morphologiques ont été observés dans l'ultrastructure des phagosomes réplicatifs chez les différents genres amibiens : chez *Willaertia*, les phagosomes réplicatifs sont moins marqués que ceux des espèces amibiennes permissives (*Hartmannella* et *Acanthamoeba*). Les bactéries observées à l'intérieur, ressemblent plus au kyste-like ou à la forme intracellulaire mûre dans les cellules HELA décrite par Garduno et al., qui a proposé que celles-ci puisse être des *L. pneumophila* métaboliquement dormantes¹⁵⁸. Il est ainsi possible que cette morphologie bactérienne particulière puisse être un phénotype d'adaptation à certain environnement cellulaire tel que les amibes du genre *Willaertia*.

De façon générale, nos résultats montrent la résistance marquée de la souche de *W. magna* C2c envers les légionelles. Nos observations se rapprochent de celles réalisées par

Declerck et al., montrant que l'amibe *Naegleria lovaniensis* est moins permissive que *A. castellanii* à l'invasion et à la multiplication des légionelles¹⁷. Toutefois, une prolifération bactérienne était toujours rapportée avec *N. lovaniensis*. Cette observation est particulièrement troublante au regard du fait que cette amibe appartient à la même famille des Vahlkampfiidae que *Willaertia*^{20, 163, 164}. En effet, ces deux genres amibiens partagent plusieurs caractéristiques (pseudopodes éruptifs, division par promitose) qui les différencient clairement des Hartmannellidae et des Acanthamoeba.

Partie II. Les interactions amibiennes et la transmission bactérienne

II.1. Le processus phagocytaire Inter-Amibien

Les amibes libres sont connues pour exercer une prédation sur la flore microbienne dans leur environnement. En plus de leur prédation sur les bactéries, il est établi que les amibes libres peuvent phagocyter et détruire des champignons¹⁶⁵. Un comportement de prédation par phagocytose entre amibes libres n'est jamais évoqué dans la littérature. Une des observations principales de notre étude est la caractérisation d'une phagocytose entre différentes amibes et l'impact que ce phénomène a sur la croissance des légionelles. Nos observations sont les premières démontrant de façon rationnelle une phagocytose inter-amibienne. En fait il faut remonter au début du siècle dernier lorsque Lapage a montré l'existence d'une phagocytose inter-amibienne, avec l'amibe *Vespertilio* qui pouvait ingérer d'autres espèces amibiennes¹⁶⁶. Toutefois l'identité de ces dernières espèces n'avait pas été clairement établie. Plus récemment, Kusch a démontré que l'amibe *proteus* peut développer une stratégie de prédation vers quelques autres protozoaires tels que des ciliées du genre *Euplotes*¹⁶⁷. Toutefois cette prédation se fait par un mécanisme cytotoxique et non par phagocytose.

II.1.a. Cinétique du processus de phagocytose inter-amibienne

La phagocytose des amibes *Hartmannella* par les amibes du genre *Willaertia* ou *Acanthamoeba* débute dans les minutes qui suivent la mise en présence des deux genres amibiens. Microscopiquement, il est parfaitement possible de suivre *in vivo*, l'ingestion des *Hartmannella* par les *Willaertia* et les *Acanthamoeba*. Il n'est pas rare d'observer une cellule de *Willaertia* ou d'*Acanthamoeba* renfermant plusieurs trophozoites d'*Hartmannella* à des stades plus ou moins avancés de digestion (voir Fig. 2. Papier n°2). L'étude cinétique du

phénomène montre qu'au cours du processus phagocytaire on assiste à une disparition très rapide de la population des *Hartmannella* du milieu de culture en 24 heures au profit des populations de *Willaertia* ou d'*Acanthamoeba* (fig. 3 et tableau 1 ; Papier n°2). Ces phénomènes pourraient avoir des conséquences importantes sur l'écologie amibienne dans un biotope donné, et impacter le développement potentiel des légionelles.

II.1.b. Résultats des cocultures tripartites (bi-amibiennes) de *L. pneumophila*

Nous avons alors étudié l'impact de la phagocytose des *H. vermiformis* par *A. castellanii* ou *W. magna* sur la prolifération de la bactérie pathogène. Cet effet est clairement montré dans nos expériences tripartites puisque les résultats de la prolifération bactérienne dépendent fortement des espèces amibiennes en présence dans le milieu de culture (fig. 4 ; Papier n°2). Dans nos conditions expérimentales, la transmission des légionelles à la deuxième amibe a pu se produire par deux processus simultanés :

- ➔ D'abord, par une transmission « directe » de l'infestation par le biais de la phagocytose d'*Hartmannella*, elles-mêmes préalablement infestées, puisqu'au moment de la mise en présence des deux populations amibiennes, les légionelles extracellulaires ont été éliminées par un traitement à la gentamycine (Fig. 2. Papier n°2). L'observation en microscopie électronique TEM (Fig. 2E-F; Papier n°2) a démontré l'ingestion des *H. vermiformis* pré-infectés par les *W. magna* ou *A. Castellanii*. Cependant, nous ne savons pas si les bactéries contenues dans les phagosomes réplicatifs des *H. vermiformis* peuvent ensuite infecter le deuxième hôte amibien.
- ➔ Deuxièmement, par l'intermédiaire d'une transmission « indirecte » de l'infestation par des légionelles extracellulaires libérées à la suite de la lyse nécrotique des *Hartmannella* infestées, ceci avant que l'ensemble de cette population n'ait pu disparaître par phagocytose. Nous avons effectivement rapporté précédemment l'effet cytolytique de *L. pneumophila* Paris envers *H. vermiformis* (Papier N°1) en accord avec d'autres observations rapportées⁵². Or, l'augmentation de la population des *Willaertia* et des *Acanthamoeba*, et le processus phagocytaire qui l'accompagne ne permettent pas la transmission de l'infestation du premier hôte cellulaire au deuxième hôte potentiel, pendant les 24 premières heures de cocultures tripartites où la plupart des *H. vermiformis* ont disparu du milieu de culture (fig. 3 ; Papier n°2).

En conséquence, une amplification de la prolifération des légionelles aurait pu être observée pour les couples *Hartmannella-Acanthamoeba* (fig. 4 ; Papier n°2). Inversement, on constate que la phagocytose par *Willaertia* C2c, a pour effet de bloquer totalement le développement des *L. pneumophila* Paris par rapport à l'évolution constatée pour les couples *Hartmannella-Acanthamoeba* (fig. 4 ; Papier n°2).

Les résultats obtenus en conditions de cocultures tripartites confirment un effet suppressif de la souche *W. magna* C2c contre la croissance de *L. pneumophila* Paris comme précédemment rapporté dans les cocultures mono-amibiennes (Papier n°1). Les cocultures tripartites impliquant successivement deux amibes distinctes prouvent que tous les genres des amibes libre-vivantes n'ont pas la même sensibilité à l'infection par *L. pneumophila*.

Partie III. Rôle des lipides de structures

L'observation majeure réalisée au cours de cette étude comparative est que la composition lipidique de l'espèce *Willaertia* diffère considérablement de celle des autres espèces amibiennes étudiées. Des différences importantes ont en effet pu être démontrées dans la composition en glycosphingolipides neutres, en lipides neutres et en phospholipides. De plus, l'étude de la composition en acides gras de ces derniers lipides de structure démontre des spécificités chez *Willaertia* par rapport aux autres espèces. Ces différences de composition pourraient avoir d'importantes conséquences fonctionnelles quand à la résistance de *Willaertia* à l'infection par les légionelles.

En effet, comme expliqué précédemment (Papier n°1), *Willaertia* est résistante à l'infection par les légionelles, à l'opposé des autres genres amibiens connus. Cette différence fait de *Willaertia*, une espèce à part dans son comportement vis à vis de *Legionella pneumophila*. Les mécanismes permettant d'expliquer cette résistance particulière de *Willaertia* envers les légionelles ne sont pas définis. Ceci est en partie dû au fait que l'espèce *Willaertia* a été très peu étudiée. Ainsi la composition lipidique de cette espèce amibienne n'a à notre connaissance jamais été rapportée. Nous nous sommes donc intéressés à la détermination de la composition en lipides de cette espèce, et nous nous sommes posés la question de savoir s'il existe des particularités dans l'expression de ces molécules qui permettraient d'expliquer en partie pourquoi les légionelles, notamment *L. pneumophila* Paris ne peuvent proliférer au sein des *W. magna* C2c. Les particularités retrouvées dans la composition en lipides de cette dernière espèce pourraient en effet expliquer en partie le comportement particulier de *Willaertia* envers les légionelles.

III. 1. Les Glycosphingolipides neutres et les phospholipides

Certains glycolipides assurent le rôle de récepteur à certaines bactéries, virus et toxines d'origines bactériennes ^{168, 169}. L'expression spécifique de certains glycosphingolipides chez *Willaertia* pourrait avoir des conséquences importantes pour la relation de l'amibe avec la bactérie pathogène. *Willaertia* exprime effectivement un glycosphingolipide migrant comme du globoside, et que l'on ne retrouve pas chez les autres espèces étudiées (Voir Fig. 3 Papier n°3). Des études complémentaires seront nécessaires pour tester cette hypothèse et pour déterminer avec précision l'identité exacte du glycosphingolipide spécifiquement exprimé chez *Willaertia*. Cette différence de composition en glycosphingolipide neutre, suggère que des différences pourraient aussi exister dans l'expression de glycosphingolipides plus complexes par analogie à ceux retrouvés chez les mammifères comme les gangliosides. En effet, ces derniers proviennent du métabolisme des glycosphingolipides « simples » que sont les glycosphingolipides neutres ¹⁷⁰. Il est donc possible que la différence observée dans l'expression de ces derniers glycosphingolipides ne soit le reflet d'une différence de composition en glycolipides plus complexes. Les essais réalisés au cours de cette Thèse visant à déterminer la présence de glycolipides plus complexes et relativement hydrophiles n'ont pas été couronnés de succès.

III.2. Rapport PE/PC

Parmi les différences majeures de composition lipidique que nous avons pu démontrer, la différence d'expression de la phosphatidylcholine et de la phosphatidyléthanolamine entre les espèces amibiennes est particulièrement intéressante. *Willaertia* C2c exprime en effet une proportion élevée de phosphatidylcholine comparé à toutes les autres espèces étudiées. A l'inverse, la proportion de phosphatidyléthanolamine est faible au regard de ce qui a été mesuré dans les espèces *A. castellanii* et *H. vermiformis*. Ces résultats montrent que l'amibe *Willaertia* C2c a un rapport PE/PC relativement faible par rapport aux autres espèces. Hors, il est maintenant bien établi que les proportions de PE/PC définissent en partie la capacité d'une membrane biologique à s'invaginer, phénomène crucial intervenant lors des processus de phagocytose comme lors de l'ingestion des legionelles par les amibes. La phosphatidyléthanolamine est en effet un lipide qui possède la propriété de promouvoir les phénomènes de transition d'une phase bicouche à une phase de type hexagonale, phénomènes biophysiques impliqués dans la fusion et la stabilité membranaire ^{171, 172}. De plus la phosphatidyléthanolamine est nécessaire à l'activité de certaines protéines de la famille Apg. Celles-ci assurent un rôle important dans les phénomènes d'autophagie et

de formation des phagosomes. Ainsi, il a été démontré que la protéine Apg8 nécessite de la PE qui se lie de façon covalente avec elle via le groupement aminé du phospholipide afin d'assurer sa fonction dans les phagosomes. Ce phénomène de lipidation de la protéine par la PE est essentiel dans la dynamique membranaire au cours des phénomènes de phagocytose

120

III.2.a. L'importance de la voie de méthylation PE-PC

L'expression de la phosphatidylcholine et de la phosphatidyléthanolamine en présence de 3-DAA, l'inhibiteur de la méthylation de PE en PC, est fortement altérée chez *Willaertia* C2c. En effet on a observé une baisse de la proportion de phosphatidylcholine comparé à toutes les autres espèces étudiées. Nos données indiquent que la voie de méthylation de la phosphatidyléthanolamine (PE) en phosphatidylcholine (PC) est sans doute très active chez *Willaertia*, ce qui expliquerait pourquoi les niveaux de la PE sont faibles chez cette espèce. Toutefois des études métaboliques seraient nécessaires afin de confirmer ces observations. Ces études métaboliques pourraient être facilement réalisées en marquant les phospholipides à l'aide de précurseurs comme la méthionine, la sérine ou l'éthanolamine tritiée ou marquée au carbone 14.

III.2.b. Effet de l'inhibiteur de la méthylation 3-deazaadenosine

Le 3-Deazaadenosine (3-DAA), l'inhibiteur des S-adénosyl méthionine synthases (les enzymes qui catalysent la biosynthèse de S-adénosyl méthionine, le donneur de groupements méthyles dans la voie de méthylation de la PE en PC), a provoqué l'inhibition de la croissance amibienne.

Ces résultats sont tout à fait comparables à ceux qui ont été précédemment publiés sur l'effet du 3-deazaadenosine. D'après Medzihradsky, le 3-DAA a un effet cytotoxique sur la croissance des érythroblastes et leur pouvoir phagocytaire chez la souris ^{145, 173}. D'autres études ont montré des effets similaires chez les protozoaires du genre *Tetrahymena* ¹⁷⁴ et les neutrophiles humains ¹⁷⁵. Or, nous savons que les S-adénosyl méthionine synthases ont un rôle important dans la croissance et la division cellulaire ^{176, 177}. En plus de leurs rôles physiologiques, les S-adénosyl méthionine synthases (SAMS) jouent un rôle essentiel dans la régulation des interrelations bactérie / cellule hôte comme démontré dans une étude réalisée avec l'amibe *Amoeba proteus* infestée par des bactéries gram-négatives. Les enzymes (SAMS) secrétées par la cellule hôte une fois que la bactérie est ingérée par l'amibe, influent sur les interactions protéines-lipides pendant la répllication bactérienne ^{178, 179}.

III. 3. Acides gras des phospholipides totaux

En plus des différences majeures observées dans la composition relative des phospholipides, les compositions en acide gras sont très différentes suivant les espèces comme démontrées dans la table 1 (Papier n°3). Encore une fois, *Willaertia* exprime une composition en acides gras de ses phospholipides totaux différente des autres espèces. Cette différence pourrait-elle être due au fait que les *Willaertia* ont un rapport PC/PE beaucoup plus élevé que chez les autres espèces. Cependant, il n'est pas illogique de penser que la différence de composition en acides gras des différentes espèces reflète la composition relative en phospholipides. En effet, il a été démontré que chez *Acanthamoeba*, la PE est essentiellement composé de l'acide gras 18:1 ω 9, alors que la PC exprime une quantité beaucoup plus faible de cet acide gras⁵⁸. Hors, *Acanthamoeba* et *Hartmanella* ont une composition des phospholipides en 18:1 ω 9 relativement identique. Ainsi, l'augmentation de la proportion de PC chez *Willaertia*, PC qui est moins riche en 18:1 ω 9 que la PE, devrait résulter en une diminution de la quantité de cet acide gras retrouvée dans les phospholipides totaux. Il est donc probable, que la différence observée en termes d'expression des acides gras reflète la composition relative en termes de phospholipides.

Les différences de composition en acide gras que nous avons observé entre les différentes espèces est très intéressante de par le fait que, a notre connaissance, toutes les études réalisées sur ce sujet et chez les amibes libres ont démontré des compositions relativement identiques d'une espèce à l'autre. Ainsi, Thomas et al., ont rapporté la composition en acides gras des phospholipides de l'espèce *Acanthamoeba castellanii*¹⁸⁰. La composition en acide gras publiée dans cette étude est très similaire à celle que nous rapportons maintenant sur notre souche d'*Acanthamoeba*. Les différences de composition en acide gras entre *Willaertia* et les autres espèces étudiées dans notre étude, pourraient avoir des conséquences fonctionnelles très importantes dans le comportement des espèces d'amibes envers les légionelles. En effet, il est bien démontré, que la composition en acide gras des lipides membranaires détermine en partie les propriétés biophysiques des membranes biologiques comme la fluidité et l'interaction des lipides de structure avec les protéines membranaires. Hors, des modifications affectant ces derniers phénomènes interviennent certainement au cours des processus de phagocytose des légionelles par les amibes. Il sera donc intéressant de déterminer si une modification de l'expression des acides gras dans les phospholipides pourrait influencer sur le pouvoir infectieux des légionelles chez *Willaertia*.

Partie IV. Effet des endocannabinoïdes

IV.1. Inhibition de la croissance amibienne en présence des endocannabinoïdes

Les résultats expérimentaux montrent que les différents endocannabinoïdes utilisés peuvent moduler la croissance amibienne. L'étude cinétique montre qu'à partir du deuxième jour, on assiste à une décroissance très rapide de la population de différentes amibes, celles-ci chutant de plus de 90% chez *W. magna*. Nos observations sont en accord avec certaines études où il a été démontré que des cannabinoïdes dont le Δ^9 -tétrahydrocannabinol (THC) peuvent inhiber la croissance de protozoaires, comme l'amibe *Naegleria fowleri* et *Tetrahymena*^{149, 150}.

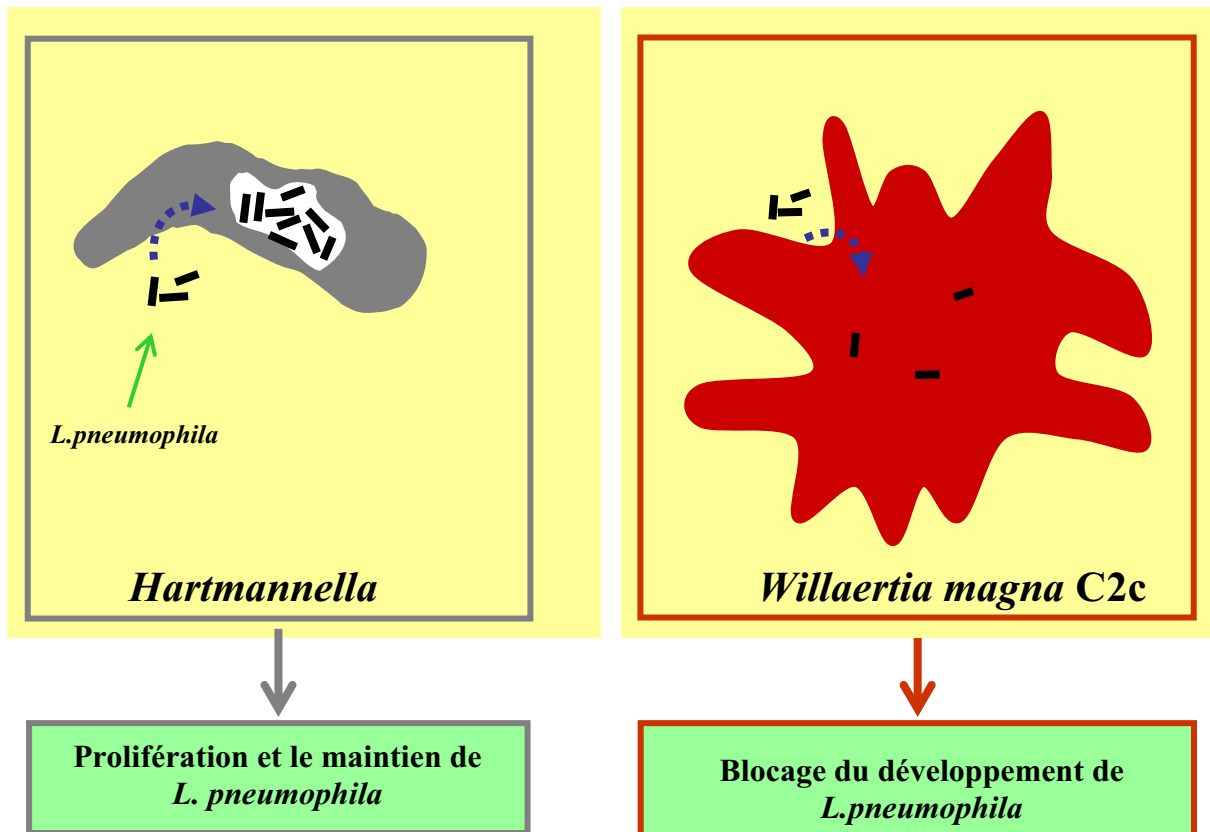
Bien que les fonctions physiologiques exactes de ces endocannabinoïdes restent indéfinies chez les amibes ils sont néanmoins exprimés chez certains protozoaires. Nous n'avons pu démontrer l'expression d'endocannabinoïdes dans les modèles amibiens utilisés dans nos études. De la même façon nous n'avons pu démontrer la présence éventuelle de *N*-acyl phosphatidyléthanolamine le précurseur de certains des endocannabinoïdes que nous avons utilisé. Lors de l'analyse des phospholipides nous n'avons pu retrouver ce phospholipide alors que certains auteurs mentionnent qu'une part importante des phospholipides exprimés chez certains protozoaires est représentée par cette molécule^{126, 148}. En fait nous savons maintenant que cela est lié à la procédure analytique que nous avons employée. En effet lors de la séparation des phospholipides par chromatographie sur couche mince double dimension, la NAPE migre avec le DPG et les lipides neutres et n'a donc pu être discriminée de ces lipides. Le dosage de la NAPE dans nos modèles amibiens demandera donc un développement technique à ce niveau.

Conclusions & Perspectives

Conclusions illustrées

1

Cocultures mono-amibiennes de *L. pneumophila*



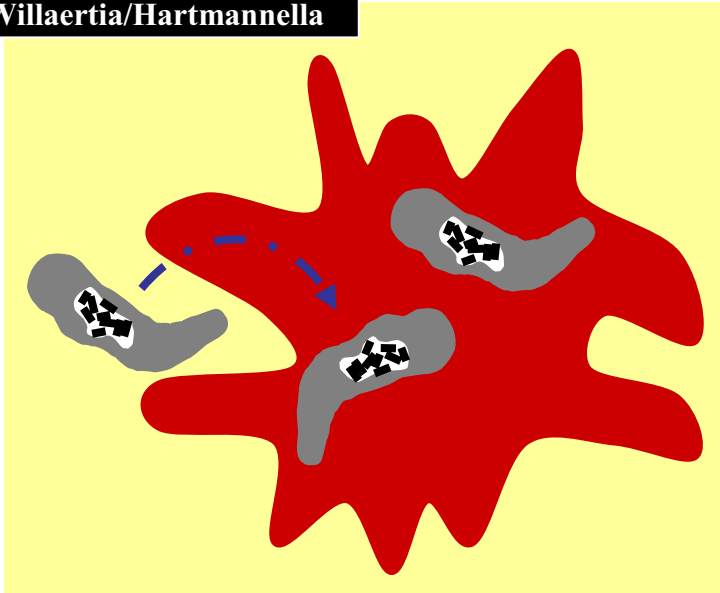
La croissance du *L. pneumophila* dépend de la souche bactérienne en elle-même et de l'espèce amibienne.

Nos résultats suggèrent également que la souche *W. Magna c2c* peut être un modèle utile pour étudier les mécanismes de la résistance cellulaire vis-à-vis des légionelles.

2

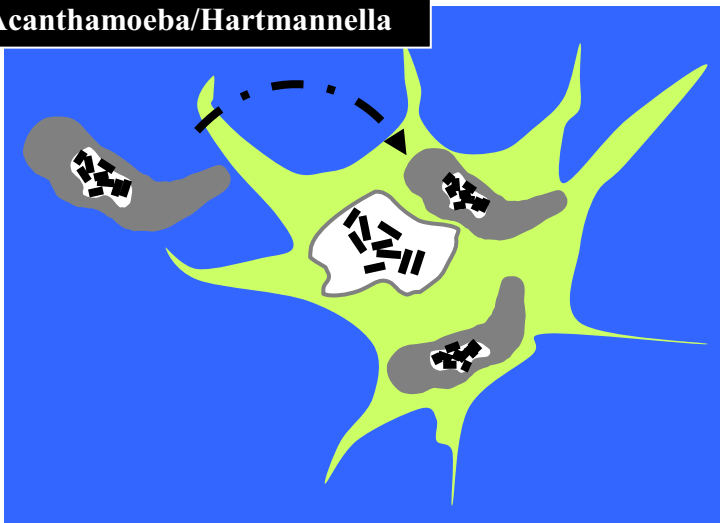
Effet de la phagocytose inter-amibienne

Willaertia/Hartmannella



Arrêt du développement de *L. pneumophila* à la suite de la phagocytose des *Hartmannella* par les *Willaertia*.

Acanthamoeba/Hartmannella

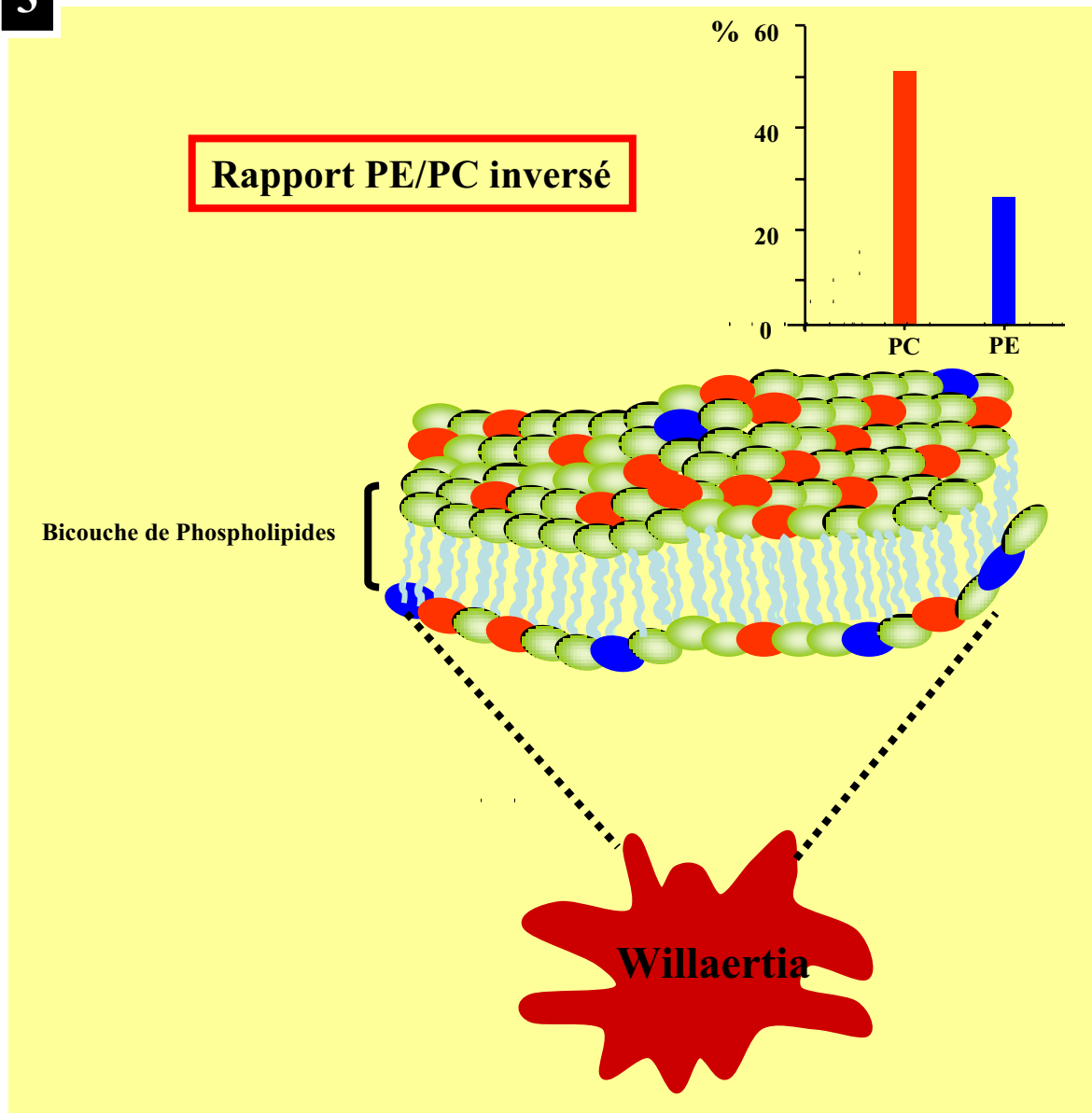


Développement de *L. pneumophila* à la suite de la phagocytose des *Hartmannella* par les *Acanthamoeba*.

En raison de la phagocytose exercée contre un des principaux vecteurs du *L. pneumophila*, les *Willaertia* ont pu être testées dans une perspective de lutte biologique pour réduire le degré de contamination d'un milieu aquatique par *L. pneumophila*.

Globalement, ces résultats nous permettent d'apporter un meilleur éclairage sur les interactions entre les différents taxa de la faune microbienne et amibienne qui, dans une chaîne trophique, peuvent influencer sur la densité et la distribution des bactéries pathogènes dans l'environnement aquatique.

3



L'espèce *Willaertia magna* C2c, diffère considérablement des autres espèces ambiennes étudiées.

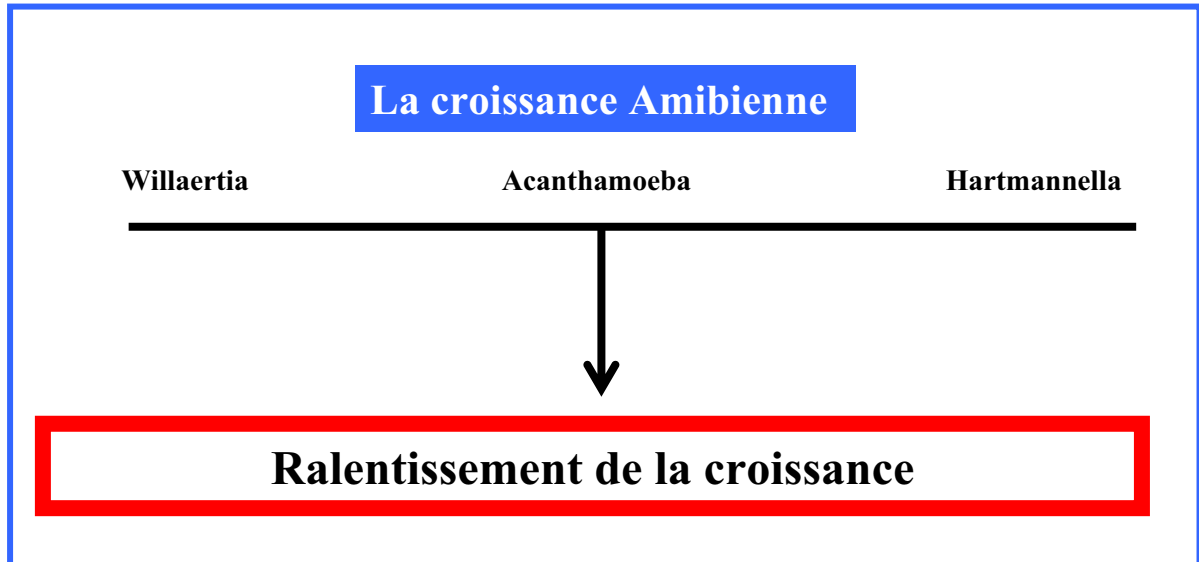
Des différences majeures ont été mises en évidence au niveau de la composition en:

- Glycosphingolipides neutres.
- Lipides neutres.
- Phospholipides.
- Acides gras.

De plus, nos données indiquent que la voie de méthylation de la PE en PC est plus active chez *Willaertia* que chez les autres espèces d'amibes. Cela pourrait participer à la résistance des *Willaertia* que nous avons observé envers les légionelles.

4

Effet des Endocannabinoïdes et du 3-deazadenosine



Perspectives

I. *Willaertia magna* pour la lutte biologique contre les légionelles ?

Il est aujourd'hui reconnu que les amibes libres jouent le rôle de vecteurs grâce auxquels les légionelles se développent et se propagent dans l'environnement. À ce jour, les techniques utilisées pour lutter contre les légionelles font appel à des traitements physiques (rayons UV, chocs thermiques) ou à des traitements chimiques, ces derniers étant de loin les plus utilisés. Néanmoins, ces traitements ne donnent pas entière satisfaction car ils permettent seulement d'éliminer provisoirement les bactéries planctoniques de *L. pneumophila* présentes à l'état libre dans le milieu traité, mais s'avèrent inefficaces vis à vis des bactéries présentes et protégées à l'intérieur des amibes. Ces dernières protègent en effet les légionelles de l'action des biocides, d'autant que les amibes possèdent une capacité de s'enkyster. De plus les industriels se trouvent confrontés au durcissement des réglementations visant à limiter les

rejets de produits biocides depuis leurs infrastructures, les produits biocides utilisés actuellement étant très toxiques, oxydants et inflammables pour certains.

Dans ce contexte les propriétés originales de la souche *W. magna* C2c nous ont amené à émettre l'idée que ces amibes pourraient-être utilisées dans la cadre d'un processus de lutte biologique contre les légionelles. L'action de l'amibe *Willaertia* se fait à deux niveaux : en s'attaquant à la bactérie elle-même et en phagocytant d'autres espèces d'amibes qui sont connues pour être des vecteurs de la bactérie dans les circuits d'eaux chaudes.

Cette idée s'est concrétisée par un dépôt de brevet international intitulée « ***Nouveau procédé de lutte biologique contre la prolifération de legionella Pneumophila, et nouvel agent désinfectant contenant des protozoaires amibiens du genre Willaertia*** », déposé le 12 octobre 2007 sous le numéro [PCT/FR2007/052131](#) (cf. Annexe). Le procédé pourrait trouver des applications dans la désinfection des réseaux d'eaux industrielles, des circuits de refroidissements des installations industrielles, ou des réseaux de climatisation. En particulier, le procédé selon l'invention pourra être mis en œuvre, par adjonction d'amibes *Willaertia*, pour lutter au sein des biofilms contre la prolifération de *L. pneumophila* dans les canalisations d'eaux, ces biofilms étant un lieu de développement de différentes espèces d'amibes. L'agent biologique correspond à deux souches amibiennes appartenant à l'espèce *Willaertia magna* déposées auprès de l'ATCC et enregistrées sous les numéros N° [PTA-7824](#) et N° [PTA-7825](#). Ces souches font partie intégrante de l'invention.

Bien entendu, le chemin à parcourir entre les résultats obtenus au laboratoire et l'application de terrain demandera de nombreuses validations et essais y compris pour répondre à la réglementation européenne sur les produits biocides. Pour cette dernière par exemple, des tests de toxicologie et d'écotoxicologie poussés doivent être entrepris.

II. *Willaertia magna* : un modèle cellulaire original pour comprendre les mécanismes régulant les relations hôtes / parasite

Au terme de cette étude, nous sommes convaincus que l'amibe *W. magna* constitue un modèle cellulaire original qui pourrait nous permettre de mieux comprendre les mécanismes régulant les relations hôte – parasite. En effet la souche C2c possède la capacité unique à nos jours de résister aux légionelles, alors que tous les cas de résistance cellulaire connus pour les

légionelles sont le fait de mutants de la bactérie. Certaines questions méritent une attention particulière :

Sur un plan cellulaire, il sera intéressant de vérifier si cette résistance à l'infestation correspond à une fusion phagolysosomale normale qui pourrait être démontrée:

- ✓ par la mise en évidence d'une activité phosphatasique acide dans les phagosomes
- ✓ par un pré-marquage des endosomes avant l'infestation des amibes par *L. pneumophila*, soit avec du dioxyde de thorium dans le cas d'une étude ultrastructurale ¹⁵⁹, ou avec le jaune Lucifer en vue d'un double marquage fluorescent utilisant d'autre part la rhodamine pour marquer les légionelles ¹⁸¹.

Cette approche permettrait de vérifier s'il se produit chez *Willaertia* une co-localisation des lysosomes avec les phagosomes.

Sur un plan moléculaire il sera intéressant d'utiliser des mutants de *L. pneumophila* et de voir comment ces mutations impactent la capacité des légionelles à infestée la souche C2c.

L'approche moléculaire devrait aussi nous permettre de mieux cerner les fonctions que certains lipides de structure pourraient jouer dans la résistance de *W. magna* C2c envers certaines souches bactériennes. Que devient la résistance de l'amibe si nous surexprimons les activités de biosynthèses de PC par la voie de méthylation ? Que se passe t-il si nous parvenons à inhiber l'expression des gènes codant les deux PE *N*-méthyl transférases ?

Les gènes codant les PE *N*-méthyl transférases ont déjà été clonés et caractérisés chez certaines espèces (bactéries, levure, plantes, poisson, rat, souris, homme) ¹⁸²⁻¹⁸⁶. De plus le génome a été séquencé chez l'amibe *Dictyostelium* ⁵.

Ces différentes données devraient nous permettre de caractériser les gènes codant ces protéines chez *Willaertia magna*.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. Foster, M. A Text Book of Physiology. *Mac-Millan and Co.*, 14 (1880).
2. Reynolds, A. Amoebae as Exemplary Cells: The Protean Nature of an Elementary Organism. *Journal of the History of Biology* **41**, 307–337 (2008).
3. Marciano-Cabral, F. & Cabral, G. Acanthamoeba spp. as agents of disease in humans. *Clin Microbiol Rev* **16**, 273-307 (2003).
4. Williams, R.S. et al. Towards a molecular understanding of human diseases using *Dictyostelium discoideum*. *Trends Mol Med* **12**, 415-424 (2006).
5. Eichinger, L. et al. The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature* **435**, 43-57 (2005).
6. Hagele, S., R. Kohler, H. Merkert, M. Schleicher, J. Hacker, and M. Steinert *Dictyostelium discoideum*: a new host model system for intracellular pathogens of the genus *Legionella*. *Cell. Microbiol* **2**, 165-171 (2000).
7. Solomon, J.M., Leung, G.S. & Isberg, R.R. Intracellular replication of *Mycobacterium marinum* within *Dictyostelium discoideum*: efficient replication in the absence of host coronin. *Infect Immun* **71**, 3578-3586 (2003).
8. Ormerod, W.E. & Venkatesan, S. Similarities of lipid metabolism in mammalian and protozoan cells: an evolutionary hypothesis for the prevalence of atheroma. *Microbiol Rev* **46**, 296-307 (1982).
9. Adosraku, R.K., Smith, J.D., Nicolaou, A. & Gibbons, W.A. *Tetrahymena thermophila*: analysis of phospholipids and phosphonolipids by high-field ¹H-NMR. *Biochim Biophys Acta* **1299**, 167-174 (1996).
10. Smith, J.D. Phospholipid biosynthesis in protozoa. *Prog Lipid Res* **32**, 47-60 (1993).
11. Thilo, L. Quantification of endocytosis-derived membrane traffic. *Biochim Biophys Acta* **822**, 243-266 (1985).
12. Rapport-AFSSET *Evaluation des risques sanitaires liés aux proliférations de Legionella dans l'eau des tours aérorefrigérantes des centres nucléaires de production électrique d'EDF*. *afssset* (2006).
13. Rowbotham, T.J. Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J Clin Pathol* **33**, 1179-1183 (1980).
14. Neumeister, B. et al. Influence of *Acanthamoeba castellanii* on intracellular growth of different *Legionella* species in human monocytes. *Appl Environ Microbiol* **66**, 914-919 (2000).

15. Gao, L.Y., Harb, O.S. & Abu Kwaik, Y. Utilization of similar mechanisms by *Legionella pneumophila* to parasitize two evolutionarily distant host cells, mammalian macrophages and protozoa. *Infect Immun* **65**, 4738-4746 (1997).
16. Segal, G., Russo, J.J. & Shuman, H.A. Relationships between a new type IV secretion system and the icm/dot virulence system of *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol* **34**, 799-809 (1999).
17. Declerck, P. et al. Impact of non-*Legionella* bacteria on the uptake and intracellular replication of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* and *Naegleria lovaniensis*. *Microb Ecol* **50**, 536-549 (2005).
18. Greub, G. & Raoult, D. Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin Microbiol Rev* **17**, 413-433 (2004).
19. Rivera, F. et al. Amoebae isolated from the atmosphere of Mexico City and environs. *Environ Res* **42**, 149-154 (1987).
20. De Jonckheere, J.F., Dive, D., Pussard, M. & Vickerman, K. *Willaertia magna* gen. nov., sp. nov. (*Vahlkampfiidae*), a thermophilic amoeba found in different habitats. *Protistologica* **20**, 5-13 (1984).
21. Smirnov, A.V., Nasonova, E.S., Chao, E. & Cavalier-Smith, T. Phylogeny, evolution, and taxonomy of vannellid amoebae. *Protist* **158**, 295-324 (2007).
22. Houssay, D. & Prenant, M. [Microsurgical technics in the determination of the respective roles of the nucleus and of cytoplasm in the growth and duration of interphase of *Thecamoeba sphaeronucleolus*]. *Exp Cell Res* **61**, 347-356 (1970).
23. Abu Kwaik, Y., Gao, L.Y., Stone, B.J., Venkataraman, C. & Harb, O.S. Invasion of protozoa by *Legionella pneumophila* and its role in bacterial ecology and pathogenesis. *Appl Environ Microbiol* **64**, 3127-3133 (1998).
24. Park, M.Y., Ko, K.S., Lee, H.K., Park, M.S. & Kook, Y.H. *Legionella busanensis* sp. nov., isolated from cooling tower water in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 77-80 (2003).
25. Fliermans, C.B. Ecology of *Legionella*: From Data to Knowledge with a Little Wisdom. *Microb Ecol* **32**, 203-228 (1996).
26. Rowbotham, T.J. Isolation of *Legionella pneumophila* from clinical specimens via amoebae, and the interaction of those and other isolates with amoebae. *J Clin Pathol* **36**, 978-986 (1983).
27. Adeleke, A. et al. *Legionella*-like amebal pathogens--phylogenetic status and possible role in respiratory disease. *Emerg Infect Dis* **2**, 225-230 (1996).
28. Marrie, T.J., Raoult, D., La Scola, B., Birtles, R.J. & de Carolis, E. *Legionella*-like and other amoebal pathogens as agents of community-acquired pneumonia. *Emerg Infect Dis* **7**, 1026-1029 (2001).

29. Barbeau, J., Gauthier, C. & Payment, P. Biofilms, infectious agents, and dental unit waterlines: a review. *Can J Microbiol* **44**, 1019-1028 (1998).
30. Ruehlemann, S.A. & Crawford, G.R. Panic in the potting shed. The association between *Legionella longbeachae* serogroup 1 and potting soils in Australia. *Med J Aust* **164**, 36-38 (1996).
31. Fields, B.S. The molecular ecology of legionellae. *Trends Microbiol* **4**, 286-290 (1996).
32. Schwartz, T., Hoffmann, S. & Obst, U. Formation of natural biofilms during chlorine dioxide and u.v. disinfection in a public drinking water distribution system. *J Appl Microbiol* **95**, 591-601 (2003).
33. Barbaree, J.M., Fields, B.S., Feeley, J.C., Gorman, G.W. & Martin, W.T. Isolation of protozoa from water associated with a legionellosis outbreak and demonstration of intracellular multiplication of *Legionella pneumophila*. *Appl Environ Microbiol* **51**, 422-424 (1986).
34. Breiman, R.F. et al. Association of shower use with Legionnaires' disease. Possible role of amoebae. *JAMA* **263**, 2924-2926 (1990).
35. Sanden, G.N., Morrill, W.E., Fields, B.S., Breiman, R.F. & Barbaree, J.M. Incubation of water samples containing amoebae improves detection of legionellae by the culture method. *Appl Environ Microbiol* **58**, 2001-2004 (1992).
36. Steinert, M., Emody, L., Amann, R. & Hacker, J. Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. *Appl. Environ. Microbiol* **63**, 2047-2053 (1997).
37. Cirillo, J.D., Falkow, S. & Tompkins, L.S. Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion. *Infect Immun* **62**, 3254-3261 (1994).
38. Brieland, J.K. et al. Humoral immunity and regulation of intrapulmonary growth of *Legionella pneumophila* in the immunocompetent host. *J Immunol* **157**, 5002-5008 (1996).
39. Brieland, J. et al. Coinoculation with *Hartmannella vermiformis* enhances replicative *Legionella pneumophila* lung infection in a murine model of Legionnaires' disease. *Infect Immun* **64**, 2449-2456 (1996).
40. Berk, S.G., Ting, R.S., Turner, G.W. & Ashburn, R.J. Production of respirable vesicles containing live *Legionella pneumophila* cells by two *Acanthamoeba* spp. *Appl Environ Microbiol* **64**, 279-286 (1998).
41. Venkataraman, C., Haack, B.J., Bondada, S. & Abu Kwaik, Y. 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**, 537-547 (1997).

42. Venkataraman, C., Gao, L.Y., Bondada, S. & Kwaik, Y.A. Identification of putative cytoskeletal protein homologues in the protozoan host *Hartmannella vermiformis* as substrates for induced tyrosine phosphatase activity upon attachment to the Legionnaires' disease bacterium, *Legionella pneumophila*. *J Exp Med* **188**, 505-514 (1998).
43. Harb, O.S., Venkataraman, C., Haack, B.J., Gao, L.Y. & Kwaik, Y.A. Heterogeneity in the attachment and uptake mechanisms of the Legionnaires' disease bacterium, *Legionella pneumophila*, by protozoan hosts. *Appl Environ Microbiol* **64**, 126-132 (1998).
44. Horwitz, M.A. Phagocytosis of the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) occurs by a novel mechanism: engulfment within a pseudopod coil. *Cell* **36**, 27-33 (1984).
45. Cirillo, S.L., Lum, J. & Cirillo, J.D. Identification of novel loci involved in entry by *Legionella pneumophila*. *Microbiology* **146 (Pt 6)**, 1345-1359 (2000).
46. Abu Kwaik, Y. The phagosome containing *Legionella pneumophila* within the protozoan *Hartmannella vermiformis* is surrounded by the rough endoplasmic reticulum. *Appl Environ Microbiol* **62**, 2022-2028 (1996).
47. Bozue, J.A. & Johnson, W. Interaction of *Legionella pneumophila* with *Acanthamoeba castellanii*: uptake by coiling phagocytosis and inhibition of phagosome-lysosome fusion. *Infect Immun* **64**, 668-673 (1996).
48. Segal, G. & Schuman, H.A. How is the intracellular fate of the legionella pneumophila phagosome determined ? *Trends Microbiol* **6**, 253-255 (1998).
49. Vogel, J.P. & Isberg, R.R. Cell biology of *Legionella pneumophila*. *Curr Opin Microbiol* **2**, 30-34 (1999).
50. Bardill, J.P., Miller, J.L. & Vogel, J.P. IcmS-dependent translocation of SdeA into macrophages by the *Legionella pneumophila* type IV secretion system. *Mol Microbiol* **56**, 90-103 (2005).
51. Molmeret, M., Bitar, D.M., Han, L. & Kwaik, Y.A. Cell biology of the intracellular infection by *Legionella pneumophila*. *Microbes Infect* **6**, 129-139 (2004).
52. Gao, L.Y. & Abu Kwaik, Y. The mechanism of killing and exiting the protozoan host *Acanthamoeba polyphaga* by *Legionella pneumophila*. *Environ Microbiol* **2**, 79-90 (2000).
53. Harb, O.S., Gao, L.Y. & Abu Kwaik, Y. From protozoa to mammalian cells: a new paradigm in the life cycle of intracellular bacterial pathogens. *Environ Microbiol* **2**, 251-265 (2000).
54. Farooqui, A.A., Horrocks, L.A. & Farooqui, T. Deacylation and reacylation of neural membrane glycerophospholipids. *J Mol Neurosci* **14**, 123-135 (2000).

55. Kent, C. Eukaryotic phospholipid biosynthesis. *Annu Rev Biochem* **64**, 315-343 (1995).
56. Lykidis, A. Comparative genomics and evolution of eukaryotic phospholipid biosynthesis. *Prog Lipid Res* **46**, 171-199 (2007).
57. Fadeel, B. & Xue, D. The ins and outs of phospholipid asymmetry in the plasma membrane: roles in health and disease. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **44**, 264-277 (2009).
58. Ulsamer, A.G., Smith, F.R. & Korn, E.D. Lipids of *Acanthamoeba castellanii*. Composition and effects of phagocytosis on incorporation of radioactive precursors. *J Cell Biol* **43**, 105-114 (1969).
59. Chang, Y.F. & Carman, G.M. CTP synthetase and its role in phospholipid synthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog Lipid Res* **47**, 333-339 (2008).
60. Kuge, O., Nishijima, M. & Akamatsu, Y.A. Chinese hamster cDNA encoding a protein essential for phosphatidylserine synthase I activity. *J. Biol. Chem.*, 24184-24189 (1991).
61. Nishijima, M., Kuge, O. & Akamatsu, Y. Phosphatidylserine biosynthesis in cultured Chinese hamster ovary cells. I. Inhibition of de novo phosphatidylserine biosynthesis by exogenous phosphatidylserine and its efficient incorporation. *The Journal of biological chemistry* **261**, 5784-5789 (1986).
62. Vermeulen, P.S., Tijburg, L.B., Geelen, M.J. & van Golde, L.M. Immunological characterization, lipid dependence, and subcellular localization of CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase purified from rat liver. Comparison with CTP:phosphocholine cytidyltransferase. *The Journal of biological chemistry* **268**, 7458-7464 (1993).
63. Arondel, V., Benning, C. & Somerville, C.R. Isolation and functional expression in *Escherichia coli* of a gene encoding phosphatidylethanolamine methyltransferase (EC 2.1.1.17) from *Rhodobacter sphaeroides*. *The Journal of biological chemistry* **268**, 16002-16008 (1993).
64. Carman, G.M. & Zeimet, G.M. Regulation of phospholipid biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* **271**, 13293-13296 (1996).
65. Testerink, N., van der Sanden, M.M., Houweling, M., Helms, J.B. & Vaandrager, A.B. Depletion of phosphatidylcholine affects ER morphology and protein traffic at the Golgi complex. *J Lipid Res* (2009).
66. Sriburi, R. et al. Coordinate regulation of phospholipid biosynthesis and secretory pathway gene expression in XBP-1(S)-induced endoplasmic reticulum biogenesis. *The Journal of biological chemistry* **282**, 7024-7034 (2007).

67. Gaits, F. et al. Lysophosphatidic acid as a phospholipid mediator: pathways of synthesis. *FEBS Lett* **410**, 54-58 (1997).
68. Landry, Y., Niederhoffer, N., Sick, E. & Gies, J.P. Heptahelical and other G-protein-coupled receptors (GPCRs) signaling. *Curr Med Chem* **13**, 51-63 (2006).
69. Barbour, S.E. & Marciano-Cabral, F. *Naegleria fowleri* amoebae express a membrane-associated calcium-independent phospholipase A(2). *Biochim Biophys Acta* **1530**, 123-133 (2001).
70. Barbour, S.E., Kapur, A. & Deal, C.L. Regulation of phosphatidylcholine homeostasis by calcium-independent phospholipase A2. *Biochim Biophys Acta* **1439**, 77-88 (1999).
71. Pertwee, R.G. Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Ther* **74**, 129-180 (1997).
72. Pertwee, R.G. Pharmacological, physiological and clinical implications of the discovery of cannabinoid receptors. *Biochem Soc Trans* **26**, 267-272 (1998).
73. Consroe, P. Brain cannabinoid systems as targets for the therapy of neurological disorders. *Neurobiol Dis* **5**, 534-551 (1998).
74. Szallasi, A. & Fowler, C.J. After a decade of intravesical vanilloid therapy: still more questions than answers. *Lancet Neurol* **1**, 167-172 (2002).
75. Hansen, H.S., Moesgaard, B., Petersen, G. & Hansen, H.H. Putative neuroprotective actions of N-acyl-ethanolamines. *Pharmacol Ther* **95**, 119-126 (2002).
76. Hill, M.N. et al. The therapeutic potential of the endocannabinoid system for the development of a novel class of antidepressants. *Trends Pharmacol Sci* **30**, 484-493 (2009).
77. Cabral, G.A., Raborn., E.S., Griffin., L., Dennis., J. & Marciano-Cabral, F. CB2 receptors in the brain: role in central immune function. *Br J Pharmacol.* **153**, 240-251 (2008).
78. Bradshaw, H.B., Rimmerman, N., Hu, S.S., Burstein, S. & Walker, J.M. Novel endogenous N-acyl glycines identification and characterization. *Vitam Horm* **81**, 191-205 (2009).
79. Burstein, S.H. & Zurier, R.B. Cannabinoids, endocannabinoids, and related analogs in inflammation. *Aaps J* **11**, 109-119 (2009).
80. Lehner, R., Kuksis, A. & Itabashi, Y. Stereospecificity of monoacylglycerol and diacylglycerol acyltransferases from rat intestine as determined by chiral phase high-performance liquid chromatography. *Lipids* **28**, 29-34 (1993).
81. Devane, W.A. et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* **258**, 1946-1949 (1992).

82. Stella, N., Schweitzer, P. & Piomelli, D. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature* **388**, 773-778 (1997).
83. Okamoto, Y. et al. Mammalian cells stably overexpressing N-acylphosphatidylethanolamine-hydrolysing phospholipase D exhibit significantly decreased levels of N-acylphosphatidylethanolamines. *Biochem J* **389**, 241-247 (2005).
84. Cadas, H., Gaillet, S., Beltramo, M., Venance, L. & Piomelli, D. Biosynthesis of an endogenous cannabinoid precursor in neurons and its control by calcium and cAMP. *J Neurosci* **16**, 3934-3942 (1996).
85. Cadas, H., Schinelli, S. & Piomelli, D. Membrane localization of N-acylphosphatidylethanolamine in central neurons: studies with exogenous phospholipases. *J Lipid Mediat Cell Signal* **14**, 63-70 (1996).
86. Cadas, H., di Tomaso, E. & Piomelli, D. Occurrence and biosynthesis of endogenous cannabinoid precursor, N-arachidonoyl phosphatidylethanolamine, in rat brain. *J Neurosci* **17**, 1226-1242 (1997).
87. Astarita, G., Ahmed, F. & Piomelli, D. Identification of biosynthetic precursors for the endocannabinoid anandamide in the rat brain. *J Lipid Res* **49**, 48-57 (2008).
88. Wang, J. et al. Functional analysis of the purified anandamide-generating phospholipase D as a member of the metallo-beta-lactamase family. *The Journal of biological chemistry* **281**, 12325-12335 (2006).
89. Simon, G.M. & Cravatt, B.F. Endocannabinoid biosynthesis proceeding through glycerophospho-N-acyl ethanolamine and a role for alpha/beta-hydrolase 4 in this pathway. *The Journal of biological chemistry* **281**, 26465-26472 (2006).
90. Sun, Y.X. et al. Biosynthesis of anandamide and N-palmitoylethanolamine by sequential actions of phospholipase A2 and lysophospholipase D. *Biochem J* **380**, 749-756 (2004).
91. Liu, J. et al. A biosynthetic pathway for anandamide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 13345-13350 (2006).
92. Liu, J. et al. Multiple pathways involved in the biosynthesis of anandamide. *Neuropharmacology* **54**, 1-7 (2008).
93. Bisogno, T. et al. Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. *J Cell Biol* **163**, 463-468 (2003).
94. Sugiura, T., Kishimoto, S., Oka, S. & Gokoh, M. Biochemistry, pharmacology and physiology of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand. *Prog Lipid Res* **45**, 405-446 (2006).

95. Nakane, S. et al. 2-Arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphate, an arachidonic acid-containing lysophosphatidic acid: occurrence and rapid enzymatic conversion to 2-arachidonoyl-sn-glycerol, a cannabinoid receptor ligand, in rat brain. *Arch Biochem Biophys* **402**, 51-58 (2002).
96. Piomelli, D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci* **4**, 873-884 (2003).
97. Beltramo, M. et al. Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science* **277**, 1094-1097 (1997).
98. Cravatt, B.F. et al. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature* **384**, 83-87 (1996).
99. Wei, B.Q., Mikkelsen, T.S., McKinney, M.K., Lander, E.S. & Cravatt, B.F. A second fatty acid amide hydrolase with variable distribution among placental mammals. *The Journal of biological chemistry* **281**, 36569-36578 (2006).
100. Kozak, K.R. & Marnett, L.J. Oxidative metabolism of endocannabinoids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **66**, 211-220 (2002).
101. Ueda, N. et al. Lipoxygenase-catalyzed oxygenation of arachidonylethanolamide, a cannabinoid receptor agonist. *Biochim Biophys Acta* **1254**, 127-134 (1995).
102. Blankman, J.L., Simon, G.M. & Cravatt, B.F. A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Chem Biol* **14**, 1347-1356 (2007).
103. Dinh, T.P. et al. Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 10819-10824 (2002).
104. Kozak, K.R., Rowlinson, S.W. & Marnett, L.J. Oxygenation of the endocannabinoid, 2-arachidonoylglycerol, to glyceryl prostaglandins by cyclooxygenase-2. *The Journal of biological chemistry* **275**, 33744-33749 (2000).
105. Kozak, K.R., Prusakiewicz, J.J. & Marnett, L.J. Oxidative metabolism of endocannabinoids by COX-2. *Curr Pharm Des* **10**, 659-667 (2004).
106. Kozak, K.R. et al. Metabolism of the endocannabinoids, 2-arachidonoylglycerol and anandamide, into prostaglandin, thromboxane, and prostacyclin glycerol esters and ethanolamides. *The Journal of biological chemistry* **277**, 44877-44885 (2002).
107. Kozak, K.R. et al. Metabolism of prostaglandin glycerol esters and prostaglandin ethanolamides in vitro and in vivo. *The Journal of biological chemistry* **276**, 36993-36998 (2001).
108. Weber, S.S., Ragaz, C. & Hilbi, H. Pathogen trafficking pathways and host phosphoinositide metabolism. *Mol Microbiol* **71**, 1341-1352 (2009).

109. Hilbi, H. Modulation of phosphoinositide metabolism by pathogenic bacteria. *Cellular microbiology* **8**, 1697-1706 (2006).
110. Yeung, T. et al. Receptor activation alters inner surface potential during phagocytosis. *Science* **313**, 347-351 (2006).
111. De Camilli, P., Emr, S.D., McPherson, P.S. & Novick, P. Phosphoinositides as regulators in membrane traffic. *Science* **271**, 1533-1539 (1996).
112. Weber, S.S., Ragaz, C., Reus, K., Nyfeler, Y. & Hilbi, H. Legionella pneumophila exploits PI(4)P to anchor secreted effector proteins to the replicative vacuole. *PLoS pathogens* **2**, e46 (2006).
113. Ragaz, C. et al. The Legionella pneumophila phosphatidylinositol-4 phosphate-binding type IV substrate SidC recruits endoplasmic reticulum vesicles to a replication-permissive vacuole. *Cellular microbiology* **10**, 2416-2433 (2008).
114. Brombacher, E. et al. Rab1 guanine nucleotide exchange factor SidM is a major phosphatidylinositol 4-phosphate-binding effector protein of Legionella pneumophila. *The Journal of biological chemistry* **284**, 4846-4856 (2009).
115. Yeung, T. et al. Contribution of phosphatidylserine to membrane surface charge and protein targeting during phagosome maturation. *J Cell Biol* **185**, 917-928 (2009).
116. Plotkowski, M.C. & Meirelles, M.N. Concomitant endosome-phagosome fusion and lysis of endosomal membranes account for Pseudomonas aeruginosa survival in human endothelial cells. *J Submicrosc Cytol Pathol* **29**, 229-237 (1997).
117. Banerji, S., Aurass, P. & Flieger, A. The manifold phospholipases A of Legionella pneumophila - identification, export, regulation, and their link to bacterial virulence. *Int J Med Microbiol* **298**, 169-181 (2008).
118. Schunder, E. et al. Phospholipase PlaB is a new virulence factor of Legionella pneumophila. *Int J Med Microbiol* (2010).
119. Aragon, V., Rossier, O. & Cianciotto, N.P. Legionella pneumophila genes that encode lipase and phospholipase C activities. *Microbiology* **148**, 2223-2231 (2002).
120. Ichimura, Y. et al. A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* **408**, 488-492 (2000).
121. Yang, L. & Huang, H.W. Observation of a membrane fusion intermediate structure. *Science* **297**, 1877-1879 (2002).
122. Gruner, S.M. Intrinsic curvature hypothesis for biomembrane lipid composition: a role for nonbilayer lipids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 3665-3669 (1985).
123. Ostrowski, S.G., Van Bell, C.T., Winograd, N. & Ewing, A.G. Mass spectrometric imaging of highly curved membranes during Tetrahymena mating. *Science* **305**, 71-73 (2004).

124. Guan, Z., Li, S., Smith, D.C., Shaw, W.A. & Raetz, C.R. Identification of N-acylphosphatidylserine molecules in eukaryotic cells. *Biochemistry* **46**, 14500-14513 (2007).
125. Karava, V. et al. Anandamide metabolism by *Tetrahymena pyriformis* in vitro. Characterization and identification of a 66 kDa fatty acid amidohydrolase. *Biochimie* **87**, 967-974 (2005).
126. Ellingson, J.S. Identification of N-acylethanolamine phosphoglycerides and acylphosphatidylglycerol as the phospholipids which disappear as Dictyostelium discoideum cells aggregate. *Biochemistry* **19**, 6176-6182 (1980).
127. Ellingson, J.S. & Dischinger, H.C. Concurrent disappearance of N-acylethanolamine glycerophospholipids and phagolysosomes enriched in N-acylethanolamine glycerophospholipids as Dictyostelium discoideum cells aggregate. *Biochim Biophys Acta* **812**, 255-260 (1985).
128. Aley, S.B., Scott, W.A. & Cohn, Z.A. Plasma membrane of Entamoeba histolytica. *J Exp Med* **152**, 391-404 (1980).
129. Ferguson, M.A., Allen, A.K. & Snary, D. The detection of phospholipids in the protozoan Trypanosoma cruzi. *Biochem J* **207**, 171-174 (1982).
130. Rivera, F. et al. Pathogenic amoebae in natural thermal waters of three resorts of Hidalgo, Mexico. *Environ Res* **50**, 289-295 (1989).
131. Page, F.C. Taxonomic criteria for limax amoebae, with descriptions of 3 new species of Hartmannella and 3 of Vahlkampfia. *J Protozool* **14**, 499-521 (1967).
132. Moffat, J.F. & Tompkins, L.S. A quantitative model of intracellular growth of Legionella pneumophila in Acanthamoeba castellanii. *Infect. Immun* **60**, 296-301 (1992).
133. Folch, J., Lees, M. & Sloane Stanley, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of biological chemistry* **226**, 497-509 (1957).
134. Fisk, C., and Subbarow, Y. A simple specific spray for the detection of phospholipids on thin layer chromatograms. *J. Lipid Res* **5**, 126-127 (1925).
135. Abdul-Malak, N. Etude au moyen de radiotraceur du métabolisme des phospholipides des tissus de la truite arc en ciel (Salmo irideus), Effet de la salinité et de la température. *Thèse de doctorat d'état, Université Claude Bernard Lyon1* (1978).
136. Meister, R. Métabolisme des phospholipides de l'anguille (anguilla anguilla) influence de la salinité et de la température. *Thèse de doctorat d'état, Université Claude Bernard Lyon1* (1980).

137. Brichon, G. Régulation écophysiological du métabolisme des glycerophospholipides azotés chez l'anguille européenne. Effet de l'adaptation en eau douce et eau de mer a deux températures (12 et 22°C). *Thèse de doctorat d'état, Université Claude Bernard Lyon1* (1984).
138. Bodennec, J. et al. A procedure for fractionation of sphingolipid classes by solid-phase extraction on aminopropyl cartridges. *J Lipid Res* **41**, 1524-1531 (2000).
139. Portoukalian, J., Meister, R. & Zwingelstein, G. Improved two-dimensional solvent systems for chromatography analysis of polar lipids on thin-layer silica gel 60 precoated plates. *J. Chromatogram* **152**, 569-574 (1978).
140. Dittmer, J.C. & Lester, R.L. A Simple, Specific Spray for the Detection of Phospholipids on Thin-Layer Chromatograms. *J Lipid Res* **15**, 126-127 (1964).
141. Waldi, D. [Simple quantitative rapid determination of pregnanediol on thin layer plates for early pregnancy demonstration and for supervision of the menstrual cycle in women.]. *Klin Wochenschr* **40**, 827-830 (1962).
142. Bodennec, J., Brichon, G., Koul, O., El Babili, M. & Zwingelstein, G. A two-dimensional thin-layer chromatography procedure for simultaneous separation of ceramide and diacylglycerol species. *J Lipid Res* **38**, 1702-1706 (1997).
143. Weber, J.M., Brichon, G., Bodennec, J. & Zwingelstein, G. Palmitate and oleate metabolism of rainbow trout in vivo. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **131**, 409-416 (2002).
144. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254 (1976).
145. Medzihradsky, J.L. Effects of 3-deazaadenosine on antibody-dependent cellular cytotoxicity and phagocytosis: reciprocal inhibition and augmentation of these functions in various effector cell populations. *Immunopharmacology* **6**, 51-63 (1983).
146. Medzihradsky, J.L., Zimmerman, T.P., Wolberg, G. & Elion, G.B. Immunosuppressive effects of the S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibitor, 3-deazaadenosine. *J Immunopharmacol* **4**, 29-41 (1982).
147. Marciano-Cabral, F. Biology of Naegleria spp. *Microbiol Rev* **52**, 114-133 (1988).
148. Karava, V., Fasia, L. & Siafaka-Kapadai, A. Anandamide amidohydrolase activity, released in the medium by *Tetrahymena pyriformis*. Identification and partial characterization. *FEBS Lett* **508**, 327-331 (2001).
149. Bram, S. & Brachet, P. Inhibition of proliferation and differentiation of *Dictyostelium discoideum* by tetrahydrocannabinol and cannabinol. In G. G. Nahas (ed.), *Marihuana: chemistry, biochemistry and cellular effects*. Springer-Verlag, New York., 207-211 (1976).

150. McClean, D.K. & Zimmerman, A.M. Action of delta 9-tetrahydrocannabinol on cell division and macromolecular synthesis in division-synchronized protozoa. *Pharmacology* **14**, 307-321 (1976).
151. Arata, S., Klein, T.W., Newton, C. & Friedman, H. Tetrahydrocannabinol treatment suppresses growth restriction of *Legionella pneumophila* in murine macrophage cultures. *Life Sci* **49**, 473-479 (1991).
152. Arata, S., Newton, C., Klein, T. & Friedman, H. Enhanced growth of *Legionella pneumophila* in tetrahydrocannabinol-treated macrophages. *Proc Soc Exp Biol Med* **199**, 65-67 (1992).
153. Klein, T.W., Newton, C. & Friedman, H. Cannabinoid receptors and immunity. *Immunol Today* **19**, 373-381 (1998).
154. Gross, A. et al. A beneficial aspect of a CB1 cannabinoid receptor antagonist: SR141716A is a potent inhibitor of macrophage infection by the intracellular pathogen *Brucella suis*. *J Leukoc Biol* **67**, 335-344 (2000).
155. Anand, C.M., Skinner, A.R., Malic, A. & Kurtz, J.B. Interaction of *L. pneumophila* and a free living amoeba (*Acanthamoeba palestinensis*). *J Hyg (Lond)* **91**, 167-178 (1983).
156. Holden, E.P., Winkler, H.H., Wood, D.O. & Leinbach, E.D. Intracellular growth of *Legionella pneumophila* within *Acanthamoeba castellanii* Neff. *Infect. Immun* **45**, 18-24 (1984).
157. Molmeret, M., Horn, M., Wagner, M., Santic, M. & Abu Kwaik, Y. Amoebae as training grounds for intracellular bacterial pathogens. *Appl Environ Microbiol* **71**, 20-28 (2005).
158. Garduno, R.A., Garduno, E., Hiltz, M. & Hoffman, P.S. Intracellular growth of *Legionella pneumophila* gives rise to a differentiated form dissimilar to stationary-phase forms. *Infect Immun* **70**, 6273-6283 (2002).
159. Horwitz, M.A. The Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes. *J Exp Med* **158**, 2108-2126 (1983).
160. Coers, J. et al. Identification of Icm protein complexes that play distinct roles in the biogenesis of an organelle permissive for *Legionella pneumophila* intracellular growth. *Mol Microbiol* **38**, 719-736 (2000).
161. Swanson, M.S. & Isberg, R.R. Analysis of the intracellular fate of *Legionella pneumophila* mutants. *Ann N Y Acad Sci* **797**, 8-18 (1996).
162. Cianciotto, N.P. & Fields, B.S. *Legionella pneumophila* mip gene potentiates intracellular infection of protozoa and human macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 5188-5191 (1992).

163. De Jonckheere, J.F. The phylogenetic position of the amoeboflagellate *Willaertia* deduced from SSUrDNA sequences. *Europ. J. Protistol* **33**, 72-76 (1997).
164. Page, F.C. The classification of "naked" amoebae (Phylum Rhizopoda). *Arch. Protistenkd* **133**, 199-217 (1987).
165. Steenbergen, J.N., Nosanchuk, J.D., Malliaris, S.D. & Casadevall, A. Interaction of *Blastomyces dermatitidis*, *Sporothrix schenckii*, and *Histoplasma capsulatum* with *Acanthamoeba castellanii*. *Infect Immun* **72**, 3478-3488 (2004).
166. Lapage, G. Memoirs: cannibalism in *Acanthamoeba vesperilio* (Penard). *Q. J. Microsc. Sci* **264**, 669-710 (1922).
167. Kusch, J. et al. Competitive advantages of *Caedibacter*-infected *Paramecia*. *Protist* **153**, 47-58 (2002).
168. Metzner, C., Salmons, B., Gunzburg, W.H. & Dangerfield, J.A. Rafts, anchors and viruses--a role for glycosylphosphatidylinositol anchored proteins in the modification of enveloped viruses and viral vectors. *Virology* **382**, 125-131 (2008).
169. Metzner, C., Mostegl, M.M., Gunzburg, W.H., Salmons, B. & Dangerfield, J.A. Association of glycosylphosphatidylinositol-anchored protein with retroviral particles. *Faseb J* **22**, 2734-2739 (2008).
170. Riboni, L., Viani, P., Bassi, R., Prinetti, A. & Tettamanti, G. The role of sphingolipids in the process of signal transduction. *Prog Lipid Res* **36**, 153-195 (1997).
171. Haque, E., McIntosh, T.J. & Lentz, B.R. Influence of lipids composition on physical properties and PEG-mediated fusion of curved and uncurved model membrane vesicles: «nature's own» fisogenic lipid bilayer. *Biochemistry* **40**, 4340 -4348 (2001).
172. Garidel, P. & Blume, A. Miscibility of phosphatidylethanolamine-phosphatidylglycerol mixtures as a function of pH and acyl chain length. *Eur Biophys J* **28**, 629-638 (2000).
173. Medzhradsky, J.L. Regulatory role for the immune complex in modulation of phagocytosis by 3-deazaadenosine. *J Immunol* **133**, 946-949 (1984).
174. Smith, J.D. & Ledoux, D.N. Effect of the methylation inhibitors 3-deazaadenosine and 3-deazaaristeromycin on phosphatidylcholine formation in *Tetrahymena*. *Biochim Biophys Acta* **1047**, 290-293 (1990).
175. Chiang, P.K. Biological effects of inhibitors of S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Pharmacol Ther* **77**, 115-134 (1998).
176. Kim, D.J. et al. Accumulation of S-adenosyl-L-methionine enhances production of actinorhodin but inhibits sporulation in *Streptomyces lividans* TK23. *J Bacteriol* **185**, 592-600 (2003).

177. Mato, J.M., Corrales, F.J., Lu, S.C. & Avila, M.A. S-Adenosylmethionine: a control switch that regulates liver function. *Faseb J* **16**, 15-26 (2002).
178. Friz, C.T. The biochemical composition of the free-living amoebae *Chaos chaos*, *Amoeba dubia* and *Amoeba proteus*. *Comp Biochem Physiol* **26**, 81-90 (1968).
179. Jeon, T.J. DNA adenine methylation of *sams1* gene in symbiont-bearing *Amoeba proteus*. *J Microbiol* **46**, 564-570 (2008).
180. Thomas, K., Rutter, A., Suller, M., Harwood, J. & Lloyd, D. Oxygen induces fatty acid (n-6)-desaturation independently of temperature in *Acanthamoeba castellanii*. *FEBS Lett* **425**, 171-174 (1998).
181. Cirillo, S.L., Yan, L., Littman, M., Samrakandi, M.M. & Cirillo, J.D. Role of the *Legionella pneumophila* *rtxA* gene in amoebae. *Microbiology* **148**, 1667-1677 (2002).
182. Hacker, S. et al. Global consequences of phosphatidylcholine reduction in *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol Genet Genomics* **280**, 59-72 (2008).
183. Marengo, B., Bottini, C., La Porta, C.A., Domenicotti, C. & Tessitore, L. Inactivation of PEMT2 in hepatocytes initiated by DENA in fasted/refed rats. *Biochem Biophys Res Commun* **346**, 234-241 (2006).
184. Boumann, H.A., Chin, P.T., Heck, A.J., De Kruijff, B. & De Kroon, A.I. The yeast phospholipid N-methyltransferases catalyzing the synthesis of phosphatidylcholine preferentially convert di-C16:1 substrates both in vivo and in vitro. *The Journal of biological chemistry* **279**, 40314-40319 (2004).
185. Shields, D.J., Agellon, L.B. & Vance, D.E. Structure, expression profile and alternative processing of the human phosphatidylethanolamine N-methyltransferase (PEMT) gene. *Biochim Biophys Acta* **1532**, 105-114 (2001).
186. Minder, A.C. et al. Phosphatidylcholine levels in *Bradyrhizobium japonicum* membranes are critical for an efficient symbiosis with the soybean host plant. *Mol Microbiol* **39**, 1186-1198 (2001).

ANNEXE

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
17 avril 2008 (17.04.2008)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2008/043969 A3

- (51) Classification internationale des brevets :
A01N 63/00 (2006.01) A01P 1/00 (2006.01)
- (21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2007/052131
- (22) Date de dépôt international :
12 octobre 2007 (12.10.2007)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité :
0654222 12 octobre 2006 (12.10.2006) FR
- (71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : UNI-
VERSITE CLAUDE BERNARD LYON I [FR/FR]; 43
Boulevard du 11 Novembre 1918, F-69622 Villeurbanne
Cedex (FR).
- (72) Inventeurs; et
- (75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : BODEN-
NEC, Jacques [FR/FR]; 24 rue de la Camille, F-69600
Oullins (FR). DEY, Rafik [FR/FR]; 519 avenue de
la Sauvegarde, F-69009 Lyon (FR). PERNIN, Pierre
[FR/FR]; 49 rue de Saint-Maximin, F-69003 Lyon (FR).
- (74) Mandataire : SARLIN, Laure; Cabinet Beau de
Loménie, 51, avenue Jean-Jaurès, BP 7073, F-69301 Lyon
Cedex 07 (FR).
- (81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN,
IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO,
RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Publiée :
— avec rapport de recherche internationale
— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont re-
çues
- (88) Date de publication du rapport de recherche
internationale: 5 juin 2008

(54) Title: METHOD FOR BIOLOGICALLY COMBATING THE PROLIFERATION OF *LEGIONELLA PNEUMOPHILA*, AND
DISINFECTING AGENT CONTAINING AMOEBIC PROTOZOA OF THE *WILLAERTIA* GENUS

(54) Titre : PROCÉDE DE LUTTE BIOLOGIQUE CONTRE LA PROLIFÉRATION DE *LEGIONELLA PNEUMOPHILA*, ET
AGENT DESINFECTANT CONTENANT DES PROTOZOAIRES AMIBIENS DU GENRE *WILLAERTIA*

(57) Abstract: The invention relates to a method for biologically combating the proliferation of *Legionella pneumophila*, with the
exception of the treatment methods applied to the human or animal body, characterized in that it uses amoebic protozoa of the species
Willaertia magna, corresponding to the strain deposited with the ATCC under number PTA-7824 or to the strain deposited with the
ATCC under number PTA-7825.

(57) Abrégé : L'invention concerne un procédé de lutte biologique contre la prolifération des *Legionella pneumophila*, à l'exception
des méthodes de traitement appliquées au corps humain ou animal, caractérisé en ce qu'il utilise des protozoaires amibiens de l'espèce
Willaertia magna, correspondant à la souche déposée sous le numéro PTA-7824 à l'ATCC ou à la souche déposée sous le numéro
PTA-7825 à l'ATCC.

WO 2008/043969 A3

Free-living freshwater amoebae differ in their susceptibility to the pathogenic bacterium *Legionella pneumophila*

Rafik Dey^{1,2,3}, Jacques Bodennec^{1,3}, Mouh Oulhadj Mameri^{1,2} & Pierre Pernin^{1,2}¹Université de Lyon, Lyon, France; ²Laboratoire de Biologie Cellulaire, ISPB, Université Lyon, CNRS, UMR5240, Lyon, France; and ³Laboratoire de Physiologie Intégrative Cellulaire et Moléculaire, Université Lyon 1, CNRS, UMR5123, Villeurbanne, France

Correspondence: Pierre Pernin, Faculté de Pharmacie-ISPB, 8 Avenue Rockefeller, Lyon, F-69373, France. Tel.: +33 478 777 108; fax: +33 478 777 158; e-mail: pierre.pernin@recherche.univ-lyon1.fr

Received 14 March 2008; accepted 23 September 2008.

DOI:10.1111/j.1574-6968.2008.01387.x

Editor: Albert Descoteaux

Keywords

Williaertia magna; *Legionella pneumophila*; free-living amoebae; protozoa–bacterial interactions.

Abstract

Legionella pneumophila is known as a facultative intracellular parasite of free-living soil and freshwater amoebae, of which several species have been shown to support the growth of the pathogenic bacteria. We report for the first time the behaviour of two strains (c2c and Z503) of the amoeba *Williaertia magna* towards different strains of *L. pneumophila* serogroup 1 and compared it with *Acanthamoeba castellanii* and *Hartmannella vermiformis*, known to be *L. pneumophila* permissive. In contrast to the results seen with other amoebae, *W. magna* c2c inhibited the growth of one strain of *Legionella* (*L. pneumophila*, Paris), but not of others belonging to the same serogroup (*L. pneumophila*, Philadelphia and *L. pneumophila*, Lens). Also, the different *L. pneumophila* inhibited cell growth and induced cell death in *A. castellanii*, *H. vermiformis* and *W. magna* Z503 within 3–4 days while *W. magna* c2c strain remained unaffected even up to 7 days. Electron microscopy demonstrated that the formation of numerous replicative phagosomes observed within *Acanthamoeba* and *Hartmannella* is rarely seen in *W. magna* c2c cocultured with *L. pneumophila*. Moreover, the morphological differences were observed between *L. pneumophila* cultured either with *Williaertia* or other amoebae. These observations show that amoebae are not all equally permissive to *L. pneumophila* and highlight *W. magna* c2c as particularly resistant towards some strains of this bacterium.

Introduction

The gram-negative bacterium *Legionella pneumophila*, the causative agent of Legionnaire's disease, can grow facultatively within macrophages, monocytes or epithelial cells (Horwitz, 1983). *Legionella pneumophila* is found ubiquitously in freshwater environments, where it may replicate within protozoa such as ciliates and free-living amoebae (Molmeret *et al.*, 2004, 2005). Within phagocytic cells, the genes of the *L. pneumophila dot/icm* system are essential for evading endocytic maturation and inhibition of phagosome–lysosome fusion in the cytoplasm of their diverse host cells (Roy, 2002). Intracellular multiplication of *Legionella* in free-living amoebae, discovered by Rowbotham (1980), has since been confirmed by numerous other studies. For instance, coculture experiments in liquid media have shown that amoebae exert an important growth-promoting effect on *L. pneumophila*. During outbreaks of Legionnaire's

disease, the water bodies concerned are usually found to contain significant numbers of free-living amoebae; furthermore, high numbers of *Legionella* species are found when concentrations of amoebae are high (Barbaree *et al.*, 1986). Moreover, the isolation of *L. pneumophila* from water is more successful if amoebae are added (Sanden *et al.*, 1992). Also, the presence of amoebae can trigger the revival of *Legionella* strains that became noncultivable (viable but noncultivable state) following a prolonged period in poor media such as distilled water (Steinert *et al.*, 1997).

Although Fields reported that 13 species of amoebae and two species of ciliated protozoa can support intracellular replication of *L. pneumophila* (Fields, 1996), most *in vitro* experiments have been performed with only two genera of amoebae – *Acanthamoeba* and *Hartmannella*. So far, there have been few attempts to test whether other genera of amoebae can act as hosts for *L. pneumophila* strains. In order to compare the ability of different common freshwater

amoebae (*Acanthamoeba castellanii*, *Hartmannella vermiformis* and two strains of *Willaertia magna*) to support *L. pneumophila* growth, we performed coculture experiments using them with different *L. pneumophila* strains belonging to the same serogroup 1.

Materials and methods

Strains

The different strains of *L. pneumophila* serogroup 1 [Lens CIP 108 286, Paris CIP 107 629T and Philadelphia (ATCC 33152)] were cultured at 37 °C for 3–4 days on buffered charcoal yeast extract (BCYE) agar before coculture experiments (Gao & Abu Kwaik, 2000).

The amoebae used in this study were *A. castellanii* (By 02.2.4) and *H. vermiformis* (Ax.5.2e4b), two species known to support *L. pneumophila* and two strains of *Willaertia* genus, hitherto untested: *W. magna*, Z 503 (ATCC 50035) and c2c Maky (ATCC PTA-7824). All amoebae were grown at 30 °C on a lawn of *Escherichia coli* on non-nutrient agar and were established in axenic culture at 37 °C in serum casein glucose yeast extract medium (SCGYEM) (De Jonckheere, 1977).

Coculture of *L. pneumophila* with amoebae

Tubes (FALCON® 3033) containing 3 mL of SCGYEM medium were seeded with 5.5×10^4 trophozoites mL⁻¹ of the different amoebae maintained in the exponential growth phase by subculture every 3–4 days. On day 0, the different strains of *L. pneumophila*, grown on BCYE medium, were suspended in sterile distilled water at 10^9 mL⁻¹ (1 OD unit at 550 nm), and inoculated into the amoebic cultures at a multiplicity of infection (MOI) of 50. Low-speed centrifugation (5 min at 1000 g) was used to initiate physical interaction between bacteria and amoebae. After 15 min, the pellet was resuspended and the tubes were incubated at 37 °C in a slanting position in order to increase the medium to air exchange surface. The cocultures were analyzed at 24 h intervals from days 0 to 4 with the following objectives:

- (1) First, the effect of the strains of *L. pneumophila* on the growth of different amoebae in cocultures. At each time point (see figures), tubes were placed on ice for 6 min to detach cells from the walls (this method was preferred to the use of a cell scraper, because it did not induce mechanical stress) and the cultured microorganisms were resuspended by vortexing. The number of amoebae was determined by counting resuspended cells per unit volume with a haemocytometer. Control values of amoebae grown without bacteria were obtained in the same manner.
- (2) Simultaneously, the growth of *L. pneumophila* in coculture with the different amoebic genera was determined

from the same tubes by the number of total *L. pneumophila* (intra- and extracellular), expressed in CFU mL⁻¹, after serial 10-fold dilutions of the coculture medium with sterile H₂O that were spread in triplicate on BCYE plates and incubated at 37 °C for at least 6 days.

Data were analysed by means of Student's *t*-test and are means \pm SEM of up to eight independent experiments (see the details in the figure legends).

Cytotoxicity of *L. pneumophila*

Firstly, the cytotoxicity of *L. pneumophila* strains towards this panel of amoebae was studied qualitatively by phase-contrast microscopy. The effects on amoebal monolayer formation in 24-well plates containing 5×10^4 amoebae per well infected with the bacterium at an MOI of 50 were recorded after 3 and 7 days.

Bacterial cytotoxicity for *Acanthamoeba* and *Willaertia* species was also checked by a trypan blue exclusion test. At 72 h of infection (MOI 50), following resuspension by agitation, amoebae were pelleted by low-speed centrifugation and resuspended in 200 μ L of a trypan blue–SCGYEM medium (4:1 v/v) mix. Cell death was determined as the percentage of trypan blue-positive cells. Because of the high cytotoxicity of *L. pneumophila* 72 h after infection, this assay could not be performed with *H. vermiformis*. Trypan blue exclusion tests were also performed on control cultures of amoebae without bacteria.

Transmission electron microscopy

Axenic cultures of *H. vermiformis*, *A. castellanii* and *W. magna* c2c Maky were infected for 36 h with *L. pneumophila* Paris at an MOI of 50 and 100. After decantation of the medium, amoebae were fixed (at room temperature) with 2% glutaraldehyde, successively in serum-free SCGYEM medium (20 min) and then in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.4; 30 min). The cells were washed and postfixed for 40 min with 1% OsO₄ in 0.15 M sodium cacodylate buffer. After dehydration in ethanol solutions (50°, 70°, 90°, 95° and $2 \times 100^\circ$), amoebae were embedded in EPON resin. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate, followed by lead citrate, and examined using a JEOL 1200 CX electron microscope at 80 kV. A minimum of > 100 cells was observed for each of the three species, and the percentage of amoebae displaying a replicative phagosome (i.e. vacuoles filled with several bacteria) was determined. Electron microscopy was also performed on the two strains of *W. magna* infected with *L. pneumophila* Lens and Philadelphia in order to compare their morphology with *W. magna* c2c Maky infected with *L. pneumophila* Paris.

Results

We first screened the impact on the growth of the different free-living amoebae that the strain *L. pneumophila* Paris had when cocultured at an MOI of 50 for up to 4 days (Fig. 1a). Cocultures with *L. pneumophila* resulted in a strong reduction in the growth of *H. vermiformis* (c. 82% and c. 88% decrease at day 3 and day 4, respectively) and of *A. castellanii* (c. 93% and c. 95% at day 3 and day 4, respectively) when

compared with controls. On the other hand, the growth of both strains of *W. magna* was unaffected by *L. pneumophila* Paris because no significant difference was observed in the number of amoebae grown with or without this bacterium.

With regard to the cytotoxicity of *L. pneumophila* for different amoebae, phase-contrast microscopy revealed that a disruption of monolayer formation was induced in *A. castellanii* and *H. vermiformis* after 72 h of bacterial infection, while *W. magna* c2c was unaffected (Fig. 1b)

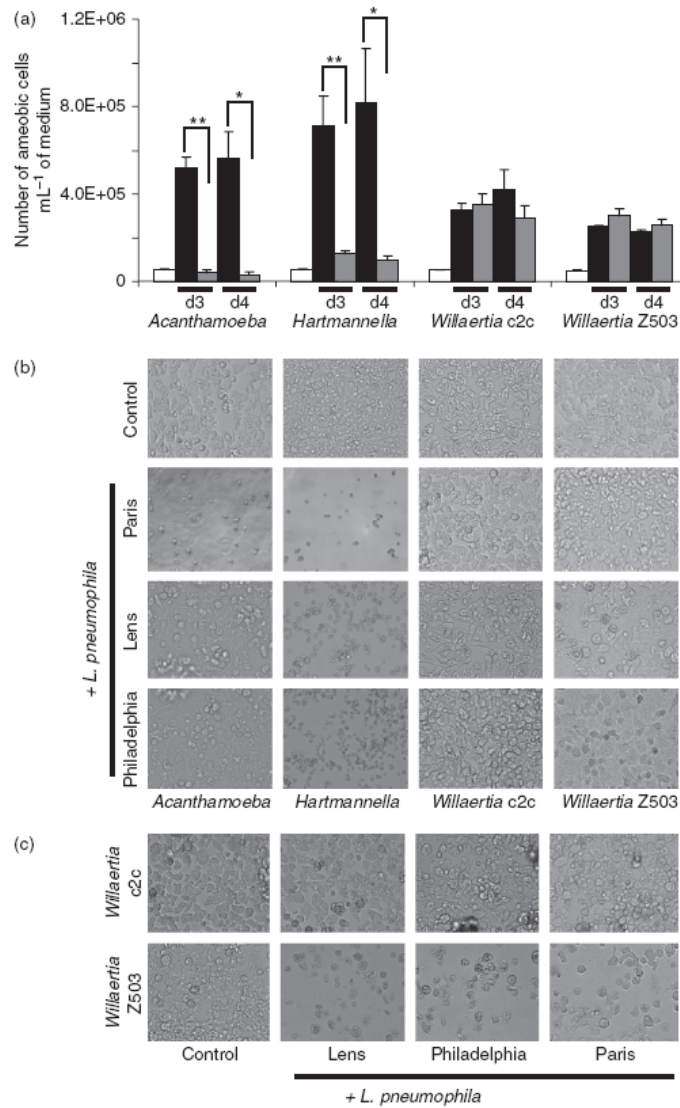


Fig. 1. Effect of *Legionella pneumophila* on the growth of different amoebae in coculture. (a) Effect of the bacterial infection on the growth of amoebae. The different amoebae were cultured at 37 °C for up to 4 days (d3 and d4 represent, respectively, day 3 and day 4 in culture) either with (grey bars) or without (black bars) *L. pneumophila* Paris at an MOI of 50. White bars represent the number of amoebae on day 0 of experiments. The data are expressed as the number of amoebae mL⁻¹ of medium and are the mean ± SEM of four to eight independent experiments. Statistical differences (Student's *t*-test) between the growth of amoebae cultured either with or without bacteria are indicated (**P* < 0.01; ***P* < 0.001). (b and c) Effect of *L. pneumophila* on monolayer formation by amoebae. Representative phase-contrast images of the different amoebae cultured in 24-well plates either with or without the strains of *L. pneumophila* at an MOI of 50 for 3 days (b) or 7 days (c). Note the destruction of monolayers of *Hartmannella* and *Acanthamoeba* cultured in the presence of the bacteria when compared with controls and also the relative resistance of *Willaertia magna* (strain c2c). Also, note the destruction of monolayers of *W. magna* Z503 cultured in the presence of the bacteria for 7 days when compared with controls and the c2c strain.

irrespective of the strain of *L. pneumophila* used in these experiments. Moreover, $28.4 \pm 3.6\%$, $11.01 \pm 1.1\%$ and $10.9 \pm 2.6\%$ of the few remaining *A. castellanii* on day 3 of coculture with, respectively, *L. pneumophila* Paris, Lens and Philadelphia were trypan blue positive; for *W. magna* c2c, it was only $3.8 \pm 0.4\%$, $2.9 \pm 0.9\%$ and $3.2 \pm 0.7\%$, respectively. In control cultures of amoebae, devoid of bacteria, the percentage of trypan blue-positive cells was $< 1\%$. Similar to what was observed with *W. magna* c2c, the monolayer formation of Z503 was not affected at day three by *L. pneumophila* Paris. With *L. pneumophila* Lens and Philadelphia, Z503 monolayers started to shrink in the presence of numerous floating rounded cells. The percentage of Z503 trypan blue-positive cells was approximately three times higher than what was observed with the c2c strain. These observations indicated that the *W. magna* c2c strain is less sensitive to bacteria than the Z503 strain. This difference between the two *W. magna* is even more obvious when amoebae are cultured up to 7 days with the *L. pneumophila* strains. Effectively, Fig. 1c demonstrates a disruption of the *W. magna* Z503 monolayer in contrast to the c2c, which remains unaffected irrespective of the *L. pneumophila* strain used.

From these preliminary results, we focused our attention on the combination of *L. pneumophila* Paris and *W. magna*. We compared the growth kinetics of this bacterium in coculture with *W. magna* c2c and Z503 with that displayed in the presence of *A. castellanii* and *H. vermiformis*. As expected, the bacterium grew in *H. vermiformis* and *A. castellanii* with a respective increase of 1.3 and 1.5 log in CFU mL⁻¹ after 3 days of infection (Fig. 2a). Unlike these two permissive amoebae, bacterial growth, being reduced markedly during the same period, was not favoured in coculture with *W. magna* (c2c Maky and Z503). A significant (c. 2.3–2.6 log) difference in bacterial yield was recorded at days 2–3 postinfection between the *Hartmannella*–*Acanthamoeba* species and the *W. magna* c2c (Fig. 2a). In contrast, when we examined the ability of the *L. pneumophila* strains Lens and Philadelphia to grow on days 3 and 4 in the presence of *H. vermiformis* and *W. magna*, the bacteria grew up to 4 days in all cases (Fig. 2b), although to different extents [a difference of c. 2 log CFU mL⁻¹ was observed after 3 days of *L. pneumophila* Philadelphia cocultured with *W. magna* c2c and other amoebae (This difference in bacterial growth when cocultured with *W. magna* c2c or other amoebae is also reinforced by visual observations of the 24-well plates that were used to study the effect of *L. pneumophila* strains on monolayer formation (Fig. 1b and c). In the presence of *L. pneumophila* Lens and Philadelphia, an intense bacterial proliferation was observed with *W. magna* Z503 (the culture medium was ‘cloudy’ due to the high bacterial density). This phenomenon was never observed when the different bacteria were cocultured with *W. magna* c2c.).

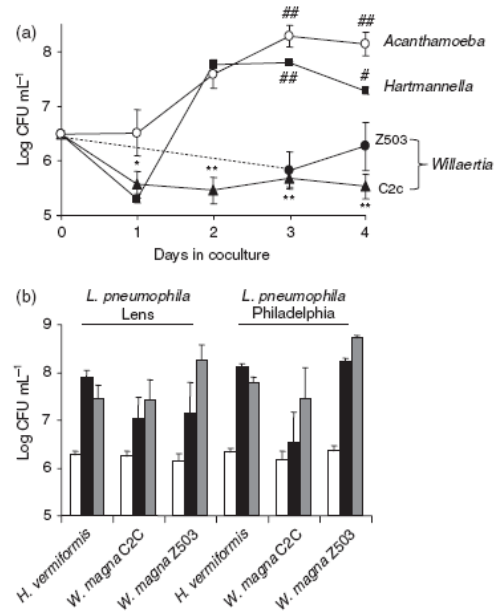


Fig. 2. Growth of *Legionella pneumophila* in coculture with the different amoebae. (a) Kinetic growth of *L. pneumophila* Paris cocultured at 37 °C for up to 4 days in the presence of different amoebae at an MOI of 50. The data are the average \pm SEM of four [*Willaertia magna* Z503 (closed circles), six [*Hartmannella vermiformis* (closed squares)] or eight independent experiments [*W. magna* c2c Maky (closed triangles) and *Acanthamoeba castellanii* (open circles)] performed in triplicate. Statistical differences (Student's *t*-test) in the growth of bacteria cocultured either with *W. magna* strain c2c Maky or *A. castellanii* at day 1 (* $P < 0.05$) and between *W. magna* c2c Maky and other two amoebic species between day 2 and day 4 (** $P < 0.001$) are indicated. Statistical differences in the growth of bacteria between *W. magna* strain Z503 and *A. castellanii* or *H. vermiformis* are indicated (* $P < 0.05$ ** $P < 0.001$). (b) Growth of *L. pneumophila* Lens and Philadelphia cocultured at an MOI of 50 with *H. vermiformis* and *W. magna* species. Cocultures were performed for up to 4 days, and bacterial growth was determined as described in Materials and methods (white bars represent the number of *L. pneumophila* on day 0 of experiments; black and grey bars represent, respectively, day 3 and day 4 of coculture). The data are the average \pm SEM of four to seven independent experiments performed in triplicate.

We next determined whether the defective growth of *L. pneumophila* Paris in the presence of *W. magna* c2c could be due to a fault in intracellular replication. Ultrastructural examination showed that the number of *Acanthamoeba* and *Hartmannella* displaying replicative phagosomes at 36 h postinfection was very high, i.e. 36–51% according to the MOI (Table 1). In contrast, replicative phagosomes were not detected in *Willaertia* c2c amoebae infected at an MOI of 50. When cocultures of *W. magna* c2c were infected at a higher

Table 1. Occurrence of replicative phagosomes within amoebae

	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	<i>Hartmannella vermiformis</i>	<i>Willaertia magna</i> c2c Maky
MOI= 50	36%	42%	0%
MOI= 100	51%	ND	1.5%

Amoebae were cocultured for 36 h with *Legionella pneumophila* Paris at a MOI of 50 or 100, fixed and processed for electron microscopy. Results are expressed as the percentage of cells displaying a replicative phagosome sampled from > 100 cells. In *Hartmannella vermiformis* phagosome occurrence at a MOI of 100 could not be determined due to the presence of too many bacterial-induced lysed cells (ND, not determined).

ratio (MOI of 100), few amoebae displayed a replicative phagosome (1.5% i.e. 2/133 amoebae) a very low level compared with *Acanthamoeba* and *Hartmannella* (Table 1), although some rare bacteria were sometimes observed as demonstrated in Fig. 3b. We also found that *W. magna* Z503 strain displayed more replicative phagosomes than the c2c strain: 7% of *W. magna* Z503 cells displayed a replicative phagosome when cocultured with *L. pneumophila* Lens and 13% with *L. pneumophila* Philadelphia. All the stages of infection could be observed ultrastructurally in *A. castellanii* and *H. vermiformis*. Shortly after infection, *L. pneumophila* Paris appeared in these two species as isolated bacteria in a vacuole-like structure (Fig. 3a) surrounded by a rough endoplasmic reticulum (RER) as described previously (Abu Kwaik, 1996). More pronounced invasion led to the formation of distended replicative phagosomes containing numerous bacteria and finally to necrosis of these heavily infected amoebae. Nevertheless, even in such amoebae, the contractile vacuole was still evident (Fig. 3d).

In contrast, out of the few *W. magna* c2c displaying intracellular bacteria (only 1.5% at an MOI of 100), the replicative phagosome was different from those observed in *Acanthamoeba* or *Hartmannella* in lacking a clearly delimiting membrane. Additionally, the bacteria inside contained numerous vacuoles usually described as polyhydroxybutyrate granules (Fig. 3e and h). In *Acanthamoeba* and *Hartmannella*, the bacteria displayed the characteristic morphology of the typical gram-negative cell envelope composed of a wavy outer membrane around a clear periplasmic space (Fig. 3g), while the *L. pneumophila* observed within the two infested *Willaertia* c2c appeared as short stubby rods with a dense cytoplasm delimited by a thick laminar outer layer (Fig. 3h). Figure 3c shows a *Willaertia* Z503 with a replicative phagosome filled with *L. pneumophila* Lens. The bacteria are contained within a vacuole-like structure with a clear delimiting membrane and display an external periplasm (see Fig. 3c and i) in contrast to what was observed with the *Willaertia* c2c strain. In *W. magna* Z503, bacterial morphology resembled one observed within the c2c strain, with vacuoles usually described

as polyhydroxybutyrate granules (compare Fig. 3f and i with e and h). Similar observations were made when *W. magna* Z503 were infected with *L. pneumophila* Philadelphia (not shown).

Discussion

Numerous studies have reported the multiplication of *L. pneumophila* within various protozoa such as amoebae, ciliates (Fields, 1996) or cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* (Hagele *et al.*, 2000; Solomon *et al.*, 2000), which has led to free-living amoebae being considered as natural reservoirs for this pathogen. But out of the five amoebic genera reported by Fields (1996) as able to support the intracellular growth of *L. pneumophila*, only two (*Acanthamoeba* and *Hartmannella*) have been tested repeatedly in coculture with *L. pneumophila* (Abu Kwaik *et al.*, 1998; Molmeret *et al.*, 2004, 2005). As far as we are aware, this study is the first to consider the interactions between *W. magna* amoebae and *L. pneumophila* systematically.

The main and unexpected finding is that, among the different amoebae tested, *W. magna* is an inefficient vector for the strain *L. pneumophila* Paris when compared with *A. castellanii* and *H. vermiformis*. Indeed, these last two permissive amoebae displayed a 2.3 log greater ability to support bacterial growth than *W. magna* tested under exactly the same conditions. Furthermore, the different *L. pneumophila* strains did not display any obvious cytotoxicity towards the *W. magna* strain c2c. Taken together, these results demonstrate that *W. magna* c2c displays a particular resistance against *L. pneumophila* Paris growth and the different *L. pneumophila* strains-induced cytotoxicity. Interestingly, the results also demonstrate that *W. magna* c2c strain is particularly resistant towards *L. pneumophila* strains-induced cytotoxicity when compared with Z503 belonging to the same genus.

The particular resistance of *W. magna* c2c may be accounted for by factors relating to the bacterium or the amoeba. Until now, in all studies that reported a defect of *L. pneumophila* growth in coculture with macrophages and/or amoebae, the underlying mechanism results from the use of two main categories of bacterial mutant strains. First, several mutants of the *dot/icm* system are defective in evasion of phagolysosomal fusion and, consequently, have lost their capacity of intracellular replication (Swanson & Isberg, 1996; Gao *et al.*, 1997; Coers *et al.*, 2000). In contrast, the *rib* mutants are defective in their cytotoxic effect and are unable to escape from the phagocytic cell despite an active intracellular replication (Alli *et al.*, 2000). *Willaertia* c2c may reduce *L. pneumophila* Paris growth in coculture either by inhibiting intracellular replication and/or by blocking bacterial-induced lysis. Another explanation for the observed defective replication of *L. pneumophila* Paris in *W. magna*

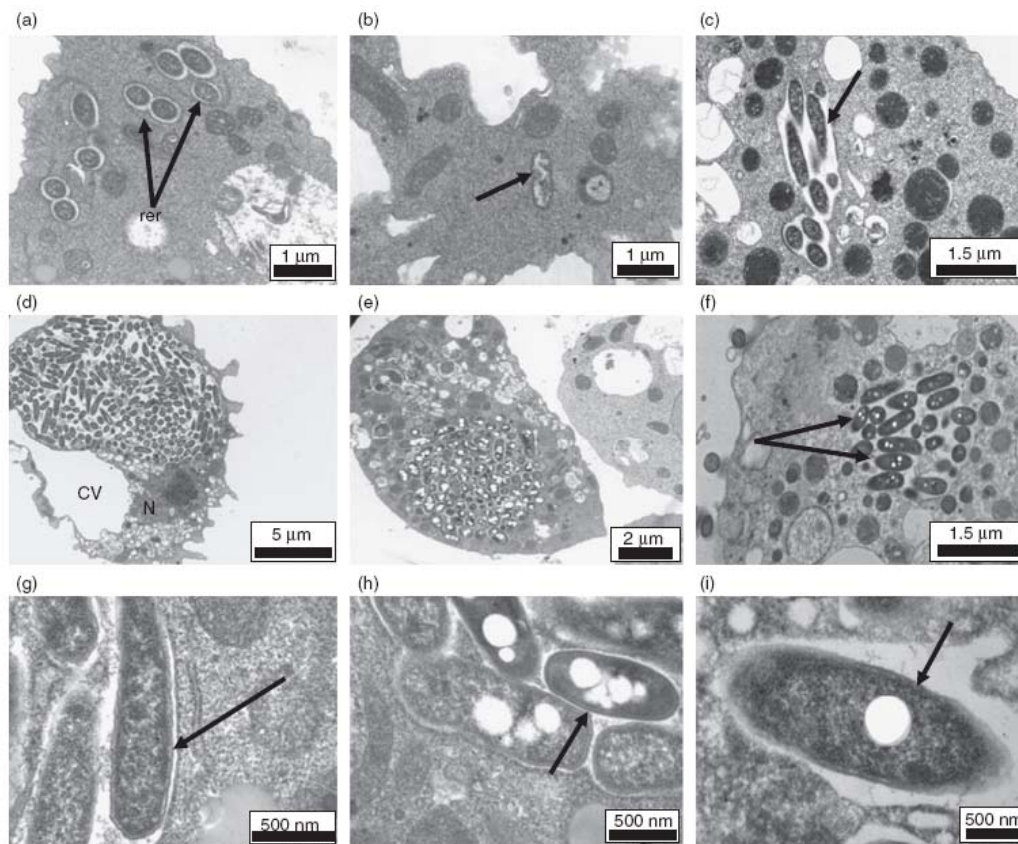


Fig. 3. Ultrastructure of *Acanthamoeba castellanii* and *Willaertia magna* infected by *Legionella pneumophila* after 36h in coculture. (a, d and g) Different stages of *A. castellanii* infection by the *L. pneumophila* Paris. Micrographs (b), (e) and (h) show the few cells (see Table 1 for details) of *W. magna* c2c that were found to be infected by *L. pneumophila* Paris. (c, f and i) Typical *W. magna* Z503 infected by *L. pneumophila* Lens. (a) First stage of *A. castellanii* infection: the bacteria are contained in phagosomes surrounded by a rough endoplasmic reticulum (rer). (b) Single *L. pneumophila* not surrounded by rer in *W. magna* c2c. (c) *Willaertia magna* Z503 displaying a clearly delimited replicative phagosome filled with *L. pneumophila* Lens. (d) Massively infected prelytic *A. castellanii* displaying a contractile vacuole (CV). N, nucleus. (e) One of the two *W. magna* c2c (2/133 cells observed) displaying a replicative phagosome. (f) Massively infected prelytic *W. magna* Z503. (g-i) Different morphological aspects of *L. pneumophila* Paris internalized within *Acanthamoeba* (g) and *Willaertia* c2c (h) and of *L. pneumophila* Lens within *Willaertia* Z503 (i). Bacteria are indicated by arrows on (b), (c), (f), (g), (h) and (i).

c2c amoebae is that the bacterial strain is specifically lacking in factors that are needed for its growth in this particular host. Differences in the membrane composition of amoebae may also result in a lower efficiency of bacterial internalization within *W. magna* c2c. Although none of these hypotheses may be presently excluded, our ultrastructural observations, especially the scarcity of replicative phagosomes in *W. magna* c2c compared with the situation with *Acanthamoeba* and *Hartmannella*, favour defective replication of *L. pneumophila* Paris in *W. magna*. To test whether the fusion of phagosome with lysosomes is not inhibited by

L. pneumophila within *Willaertia* c2c amoebae, colocalization studies of *L. pneumophila*, with late endosomal and lysosomal markers such as acid phosphatase or lysosome-associated-membrane-protein (LAMP-1) glycoprotein, could be performed. Moreover, the expression of replicative phagosomes occurring only for the highest MOI (i.e. 100), in very few *W. magna* c2c (2/133), suggests that the cell defence mechanisms of *Willaertia* amoebae may be partially overwhelmed at this bacterial concentration. Interestingly, this replicative phagosome appeared not as clearly delimited as those in other permissive amoebic species (*Hartmannella*

and *Acanthamoeba*), and the bacteria observed within resemble the 'cyst-like' or mature intracellular form described in HELA cells by Garduno *et al.* (2002), who suggested that it could be metabolically dormant *L. pneumophila*. This bacterial morphology was also observed within the *W. magna* Z503 strain when infected with *L. pneumophila* Paris and Philadelphia. It is thus possible that this particular bacterial morphology may be an adaptation phenotype to some cellular environment such as amoebae of the *Willartia* genus. All these ultrastructural observations suggest that the replication of *L. pneumophila* Paris cannot occur properly within *W. magna* and may explain why bacterial growth is inhibited in the presence of this amoeba.

Overall, our results demonstrate the marked resistance of one strain of *W. magna* towards *L. pneumophila*. They are in agreement with a recent publication (Declerck *et al.*, 2005) showing that the amoeba *Naegleria lovaniensis* is clearly less permissive than *A. castellanii* to invasion and replication of *L. pneumophila*. This observation seems perfectly coherent with our own results because *Naegleria* and *Willartia* are related genera of the family *Vahlkampfiidae* (De Jonckheere *et al.*, 1984, 1997; Page, 1987). Indeed, these genera share several characteristics (eruptive pseudopods, division by promitosis) that clearly differentiate them from *Hartmannella* and *Acanthamoeba*.

In conclusion, our observations show that growth of *L. pneumophila* depends on both the bacterial strain itself and on the species of host amoebae. More precisely, our results demonstrate that all free-living amoebae are not equally permissive to *L. pneumophila*, because at least one strain of the bacterium (*L. pneumophila* Paris) was inhibited when cocultured with *W. magna* c2c. Consequently, the distribution and the density of the pathogenic bacterium in the environment may be subject to variations according to the composition and the evolution of the amoebic population in the biotope, with potential implications on the occurrence of outbreaks of Legionnaire's disease. Our results also suggest that *W. magna* c2c may be a useful model to study the mechanisms of host resistance to *L. pneumophila*.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the French 'Direction Générale de la Santé'. We thank Christine Vernet for technical assistance.

References

- Abu Kwaik Y (1996) The phagosome containing *Legionella pneumophila* within the protozoan *Hartmannella vermiformis* is surrounded by the rough endoplasmic reticulum. *Appl Environ Microb* **62**: 2022–2028.
- Abu Kwaik Y, Gao LY, Stone BJ, Venkataraman C & Harb OS (1998) Invasion of Protozoa by *Legionella pneumophila* and its role in bacterial ecology and pathogenesis. *Appl Environ Microb* **64**: 3127–3133.
- Alli OA, Gao LY, Pedersen LL, Zink S, Radulic M, Doric M & Abu Kwaik Y (2000) Temporal pore formation-mediated egress from macrophages and alveolar epithelial cells by *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* **68**: 6431–6440.
- Barbaree JM, Fields BS, Feeley JC, Gorman GW & Martin WT (1986) Isolation of protozoa from water associated with a legionellosis outbreak and demonstration of intracellular multiplication of *Legionella pneumophila*. *Appl Environ Microb* **51**: 422–424.
- Coers J, Kagan JC, Matthews M, Nagai H, Zuckman M & Roy CR (2000) Identification of icm protein complexes that play distinct roles in the biogenesis of an organelle permissive for *Legionella pneumophila* intracellular growth. *Mol Microbiol* **38**: 719–736.
- Declerck P, Behets J, Delaet Y, Margineanu A, Lammertyn E & Ollevier F (2005) Impact of non-*Legionella* bacteria on the uptake and intracellular replication of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* and *Naegleria lovaniensis*. *Microb Ecol* **50**: 536–549.
- De Jonckheere JF (1977) Use of an axenic medium for differentiation between pathogenic and nonpathogenic *Naegleria fowleri* isolate. *Appl Environ Microb* **33**: 751–757.
- De Jonckheere JF (1997) The phylogenetic position of the amoeboflagellate *Willartia* deduced from SSUrDNA sequences. *Eur J Protistol* **33**: 72–76.
- De Jonckheere JF, Dive D, Pussard M & Vickerman K (1984) *Willartia magna* gen. nov., sp. nov. (*Vahlkampfiidae*), a thermophilic amoeba found in different habitats. *Protistologica* **20**: 5–13.
- Fields BS (1996) The molecular ecology of legionellae. *Trends Microbiol* **4**: 286–290.
- Gao LY & Abu Kwaik Y (2000) The mechanism of killing and exiting the protozoan host *Acanthamoeba polyphaga* by *Legionella pneumophila*. *Environ Microbiol* **2**: 79–90.
- Gao LY, Harb OS & Abu Kwaik Y (1997) Utilization of similar mechanisms by *Legionella pneumophila* to parasitize two evolutionarily distant host cells, mammalian macrophages and protozoa. *Infect Immun* **65**: 4738–4746.
- Garduno RA, Garduno E, Hiltz M & Hoffman PS (2002) Intracellular growth of *Legionella pneumophila* gives rise to a differentiated form dissimilar to stationary-phase forms. *Infect Immun* **70**: 6273–6283.
- Hagele S, Kohler R, Merkert H, Schleicher M, Hacker J & Steinert M (2000) *Dictyostelium discoideum*: a new host model system for intracellular pathogens of the genus *Legionella*. *Cell Microbiol* **2**: 165–171.
- Horwitz MA (1983) The Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes. *J Exp Med* **158**: 2108–2126.

- Molmeret M, Bitar DM, Han L & Kwaik YA (2004) Cell biology of the intracellular infection by *Legionella pneumophila*. *Microbes Infect* **6**: 129–139.
- Molmeret M, Horn M, Wagner M, Santic M & Kwaik YA (2005) Amoebae as training grounds for intracellular bacterial pathogens. *Appl Environ Microb* **71**: 20–28.
- Page FC (1987) The classification of “naked” amoebae (Phylum *Rhizopoda*). *Arch Protistenkd* **133**: 199–217.
- Rowbotham TJ (1980) Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J Clin Pathol* **33**: 1179–1183.
- Roy CR (2002) The dot/Icm transporter of *Legionella pneumophila*: a bacterial conductor of vesicle trafficking that orchestrates the establishment of a replicative organelle in eukaryotic hosts. *Int J Med Microbiol* **291**: 463–467.
- Sanden GN, Morrill WE, Fields BS, Breiman RF & Barbaree JM (1992) Incubation of water samples containing amoebae improves detection of legionellae by the culture method. *Appl Environ Microb* **58**: 2001–2004.
- Solomon JM, Rupper A, Cardelli JA & Isberg RR (2000) Intracellular growth of *Legionella pneumophila* in *Dictyostelium discoideum*, a system for genetic analysis of host–pathogen interactions. *Infect Immun* **68**: 2939–2947.
- Steinert M, Emody L, Amann R & Hacker J (1997) Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. *Appl Environ Microb* **63**: 2047–2053.
- Swanson MS & Isberg RR (1996) Identification of *Legionella pneumophila* mutants that have aberrant intracellular fates. *Infect Immun* **64**: 2585–2594.

RESUME

Il est aujourd'hui bien établi que les amibes libres jouent le rôle de vecteurs à la bactérie pathogène *Legionella pneumophila* favorisant ainsi son développement et sa propagation dans l'environnement. Ainsi, et jusqu'à maintenant, toutes les espèces d'amibes libres étudiées ont démontré une capacité à soutenir et favoriser la croissance de la bactérie responsable des légionelloses. Toutefois, l'ensemble des études a porté sur un nombre restreint d'espèces amibiennes, et leurs capacités relatives à soutenir la croissance bactérienne n'ont que très peu été abordées. Nous avons comparé la capacité de différentes espèces amibiennes à soutenir la prolifération de différentes souches de *L. pneumophila* du sérogroupe 1. Ces études ont mis en évidence les propriétés particulières d'une souche d'amibe appartenant à l'espèce *Willaertia magna*. Cette souche présente, au contraire de toutes les autres espèces, la capacité à inhiber et diminuer la prolifération de certaines souches de *L. pneumophila*. Nous avons par ailleurs pu démontrer l'existence d'une phagocytose interamibienne entre différentes espèces d'amibes, un phénomène jamais mis en évidence à notre connaissance. Les conséquences de cette phagocytose interamibienne sur la croissance et la prolifération de *L. pneumophila* sont aussi rapportées. La microscopie électronique suggère fortement que la bactérie *L. pneumophila* ne peut inhiber la fusion phagolysosomale chez *W. magna* à l'inverse du phénomène observé chez les espèces amibiennes permissives. Ces observations démontrent l'importance de phénomènes membranaires dans la capacité des bactéries à parasiter leur hôte amibien. L'analyse comparée de la composition lipidique des membranes de différentes espèces amibiennes montre chez *W. magna* une expression élevée de phosphatidylcholine. L'inhibition de la voie de biosynthèse de ce phospholipide par méthylation de phosphatidyléthanolamine résulte en une forte diminution de la croissance amibienne, suggérant que cette voie métabolique joue un rôle important dans les capacités de résistance de *W. magna*.

TITLE

Comparative study of the *Legionella pneumophila* proliferation in various amoebic hosts and their interactions. Potential amino phospholipids implication.

ABSTRACT

Free living amoeba is a known vector of *L. pneumophila* in the environment and it has been shown to favour bacterial growth. Until now, all studied amoeba species showed a capacity to support the growth of the bacterium responsible for the Legionnaire's disorder. However, these studies were related to a restricted number of amoebic species, and their relative capacity to support the bacterial growth. We compared the capacity of various amoebic species to support the proliferation of various strains of *L. pneumophila*. These studies highlighted the particular properties of a strain belonging to the *Willaertia magna* species. This amoeba has, contrary to all the other species, the capacity to inhibit and decrease *L. pneumophila* proliferation. We also demonstrate the existence of an inter-amoebic phagocytosis between various species of amoebas, a phenomenon never studied to our knowledge. The consequences of this inter-amoebic phagocytosis on the growth and proliferation of *L. pneumophila* are also reported. Electron microscopy strongly suggests that the bacterium cannot inhibit the phagolysosomal fusion in *W. magna* contrary to permissive amoebic species. These observations suggest the importance of membrane phenomena in the capacity of the bacteria to infest their amoebic host. Compared analysis of the lipidic composition of various amoebic species shows in *W. magna* a high expression of phosphatidylcholine the major phospholipid. The inhibition of the PE N-methyltransferase biosynthesis pathway of this phospholipid results in a strong reduction of the amoebic growth, suggesting that this metabolic pathway plays an important role in the resistance capacity of *W. magna* to *L.pneumophila*.

DISCIPLINE

PHYSIOLOGIE INTEGRATIVE, CELLULAIRE ET MOLECULAIRE

Unité Mixte de Recherche 5123

MOTS-CLES

Willaertia magna, Amibes libres, *Legionella pneumophila*, Phagocytose, lipides, N-acyléthanolamine (Anandamide), 2-acylglycerol (2 AG).

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE :

UMR. CNRS 5123, UCBL, 43 bd du 11 novembre 1918 69622 VILLEURBANNE.