

THESE

Pour l'obtention du Grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS

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

Ecole Doctorale : Chimie Ecologie Géosciences Agrosociétés « *Théodore Monod* »

Secteur de Recherche : Biochimie, Biologie Moléculaire

Présentée par :

Steven Jonathan ROLLAND

Mise en évidence de gènes d'amibes libres impliqués dans sa physiologie et dans l'interaction avec des bactéries intracellulaires

Réalisée dans le laboratoire : UMR CNRS 7267 Ecologie et Biologie des
Interactions - Microbiologie De l'Eau

Directeurs de Thèse : Pr. Yann HECHARD et Dr. Ascel SAMBA-LOUAKA

Soutenue le 15 Octobre 2019 devant la Commission d'Examen

JURY

Rapporteurs :

Patricia DOUBLET
Olivier DUSSURGET

PR - Université Lyon 1
PR - Université Paris 7

Examineurs :

Bénédicte COUPAT-GOUTALAND
Christine BRAQUART-VARNIER
Javier PIZARRO-CERDA
Ascel SAMBA-LOUAKA
Yann HECHARD

MCF - Université Lyon 1
PR - Université de Poitiers
DR - Institut Pasteur Paris
MCF - Université de Poitiers
PR - Université de Poitiers

THESE

Pour l'obtention du Grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS

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

Ecole Doctorale : Chimie Ecologie Géosciences Agrosociétés « *Théodore Monod* »

Secteur de Recherche : Biochimie, Biologie Moléculaire

Présentée par :

Steven Jonathan ROLLAND

Mise en évidence de gènes d'amibes libres impliqués dans sa physiologie et dans l'interaction avec des bactéries intracellulaires

Réalisée dans le laboratoire : UMR CNRS 7267 Ecologie et Biologie des
Interactions - Microbiologie De l'Eau

Directeurs de Thèse : Pr. Yann HECHARD et Dr. Ascel SAMBA-LOUAKA

Soutenue le 15 Octobre 2019 devant la Commission d'Examen

JURY

Rapporteurs :

Patricia DOUBLET
Olivier DUSSURGET

PR - Université Lyon 1
PR - Université Paris 7

Examineurs :

Bénédicte COUPAT-GOUTALAND
Christine BRAQUART-VARNIER
Javier PIZARRO-CERDA
Ascel SAMBA-LOUAKA
Yann HECHARD

MCF - Université Lyon 1
PR - Université de Poitiers
DR - Institut Pasteur Paris
MCF - Université de Poitiers
PR - Université de Poitiers

« Il n'y a pas d'évolution sans liberté d'essayer »

François Dalle

Remerciements

Mes travaux de thèse ont été réalisés au sein du laboratoire Écologie et Biologie des Interactions dirigé à mon arrivée par **Didier Bouchon**, puis **Jean-Marc Berjeaud**. Je souhaiterais les remercier de m'avoir donné l'opportunité de réaliser mes travaux au sein du laboratoire. Je souhaiterais également remercier **Marie-Hélène Rodier** de m'avoir accueilli au sein de l'équipe Microbiologie De l'Eau. Je remercie également mon école doctorale de rattachement : l'ED Théodore Monod.

Mes remerciements vont également au **Pr. Patricia Doublet** et au **Pr. Olivier Dussurget** d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse, ainsi qu' au **Dr. Bénédicte Coupat-Goutaland**, au **Pr. Christine Braquart-Varnier** et au **Dr. Javier Pizarro-Cerdà** d'avoir bien voulu participer à ce jury de thèse en tant qu'examineur.

Je souhaiterais remercier tout particulièrement **Ascel Samba-Louaka** et **Yann Héchard**, de m'avoir donné l'opportunité de réaliser ces travaux et pour m'avoir accompagné durant ces trois années en tant que directeurs de thèse. Vous m'avez fait découvrir le monde des amibes, un monde bien complexe mais tellement passionnant. Je vous remercie également de m'avoir donné l'opportunité d'enseigner, de m'avoir conseillé et aidé tant au niveau enseignement qu'au niveau scientifique et d'avoir complété ma formation dans le domaine de la microbiologie cellulaire. Je sors grandi de ces trois années de thèse grâce à vous. Je n'oublie pas les pique-niques (même si ce soir-là, j'ai failli perdre mon pieds à cause d'une guêpe), et puis les soirées autour d'un repas ou d'une bière.

Je souhaiterais grandement remercier tous les membres de l'équipe MDE pour leur accueil. Je souhaiterais commencer par **Marie-Hélène Rodier** pour ta bienveillance, ton humour, et ta bonne humeur à toutes épreuves. **Anne Mercier**, je te remercie pour toutes nos discussions scientifiques, ton soutien et toute l'aide que tu m'as apportée durant cette thèse. **Cyril Noël**, je voudrais te dire merci pour ton aide et tous tes conseils en bioinformatique. Je remercie également **Willy Aucher** pour tous ses bons conseils BioMol et **Julien Verdon** et **Alexandre Crépin**, pour les discussions enrichissantes tant au niveau de l'enseignement que scientifique. Je remercie **Jean-Marc Berjeaud** "alias JMB", pour les conseils littéraires et cinématographiques. **Vincent Delafont**, je te remercie pour tous tes conseils scientifiques, tes discussions

passionnées autour de la Science et ce, sur des sujets très variés. Ça a été un plaisir de travailler avec toi. **Christine Imbert**, je tiens à te remercier pour ta passion de la parasitologie, promis si j'ai d'autres bestioles bizarres je te les garde ! Je remercie **Marion Girardot** pour sa sympathie, et pour avoir été présente durant de nombreuses soirées au laboratoire quand tout le monde était parti. J'aimerais dire un grand merci à **Laurence** et **Sylvie** pour les discussions cuisine ou celles à vos retours de vacances, pour votre gentillesse, mais également pour toute l'aide apportée pour les parties administratives. Vous avoir dans l'équipe est une chance. Je remercie **Christophe** pour toute l'aide qu'il m'a apportée durant cette thèse. Tu m'as fait gagner un temps précieux ! **Daniel**, merci pour tous les séquençages que tu m'as fait, parfois dans la hâte, et puis merci pour ton rire caractéristique reconnaissable à des kilomètres ! Je remercie également **Estelle Cateau, Camille Juin, Aziz, Elodie Maisonneuve, Vincent Rochard, Marie-Laure Mollichella, Marion Rocher, Dominique et Laetitia**. Une petite pensée va également aux différents stagiaires qui sont venus au laboratoire et avec qui j'ai partagé de bons moments : **Sastine, Morgane, Manon B², Julie, Marine, Thibault, Virginie, Inayatou, Manon D², Grace**, et j'en ai sûrement oublié, je m'en excuse. Je remercie également les membres des autres équipes avec qui j'ai pu sympathiser : **Florence T, Pierre C, Crustine, Thomas B ...**

Stéphanie CraparT/D, merci pour tous ces moments sympathiques au laboratoire, tes petits cadeaux surprises qui font toujours plaisir, ton aide précieuse dans mes manip, mais également pour le laboratoire. J'espère que j'aurai été un chef (temporaire) à la hauteur ! Bon, j'avoue, je t'en veux quand même ... tu n'étais même pas présente durant mon premier TP enseignement ... mais finalement, tu as su largement te rattraper par la suite ;-). Je n'oublie pas **Maëlle**, pour ses petites attentions.

Je souhaiterais également remercier les doctorants/ATER/Post-doc qui m'ont accompagné durant ces trois ans de thèse. **Luce Mengue** pour ta présence, tes conseils, ta bonne humeur, ta disponibilité et ton soutien durant cette thèse. **Marie-Hélène Corre**, mouai non, **Mamache** c'est mieux ! Je te remercie pour ton accueil, ta passion de la recherche et de l'enseignement, mais aussi pour les moments moins professionnels : le tennis, les séances gâteaux, les apéros, les longues discussions devant le labo tard le soir, le week-end en Bretagne et j'en passe... Ces trois années de thèse auraient été bien compliquées et beaucoup moins fun sans toi. **Meg Rouxel**,

tu as commencé ta thèse en même temps que moi et tu l'a fini presque en même temps que moi. Je te remercie pour tous les bons moments passés ensemble au cours de cette thèse, mais aussi au badminton (on commence enfin à jouer correctement ensemble !), les soirées, les jeux de sociétés et ton fameux « Si tu prends ça, j'arrête de jouer ! » et puis je terminerais sur notre semaine au congrès à Glasgow (Spécial cass-dédi à Mamma Mia). **Clément Bernard**, merci pour ces soirées au laboratoire, tes inventions aussi farfelues les unes que les autres, ton aide, les soirées jeux de société, les conseils en informatique et puis merci d'avoir sauvé mon ordinateur ... Promis, je ne ferais plus n'importe quoi avec les pilotes de mon ordi ! **Florine Ecale**, alias Agent Fécale, je te remercie pour tous ces bons moments passés au labo ou en dehors, pour ta disponibilité, ton aide, et puis je n'oublie pas ton fameux broyé dont j'attends toujours la recette... Sinon, je ne veux pas te mettre la pression, mais ça y est ... tu es officiellement la prochaine. PS : Je ne te remercie certainement pas pour ta résistance énervante à toutes mes chiantises ! **Aurélien Alafaci**, alias chaton, merci pour ta positivité fantas-TIQUE, les « non mais juste une et on ne reste pas tard, promis », et puis surtout pour m'avoir soutenu et avoir rigolé à toutes mes blagues, même les plus nulles ! Je tenais à finir tes remerciements par : Miaouuuuh Miaou Miauuuuu Miaouh Miaouu ! **Charlotte Depeux**, je te remercie pour ton soutien, ta passion de la science et j'espère ne pas t'avoir traumatisé avec les amibes ! **Yoann Perrin**, pour m'avoir appris que la sauvegarde sur un disque dur externe, finalement c'est très utile.

Je remercie également **Antoine Desrut**, alias le presque aussi relou que moi, je te remercie pour tous les bons moments qu'on a passé ensemble, que ce soit au badminton, à te voir faire du patinage artisti.... Heu du hockey, pour le week-end sur l'Île de Ré (même si tu as quand même été super relou) et puis pour le week-end au Mont-Dore ou on a bien failli ne jamais pouvoir sortir de ce chalet ! Et je n'oublie pas **Charlène**, alias Mimie, ma binôme rouspéteuse du badminton.

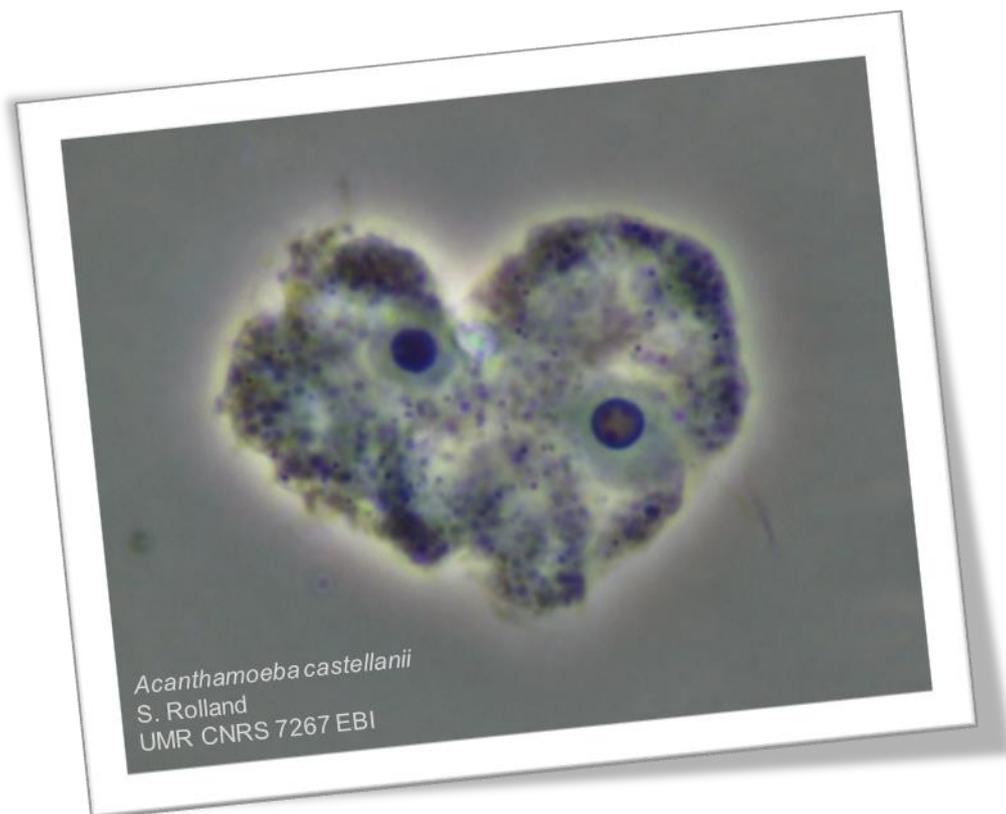
Obélia Haida, dire que nous nous étions rencontré au tout début de ma thèse, et il a fallu attendre plus de 2 ans pour vraiment se côtoyer. Quel gâchis ! Je te remercie pour ces derniers mois de thèse, pour toutes les soirées, les conseils, ton écoute et ton soutien. Histoire de rester dans l'aile C, je remercie également **Adélie Salin**, on avait beau se croiser régulièrement et pourtant ... il a fallu le concours MT180 pour que l'on se côtoie. Même si je n'ai pas eu de prix, faire ta rencontre en était un. Je te

remercie pour ces moments de discussions scientifiques ou non, et tes histoires beaucoupuuuu trop longues (Merci !!! Je ne suis pas le seul finalement). PS : Promis, juste une !

Je remercie également les enseignants de la section 64 pour leur accueil, leur disponibilité et leurs bons conseils pendant mon DCACE. Et puis je n'oublie pas **Céline Lebon** pour ta précieuse aide durant les travaux pratiques.

J'ai également une petite pensée à mon ancien laboratoire où j'ai effectué deux stages de Master, et plus particulièrement envers **Pascale C, Nathalie R, Juan-Jose Q** et **Javier P** pour m'avoir fait découvrir le monde magique de la microbiologie cellulaire, pour m'avoir formé dans ce domaine et pour leur soutien.

Pour finir, je remercie mes amis, mais aussi ma famille, en particulier ma mère, mes grands-parents, mon frère et sa petite famille qui ont été d'un grand soutien pendant cette thèse malgré la distance.



Sommaire

Sommaire	1
Liste des abréviations	5
Liste des figures	7
Liste des tableaux	8
Liste des annexes	9
Chapitre 1 : Introduction bibliographique	11
1. Les amibes	12
2. L'amibe modèle <i>Acanthamoeba castellanii</i>	15
2.1. Généralités	15
2.1.1. Historique	15
2.1.2. Classification et génotypage chez <i>Acanthamoeba</i>	15
2.1.3. Ecologie.....	16
2.2. Différenciation cellulaire.....	17
2.2.1. Le Trophozoïte	17
2.2.2. Le kyste	19
2.2.3. Le pseudokyste	21
2.3. Processus de différenciation	22
2.3.1. Le processus d'enkystement	22
2.3.1.1. Implication du métabolisme des sucres	23
2.3.1.2. Implication de l'autophagie	24
2.3.1.3. Implication des protéases	25
2.3.1.4. Régulation des gènes durant l'enkystement	26
2.3.1.5. Implication de protéines de signalisation	27
2.3.1.6. Cas de Csp21	27
2.3.2. Le processus de déenkystement.....	28
2.4. Pathologie induite par <i>Acanthamoeba castellanii</i>	28
2.4.1. La kératite amibienne	29
2.4.2. L'encéphalite amibienne granulomateuse	29
2.5. Les outils moléculaires disponibles chez <i>A. castellanii</i>	30
2.5.1. Les outils de biologie moléculaire	31
2.5.1.1. Les vecteurs d'expression	31
2.5.1.2. Les ARN interférents	32
2.5.2. Les génomes séquencés d' <i>Acanthamoeba</i> sp.....	34
2.6. <i>Acanthamoeba</i> sp., un hôte environnemental	35

3. <i>La bactérie intracellulaire facultative Legionella pneumophila</i>	37
3.1. Taxonomie du genre <i>Legionella</i>	37
3.2. Ecologie	38
3.3. Caractéristiques morphologiques et biochimiques	40
3.4. La maladie du légionnaire	41
3.5. Facteurs liés au pouvoir pathogène de <i>L. pneumophila</i>	43
3.5.1. Caractéristiques génomiques	43
3.5.2. Les Systèmes de sécrétion	44
3.5.2.1. Système de sécrétion de type 1 (SST1)	44
3.5.2.2. Système de sécrétion de type 2 (SST2)	45
3.5.2.3. Système de sécrétion de type 4 (SST4-A et SST4-B)	45
3.6. Cycle de vie intracellulaire de <i>L. pneumophila</i>	46
3.6.1. Internalisation de <i>L. pneumophila</i>	47
3.6.1.1. Adhérence de <i>L. pneumophila</i> à la surface de son hôte ...	47
3.6.1.2. Internalisation de <i>L. pneumophila</i>	48
3.6.2. Formation de la vacuole contenant <i>L. pneumophila</i> (VCL)	50
3.6.2.1. Inhibition de la voie phagolysosomale	50
3.6.2.2. Maturation de la VCL	51
3.6.2.3. Détournement des processus biologiques	52
3.6.3. Sortie des bactéries	53
Chapitre 2 : Contexte et objectifs des travaux de thèse	55
Chapitre 3 : Matériels et Méthodes	57
1. Culture des microorganismes	58
1.1. Culture d' <i>Acanthamoeba castellanii</i>	58
1.2. Culture de <i>Legionella pneumophila</i>	59
1.3. Culture d' <i>Escherichia coli</i> DH5 α	60
1.4. Infection d' <i>A. castellanii</i> par <i>L. pneumophila</i>	61
2. Techniques de biologie moléculaire	62
2.1. Extraction et traitement DNase des ARN totaux	62
2.2. Extraction de plasmides	63
2.3. Transcription inverse (RT), PCR quantitative (qPCR)	63
2.4. Amplification par PCR	64
2.5. Construction des plasmides	65
2.6. Transformation bactérienne	67
2.7. Séquençage des plasmides	68
2.8. Dosage des acides nucléiques	69
3. Techniques de biologie cellulaire	69

3.1. Transfection des amibes	69
3.2. Estimation de la croissance amibienne	70
3.3. Dosage de la production d'ATP	70
3.4. Quantification du lucifer yellow internalisé.....	71
3.5. Enkystement des amibes	72
4. Protéome d' <i>A. castellanii</i> Neff infectée par <i>L. pneumophila</i> Paris.....	72
4.1. Infection d' <i>A. castellanii</i> par <i>L. pneumophila</i>	72
4.2. Extraction des protéines et analyse LC-MS/MS	73
Chapitre 4 : Protéome d'<i>A. castellanii</i> infectée par <i>L. pneumophila</i>.....	75
5. Modulation de l'expression protéique d' <i>A. castellanii</i> en réponse à l'infection par <i>L. pneumophila</i>	76
6. Analyse des protéines par assignation de termes GO (Gene Ontology).....	77
7. Regroupement de gènes en fonction de leurs termes GO.....	79
8. Discussion sur le protéome	80
Chapitre 5 : Étude de gènes d'<i>A. castellanii</i> sélectionnés à partir de l'analyse du protéome.....	87
1. Sélection de gènes à étudier.....	88
2. Analyse bio-informatique des gènes sélectionnés.....	91
2.1. ACA1_232430 : CBS-domain containing protein (CBS1)	91
2.2. ACA1_383450 : G protein coupled receptor, putative (GPR)	92
2.3. ACA1_321190 : Adaptin ear-binding coat-associated protein 2 (NECAP2)	93
2.4. ACA1_182370 : Osteoclast stimulating factor, putative (OSF)	94
2.5. ACA1_384820 : hypothetical protein (Erat)	95
2.6. Conservation des cinq gènes dans les génomes d' <i>Acanthamoeba</i> spp.	97
Souches	98
3. Modulation de l'expression des gènes	98
3.1. Construction des plasmides d'expression	99
3.2. Transfection des amibes	100
3.3. Vérification de l'expression protéique.....	102
4. Interaction entre <i>A. castellanii</i> et <i>L. pneumophila</i>	104
4.1. Suivi de l'expression des gènes au cours de l'infection.....	104
4.2. Suivi de la croissance intracellulaire de <i>L. pneumophila</i>	106
5. Impact des gènes sélectionnés sur les processus physiologiques de l'amibe	108
5.1. Effet sur la croissance des amibes.....	108
5.2. Effet sur la production d'ATP	110

5.3. Effet sur l'endocytose.....	111
5.4. Effet sur le processus d'enkystement.....	112
5.4.1. Influence de la surexpression des gènes d'intérêt sur la formation du kyste	112
5.4.2. Suivi de l'expression des gènes au cours de l'enkystement...	113
5.4.3. Publication : Erat, a newly described protein impairs encystment in the amoeba <i>Acanthamoeba castellanii</i>	116
6. Discussion	140
6.1. La protéine NECAP2	140
6.2. La protéine CBS1	141
6.3. La protéine OSF	143
6.4. La protéine Erat	144
6.5. La protéine GPR	145
Chapitre 6 : Discussion générale	148
Chapitre 7 : Conclusion générale	154
Chapitre 8 : Références bibliographiques	158
Annexes	187

Liste des abréviations

ACES : acide N-(2-Acétamido)-2-aminoéthanesulfonique

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

AMP : Adénosine monophosphate

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ARNr 18S : ARN ribosomal 18S

ARNt : ARN de transfert

ATP : Adénosine triphosphate

BCYE : Buffered Charcoal Yeast Extract

BT : Bleu trypan

BYE : Buffered Yeast Extract

CBS : Cystathionine beta synthase

CBS1 : CBS-domain containing protein n°1 (ACA1_232430)

Cdc2b : Cell division control protein 2 homolog b

CS : Cellulose synthase

Csp21 : Cyst specific protein 21

DMSO : diméthylsulfoxyde

DNase : Désoxyribonucléase

Dot/Icm : Defective in organelle trafficking/Intracellular multiplication

EDTA : Ethylènediaminetétraacétique

eEF1A : elongation eukaryotic factor 1A

eGFP : enhanced green fluorescent protein

Erat : Encystment-repressed N-acétyltransferase (ACA1_384820)

Fwd : forward

GalNac : N-acétylgalactosamine

GAPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

GNAT : Gcn5-N-acétyltransferase

GO : Gene ontology

GPCR : récepteur couplé à des protéines

G

GPR : G protein coupled receptor (ACA1_383450)

GTP : Guanosine triphosphate

Hsp : Heat shock protein

IP : iodure de propidium

kDa : kilodalton

LB : Lysogeny broth

LC-MS/MS : chromatographie en phase liquid - Spectrométrie de masse

LegK4 : *Legionella* kinase 4

LY : Lucifer yellow

MAPK : Mitogen-activated protein kinases

Mb : mégabase

MDE : Microbiologie de l'eau

miRNA : microARN

MOI : Multiplicity of infection

MRA : Microorganismes résistants à l'amibe

NAD : nicotinamide adénine dinucléotide

NECAP2 : Adaptin earbinding coat-associated protein 2 isoform2, putative (ACA1_321190)

OSF : Osteoclast-stimulating factor, putative (ACA1_182370)
PAS : Page's amoeba saline
PCR : Polymerase chain reaction
PH : Plesckstrin Homology
PI3K : phosphatidylinositol-3-kinase
PMSF : Phénylméthylsulphonyl fluoride
PRMT : Proteine arginine methyltransferase
PYG : Peptone Yeast Glucose
Rev : Reverse
RNase : Ribonucléase
Rns : gène codant l'ARNr 18S
RT-qPCR : Reverse transcription – quantitative PCR
shRNA : ARN en épingle à cheveux (short hairpin RNA)

siRNA : petit ARN interférent (short interference RNA)
SST1 : système de secretion de type I
SST2 : système de secretion de type II
SST4-A : Système de sécrétion de type IV-A
SST4-B : Système de sécrétion de type IV-B
TBP : TATA-binding protein
TPBF : TBP promoter binding factor
UDP-glucose : Uridine diphosphate glucose
UFC : Unité formant colonie
VBNC : viable mais non cultivable
VCL : Vacuole contenant *Legionella pneumophila*

Liste des figures

Figure 1 : <i>Acanthamoeba</i> spp. sous forme de trophozoïte	18
Figure 2 : Kyste mature d' <i>A. castellanii</i> après cryofixation et cryosubstitution.....	20
Figure 3 : Changements morphologiques d' <i>A. castellanii</i> durant l'enkystement.....	22
Figure 4 : Carte des plasmides pGAPDH-eGFP et pTPBF-eGFP	32
Figure 5 : Mécanisme de répression de gène par l'intermédiaire des siRNAs	33
Figure 6 : Cycle de vie des bactéries pathogènes du genre <i>Legionella</i>	39
Figure 7 : Incidence de cas de légionellose reportés entre 1988 et 2018.....	42
Figure 8 : Facteurs de l'hôte et de la bactérie intervenant durant le cycle de vie intracellulaire de <i>L. pneumophila</i> dans les amibes ou les macrophages	46
Figure 9 : Les trois mécanismes d'internalisation de <i>L. pneumophila</i> dans les cellules..	50
Figure 10 : Carte du plasmide pTPBF-eGFP	66
Figure 11 : Réaction chimique médiée par la Luciférase.....	71
Figure 12 : Nombre de protéines dont la quantité est significativement modifiée durant l'infection d' <i>A. castellanii</i> par <i>L. pneumophila</i>	76
Figure 13 : Quantification du nombre de protéines associées aux termes GO les plus représentés à partir des résultats du protéome.....	78
Figure 14 : Prédiction des domaines protéiques pour les 5 protéines putatives étudiées.	96
Figure 15 : Viabilité des amibes après transfection et sélection avec de la G418.	101
Figure 16 : Vérification de la transfection des amibes.....	103
Figure 17 : Évolution de l'expression des gènes d'intérêt au cours de l'infection d' <i>A. castellanii</i> par <i>L. pneumophila str. Paris</i>	105
Figure 18 : Croissance intracellulaire de <i>L. pneumophila</i> après surexpression de gènes chez <i>A. castellanii</i>	107
Figure 19 : Effet de la transfection et de la surexpression des gènes d'intérêt sur la croissance d' <i>A. castellanii</i>	109
Figure 20 : Effet de la transfection et de la surexpression sur la production d'ATP chez <i>A. castellanii</i>	110
Figure 21 : Effet de la transfection et de la surexpression de gènes d'intérêt au cours du processus d'internalisation.	111
Figure 22 : Effet de la transfection et de la surexpression des gènes d'intérêt sur la capacité de formation de kyste.	112
Figure 23 : Evolution de l'expression des gènes étudiés au cours de l'enkystement d' <i>A. castellanii</i>	114

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques générales des séquences des 8 premiers génomes séquencés de <i>L. pneumophila</i>	44
Tableau 2 : Souches d'amibes utilisées durant cette étude.....	59
Tableau 3 : Souches bactériennes utilisées durant cette étude.....	60
Tableau 4 : Amorces utilisées pour la qPCR.....	64
Tableau 5 : Amorces utilisées pour l'amplification de la séquence codante à insérer dans le plasmide.....	65
Tableau 6 : Plasmides utilisés durant cette étude.....	67
Tableau 7 : Protéines sélectionnées initialement, mais exclues de l'étude.....	89
Tableau 8 : Résultat simplifié de l'analyse du protéome d' <i>A. castellanii</i> infectée par <i>L. pneumophila</i> pour les cinq protéines étudiées durant cette thèse.....	90
Tableau 9 : Résultats d'analyse BLASTp des 10 premières séquences homologues à la séquence protéique de CBS1 (ACA1_232430).....	92
Tableau 10 : Résultats d'analyse BLASTp des 10 premières séquences homologues à la séquence protéique de GPR (ACA1_383450).....	93
Tableau 11 : Résultats d'analyse BLASTp des 10 premières séquences homologues à la séquence protéique de NECAP2 (ACA1_321190).....	94
Tableau 12 : Résultats d'analyse BLASTp des 10 premières séquences homologues à la séquence protéique de OSF (ACA1_182370).....	95
Tableau 13 : Résultats d'analyse BLASTp des 10 premières séquences homologues à la séquence protéique de Erat (ACA1_384820).....	96
Tableau 14 : Conservation des gènes étudiés dans les 15 génomes du genre <i>Acanthamoeba</i>	98
Tableau 15 : Plasmides construits et utilisés lors de cette étude.....	100

Liste des annexes

Annexe 1 : Protéine dont le taux est augmenté après 24 h d'infection d'<i>A. castellanii</i> Neff par <i>L. pneumophila</i> Paris.	188
Annexe 2 : Protéines dont le taux est diminué après 24 h d'infection d'<i>A. castellanii</i> Neff par <i>L. pneumophila</i> Paris.	188
Annexe 3 : Protéines dont le taux est augmenté après 48 h d'infection d'<i>A. castellanii</i> Neff par <i>L. pneumophila</i> Paris.	189
Annexe 4 : Protéines dont le taux est diminué après 48 h d'infection d'<i>A. castellanii</i> Neff par <i>L. pneumophila</i> Paris.	190
Annexe 5 : Regroupement des protéines en 10 groupes fonctionnels basé sur leurs termes GO.....	197
Annexe 6 : Publication n°2 : <i>Legionella pneumophila</i> decreases velocity of <i>Acanthamoeba castellanii</i> (Mengue et al., 2017)	201

Chapitre 1 :

Introduction bibliographique

1. Les amibes

Les amibes (du grec « amoibê » signifiant transformation) regroupent un ensemble polyphylétique d'organismes unicellulaires eucaryotes formant le plus large et divers groupe parmi les protistes. La caractéristique commune à l'ensemble de ces organismes est leur capacité à changer de forme grâce à l'extension et la rétraction de prolongements cytoplasmiques appelés pseudopodes. Ces pseudopodes leur permettent de se déplacer par un mouvement dit « amiboïde » ou de capturer des proies par phagocytose. Cependant, le terme amibe n'a pas de réelle valeur taxonomique du fait de la grande diversité observée entre ces organismes.

Les organismes amiboïdes ont longtemps été inclus dans le taxon des Sarcodina ([Schmarda 1871](#); [Page 1976](#)). Cependant, les études phylogénétiques moléculaires, se basant sur le gène de l'ARN ribosomal 18S (ARNr 18S), ont classées les amibes libres dans quatre clades appartenant aux eucaryotes. La grande majorité est retrouvée dans le taxon des Amoebozoa et des Excavata, et le restant parmi les Rhizaria ([Bass et al. 2009](#)) et les Opisthokonta ([Brown et al. 2009](#); [Samba-Louaka et al. 2019](#)).

Les amibes n'ont pas un cycle de vie simple. En effet, il est retrouvé une grande diversité de formes ou d'états cellulaires. Parmi les Amoebozoa, on trouve une amibe, *Amoeba proteus*, dont on ne connaît qu'une seule forme morphologique : le trophozoïte. Les amibes à thèques, appelées thecamoebiens, se différencient des amibes dites « nues » (ou gymnamoebae) de par la présence d'une coque protectrice de composition minérale ou organique à leur surface. Certaines amibes ont également la capacité de former des kystes, de se reproduire de façon sexuée ou asexuée, de former des organes de fructification portant des spores ou possédant des flagelles ([Shadwick et al. 2009, 2016](#); [Kang et al. 2017](#)).

D'un point de vue distribution, les amibes sont largement répandues dans l'environnement qu'il soit naturel ou artificiel. Elles sont couramment retrouvées dans des écosystèmes microbiens d'eau douce et de sol ([Rodríguez-Zaragoza 1994](#); [Khan 2006](#)). Les amibes peuvent interagir avec une grande variété de microorganismes ([Greub and Raoult 2004](#); [Khan 2006](#)). Ces derniers vont être phagocytés et dégradés par l'amibe et seront utilisés comme source de nourriture. Dans un contexte plus large, les amibes ont un rôle majeur dans l'environnement puisqu'elles vont être impliquées

dans le contrôle des communautés microbiennes et dans le recyclage des éléments nutritifs (Petersen and Luxton 1982). Dans certains cas, les microorganismes phagocytés vont développer des mécanismes de résistance à la digestion amibienne, leur permettant de survivre, voir même de se multiplier directement au sein de l'amibe. Plusieurs études ont montré que des bactéries résistantes aux amibes peuvent également potentiellement être résistantes à des cellules phagocytaires de l'homme et d'autres animaux (Fields et al. 1986; Greub and Raoult 2004; Fenner et al. 2006; Goy et al. 2007).

En se basant sur leur mode de vie, les amibes peuvent être classées en quatre grands groupes : les amibes parasitaires, les amibes libres, les amibes sociales et les amibes amphizoïques. Les **amibes parasitaires** sont incapables de se développer et de se multiplier seule dans l'environnement. Elles ont besoin d'un hôte pour compléter leur cycle de vie (Exemple : *Entamoeba histolytica*). Ces amibes sont essentiellement retrouvées dans le système digestif de mammifères, comme par exemple celui de l'Homme. Les **amibes libres** regroupent la plupart des amibes décrites et correspondent à des organismes pouvant survivre et se multiplier de façon autonome dans l'environnement (Ex : *Amoeba proteus*). Les **amibes sociales** regroupent des amibes libres ayant la capacité de vivre sous forme pluricellulaires durant un stade de leur cycle de vie, bien que ce soient des organismes unicellulaires. L'espèce la plus connue et la plus étudiée est *Dictyostelium discoideum* dont le génome a été séquencé et publié en 2005 (Eichinger et al. 2005). Les **amibes amphizoïques** regroupent des amibes libres qui ont la capacité de vivre de façon autonome dans l'environnement, mais qui ont également la capacité de vivre de façon parasitaire chez un hôte (ex : *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba castellanii*). Les pathologies infectieuses causées par les amibes amphizoïques sont rares, mais ont été décrites partout dans le monde (Król-Turmińska and Olender 2017).

Malgré la grande diversité d'amibes, seules quelques espèces ou genres sont responsables de pathologies infectieuses chez l'homme et autres animaux. C'est le cas d'amibes parasitaires comme *Entamoeba histolytica*, qui a été découverte en 1873 chez un patient atteint de dysenterie amibienne (ou amibiase), *Entamoeba invadens*, un important parasite des reptiles, et *Paramoeba* spp., un important pathogène pour le saumon, le homard et l'oursin et un parasite opportuniste pour l'homme (Feehan et al. 2013; Hellebø et al. 2017). Parmi les amibes amphizoïques, il est retrouvé :

Naegleria fowleri, l'agent responsable d'infections fatales du système nerveux central qui a été découverte en 1899 par Schardinger (De Jonckheere 2002), *Sappinia diploidea*, l'agent responsable d'encéphalite granulomateuse (Gelman et al. 2001), *Balamuthia mandrillaris*, l'agent responsable d'infections du système nerveux central, des poumons, des sinus et de la peau (Visvesvara et al. 1993), *Acanthamoeba castellanii*, l'agent responsable de kératite amibienne et d'encéphalite granulomateuse (Castellani 1930; Siddiqui and Khan 2012).

Le fait que les amibes soient impliquées dans des pathologies infectieuses chez l'homme, dans la survie et la dissémination de pathogène dans l'environnement, mais également dans le contrôle des communautés microbiennes et le recyclage des éléments nutritifs, fait de ces organismes un modèle d'étude intéressant pour répondre aux problématiques environnementales, sanitaires et de santé.

Pour la suite de cette introduction bibliographique, l'intérêt s'est porté sur les amibes nues du genre *Acanthamoeba*, puisque *Acanthamoeba castellanii* est le modèle étudié durant cette thèse.

2. L'amibe modèle *Acanthamoeba castellanii*

2.1. Généralités

2.1.1. Historique

Le genre *Acanthamoeba* regroupe des espèces d'amibes libres nues appartenant à la famille des Acanthamoebidae, de l'ordre des Acanthopoda, de la classe des Centramoebida et du Phylum des Discosea (Page 1976; Cavalier-Smith 2004; Smirnov et al. 2011; Cavalier-Smith et al. 2016; Kang et al. 2017; Adl et al. 2019). *Acanthamoeba* dérive du mot grec « *Acantha* » signifiant « piquant, épine » du fait de la présence de fins prolongements cytoplasmiques, appelés « acanthopodes ».

La première espèce décrite est *A. castellanii*. Elle a été isolée comme contaminant d'une culture de *Cryptococcus pararoseus* (Castellani 1930). Castellani décrit cette amibe comme étant ronde ou ovale et possédant un diamètre compris entre 13,5 et 22,5 μm . La présence de pseudopodes à la surface cellulaire est remarquée. La forme enkystée d'un diamètre d'environ 9 à 12 μm , montre la présence de deux parois. En tenant compte de ces caractéristiques, cette amibe a été placée dans le genre *Hartmannella*, et est nommée *Hartmannella castellanii*. En 1931, elle est finalement renommée *Acanthamoeba castellanii* (Volkonsky 1931). Bien que le genre *Acanthamoeba* ait été établi par Volkonsky en 1931, la classification de cet organisme a causé beaucoup de confusions du fait que la classification changeait en fonction des caractères pris en compte (Visvesvara 1991).

2.1.2. Classification et génotypage chez *Acanthamoeba*

La classification traditionnelle des espèces parmi le genre *Acanthamoeba* se base exclusivement sur la taille et la forme des kystes. Trois groupes ont été décrits. Les amibes classées dans le **groupe I** regroupent les espèces formant de larges kystes dont le diamètre est supérieur à 18 μm , avec un ectokyste lisse ou très légèrement irrégulier et un endokyste en forme d'étoile, et séparé de l'ectokyste. Le **groupe II** comprend des espèces avec des kystes dont la taille est inférieure à 18 μm et comprenant un ectokyste ridé et un endokyste polymorphique (forme étoilé, polygonal, triangulaire ou ovale) étroitement apposés ou largement séparés de l'ectokyste. Le **groupe III** comprend des espèces d'un diamètre allant jusqu'à 18 μm avec un ectokyste lisse ou légèrement plissé et un endokyste ovale (Pussard and Pons 1977; Marciano-Cabral and Cabral 2003). Mais cette classification a ses limites et se révèle être incohérente. Par exemple, selon la force ionique présente dans le milieu

de culture, la forme du kyste peut être altérée, ce qui empêche de relier la forme du kyste à la taxonomie (Sawyer 1971).

De nombreuses études se sont intéressées à la recherche de nouveaux critères pour classer les espèces parmi le genre *Acanthamoeba*. De ce fait, cette classification n'a cessé d'évoluer au cours des années. Ces nouveaux critères, bien que non concluant, reposaient sur des critères morphologiques tels que le nombre d'ostioles sur le kyste (Pussard and Pons 1977), mais aussi à l'étude de profils électrophorétiques d'isoenzymes (de Jonckheere 1983; Daggett et al. 1985; Moura et al. 1992) ou encore à l'étude du polymorphisme de longueur des fragments de restriction de l'ADN mitochondrial (Bogler et al. 1983; Yagita and Endo 1990).

La classification actuelle des espèces du genre *Acanthamoeba* est basée sur le séquençage du gène nucléaire codant l'ARN ribosomal 18S (Rns), ce qui permet de les répartir dans au moins 20 génotypes actuellement décrits (Gast et al. 1996; Stothard et al. 1998; Corsaro et al. 2015; Fuerst et al. 2015). Le génotypage peut s'effectuer à partir d'un fragment du gène Rns : appelé « ASA.S1 » (*Acanthamoeba* specific amplimer), d'une taille variant de 423 à 551 nucléotides (Stothard et al. 1998). De plus, une région hautement variable présent dans le fragment ASA.S1, désignée comme DF3 (Diagnostic Fragment 3) peut également être utilisée pour le génotypage (Schroeder et al. 2001).

2.1.3. Ecologie

Les espèces du genre *Acanthamoeba* sont retrouvées de façon ubiquitaire dans l'environnement. Elles ont notamment pu être isolées à partir de l'eau, du sol, et même de l'air, et vont se retrouver à la fois dans des environnements naturels et artificiels (de Jonckheere 1991). Dans l'environnement, elles ont ainsi pu être isolées à partir de compost, de poussières, d'eaux douces, d'eau de mer, de légumes, de plantes, de champignons et d'animaux par exemple. Au niveau des environnements artificiels, elles ont pu être isolées à partir d'eau minérale en bouteille, de piscines, de jacuzzis, de tours de refroidissement de centrales nucléaires, de conduits de ventilation, d'humidificateur d'air, de système de climatisation ... mais également en lien avec l'homme comme des prélèvements pharyngés, de cavités nasales humaines, de tissus pulmonaires, d'excréments, de biopsies de la cornée, de liquide céphalo-rachidiens ou sur des systèmes utilisés en médecine tels que des unités de dialyse, des stations de lavages pour les yeux, des unités de traitement dentaire, des instruments chirurgicaux

ou de lentilles de contact (Marciano-Cabral and Cabral 2003; Siddiqui and Khan 2012; Lorenzo-Morales et al. 2013).

Les amibes du genre *Acanthamoeba* sont considérées ubiquitaires, de par le fait qu'elles sont isolées d'environnements très variés et en interaction constante avec l'Homme. D'ailleurs, des anticorps naturels contre *Acanthamoeba* sont retrouvés dans le sang de plus de 80% de la population humaine mondiale (Cursons et al. 1980; Brindley et al. 2009).

2.2. Différenciation cellulaire

A l'état naturel, le cycle de vie des amibes du genre *Acanthamoeba* présente deux formes principales : la forme trophozoïte, qui est une forme végétative métaboliquement active et une forme de résistance métaboliquement peu active, appelée kyste. Une troisième forme, induite lors de stress aigu, a récemment été décrite : le pseudokyste. Aucune autre forme n'est observée comme par exemple une forme flagellée, comme chez *Naegleria* sp., ou bien la capacité de former un organe de fructification multicellulaire, comme chez *Dictyostelium discoideum*. Récemment, l'amibe *A. pyriformis* (anciennement *Protostelium pyriformis*) montre une structure dormante surélevée par une tige non cellulaire (Tice et al. 2016). Cependant, c'est la seule espèce actuellement décrite parmi le genre *Acanthamoeba* pouvant faire cette structure.

2.2.1. Le Trophozoïte

La forme trophozoïte (du grec « tropho » signifiant nourrir) correspond à la forme végétative métaboliquement active pouvant se nourrir et se déplacer par l'intermédiaire de prolongements cytoplasmiques appelés pseudopodes (Bowers 1977; Bowers and Olszewski 1983). Ce trophozoïte peut également se diviser par fission binaire. Cette forme est retrouvée lorsque l'amibe est dans des conditions favorables pour sa survie, son développement ou sa multiplication, par exemple avec un pH neutre, une source nutritive et une température avoisinant les 30°C.

Le trophozoïte a un diamètre variant en moyenne entre 12 et 35 µm, avec des différences morphologiques qui peuvent varier en fonction de l'isolat, de l'espèce ou du génotype. Il possède également de fines et courtes projections cytoplasmiques, ressemblant à des épines, appelées acanthopodes (Visvesvara 1991; Marciano-

[Cabral and Cabral 2003](#)) qui sont essentiels pour l'adhérence sur des surfaces biologiques et inertes, la locomotion et la capture de proie (**Figure 1A**).

Le cytoplasme est composé d'un hyaloplasme constitué de plus de 60% d'eau, de sels et de composés organiques. Les trophozoïtes comportent également une structure cellulaire similaire aux autres eucaryotes (**Figure 1B**) tels que la présence d'un ou plusieurs noyaux avec un nucléole prédominant, la présence d'un système endo-membranaire proche de celui des autres eucaryotes incluant du réticulum endoplasmique lisse et rugueux, un appareil de Golgi, des vacuoles d'internalisation et de digestion, une ou plusieurs vacuoles contractiles, des peroxysomes et des mitochondries ([Khan 2015](#)).

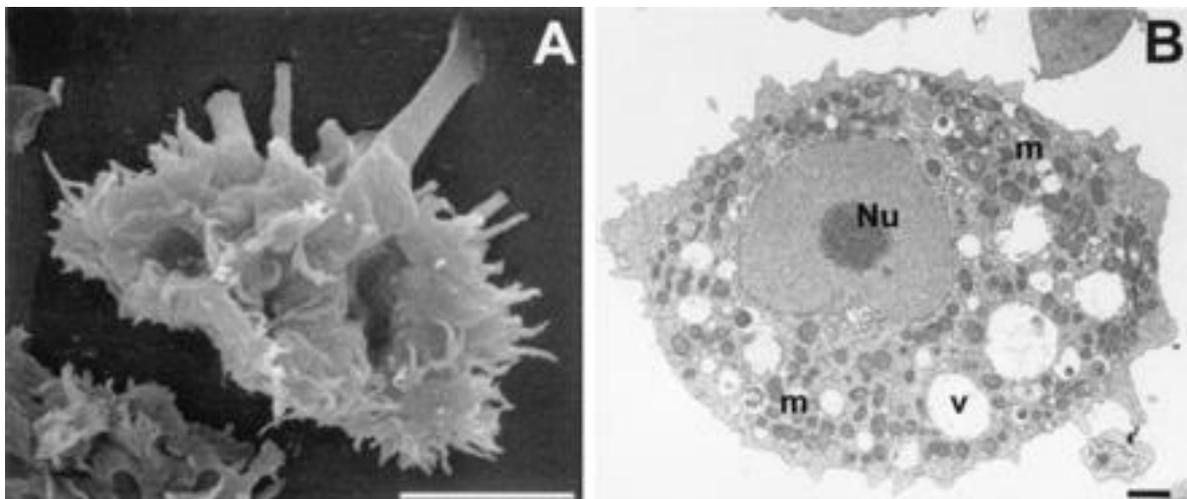


Figure 1 : *Acanthamoeba* spp. sous forme de trophozoïte (d'après [Marciano-Cabral et Cabral, 2003](#)). (A) Le trophozoïte d'*A. polyphaga* observé en microscopie électronique à balayage montre une surface irrégulière composée de prolongements cytoplasmiques (pseudopodes). L'échelle représente une taille de 10 μm . (B) Le trophozoïte d'*A. castellanii* observé en microscopie électronique à transmission montre la présence d'une structure similaire à une cellule eucaryote classique avec la présence d'un nucléole (Nu), de mitochondries (m), ainsi que de vacuoles (V). L'échelle représente une taille de 1 μm .

2.2.2. Le kyste

Le kyste est décrit comme une forme résistante et dormante dont le métabolisme est peu actif. Le processus menant à la formation du kyste à partir d'un trophozoïte est le processus d'enkystement. Il est réversible et est induit lorsque les conditions environnementales deviennent stressantes pour l'amibe telles qu'une carence en nourriture, un changement de pH, d'osmolarité ou de pression, ou bien la présence d'agents chimiques (Neff and Neff 1969; Khan 2015). Sous la forme de kyste, l'amibe peut ainsi résister à différents traitements physico-chimiques et peut persister et rester viable durant des années (Mazur T. et al. 1995; Aksozek et al. 2002; Khan 2006; Fouque et al. 2012; Lloyd 2014).

Le kyste a une morphologie arrondie et présente un diamètre nettement inférieur aux trophozoïtes. En général, il possède une taille comprise entre 5 et 20 µm. L'absence de pseudopodes ne permet pas au kyste de se déplacer.

L'analyse par microscopie électronique à transmission d'un kyste mature (**Figure 2**) montre la présence d'une paroi composée de deux couches denses et enrichies en microfibrilles, séparées par une couche qui n'en présente pas (Bowers and Korn 1969; Chávez-Munguía et al. 2013). La couche externe, ou ectokyste, est composée majoritairement de protéines et de polysaccharides, tandis que la couche interne, ou endokyste, est composée majoritairement de cellulose (Garajová et al. 2019; Magistrado-Coxen et al. 2019). Ces deux couches se rejoignent au niveau d'une ou plusieurs ouvertures appelées ostioles. De plus, un opercule est également décrit et empêche la communication du kyste avec l'environnement extérieur. Cet opercule a une forme en cloche et possède une structure d'aspect fibreux similaire à celle observée dans la paroi (Chávez-Munguía et al. 2005).

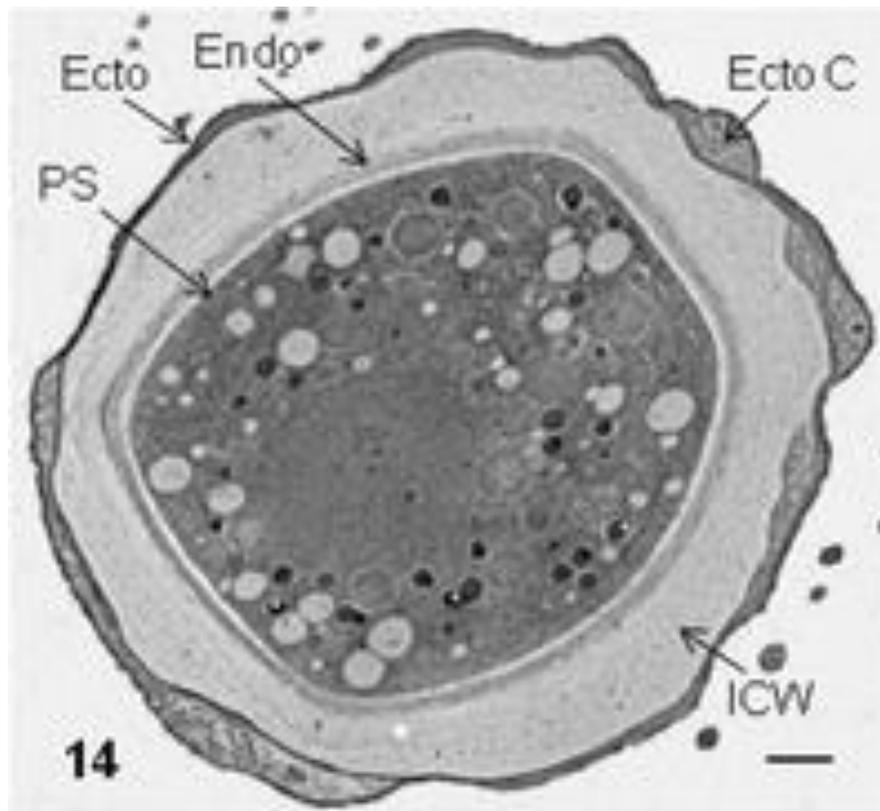


Figure 2 : Kyste mature d'*A. castellanii* après cryofixation et cryosubstitution (d'après Chávez-Munguía *et al.*, 2013). La paroi du kyste montre la présence d'une couche externe, l'ectokyste (Ecto, EctoC), et d'une couche interne, l'endokyste (Endo). Un espace entre ces deux couches est observé (ICW), et également entre la membrane plasmique et l'endokyste (PS).

La paroi du kyste des *Acanthamoeba* de génotype T4 est constituée de 33% de protéines connues, de 4 à 6% de lipides, de 35% de carbohydrates (principalement de la cellulose), de 8% de résidus, et de 20% de protéines non-identifiées. Cependant, cette composition peut varier selon l'espèce ou le génotype (Barrett and Alexander 1977). L'endokyste est composé de cellulose, un glycopolymère absent dans le trophozoïte. Un tiers de la masse sèche de l'endokyste pourrait être de la cellulose (Tomlinson and Jones 1962; Weisman 1976). De son côté, l'ectokyste serait un amalgame de protéines et de polysaccharides, incluant 8 peptides mineurs (Neff and Neff 1969; Barrett and Alexander 1977). Un des composants majeurs est une protéine avec un poids moléculaire de 70 kilodalton (kDa) (Neff and Neff 1969; Rubin *et al.* 1976). Chez certaines espèces d'*Acanthamoeba* sp., une protéine de 21 kDa, nommée Csp21, est retrouvée spécifiquement dans le kyste (Hirukawa *et al.* 1998).

Une analyse des monosaccharides présents dans le kyste par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse montre la présence de 53,4 % de glucose, de 44,3 % de galactose, de 3% de mannose, et des traces de xylose. Les études précédentes se sont focalisées sur la cellulose, un polymère de glucose, or la présence d'une importante proportion de galactose montre que d'autres voies cellulaires pourraient être impliquées durant l'enkystement d'*Acanthamoeba* (Dudley et al. 2009).

Récemment, trois grands types de lectines se liant à la cellulose ont été décrites comme localisées dans la paroi du kyste. La lectine Jonah est localisée dans l'ectokyste, tandis que les lectines Luke et Leo sont localisées dans l'endokyste et au niveau de l'ostiole (Magistrado-Coxen et al. 2019).

2.2.3. Le pseudokyste

Les trophozoites d'*Acanthamoeba* peuvent rapidement (en moins de deux heures) se différencier en pseudokystes lors d'un stress aigu, comme l'exposition à des solvants organiques, par exemple le méthanol, le diméthylsulfoxyde (DMSO) ou l'acétone (Kliescikova et al. 2011a). La formation de pseudokystes a également été décrite lors de l'exposition à des solutions de lentilles de contact contenant du propylène glycol (Kliescikova et al. 2011b).

La surface du pseudokyste est recouverte d'une couche fibrillaire composée de mannose et de glucose. Cependant, Csp21, une protéine spécifique du kyste n'y est pas exprimée. La résistance de ce pseudokyste à la température, au pH ou à la dessiccation reste limitée (Kliescikova et al. 2011a, 2011b). Des enzymes impliquées dans la biosynthèse du tréhalose sont induites lors de la formation du pseudokyste, suggérant un rôle de ce diholoside dans ce processus (Bínová et al. 2017).

2.3. Processus de différenciation

2.3.1. Le processus d'enkystement

Le processus d'enkystement correspond à la différenciation du trophozoïte en kyste sous l'influence de conditions environnementales défavorables pour l'amibe. Ce processus induit un changement morphologique de la cellule, un arrêt de la croissance cellulaire, un changement de propriétés biochimiques ainsi que de l'assemblage d'une paroi à la surface cellulaire (**Figure 3**). La formation de la paroi du kyste est décrite par Magistrado-Coxen et col. comme un processus finement chorégraphié dans lequel des lectines et des glycopolymères vont se combiner entre eux afin de former une paroi mature constituée d'une couche protectrice : l'endokyste ([Magistrado-Coxen et al. 2019](#)).

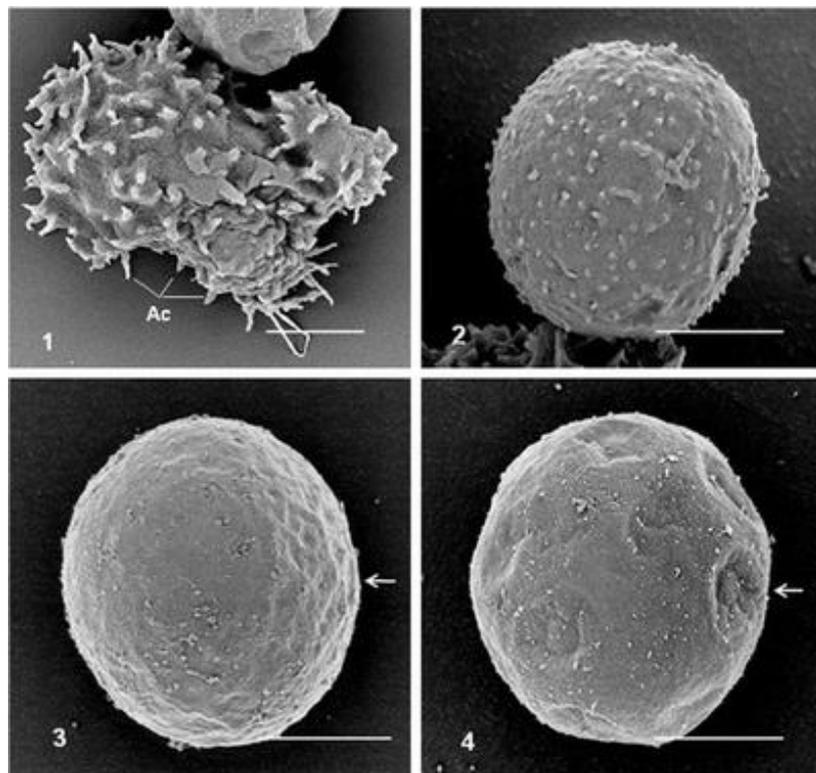


Figure 3 : Changements morphologiques d'*A. castellanii* durant l'enkystement (d'après Chavez-Mungia et al., 2013). L'observation en microscopie électronique à balayage montre un changement morphologique du trophozoïte (1) en prékyste (2) avec un arrondissement de la cellule et une perte progressive de pseudopodes, suivie de la formation d'un kyste immature (3). Enfin, le kyste mature présente une paroi complètement formée (4). L'échelle représente une distance de 5 μm .

La nature de la paroi peut être différente en fonction de l'organisme étudié. Il est ainsi décrit une paroi composée majoritairement de cellulose dans le cas des amibes modèles *A. castellanii* et *D. discoideum*, ou composée majoritairement de chitine dans le cas de l'amibe parasite *Entamoeba histolytica* (Arroyo-Begovich et al. 1980). D'autres glycopolymères peuvent être des constituants majoritaires comme des polymères de glucose liés par liaison β 1-3 dans le cas de *Toxoplasma*, ou des polymères de N-acétylgalactosamine (GalNac) liés par liaison β 1-3 pour *Giardia* (Samuelson et al. 2013).

Chez *Acanthamoeba castellanii*, la différenciation du trophozoïte en kyste dure entre 16 et 24 heures (Lloyd et al. 2001; Köhler et al. 2008). Le niveau cellulaire pour les ARN, les protéines, les triacylglycérides et le glycogène diminuent très fortement durant l'enkystement, ce qui induit une diminution du volume cellulaire et une perte d'eau (Weisman 1976). De plus, une quantité moins importante de mitochondries est observée (Siddiqui and Khan 2012). Bien que le processus d'enkystement chez *A. castellanii* reste peu connu, plusieurs acteurs moléculaires ont été mis en évidence tels que des enzymes impliquées dans le métabolisme des sucres, dans l'autophagie, dans la dégradation protéolytique et dans la régulation de l'expression de gènes.

2.3.1.1. Implication du métabolisme des sucres

La propriété de résistance du kyste est fortement liée à la présence de cellulose dans sa paroi (Potter and Weisman 1972), ainsi que d'autres composés polysaccharidiques constitués de glucose, de galactose, de xylose ou de mannose par exemple (Dudley et al. 2009). La synthèse de cellulose se déroule directement à la membrane plasmique par la cellulose synthase en utilisant l'uridine diphosphate glucose (UDP-glucose) pour former des chaînes d'homopolymères β 1-4 D-glucane. Les molécules d'UDP-glucose sont synthétisées par l'intermédiaire de l'UDP-glucose pyrophosphorylase ou de la sucrose synthase (Dudley et al. 2007). Les gènes codants l'UDP-glucose pyrophosphorylase et la cellulose synthase sont fortement exprimés durant le processus d'enkystement (Moon and Kong 2012). De plus, l'utilisation d'ARN interférents dirigés contre le gène de la cellulose synthase inhibent la formation des kystes (Aqeel et al. 2013; Moon et al. 2014).

Des études précédentes ont montré que la synthèse de la cellulose est effectuée en utilisant le glucose issu du glycogène stocké durant la phase de croissance (Weisman et al. 1970; Potter and Weisman 1971; Stewart and Weisman

1974). De plus, le glycogène est la macromolécule la plus vite dégradée au cours des premières phases de l'enkystement d'*Acanthamoeba* (Bowers and Korn 1969; Potter and Weisman 1971). En général, le glycogène est clivé en glucose par l'intermédiaire des hydrolases lysosomales (amylases) et par la glycogène phosphorylase (Weisman 1976). Il a été montré que le gène codant la glycogène phosphorylase est hautement exprimé au cours de l'enkystement (Moon and Kong 2012) et que l'utilisation d'ARN interférents contre le gène de cette enzyme empêche la formation de l'endokyste et donc empêche l'obtention d'un kyste mature (Lorenzo-Morales et al. 2008, 2010).

D'autres enzymes liées au métabolisme des sucres ont été décrites comme étant impliquées dans l'enkystement. C'est le cas de la xylose isomérase dont l'utilisation d'ARN interférents induit un blocage de la formation du kyste (Moon et al. 2014). De plus, le tréhalose semble également avoir un rôle à jouer puisque l'expression de la tréhalose synthase est induits deux heures après induction de l'enkystement (Bínová et al. 2017).

2.3.1.2. Implication de l'autophagie

L'autophagie est un système de dégradation conservé chez les eucaryotes et est décrit comme une « auto-digestion ». Contrairement aux autres systèmes de dégradation, l'autophagie peut dégrader presque tout dans la cellule, incluant les protéines, les organelles, et même des microorganismes internalisés (Mizushima and Komatsu 2011; Mizushima et al. 2011). Il est essentiel pour de nombreux processus cellulaires tels que la survie durant des phases de carence, la différenciation cellulaire ou la mort cellulaire. De plus, son implication a été démontrée lors du processus d'enkystement de plusieurs protistes parasites (Picazarri et al. 2008; Brennand et al. 2011).

L'autophagie est initiée par la formation dans le cytoplasme d'une double membrane appelée phagophore, qui va ensuite s'étendre progressivement autour du matériel cytoplasmique à dégrader et former ainsi l'autophagosome. Les lysosomes vont ensuite fusionner avec l'autophagosome afin de former l'autolysosome, dont le contenu sera dégradé par les enzymes lysosomales (Jenzer and Legouis 2017). Les produits formés vont être transportés vers le cytoplasme où ils seront réutilisés ou fourniront l'énergie nécessaire à la cellule afin de survivre à la période de carence (Huang and Klionsky 2002; Yorimitsu and Klionsky 2005).

Chez *Acanthamoeba*, de nombreux gènes liés à l'autophagie ont été décrits comme étant impliqués dans le processus d'enkystement. En effet, l'utilisation d'ARN interférents ciblés contre ces gènes bloque la capacité à former des kystes. C'est le cas d'AcAtg8, l'isoforme AcAtg8b, AcAtg12, AcAtg3 et AcAtg16L. De plus, l'expression d'AcAtg8, d'AcAtg8b et d'AcAtg12 est fortement induite durant le processus d'enkystement (Moon et al. 2009, 2011a, 2013; Song et al. 2012; Kim et al. 2015). L'utilisation d'inhibiteurs de l'autophagie tels que la 3-méthyladénine et le chloroquine, montre une réduction significative du nombre de cellules enkystées. Un léger effet est observé lors de l'utilisation de wortmannin (Moon et al. 2015). L'ensemble de ces études montre que l'autophagie est un processus cellulaire indispensable dans le processus d'enkystement d'*A. castellanii*.

2.3.1.3. Implication des protéases

Une des caractéristiques retrouvées dans le genre *Acanthamoeba* est la sécrétion importante de protéases (Khan 2006). Les protéases sont des enzymes impliquées dans la dégradation de protéines et sont classées en quatre grandes classes : les protéases à serine, les protéases à cystéine, les protéases acides et les métalloprotéinases.

Les protéases à sérine sont les protéases les plus abondantes chez *Acanthamoeba* et sont décrites comme impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire lors de l'infection chez l'Homme (Hong et al. 2000; Kong et al. 2000; Kim et al. 2003; Khan 2006). De plus, leur implication dans le processus d'enkystement a également été mise en évidence par l'utilisation d'inhibiteurs, tel que le phénylméthylsulphonyl fluoride (PMSF), du fait que cela empêche la formation des kystes (Dudley et al. 2008a). Une protéase à sérine, l'EMSP (encystation-mediating serine proteinase), a été décrite comme impliquée lors du processus d'enkystement d'*A. castellanii* (Moon et al. 2008).

L'implication de protéases à cystéine a dans un premier temps été suggérée durant les premières phases de l'enkystement d'*Acanthamoeba*, du fait que l'utilisation de l'E-64d, un inhibiteur de protéase à cystéine, bloque l'enkystement (Leitsch et al. 2010). Puis, cela a été démontré par la description de CSCP (cyst specific cystein proteinase), une protéinase lysosomale, qui est fortement exprimée durant l'enkystement (Moon et al. 2011b), et dont l'inhibition de l'expression semble induire une accumulation de mitochondries non digérées, aboutissant à une incapacité de former un kyste (Moon

et al. 2012b). De plus, l'étude de la protéine AcStefin, un inhibiteur de protéases à cystéine, montre que leur activité est très régulée durant l'enkystement. En effet, l'utilisation d'ARN interférents contre AcStefin induit une augmentation de l'activité des protéases à cystéine, ce qui induit une formation incomplète de la paroi du kyste (Lee et al. 2013).

Les métalloprotéinases sont des protéases possédant des ions métalliques dans leur site catalytique. Des études ont suggéré leur implication dans le processus d'enkystement du fait que l'utilisation d'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA), un chélateur d'ions métalliques, diminue fortement la formation des kystes (Dudley et al. 2008a). Une leucine aminopeptidase de la famille M17 (AcLAP) a été caractérisée récemment et est impliquée durant le processus d'enkystement. En effet, AcLAP est fortement exprimé durant les dernières phases de l'enkystement et l'utilisation d'ARN interférents montre une diminution de la formation de kyste mature avec la formation d'une paroi anormale (Lee et al. 2015).

2.3.1.4. Régulation des gènes durant l'enkystement

Pour mener à bien la différenciation du trophozoïte en kyste, une régulation importante de l'expression des gènes est nécessaire. Une étude de comparaison de transcriptomes de kystes et de trophozoïtes a été effectuée par l'intermédiaire de microarray d'ADNc. Les résultats montrent que 701 gènes sont induits de plus de deux fois dans le kyste, et 859 gènes sont au contraire réprimés (Moon et al. 2011c). Cependant, le mécanisme induisant le changement d'expression de ces gènes reste mal connu à ce jour.

Parmi les mécanismes de régulation de gènes, on peut retrouver les modifications épigénétiques. Elles vont agir sur l'expression de gènes sans en modifier la séquence nucléotidique (Jaenisch and Bird 2003). Les modifications épigénétiques peuvent être regroupées dans trois grandes catégories : la méthylation de l'ADN, la modification des histones et le positionnement du nucléosome (Portela and Esteller 2010). Une étude récente a montré que le promoteur du gène codant la CSCP était méthylé, et pourrait être en lien avec la modification de son expression au cours de l'enkystement (Moon et al. 2017a).

La modification des histones comme la méthylation ou l'acétylation affecte l'état de la chromatine et de ce fait l'expression des gènes (Kouzarides 2007). La

méthylation peut être induite par l'intervention de méthyltransférase(s) à arginine (PRMT, protein arginine methyltransferase(s)). Ce sont des enzymes impliquées dans le transfert d'un groupement méthyl ou S-adénosylméthionine sur un résidu arginine d'une protéine cible. Ce transfert va donc générer une protéine qui sera monométhylée, diméthylée ou triméthylée sur une arginine (Niewmierzycka and Clarke 1999). Durant le processus d'enkystement, les protéines AcPRMT5 et AcPRMT1 semblent jouer un rôle important du fait que leur expression est induite au cours de l'enkystement et que l'inhibition de l'expression bloque la formation du kyste (Moon et al. 2016, 2017b). Chez d'autres organismes, il est décrit que PRMT1 est associée à une activation de gènes (Wang et al. 2001), tandis que PRMT5 est associée à une répression de gènes (Pal et al. 2004). Cependant, les cibles d'AcPRMT1 et d'AcPRMT5 n'ont pas encore été identifiées chez *A. castellanii*.

2.3.1.5. Implication de protéines de signalisation

Bien que différents signaux environnementaux puissent induire l'enkystement, les voies de signalisation mises en jeu restent très mal connues. Il a été proposé que certaines voies de signalisation telles que les voies de Ras, des MAPK (Mitogen-activated protein kinases) et du PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase) pourraient être liées à l'enkystement (Fouque et al. 2012). De plus, les résultats d'analyse et de microarray d'ADNc issus de kystes d'*Acanthamoeba* montrent une forte expression de protéines kinases C (PKC) durant l'enkystement (Moon et al. 2011c). Les PKC sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques tels que l'apoptose, la polymérisation de l'actine, la modulation de l'activité de canaux ioniques, la régulation du cycle cellulaire ou encore la biogenèse membranaire (Toker 1998). L'utilisation d'inhibiteurs de PKC comme le chélérytrine, inhibe la maturation du kyste. De plus, parmi les 27 protéines identifiées comme des PKC potentielles chez *Acanthamoeba*, 21 sont fortement exprimées au cours de l'enkystement. Enfin, l'étude de l'une d'entre elles confirme son implication dans le processus d'enkystement du fait que l'inhibition de l'expression du gène d'AcPKC23 inhibe la formation du kyste (Moon et al. 2012a).

2.3.1.6. Cas de Csp21

D'autres protéines ont également pu être mises en évidence, bien que leurs fonctions restent encore mal connues. C'est le cas de Csp21 (cyst specific protein 21), une protéine hydrophobe de 21 kDa, qui est spécifique de la forme de kyste (Hirukawa

et al. 1998). De plus, son expression est réprimée durant la phase de croissance et fortement exprimée durant les premières phases de l'enkystement (Chen et al. 2004b).

2.3.2. Le processus de désenkystement

Le processus de désenkystement aboutit à la différenciation du kyste en trophozoïte. C'est un processus peu étudié et est induit lorsque les conditions environnementales redeviennent favorables pour l'amibe. Il est décrit que le processus peut être initié après une incubation de 11 h dans du milieu de culture à partir de kystes matures (Khunkitti et al. 1998). Le désenkystement induit un changement morphologique du contenu du kyste avec une apparition de fines granules denses dans le cytoplasme, la formation des réseaux endomembranaires et phagosomales, puis l'apparition des pseudopodes à travers l'ostiole menant à la sortie du trophozoïte (Mattar and Byers 1971; Chambers and Thompson 1972; Chávez-Munguía et al. 2005). L'utilisation de PMSF (inhibiteur des protéases à sérine) et de l'EDTA (chélateur d'ions métalliques) inhibe le processus de désenkystement, ce qui montre l'implication des protéases à sérine et des ions métalliques dans cette différenciation (Dudley et al. 2008a). De plus, l'utilisation d'ARN interférents contre AcStefin, un inhibiteur des protéases à cystéine, inhibe également l'enkystement montrant un rôle des protéases à cystéine dans le désenkystement (Lee et al. 2013).

Des études se sont intéressées aux effets des conditions environnementales et physiologiques sur ce processus. Elles ont ainsi montré qu'une température de 30°C et un pH neutre correspondaient aux conditions optimales. Cependant, une température inférieure à 4°C, un pH inférieur à 4, l'utilisation de solvants comme le méthanol et l'éthanol ou d'inhibiteur des protéines G comme le propranolol hydrochloride, inhibent le désenkystement. Une concentration atmosphérique en CO₂ de 5% ou la présence de sérum de veau foetal favorisent le désenkystement (Lakhundi et al. 2014).

2.4. Pathologie induite par *Acanthamoeba castellanii*

Certaines espèces parmi le genre *Acanthamoeba* sont responsables de deux pathologies infectieuses majeures chez l'Homme : la kératite amibienne et l'encéphalite amibienne granulomateuse. Le génotype le plus fréquent impliqué dans des pathologies infectieuses chez l'Homme correspond au génotype T4, ce qui

suggère une résistance plus accrue aux agents thérapeutiques et/ou une virulence plus importante (Siddiqui and Khan 2012). Cependant, d'autres génotypes sont également isolés de patients tels que les génotypes T2 à T6, T10, T11 et T15 dans le cas de kératite amibienne et les génotypes T1, T2, T4, T5, T10 et T12 dans le cas d'encéphalite granulomateuse (Behera et al. 2016).

2.4.1. La kératite amibienne

La kératite amibienne correspond à une infection sévère de l'œil. Les premiers symptômes caractéristiques sont : une douleur, une photophobie, une inflammation de l'œil, une production excessive de liquides lacrymaux et une diminution de l'acuité visuelle. La pathologie se propage par la formation d'ulcération, d'uvéïte conduisant à de potentiels dommages de l'iris avec une dilatation des pupilles, la formation d'abcès, une sclérite et d'autres problèmes liés à l'acuité visuelle (Maycock and Jayaswal 2016). La majorité des cas concerne des personnes qui portent des lentilles de contact et est causée par une mauvaise hygiène, ou une mauvaise efficacité des produits de désinfection (Joslin et al. 2007; Dart et al. 2008, 2009). Souvent *Acanthamoeba* arrive par l'intermédiaire de l'eau du robinet, puis se multiplie sur la lentille de contact dans le cas où elle n'est pas suffisamment désinfectée et va ainsi pouvoir infecter l'œil (Walochnik et al. 2015).

Le diagnostic reste actuellement compliqué, et les traitements possibles sont longs et ont une efficacité limitée. Le traitement reste actuellement difficile à mettre en place, à cause d'une grande variabilité de pathogénicité retrouvée entre les différentes souches, un processus infectieux qui peut varier d'un patient à l'autre, ainsi qu'un faible nombre de cas qui sont reportés (Lorenzo-Morales et al. 2015). Cependant, malgré la combinaison de la chirurgie et du développement d'agents thérapeutiques, la capacité de l'amibe à s'enkyster et à se désenkyster pose réellement un problème dans la récurrence des cas de kératites (Anwar et al. 2018).

2.4.2. L'encéphalite amibienne granulomateuse

L'encéphalite amibienne granulomateuse est une très rare pathologie infectieuse touchant le système nerveux central, dont le taux de mortalité avoisine les 98 %. Cette pathologie est induite par *Balamuthia mandrillaris* et quelques espèces parmi les *Acanthamoeba* (Martínez and Visvesvara 2001; Kot et al. 2018). L'infection

se déclare surtout chez des personnes ayant des troubles physiologiques ou qui sont immunodéprimés, comme par exemple, des personnes infectées par le virus de l'immunodéficience humaine, des personnes transplantées, ou des personnes atteintes de diabète (Salameh et al. 2015; Memari et al. 2017). Les symptômes sont des maux de tête, une raideur de la nuque, de la fièvre, des convulsions, des nausées, des vomissements ainsi que des problèmes psychiatriques tels que la confusion, une léthargie et des hallucinations (Ahmed Khan 2011; Kot et al. 2018).

La voie d'entrée d'*Acanthamoeba* se fait au niveau de l'épithélium olfactif (narine) après respiration d'air ou d'eau contaminée. Les trophozoïtes pénètrent la muqueuse et migrent ensuite vers le système nerveux central qu'elles infecte (Ahmed Khan 2011; Kot et al. 2018). D'autres sites d'infection sont également décrits tels que la muqueuse buccale, les blessures au niveau de la peau, la cornée et la muqueuse intestinale (Visvesvara et al. 2007).

Le traitement d'infection par *Acanthamoeba* au niveau du cerveau reste difficile du fait de la non-spécificité des symptômes et surtout du fait que le diagnostic reste difficile à poser et souvent tardif (Kot et al. 2018).

2.5. Les outils moléculaires disponibles chez *A. castellanii*

L'amibe *Acanthamoeba* a longtemps été étudiée comme un modèle eucaryote afin de mieux comprendre les composants du cytosquelette impliqués dans la mobilité cellulaire (Pollard et al. 1970; Isenberg et al. 1980; Adams and Pollard 1989; Brzeska et al. 2001), ainsi que dans l'expression des gènes (Bateman and Paule 1986; Chen et al. 2004c). De par le manque d'outils moléculaire, et la présence d'un génome polyploïde, ce modèle a partiellement été délaissé face à d'autres modèles cellulaires tels que *Dictyostelium discoideum*, une amibe sociale possédant un état haploïde dans son cycle de vie, ou les cellules de mammifères. Cependant, un regain d'intérêt est observé, du fait que cette amibe ubiquitaire interagit avec de nombreux microorganismes incluant des pathogènes humains, et est décrit comme un hôte naturel pour ces pathogènes. Un intérêt non négligeable est donc porté dans divers domaines d'études tels que la microbiologie cellulaire, la physiologie, la biologie moléculaire, la biochimie, l'interaction entre organismes ainsi qu'en biologie environnementale (Swart et al. 2018).

2.5.1. Les outils de biologie moléculaire

La disponibilité d'outils moléculaire chez *Acanthamoeba* reste actuellement faible. En effet, la polyploïdie du génome pose problème pour l'utilisation d'outils menant à l'inactivation de gène (recombinaison homologue médiée par un plasmide, CRISPR-Cas9 ...). De ce fait, des techniques alternatives tels que des plasmides d'expression (Peng et al. 2005; Bateman 2010) ou des ARN interférents (Lorenzo-Morales et al. 2005) ont été développées.

2.5.1.1. Les vecteurs d'expression

Le premier vecteur d'expression généré permettait l'expression de la chloramphénicol acétyltransférase sous le contrôle du promoteur du gène de l'ubiquitine (vecteur POPSB). Ce vecteur d'expression a été introduit dans *Acanthamoeba* par électroporation (Hu and Henney 1997). Par la suite, le vecteur a été amélioré afin de permettre la production de protéines fusionnées à la protéine fluorescente eGFP (pUBPG). De plus, un protocole de transfection par l'intermédiaire de vecteurs lipidiques a également été développé, mais le taux de cellules transfectées était inférieur à 5%, ce qui rend difficile la quantification de l'expression d'un gène rapporteur par exemple (Kong and Pollard 2002). C'est ainsi, que des plasmides d'expression dits « stables » basés sur la présence d'un gène de résistance à la néomycine G418, ont été développés (Peng et al. 2005). Par la suite, ces plasmides ont été améliorés afin de permettre une expression d'une protéine fluorescente sous le contrôle du promoteur du gène TPBF (TATA binding protein (TBP) promoter binding factor) (plasmide pTPBF-eGFP) ou du gène de la GAPDH (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase) (plasmide pGAPDH-eGFP), tout en maintenant l'expression du gène de résistance à la néomycine G418 (**Figure 4**) (Bateman 2010). Les deux vecteurs montrent une expression robuste, basée sur l'analyse du gène rapporteur eGFP. Ces plasmides ont ainsi été utilisés pour générer des protéines fusionnées dans des études moléculaires chez *Acanthamoeba* sp. (Lee et al. 2015; Hong et al. 2018).

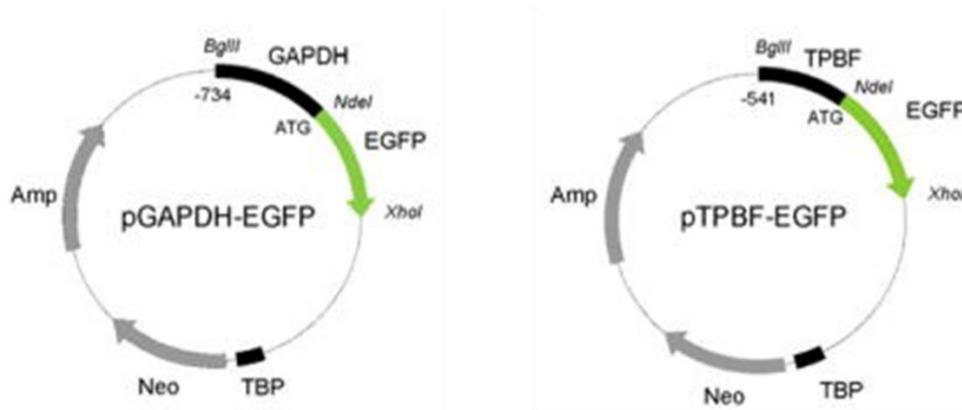


Figure 4 : Carte des plasmides pGAPDH-eGFP et pTPBF-eGFP (d'après Bateman, 2010). Les fragments « GAPDH », « TPBF » et « TBP » correspondent aux séquences promotrices utilisées pour l'expression des séquences codantes adjacentes. Le fragment « Amp » correspond au gène qui s'exprime chez *E. coli* et qui apporte la résistance à l'ampicilline. Le fragment « Neo » correspond à la séquence codante du gène de résistance à la généticine G418 qui s'exprime chez *A. castellanii*. Le fragment « eGFP » correspond à la séquence codante de la protéine fluorescente eGFP.

2.5.1.2. Les ARN interférents

Les ARN interférents ont été découverts chez les plantes dans les années 1990, mais c'est seulement en 1998 que le processus d'interférence est démontré dans le modèle *Caenorhabditis elegans* (Fire et al. 1998; Dana et al. 2017). Cette découverte a permis à Andrew Fire et Craig Mello, une reconnaissance dans le monde scientifique par l'obtention du prix Nobel en 2006.

L'interférence par les ARN est un processus biologique dans lequel un ARN double brin (siRNA, miRNA) va cibler un brin d'ARNm complémentaire, ce qui va aboutir à une dégradation de ce dernier ou à une inhibition de la traduction (Wittrup and Lieberman 2015; Ahmadzada et al. 2018). De ce fait, l'ARNm n'étant plus fonctionnel, cela induit une diminution de l'expression du gène (Figure 5).

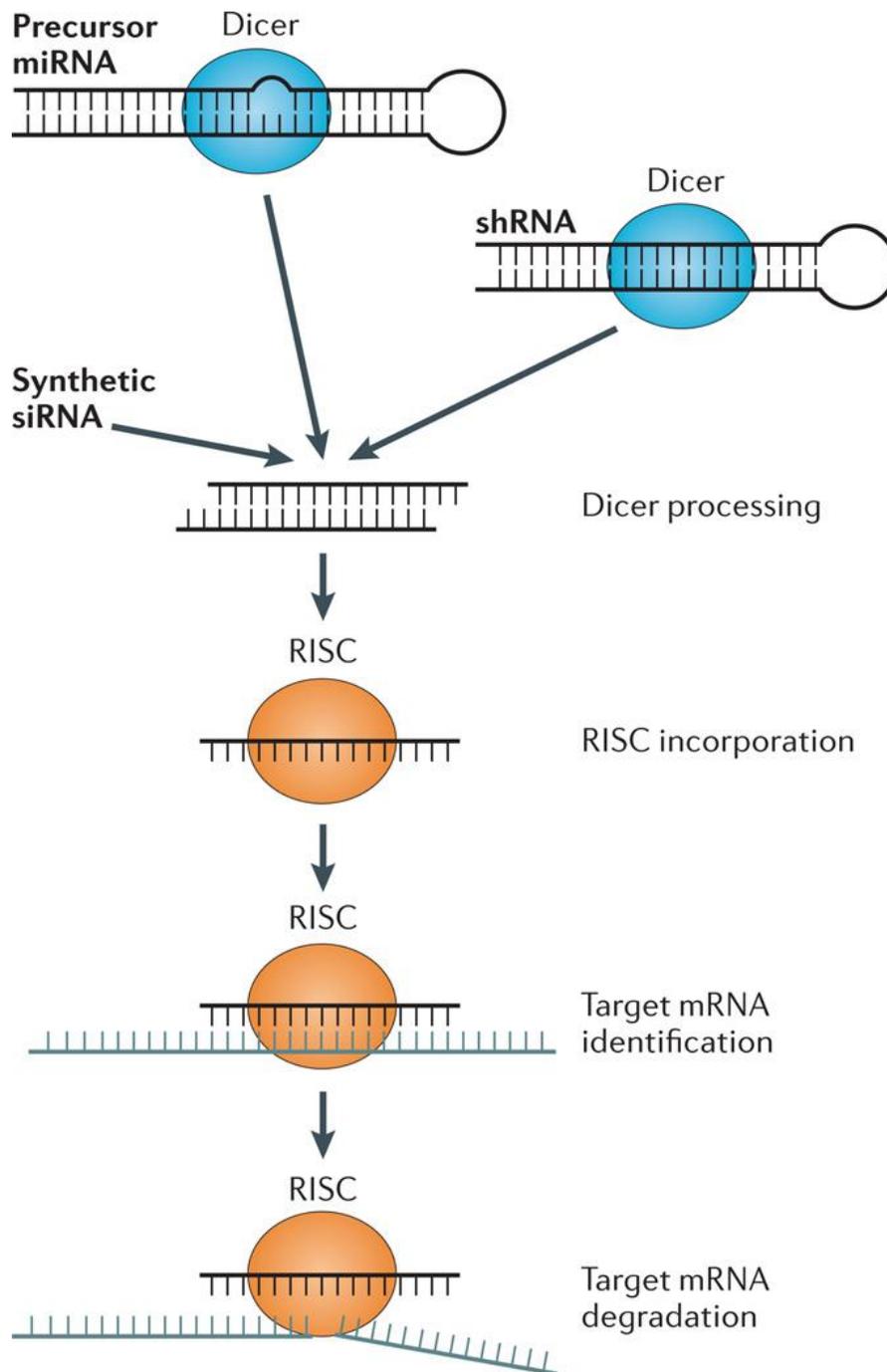


Figure 5 : Mécanisme de répression de gène par l'intermédiaire des siRNAs (d'après Wittrup and Lieberman, 2015). L'enzyme Dicer peut générer de façon endogène des petits ARN à partir d'ARN en épingle à cheveux (shRNA) ou de façon exogène par l'intermédiaire d'ARN double brins. Cette première étape peut être contournée en introduisant directement de petits ARN (siRNA) dans la cellule. Par la suite, le brin anti-sens est pris en charge par le complexe RISC (RNA-induced silencing complex), et est utilisé comme guide pour la reconnaissance de l'ARNm complémentaire. La protéine Argonaute 2 du complexe RISC va cliver le complexe ARNm/siRNA ce qui va induire une dégradation de l'ARN et donc empêcher la traduction de la protéine.

Chez *Acanthamoeba*, de nombreuses études utilisant les ARN interférents ont permis une meilleure compréhension de l'enkystement et notamment, l'identification de protéines intervenant dans ce processus ([Dudley et al. 2008a](#); [Lorenzo-Morales et al. 2010](#); [Aqeel et al. 2013](#); [Moon et al. 2014](#)). De plus, l'utilisation de cette technique a même été proposée afin de cibler des protéines clés de la pathogénicité d'*Acanthamoeba* sp., ceci, afin de mieux traiter les kératites induites par ces dernières ([Lorenzo-Morales et al. 2010](#)). Récemment, une étude a montré une efficacité de ces ARN interférents dans le traitement de kératite amibienne chez la souris ([Zorzi et al. 2019](#)).

2.5.2. Les génomes séquencés d'*Acanthamoeba* sp.

Le premier génome séquencé et annoté correspond à l'espèce *A. castellanii* Neff (ATCC 30010). Ce génome d'une taille de 45 Mb (mégabase) montre la présence de 15 455 gènes riches en introns prédits pour coder des protéines, dont 14 974 ont été identifiés par l'intermédiaire de données transcriptomiques ([Clarke et al. 2013](#)). De façon intéressante, ce génome montre la présence de 450 gènes, soit 2,9% du génome, décrits comme ayant pu être acquis par un transfert latéral de gènes ([Clarke et al. 2013](#)). Ce génome est accessible en ligne, par exemple, par l'intermédiaire du site AmoebaDB, une base de données regroupant des génomes et d'autres études basées principalement sur les genres *Acanthamoeba* et *Entamoeba* ([Aurrecoechea et al. 2011](#)). L'acquisition de ce génome annoté sert de base pour les autres génomes parmi le genre *Acanthamoeba* et facilite l'accès à des outils de biologie moléculaire, ainsi qu'à des analyses protéomiques et/ou transcriptomiques.

En 2015, quatorze génomes d'*Acanthamoeba* sp. ont été déposés sur NCBI par une équipe de l'université de Liverpool. Cependant, l'analyse de ces génomes par une équipe américaine, montre que certains ne sont pas bien attribués à l'isolat correspondant ([Paul A. Fuerst, site internet : u.osu.edu/Acanthamoeba/](#)). Cette étude se base sur l'analyse de la séquence du gène de l'ARNr 18S. Parmi ces quatorze génomes, six sont correctement attribués à leurs isolats et un posséderait des séquences d'ADN contaminants. Pour les sept autres génomes, une attribution problématique entre les séquences du génome et l'isolat a été identifiée.

En 2016, des chercheurs de l'université de Kingston ont déposé des séquences du projet de séquençage d'*A. polyphaga* Linc Ap-1. Cependant, cet isolat semble relativement différent des autres isolats identifiés comme *A. polyphaga*. Cette même

année, le génome d'*Acanthamoeba pyriformis* (anciennement *Protostelium pyriformis*) a été séquencé et correspond à un membre atypique parmi le genre *Acanthamoeba* (Tice et al. 2016). En 2017, deux autres génomes ont été déposés dans la base de données par une équipe de l'institut de technologie autrichienne.

Bien que l'accès à certains génomes soit disponible, leurs utilisations et leurs analyses restent difficiles du fait de l'absence d'annotation, de problèmes d'attribution de nom, de l'origine des isolats qui reste parfois floue, ou encore de problèmes de classification des amibes. En effet, les anciennes attributions d'espèces basées sur les caractères morphologiques et biochimiques, ne concordent pas forcément avec la nouvelle classification basée sur l'analyse du gène de l'ARNr 18S.

2.6. *Acanthamoeba* sp., un hôte environnemental

Les amibes libres et notamment les amibes appartenant au genre *Acanthamoeba* ont la capacité de coloniser tous types d'habitats. Elles vont ainsi être en étroite relation avec de nombreux microorganismes, tels que les champignons, les bactéries ou les virus. De manière générale, les amibes se nourrissent en phagocytant ces microorganismes, puis en les dégradant par l'intermédiaire de la voie phagolysosomale. Cependant, certains microorganismes ont pu développer des mécanismes de résistance afin de survivre à la digestion par l'amibe, qui dans certains cas, leur permettent de se multiplier directement au sein de l'hôte (Greub and Raoult 2004; Siddiqui and Khan 2012; Khan 2015). C'est le cas de nombreux pathogènes de l'Homme et des animaux. Ils sont appelés MRA pour « Microorganismes Résistants à l'Amibe » (Greub and Raoult 2004). Une fois à l'intérieur de l'amibe, ces MRA vont pouvoir être protégés de certains biocides ou des conditions environnementales difficiles, ce qui va rendre leur survie et leur persistance plus efficace (Steenbergen et al. 2001).

Ainsi, ces MRA vont pouvoir utiliser les amibes comme des réservoirs environnementaux pour persister dans l'environnement, mais également les utiliser comme des « chevaux de Troie » lorsque des amibes portant des MRA vont être en interaction avec l'Homme (Greub and Raoult 2004; Guimaraes et al. 2016).

Une très grande diversité de MRA a actuellement été décrite, et la liste ne cesse d'augmenter. Cela inclut autant des espèces pathogènes, que des espèces non pathogènes, ainsi que des champignons, des bactéries mais également des virus.

Parmi les bactéries les plus étudiées en relation avec les amibes, on retrouve *Legionella pneumophila*, des membres du genre *Mycobacterium* ainsi que des membres de l'ordre des Chlamydiales. D'autres pathogènes importants de l'Homme sont également décrits, tels que *Francisella tularensis*, *Coxiella burnetii*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia pestis*, des Pseudomonaceae, *Helicobacter pylori*, et bien d'autres pathogènes (Greub and Raoult 2004; Guimaraes et al. 2016). Parmi les champignons, il a été montré qu'*Acanthamoeba* pouvait servir d'hôte pour *Cryptococcus neoformans*, *Blastomyces dermatidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Sporothrix schenckii* et *Histoplasma capsulatum* (Steenbergen and Casadevall 2003; Guimaraes et al. 2016). Enfin, il ne faut pas oublier les virus, comme les adénovirus (Lorenzo-Morales et al. 2007), des entérovirus (Greub and Raoult 2004; Mattana et al. 2006; Raoult and Boyer 2010) ou encore les virus géants qui ont été découverts dans les amibes et qui ont une taille et une physiologie différentes des virus classiques (La Scola et al. 2003; Colson et al. 2017).

De par sa capacité à interagir avec une grande diversité de microorganismes et ses capacités de phagocytose, *Acanthamoeba* sp. est un bon organisme modèle pour l'étude des interactions hôte-pathogènes (Steenbergen and Casadevall 2003; Greub and Raoult 2004; Sandström et al. 2011; Steiner et al. 2017; Swart et al. 2018).

3. La bactérie intracellulaire facultative *Legionella pneumophila*

La bactérie *Legionella pneumophila* a pour la première fois été identifiée en 1977, suite à une épidémie de pneumonies sévères lors du 58ème congrès annuel de la légion américaine à Philadelphie (Mcdade et al. 1977). En effet, lors de ce congrès qui se déroula en 1976, 182 personnes ont été infectées, dont 29 personnes qui sont décédées. Suite à cette épidémie, la pathologie infectieuse induite par *L. pneumophila* est nommée « maladie du légionnaire ». L'origine de cette épidémie serait liée au système de climatisation où la bactérie s'est développée. C'est au cours du premier symposium international sur la maladie des légionnaires que la bactérie fut nommée *Legionella pneumophila*, en référence aux légionnaires qui ont été infectés et au site d'infection : les poumons (Brenner et al. 1979).

3.1. Taxonomie du genre *Legionella*

Legionella est le seul genre bactérien appartenant à la famille des *Legionellaceae* et forme avec les *Coxiellaceae*, l'ordre des *Legionellales*. Ce sont des bactéries appartenant à l'ordre gamma du phylum des protéobactéries (Brenner et al. 1979; Fields et al. 2002). L'espèce la plus proche phylogénétiquement des *Legionellaceae* est *Coxiella burnetii*, l'agent responsable de la fièvre Q, une zoonose d'origine animale. De façon intéressante, des caractéristiques communes sont retrouvées avec *L. pneumophila* comme le mode d'infection, des facteurs de virulence, ou un mode de vie intracellulaire similaires (Zusman et al. 2003; Qiu and Luo 2017).

Plus de 60 espèces sont actuellement décrites parmi le genre *Legionella* (<http://www.bacterio.net/Legionella.html>). Ces espèces sont divisées en plus de 70 sérogroupes basés sur la structure des lipopolysaccharides bactériens (Zähringer et al. 1995). L'espèce la plus étudiée parmi ce genre, *L. pneumophila*, comporte à elle-seule 15 sérogroupes différents.

La plupart des *Legionella* ont été isolées à partir d'échantillons environnementaux, et environ la moitié des espèces connues est associée à des infections chez l'Homme (Khodr et al. 2016). En Europe et aux Etats-Unis, plus de 90% des cas de légionelloses sont causés par *L. pneumophila*, dont environ 85 % correspondent au séro groupe 1 (Yu et al. 2002). Cependant, en Australie et en Nouvelle-Zélande, *L. longbeachae* représente à elle seule environ 30% des cas reportés (Fields et al. 2002; Newton et al. 2010).

3.2. Ecologie

Les bactéries du genre *Legionella* sont décrites comme ubiquitaires de l'eau ou des environnements humide (Fliermans et al. 1981; Newton et al. 2010). Dans la nature, elles ont pu être isolées à partir d'eau douce provenant de lacs, de rivières, d'eau stagnante, ou encore de boue (Fliermans et al. 1981; Hoge and Breiman 1991; Borella et al. 2005), mais sont souvent retrouvées en très faible proportion (<1% de la population). Certaines espèces ont également pu être détectées dans de l'eau de mer (Palmer et al. 1993). Ces bactéries étant ubiquitaires des environnements aqueux, elles sont souvent retrouvées dans les systèmes créés par l'Homme, tels que les réseaux d'eau domestique, les fontaines, les piscines, les réseaux d'eau d'unité dentaire, les systèmes de climatisation ou encore les tours aéro-réfrigérantes (Koide et al. 1993; Atlas et al. 1995; Heng et al. 1997; Lye et al. 1997). D'ailleurs ce genre d'environnement est souvent l'origine de cas de légionellose, puisque l'eau peut stagner, et/ou est souvent chauffée ce qui favorise la croissance des légionelles. Bien que la plupart de ces bactéries soient retrouvées dans l'eau, *L. longbeachae* est principalement isolée au niveau de composts et de terreaux (Steele et al. 1990).

Il est admis que cette bactérie, bien qu'elle puisse être planctonique, a un mode de vie plutôt associé à d'autres microorganismes, par exemple, dans des biofilms complexes (Declerck 2010; Abdel-Nour et al. 2014) ou bien associé à des protistes tels que les amibes libres ou les ciliés (**Figure 6**) (Fields 1996; Hoffmann et al. 2014b). Il a été montré par l'intermédiaire d'expériences de co-cultures, combinées à des techniques microscopiques, que *L. pneumophila* pouvait survivre à beaucoup d'espèces parmi les amibes tels que les genres *Acanthamoeba* (*A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. palestinensis*...), *Vermamoeba* (*V. vermiformis*, anciennement *Hartmanella*) et *Naegleria* (*N. gruberi*, *N. lovaniensis*, *N. jadini* ...) tout comme d'autres espèces telles que *Tetrahymena pyroformis*, *Echinamoeba exudans* et *Tetramitus jugosus* (Rowbotham 1980; Tyndall and Domingue 1982; Anand et al. 1983; Barbaree et al. 1986; Boamah et al. 2017). De manière intéressante, la plupart de ces amibes appartiennent à des phyla différents, montrant une adaptation de *L. pneumophila* et une stratégie d'infection particulière.

Les amibes du genre *Acanthamoeba* et *D. discoideum* sont décrits comme des organismes modèles pour l'étude du comportement intracellulaire de *L. pneumophila*, ainsi que pour l'étude des facteurs impliqués dans sa virulence (Guimaraes et al. 2016;

Swart et al. 2018). Cependant, *D. discoideum* n'est pas décrit comme un hôte naturel de *L. pneumophila*, bien qu'il puisse servir d'hôte et qu'il possède un stade haploïde dans son cycle de vie, ce qui facilite son utilisation comme hôte modèle (Swart et al. 2018).

Une autre niche possible pour la réplication de *L. pneumophila* sont les nématodes. Il a été montré que dans des conditions de laboratoire, *C. elegans* peut être infecté avec cette bactérie (Brassinga et al. 2010; Komura et al. 2010).

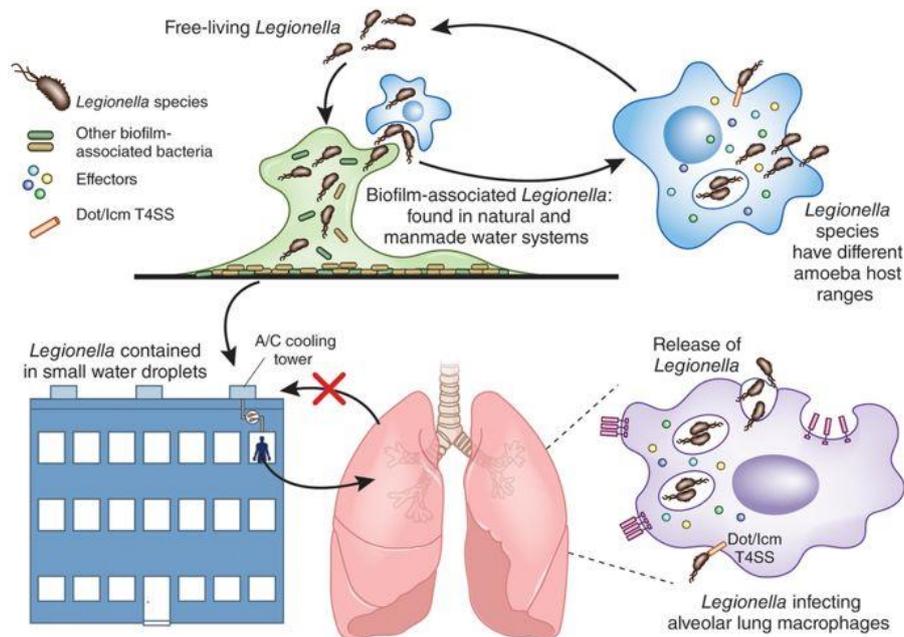


Figure 6 : Cycle de vie des bactéries pathogènes du genre *Legionella* (d'après Comas, 2016). Ces bactéries sont retrouvées dans l'environnement sous forme planctonique, ou associées à des biofilms ou des protistes qu'elles infectent. Dans certains cas, elles vont pouvoir se multiplier et se retrouver dans les réseaux d'eau et ainsi contaminer les poumons de personnes ayant respiré des aérosols contaminés. Les mécanismes de survie de la bactérie dans le protiste et dans le macrophage est similaire.

3.3. Caractéristiques morphologiques et biochimiques

L. pneumophila est décrite comme un bacille à Gram négatif d'une taille d'environ 0,3 à 0,9 de largeur et environ 2 µm de longueur. Cette taille peut augmenter jusqu'à plus de 20 µm dans le cas de formes filamenteuses (Mcdade et al. 1977). Ce sont des bactéries mobiles qui possèdent un flagelle en position polaire ou latérale (Ott et al. 1991), mais, des formes sans flagelles et donc non mobiles peuvent également être retrouvées dans certaines conditions. Elles ne présentent pas de capsule et ne sporulent pas. Elles présentent différents types de pilis à leur surface, dont certains semblent être associés à la phase d'adhérence lors de l'infection d'une cellule hôte (Rodgers et al. 1980; Stone and Abu Kwaik 1998). La paroi est très particulière par rapport à celle des autres bactéries Gram négatif, puisque cette dernière est riche en acides gras ramifiés qui sont habituellement retrouvés chez les bacilles à Gram positif. De plus, cette paroi est très hydrophobe (Miller 1983).

Ce sont des bactéries aérobies, ne possèdent pas de métabolisme fermentatif. Elles sont chimio-organotrophes et vont utiliser principalement les acides aminés comme source de carbone et d'énergie. Elles sont plutôt exigeantes à cultiver, mais se développent correctement dans du milieu BCYE (Buffered Charcoal Yeast Extract) gélosé ou non, qui a la particularité de contenir une source importante de L-cystéine et du fer soluble. Elles se développent à température ambiante (25 à 42°C) avec un optimal de croissance autour de 35°C (Fields et al. 2002).

Dans l'environnement, *L. pneumophila* peut alterner entre deux formes principales : une forme répliquative et une forme transmissive qui est hautement virulente. Des différences morphogénétiques et métaboliques vont être observées (Molofsky and Swanson 2004; Bruggemann et al. 2006). Ce processus est régulé par la phase de croissance et notamment la présence ou non de nutriments (Byrne and Swanson 1998). Ainsi, durant la phase exponentielle, la bactérie sera sous forme répliquative et va réprimer des gènes impliqués dans la virulence, la mobilité, ou encore la résistance à des stress. En fin de phase exponentielle, la bactérie va s'orienter vers sa forme transmissive, où elle va exprimer ces gènes (Byrne and Swanson 1998; Bruggemann et al. 2006; Faucher et al. 2011). Cette transition entre les deux formes lui donne la capacité de s'adapter à des stress environnementaux ou à la vie intracellulaire.

Une forme viable mais non cultivable (VBNC en anglais) est également décrite comme moyen de survie (Dietersdorfer et al. 2018). Comme le terme l'indique, ce sont des bactéries qui suite à un stress, par exemple, la carence, les traitements chimiques ou la chaleur, vont rester viables mais vont perdre leur capacité à être cultivées dans des milieux de culture standard (Kirschner 2016; Dietersdorfer et al. 2018). Les VBNC gardent leur pouvoir pathogène et retrouvent leur cultivabilité après avoir infecté des amibes (Steinert et al. 1997; García et al. 2007; Al-Bana et al. 2014; Ducret et al. 2014).

3.4. La maladie du légionnaire

Parmi le genre *Legionella*, certaines espèces sont responsables d'une pathologie infectieuse chez l'Homme, appelée légionellose. Ces manifestations se présentent après inhalation d'aérosols contaminés par les bactéries (Yu 1993). Elles vont ainsi se retrouver dans les poumons, et vont pouvoir se multiplier au sein des macrophages alvéolaires (**Figure 6**) (Mcdade et al. 1977; Horwitz and Silverstein 1980). Jusqu'à récemment, il était admis que la transmission entre individus n'était pas possible, mais, un cas a récemment été rapporté (Correia et al. 2016).

La maladie du légionnaire correspond à une pneumonie sévère, avec parfois des atteintes extra-pulmonaires et dont la gravité peut varier d'un patient à l'autre (Mcdade et al. 1977; Diederer 2008). Son nom provient de l'épidémie qui a eu lieu en 1976, lors du congrès annuel des légionnaires américains, à Philadelphie (Fraser et al. 1977). C'est une pathologie caractérisée par une atteinte des poumons dont les premiers symptômes peuvent être divers comme une fièvre ressemblant à une grippe, des problèmes respiratoires ou une atteinte des poumons. D'autres symptômes peuvent être associés, tels que la toux, une perte d'appétit, une faiblesse. Des manifestations extra-pulmonaires peuvent être également observées comme des confusions, des pertes de mémoires, des hallucinations ou encore des manifestations neurologiques (Marrie et al. 1992; McClelland et al. 2004). La manifestation de maladie de légionnaire peut à la fois se faire de façon sporadique ou lors d'épidémies communautaires. Le taux de mortalité est estimé à environ 10% des cas. Les personnes à risques correspondent aux personnes âgées, et aux personnes immuno-déprimées. D'autres facteurs aggravants tels que le tabac, le cancer, le diabète sont également décrits (données Santé Publique France).

L'organisme « Santé Publique France » (anciennement Institut de veille sanitaire) est responsable depuis 1996, de répertorier l'incidence des cas de

légionellose. Cette incidence ne cesse de croître en France (**Figure 7**) et dans le monde. De multiples causes pourraient expliquer l'augmentation de ce nombre de cas, telles qu'une multiplication plus importante des légionelles dans l'environnement, une augmentation de la fréquence d'utilisation de systèmes transportant de l'eau et générant des aérosols, une augmentation de la susceptibilité de la population ou encore l'amélioration des techniques de détection.

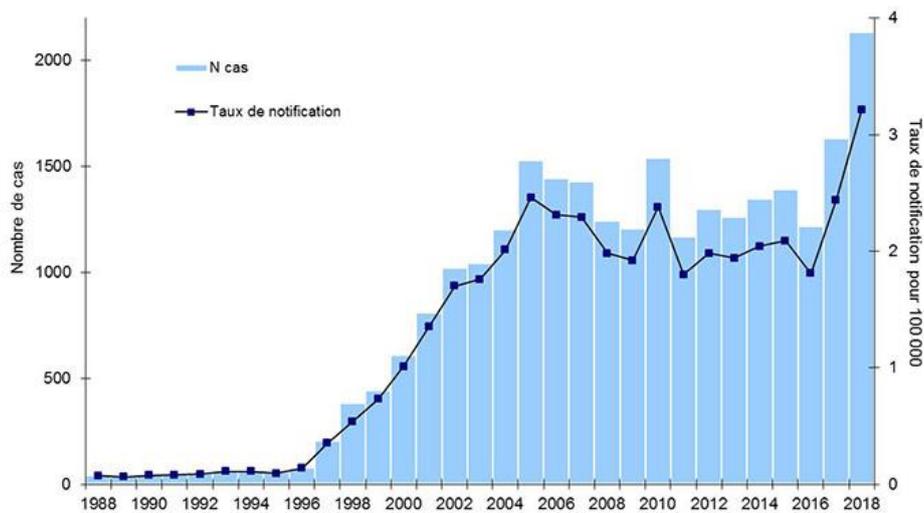


Figure 7 : Incidence de cas de légionellose reportés entre 1988 et 2018 (D'après Santé Publique France). Les données ont été mises à jour le 14 Juin 2019.

3.5. Facteurs liés au pouvoir pathogène de *L. pneumophila*

3.5.1. Caractéristiques génomiques

Les premiers génomes de *L. pneumophila* qui ont été séquencés correspondent aux trois souches les plus étudiées actuellement : Philadelphia-1, Paris et Lens (Cazalet et al. 2004; Chien et al. 2004). Par la suite, cinq autres génomes ont été séquencés et analysés (Gomez-Valero and Buchrieser 2013). Chacune de ces souches contiennent un chromosome circulaire d'une taille comprise entre 3,3 et 3,5 Mb, un contenu en guanine/cytosine d'environ 38% et codent pour environ 3 000 gènes (Tableau 1). La comparaison des génomes des souches Lens et Paris montrent la présence d'un plasmide de taille différente selon la souche, ainsi qu'une variabilité importante au sein du génome. Bien que ces deux souches correspondent à la même espèce et au même séro groupe, la comparaison de la séquence de leur chromosome montre que 14% des gènes sont spécifiques de la souche Paris et 10% de la souche Lens (Cazalet et al. 2004).

Parmi les 3000 gènes codés par les souches de *L. pneumophila*, plus de 150 ont montré une forte similarité avec des protéines eucaryotes ou qui possèdent des motifs spécifiques de type eucaryotes (domaine F-box et U-box, domaine SET, domaine Sel1, domaine ankyrine etc...). Cela suggère que *L. pneumophila* pourrait utiliser ces protéines pour mieux détourner les fonctions cellulaires de l'hôte en imitant des protéines eucaryotes clés (Cazalet et al. 2004; Gomez-Valero et al. 2019).

Récemment, 80 génomes de bactéries appartenant aux genres *Legionella* et représentatifs de 58 espèces ont été analysés afin de mieux comprendre l'évolution de ces pathogènes de l'Homme à origine environnementale (Gomez-Valero et al. 2019). Ces résultats montrent un répertoire de plus de 18 000 effecteurs sécrétés et qui présentent 137 domaines proches des eucaryotes, et dont plus de 200 protéines sont en lien avec le système de sécrétion de type 4. Ce dernier est hautement conservé dans le genre *Legionella* (Gomez-Valero et al. 2019). Ces résultats confortent l'hypothèse que ces bactéries ont acquis ces protéines par transferts latéraux de gènes à partir d'organismes présents dans tous les domaines de la vie, afin de mieux s'adapter à tous types d'hôtes.

Tableau 1 : Caractéristiques générales des séquences des 8 premiers génomes séquencés de *L. pneumophila* (d'après Gomez-Valero and Buchrieser, 2013)

	Souches de <i>L. pneumophila</i>							
	Paris	Lens	Philadelphia	Corby	Alcoy	130b	Lorraine	HL06041 035
Taille du chromosome (en Mb)	3.5	3.3	3.4	3.6	3.5	3.5	3.5	3.5
G + C (%)	38	38	38	38	38	38	38	38
Nombre de gènes	3178	3034	3083	3290	3197	3293	3170	3184
Plasmide	1	1	0	0	0	0	1	0

3.5.2. Les Systèmes de sécrétion

L'analyse des génomes de *L. pneumophila* montre la présence de gènes codants pour de multiples systèmes de sécrétions incluant le système de sécrétion de type I Lss, le système de type II Lsp (SST2), le système de sécrétion de type IV-A Lvh (SST4-A), et le système de sécrétion de type IV-B Dot/Icm (SST4-B) (De Buck et al. 2007). Ces systèmes sont spécialisés dans le transport d'effecteurs vers le milieu extracellulaire ou directement dans la cellule hôte (Tseng et al. 2009).

3.5.2.1. Système de sécrétion de type 1 (SST1)

L'implication de SST1 dans la virulence de bactéries pathogènes, tels que le système Hly chez les *Escherichia coli* uro-pathogènes, ou le système Apr chez *Pseudomonas aeruginosa* ont depuis longtemps été décrits (Mackman et al. 1986; Lazdunski et al. 1990; Koronakis et al. 2004). Cependant, pour *L. pneumophila*, bien que le SST1 Lss ait été prédit par l'analyse des génomes, son implication dans la virulence a été rapportée que très récemment (Fuche et al. 2015). Il permet notamment la sécrétion de la protéine RtxA qui est impliquée dans la virulence de *L. pneumophila* (Cirillo et al. 2001, 2002).

3.5.2.2. Système de sécrétion de type 2 (SST2)

L'implication du SST2 Lsp dans la virulence de *L. pneumophila* a largement été rapporté (Rossier and Cianciotto 2001; Rossier et al. 2004; Cianciotto 2013). Au moins 27 protéines sécrétées par le SST2 sont décrites comme impliquées dans la virulence de *L. pneumophila*, incluant la protéine NttC, NttA, l'acétyltransférase PlaC, la métalloprotéase ProA et l'aminopeptidase LapA (Tyson et al. 2013, 2014; White et al. 2018).

3.5.2.3. Système de sécrétion de type 4 (SST4-A et SST4-B)

Le système de sécrétion de type 4 (SST4) est une machinerie moléculaire utilisée dans le transfert de plasmide ou d'effecteurs dans une cellule cible (Christie and Vogel 2000; Christie et al. 2014; Costa et al. 2015). Les SST4 sont divisés en trois grands types : 4A, 4B et autres. Par exemple, le SST4-A VirB/D4 d'*Agrobacterium tumefaciens* lui permet d'injecter des gènes bactériens directement dans la cellule de la plante. Le SST4-B Dot/Icm (defective in organelle trafficking (Dot)/intracellular multiplication (Icm)) de *L. pneumophila* et *C. burnetti* permettent de transférer des effecteurs directement dans la cellule hôte (Ghosal et al. 2019).

Le système Dot/Icm est un des éléments clés indispensable dans la survie intracellulaire de *L. pneumophila*. Il est localisé aux deux pôles de la bactérie (Jeong et al. 2017) et est composé d'environ 27 composants, incluant une protéine de la membrane externe (DotH), des lipoprotéines (DotC, DotD et DotK), une protéine périplasmique (IcmX), des protéines de la membrane interne (DotA, DotE, DotF, DotG, DotI, DotJ, DotM, DotP, DotU, DotV, IcmF, IcmT et IcmV), et des protéines solubles intra-cytoplasmiques (DotN, IcmQ, IcmR, IcmS, IcmW and Lvg) (Ghosal et al. 2019). Plus de 330 effecteurs sont sécrétés par le SST4-B Dot/Icm (Zhu et al. 2011; Lifshitz et al. 2013). La fonction de la plupart de ces effecteurs reste inconnue, cependant, beaucoup d'entre eux pourraient moduler les fonctions cellulaires de l'hôte afin que la bactérie puisse survivre à la digestion cellulaire.

La possibilité que le SST4-A Lvh soit impliqué dans la virulence a été rapportée (Bandyopadhyay et al. 2007, 2013).

3.6. Cycle de vie intracellulaire de *L. pneumophila*

Le cycle de vie intracellulaire de *L. pneumophila* est similaire d'un hôte à l'autre avec la formation d'une vacuole répliquative (Isberg et al. 2009). Les mécanismes moléculaires mis en jeu par la bactérie peuvent varier en fonction de la cellule hôte, bien que des éléments communs soient retrouvés (Figure 8) (Escoll et al. 2013). Le cycle est constitué de plusieurs étapes : la phase d'attachement à la surface cellulaire de l'hôte, l'internalisation de la bactérie, l'inhibition de la voie phago-lysosomale, la formation et la maturation du phagosome en vacuole répliquative avec le recrutement d'organites à sa surface, le détournement de processus biologique, la réplication de la bactérie, puis finalement la sortie (Figure 8). La présence et la fonctionnalité du SST4-B Dot/Icm et de ses effecteurs associés, est indispensable pour mener à bien cette survie intracellulaire. De plus, le SST2 et ses plus de 25 effecteurs, est également impliqué durant ce processus infectieux.

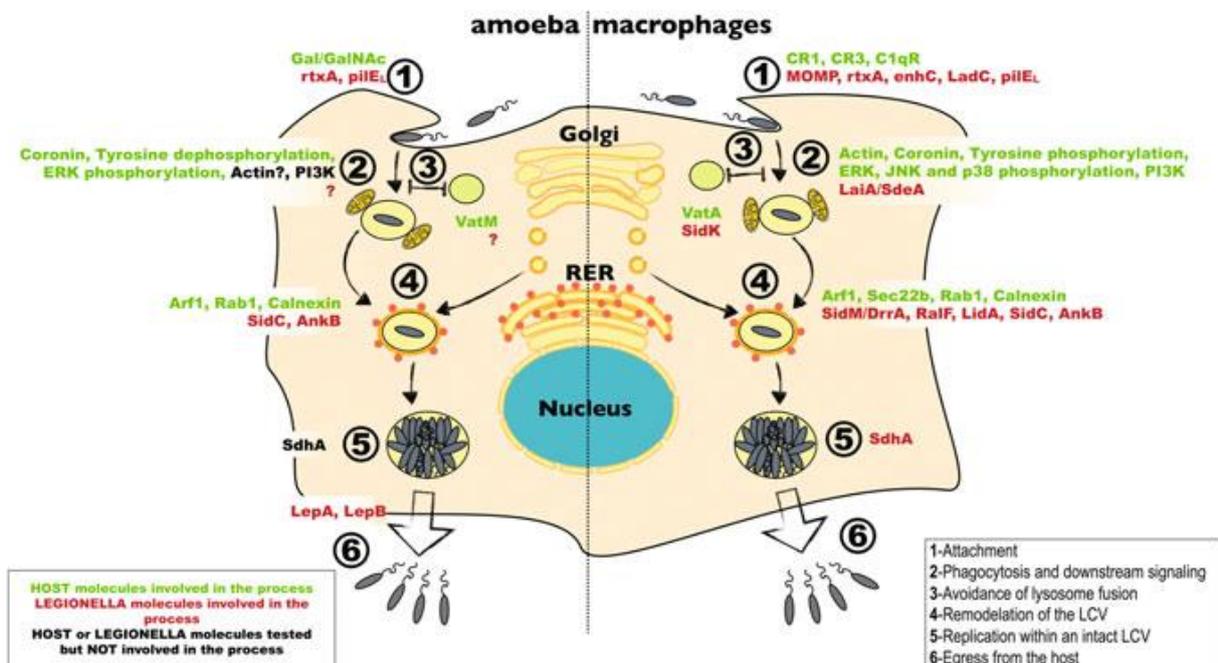


Figure 8 : Facteurs de l'hôte et de la bactérie intervenant durant le cycle de vie intracellulaire de *L. pneumophila* dans les amibes ou les macrophages (d'après Escoll et al., 2013). Les effecteurs de l'hôte (en vert) et de la bactérie (en rouge) ne sont pas représentatifs de tous les effecteurs actuellement décrits dans la littérature. Le cycle de vie de *L. pneumophila* se compose d'une phase d'adhérence (1), sa phagocytose (2), le détournement de la voie phago-lysosomale (3), le remodelage de la vacuole contenant la bactérie (4) par le recrutement d'organites et de vésicules, suivie de la réplication de la bactérie (5), et enfin la sortie de l'hôte (6).

3.6.1. Internalisation de *L. pneumophila*

3.6.1.1. Adhérence de *L. pneumophila* à la surface de son hôte

La première étape de l'infection par *L. pneumophila* correspond à la phase d'adhérence à la surface cellulaire de l'hôte. Cette phase fait intervenir des protéines bactériennes, mais également des protéines de l'hôte qui vont agir en tant que récepteurs.

Des protéines bactériennes en relation avec les pilis de type IV semblent impliquées durant la phase d'adhérence à des cellules épithéliales, et à des macrophages. C'est le cas des protéines PilE_L et PilY1 (Stone and Abu Kwaik 1998; Hoppe et al. 2017). La toxine RtxA joue un rôle à la fois dans l'adhérence et pour l'entrée dans *A. castellanii*, ainsi que dans l'adhérence à des cellules épithéliales et à des monocytes (Cirillo et al. 2001, 2002). La sécrétion de cette toxine se fait par l'intermédiaire du SST1 composé de LssB, LssD et TolC, montrant ainsi l'implication de ce système dans le mécanisme d'adhérence de *L. pneumophila* (Fuche et al. 2015). La protéine MOMP (major outer membrane protein) de *L. pneumophila* va être reconnue par les protéines du complément C3 et C3i, ce qui va induire l'internalisation de la bactérie dans les monocytes après interaction avec les récepteurs du complément CR1 et CR3 (Bellinger-Kawahara and Horwitz 1990; Krinos et al. 1999). La protéine Hsp60 (heat shock protein) est une protéine chaperonne associée à l'enveloppe cellulaire de *L. pneumophila* et montre un rôle dans l'adhérence et l'internalisation dans des cellules non-phagocytaires (Garduño et al. 1998). Les protéines Lcl (*Legionella* collagen-like) et LadC (*L. pneumophila*-specific adenylate cyclase) sont des adhésines impliquées dans l'adhérence aux cellules épithéliales pulmonaires, mais également à des cellules phagocytaires telles que des macrophages, et les amibes (Newton et al. 2008; Vandersmissen et al. 2010; Duncan et al. 2011; Abdel-Nour et al. 2014). LaiA/SdeA, un effecteur du système de sécrétion de type IV-B Dot/Icm, va également intervenir dans l'adhérence à des cellules épithéliales pulmonaires et des macrophages (Bardill et al. 2005; Chang et al. 2005).

La reconnaissance de la bactérie par l'hôte va faire intervenir des protéines agissant comme des récepteurs afin d'induire une internalisation de la bactérie. Chez l'amibe *Vermamoeba vermiformis*, il a été montré qu'une lectine de 170 kDa (galactose/N-acetylgalactosamine-inhibitable lectin) est impliquée dans l'adhérence de *L. pneumophila*. De plus, l'ajout de galactose ou de N-acetylgalactosamine a un très

faible effet sur l'adhérence de *L. pneumophila* chez *A. castellanii*, suggérant des mécanismes variant d'un hôte à l'autre (Venkataraman et al. 1997; Harb et al. 1998). Chez les macrophages, l'internalisation peut se faire par une voie dépendante de l'opsonisation. Comme décrit précédemment, les récepteurs CR1 et CR3 vont reconnaître les protéines du complément qui ont interagit avec la protéine MOMP de la bactérie, et de ce fait induisent l'internalisation (Bellinger-Kawahara and Horwitz 1990; Krinos et al. 1999). Cependant, le blocage de ces deux récepteurs ainsi que du CR4 par des anticorps monoclonaux spécifiques n'empêche pas l'attachement ou la réplication intracellulaire de *L. pneumophila*, suggérant l'implication de voies alternatives indépendante de l'opsonisation (Rodgers and Gibson 1993).

Cependant, bien que des acteurs moléculaires soient décrits pour ce processus d'adhérence à la surface de l'hôte, ce processus reste mal connu.

3.6.1.2. Internalisation de *L. pneumophila*

L'internalisation de *L. pneumophila* peut se faire par trois grands types de mécanismes : la phagocytose par enroulement (coiling phagocytosis), la phagocytose classique et la macropinocytose (Figure 9). La phagocytose classique et la phagocytose par enroulement sont les plus fréquemment retrouvées.

La phagocytose par enroulement consiste en un seul pseudopode qui s'enroule autour de la bactérie, contrairement à la phagocytose classique, où deux pseudopodes entourent la bactérie à internaliser (Figure 9). Cette phagocytose a été mise en évidence par microscopie électronique à transmission et ne semble pas liée à la virulence de la bactérie, mais plutôt à un élément à la surface de la bactérie puisque c'est un processus observé avec des *L. pneumophila* vivantes, tuées par la chaleur ou tuées par le glutaraldéhyde (Horwitz 1984). Cependant, l'entrée de bactéries par phagocytose par enroulement semble dépendante des conditions de culture de la bactérie, puisque lorsque cette dernière est cultivée dans un hôte cellulaire, la fréquence d'observation de ce mécanisme augmente contrairement à des bactéries cultivées en milieu de culture BCYE (Cirillo et al. 1994, 1999). De plus, ce mécanisme diffère en fonction de l'espèce et du sérotype de la bactérie (Rechnitzer and Blom 1989). Le troisième mécanisme d'entrée de *L. pneumophila* dans les macrophages et dans l'amibe *D. discoideum* correspond à la macropinocytose. Ce mécanisme semble dépendant du SST4 Dot/Icm et est sous le contrôle du locus Lgn1 (Watarai et al. 2001).

Les mécanismes d'internalisation précédemment décrits sont dépendants du cytosquelette d'actine dans les cellules de mammifères, puisque l'utilisation d'inhibiteurs de la polymérisation d'actine, tel que le cytochalasine D, bloque l'entrée de *L. pneumophila* (Elliott and Winn 1986; Hayashi et al. 2008; Prashar et al. 2012). Des études de la phagocytose chez *A. castellanii*, *A. polyphaga* et *V. vermiformis* montrent que ce processus pourrait ne pas faire intervenir l'actine (King et al. 1991; Moffat and Tompkins 1992). Cependant, chez *D. discoideum*, l'internalisation de *L. pneumophila* fait intervenir le cytosquelette d'actine (Lu and Clarke 2005). Lu et Clarke suggèrent que le processus dans les autres amibes pourrait tout de même être dépendant de l'actine puisque l'effet des inhibiteurs utilisés dans les études, n'a pas été vérifié sur la dépolymérisation de l'actine chez les hôtes amibiens (Lu and Clarke 2005). L'implication des coronines, des protéines se liant à l'actine, sont également impliquées lors de l'internalisation par *D. discoideum* et les macrophages (Lu and Clarke 2005; Hayashi et al. 2008).

Suite à l'internalisation de *L. pneumophila*, d'autres processus sont rapidement mis en jeu (Escoll et al. 2013). Par exemple, une multiple déphosphorylation des protéines de l'hôte est observée chez *V. vermiformis* (Harb et al. 1998) et chez les macrophages (Venkataraman et al. 1997; Coxon et al. 1998). De plus, l'implication des voies MAPK a également été décrite. Ces voies font intervenir trois grands types de kinases : p38, JNK et ERK qui vont elles-mêmes phosphoryler d'autres kinases par un mécanisme en cascade, et ainsi réguler de nombreuses activités cellulaires (Shin 2012). Chez *A. castellanii* et *D. discoideum*, seule la voie ERK est retrouvée et est d'ailleurs rapidement phosphorylée après internalisation de la bactérie (Li et al. 2009; Clarke et al. 2013). Une activité MAPK est également observée dans les macrophages murins et humains (Shin et al. 2008).

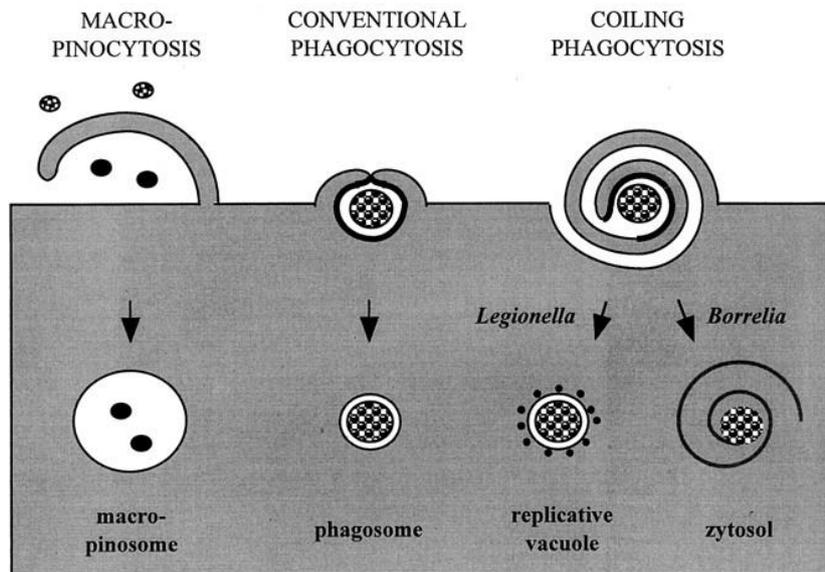


Figure 9 : Les trois mécanismes d'internalisation de *L. pneumophila* dans les cellules (d'après Rittig *et al.*, 1998).

3.6.2. Formation de la vacuole contenant *L. pneumophila* (VCL)

3.6.2.1. Inhibition de la voie phagolysosomale

Lorsque des bactéries ou des composés inertes sont internalisés, ils vont être retrouvés au sein d'un phagosome. Ce phagosome va progressivement s'acidifier en fusionnant avec des lysosomes. Ce sont des vésicules contenant des enzymes incluant des protéases et des hydrolases, dont le rôle sera de dégrader le contenu du phagosome. Cependant, quand *L. pneumophila* est internalisée, elle va inhiber cette voie de dégradation, et maintenir un pH neutre en début d'infection, puis le pH va s'acidifier naturellement afin d'éliminer les bactéries présentes. Le maintien d'un pH neutre n'est pas observé dans les phagosomes contenant des *E. coli* non pathogènes, ou des *L. pneumophila* tuées à la chaleur (Horwitz 1983a; Sturgill-Koszycki and Swanson 2000). En début d'infection, la bactérie va inhiber l'acidification du pH ce qui lui permet de survivre. Cependant, le phagosome va progressivement s'acidifier et présenter des marqueurs lysosomaux, comme la protéine LAMP-1, suggérant que le phagosome fusionne avec des lysosomes. Ces résultats suggèrent que la bactérie a besoin en début d'infection d'un pH neutre pour survivre, mais qu'au bout d'un certain temps, elle devient résistante à cette acidification. D'ailleurs, chez les macrophages,

la réplication des bactéries semble induite par cette acidification tardive (Swanson and Hammer 2000).

Un effecteur associé au SST4 Dot/Icm, SidK, va interagir avec la protéine VatA, un composant clé de la pompe à protons, ce qui va inhiber son activité et la translocation des protons, aboutissant à une inhibition de l'acidification de la vacuole (Xu et al. 2010).

3.6.2.2. Maturation de la VCL

Après internalisation de la bactérie et inhibition de la voie phago-lysosomale, la vacuole contenant *L. pneumophila* (VCL) va subir des changements médiés par le recrutement de vésicules cytoplasmiques, de réticulum endoplasmique ou encore de mitochondries (Horwitz 1983b; Horwitz and Maxfield 1984). De plus, un remodelage de la VCL est observé par le recrutement de vésicules dérivées du réticulum endoplasmique, de protéines effectrices exportées par le SST4 Dot/Icm, de diverses protéines de l'hôte, de ribosomes, ce qui aboutit à la formation d'une niche répliquative permettant la réplication de la bactérie (Tilney et al. 2001; Escoll et al. 2015). La VCL va ainsi être recouverte de protéines modulant le recrutement d'autres protéines, ou permettant de détourner des processus physiologiques importants de la cellule. La plupart de ces recrutements se font par l'intermédiaire d'effecteurs associées au SST4 Dot/Icm ainsi qu'au SST2.

Il a été suggéré que par la présence de protéines telles que Rab1 et Arf1, des vésicules sécrétoires provenant du réticulum endoplasmique sont détournées vers la VCL. Le recrutement de ces protéines est médié par les effecteurs bactériens SidM/DrrA et RalF (Nagai et al. 2002; Machner and Isberg 2006; Murata et al. 2006). D'autres effecteurs sont également impliqués dans le recrutement de vésicules et le détournement du trafic vésiculaire, tels que les effecteurs bactériens SidC, LidA ou RalF (Escoll et al. 2013). Les effecteurs LncP et LegS2/Spl sont retrouvés sur les mitochondries, ce qui suggère l'importance des mitochondries au cours de l'infection (Degtyar et al. 2009; Dolezal et al. 2012). Les effecteurs SidJ et LegK2 sont impliqués dans le recrutement du réticulum endoplasmique à la VCL (Liu and Luo 2007; Hervet et al. 2011).

3.6.2.3. Détournement des processus biologiques

L. pneumophila possède dans son génome un arsenal de gènes ressemblants à ceux des eucaryotes. Ces derniers vont lui permettre de détourner de très nombreux processus biologiques de son hôte afin de pouvoir survivre et se multiplier. Bien que beaucoup d'effecteurs aient été identifiés dans le détournement de ces processus biologiques, tous ces effecteurs ne seront pas décrits dans la suite de cette introduction.

Parmi ces processus, il est retrouvé le trafic vésiculaire ou la transduction de signal impliquant de nombreux éléments tels que les phosphoinositides (lipides) et les enzymes régulatrices (kinase et phosphatase), les petites GTPases ou la machinerie d'ubiquitination (Di Paolo and De Camilli 2006; Stenmark 2009; Jean and Kiger 2012; Popovic et al. 2014; Finsel and Hilbi 2015). De nombreux effecteurs du SST4-B Dot/Icm peuvent se lier aux phosphoinositides tels que LidA, LptD, RidL et SetA, ou vont réguler leurs fonctions tel que SidP (Finsel and Hilbi 2015). Parmi les petites GTPases, Rab5, Rab7, Rab14 et Rab21 sont retrouvées sur la membrane de la VCL (Urwyler et al. 2009; Hoffmann et al. 2014a). L'effecteur PieE peut se fixer à des petites GTPases comme Rab5c et Rab7 (Mousnier et al. 2014). Le transport rétrograde est un processus impliqué dans le recyclage des récepteurs vers l'appareil de Golgi, qui va être inhibé au cours de l'infection par *L. pneumophila*. Des effecteurs comme LpnE et RidL ont été montrés comme impliqués dans cette inhibition (Weber et al. 2009; Finsel and Hilbi 2015).

L'autophagie, un processus de recyclage important des éléments de la cellule, est détourné par l'effecteur RavZ de *L. pneumophila* (Choy et al. 2012). L'effecteur LegA9 a également été montré comme impliqué dans le détournement de ce processus, cependant le mécanisme d'action reste mal connu (Khweek et al. 2013).

Plusieurs effecteurs du système Dot/Icm ont montré une implication dans le détournement de l'apoptose. C'est le cas de SidF, LnaB ou LegK1 (Losick and Isberg 2006; Abu-zant et al. 2007; Banga et al. 2007; Ge et al. 2009). D'autres effecteurs ont également été mis en évidence.

Une altération de la mobilité cellulaire, du cytosquelette d'actine, de la division cellulaire, de la traduction, de la régulation des gènes ou des modifications épigénétiques sont également des processus détournés par *L. pneumophila* (Franco

and Shuman 2012; Michard et al. 2015; Rolando et al. 2015; Mengue et al. 2016, 2017; de Jesús-Díaz et al. 2017; Schuhmacher et al. 2018; Sol et al. 2019).

3.6.3. Sortie des bactéries

Une fois le cycle de réplication intracellulaire terminé, *L. pneumophila* va induire l'expression de ces gènes de virulence et notamment des gènes impliqués dans l'activité de formation de pores membranaires (Kirby et al. 1998). Cette activité est nécessaire pour la lyse de la cellule hôte et va ainsi permettre aux bactéries de se disperser dans l'environnement (Byrne and Swanson 1998). Cette sortie nécessite la lyse de deux membranes : la membrane vacuolaire et la membrane cytoplasmique de l'hôte (Molmeret et al. 2004). La lysophospholipase PlaA sécrétée par le SST2, a été montré comme déstabilisant la membrane du phagosome et impliqué lors de la sortie de l'hôte (Molmeret et al. 2004; Creasey and Isberg 2012; Lang et al. 2017). La mutation du gène *icmT* bloque la capacité de sortie de *L. pneumophila* mais le mécanisme reste mal connu (Molmeret et al. 2002).

Cependant, une sortie de *L. pneumophila* par exocytose, sans lyse de la cellule hôte a également été décrite chez *A. castellanii* et *D. Dictyostelium* (Chen et al. 2004a; Flieger et al. 2018). Elle implique deux protéines sécrétées par le SST4-b Dot/Icm, LepA et LepB (Chen et al. 2004a). Des études précédentes ont montré que des bactéries associées à des vésicules sont libérées par *A. polyphaga* et *A. castellanii* (Berk et al. 1998).

La sortie de la cellule est une étape essentielle pour *L. pneumophila*, puisque cela lui permet de se disséminer dans l'environnement et potentiellement d'infecter de nouvelles cibles eucaryotes. Cependant, le mécanisme aboutissant à une dispersion sous forme de vésicules (exocytose par l'hôte) ou sous forme libre (lyse de l'hôte) reste mal connu.

Chapitre 2 :
Contexte et objectifs des
travaux de thèse

L'équipe Microbiologie de l'eau (MDE) appartient au laboratoire Écologie et Biologie des Interactions (UMR CNRS 7267, Université de Poitiers). Les thématiques de recherche de l'équipe sont portées principalement sur le contrôle et la compréhension du développement des microorganismes présents dans les environnements naturels ou artificiels. La compréhension de l'interaction entre les amibes libres et les bactéries pathogènes correspond à un des axes de recherche de l'équipe MDE. Dans ce contexte, mes travaux de thèse avaient pour but de mieux comprendre l'interaction entre *Acanthamoeba castellanii* et *Legionella pneumophila* et d'étudier la physiologie des amibes.

Au cours de l'évolution, la bactérie *L. pneumophila* a développé des mécanismes de résistance à la digestion par des cellules phagocytaires. Cette évolution résulte du mode de vie environnemental de cette bactérie puisqu'elle peut interagir avec d'autres organismes au sein de biofilms, ou avec des protistes. Son adaptation à ces nombreux hôtes lui permet également de résister aux cellules phagocytaires, comme les macrophages humains, ou les amibes. L'amibe *A. castellanii* est un hôte environnemental pour ces bactéries. Les études actuelles se focalisent majoritairement sur les facteurs de virulence de *L. pneumophila* et de leur(s) cible(s) dans l'hôte qu'elle infecte. Cependant, les protéines de l'hôte intervenant dans la réponse au pathogène reste encore peu étudiées. Dans ce contexte, **le premier objectif de ma thèse était d'identifier et de caractériser des protéines d'*A. castellanii* pouvant être impliquées dans l'interaction avec *L. pneumophila*.**

A. castellanii est une amibe ubiquitaire des environnements aqueux. Cette dernière a développé des mécanismes de résistance en réponse à des contraintes environnementales défavorables, comme le manque de nourriture ou le changement de paramètres physico-chimiques. Pour cela, elle peut se différencier en kyste, une forme de résistance. Cette forme pose un réel souci dans le cas de traitements de pathologies infectieuses induites par des amibes du genre *Acanthamoeba*. De manière générale, la physiologie de l'amibe reste actuellement peu étudiée et de ce fait, reste mal connue. Afin de mieux comprendre les amibes, **le second objectif de ma thèse était d'étudier le rôle de protéines d'*A. castellanii* dans sa physiologie.**

Chapitre 3 :

Matériels et Méthodes

1. Culture des microorganismes

1.1. Culture d'*Acanthamoeba castellanii*

Les cultures axéniques d'*A. castellanii* ATCC 30010 ont été maintenues dans une flasque de culture de 25 cm² ou 75 cm² de surface, en milieu PYG (Peptone Yeast Glucose) liquide composé de : proteose peptone à 2 %, d'extrait de levure à 0,1 %, de glucose à 0,1 M, de MgSO₄ à 4 mM, de CaCl₂ à 0,4 mM, de citrate de sodium déshydraté à 0,1 %, de Fe(NH₄)₂(SO₄)₂·6H₂O à 0,05 mM, de NaH₂PO₃ à 2,5 mM, de K₂HPO₃ à 2,5 mM, ajusté à pH 6.5. Les cellules ont été cultivées à 30°C dans un incubateur à température contrôlée, sans ajout de CO₂ et à l'obscurité.

Pour les différentes expériences, les amibes ont été utilisées à partir d'une flasque d'une confluence de 60 à 90 %. Les cellules ont été rincées deux fois dans du tampon PAS (Page's Amoeba Saline) (4 mM MgSO₄, 0,4 mM CaCl₂, 0,1 % citrate de sodium déshydraté, 0,05 mM Fe(NH₄)₂(SO₄)₂·6H₂O, 2,5 mM NaH₂PO₃, 2,5 mM K₂HPO₃, pH 6,5), puis décollées par tapotements dans du tampon PAS. La concentration de la suspension a été déterminée par l'intermédiaire de cellules de comptage FastRead 102® (Biosigma) à l'aide d'un microscope photonique.

Pour les amibes transfectées (**Tableau 2**), un ajout de généticine G418 à une concentration finale de 50 µg/ml dans le milieu PYG a été réalisé pour le maintien de la culture. Le jour avant l'utilisation de ces amibes, le milieu PYG contenant la généticine G418 a été remplacé par du milieu PYG.

Tableau 2 : Souches d'amibes utilisées durant cette étude. La souche de base correspond à *A. castellanii* Neff. Les autres souches amibiennes ont été transfectées par le plasmide pTPBF- permettant la surexpression ou non d'une protéine.

Souche amibienne (Nom simplifiée)	Source
<i>A. castellanii</i> Neff ATCC 30010 (Ac)	Clarke <i>et al.</i> , 2013
<i>A. castellanii</i> Neff ATCC 30010 + pTPBF-eGFP (Ac + pTPBF-eGFP)	Cette étude
<i>A. castellanii</i> Neff ATCC 30010 + pTPBF-vide (Ac + pTPBF-vide)	Cette étude
<i>A. castellanii</i> Neff ATCC 30010 + pTPBF-CBS (Ac + pTPBF-CBS)	Cette étude
<i>A. castellanii</i> Neff ATCC 30010 + pTPBF-Erat (Ac + pTPBF-Erat)	Cette étude
<i>A. castellanii</i> Neff ATCC 30010 + pTPBF-GPR (Ac + pTPBF-GPR)	Cette étude
<i>A. castellanii</i> Neff ATCC 30010 + pTPBF-NECAP2 (Ac + pTPBF-NECAP2)	Cette étude
<i>A. castellanii</i> Neff ATCC 30010 + pTPBF-OSF (Ac + pTPBF-OSF)	Cette étude

1.2. Culture de *Legionella pneumophila*

Les souches de *L. pneumophila* utilisées dans cette étude ont été conservées à -80°C dans du glycérol à 30% (**Tableau 3**). Les bactéries ont étéensemencées sur une gélose BCYE (Buffered Charcoal Yeast Extract) composée de : 1 % d'ACES (acide N-(2-Acétamido)-2-aminoéthanesulfonique), 1 % d'extrait de levure, 0.2 % de charbon actif, 0,1 % d'alpha-cétoglutarate, 1,5 % d'agar, supplémentée de 0.025 % de pyrophosphate de fer (III) et de 0.04% de L-cystéine, à pH 6,9. Les boîtes ont ensuite été incubées pendant trois jours à 37°C dans un incubateur à température contrôlée, sans ajout de CO₂ et à l'obscurité. Pour les expériences d'infection, des colonies de *L. pneumophila* Paris ont été prélevées afin de préparer une suspension bactérienne à une densité optique à 600 nm (DO) de 0,100 dans 10 ml de milieu de culture BYE (1 % d'ACES (acide N-(2-Acétamido)-2-aminoéthanesulfonic), 1% d'extrait de levure, 0,1 % d'alpha-cétoglutarate, 0,025 % de pyrophosphate de fer (III) et 0.04 % de L-cystéine à pH 6,9). L'ermeneyer contenant la suspension bactérienne a été incubé environ 21 h à 37 °C sous agitation (180 rpm). Le jour de l'infection, 1 mL de culture bactérienne a été prélevé puis centrifugé (2 000 g, 10 min). Le surnageant a été jeté et le culot a été resuspendu dans 1 mL de milieu PYG ou de tampon PAS. Les étapes de centrifugation et de mise en suspension ont été répétées une deuxième fois. Le

nombre de bactéries a été estimé par mesure de la DO à 600 nm en considérant qu'une unité de DO_{600nm} équivaut à 1.10⁹ bactéries/mL.

Pour la culture de la souche *L. pneumophila* Paris $\Delta dotA$, de la kanamycine à 15 µg/ml a été ajoutée au milieu de culture.

Tableau 3 : Souches bactériennes utilisées durant cette étude

Souche bactérienne	Source
<i>Legionella pneumophila</i> Paris	Cazalet <i>et al.</i> , 2004
<i>Legionella pneumophila</i> Paris $\Delta dotA$	Gomez-Valero <i>et al.</i> , 2014
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	
<i>Escherichia coli</i> DH5 α + pTPBF-eGFP	Cette étude
<i>Escherichia coli</i> DH5 α + pTPBF-vide	Cette étude
<i>Escherichia coli</i> DH5 α + pTPBF-CBS1	Cette étude
<i>Escherichia coli</i> DH5 α + pTPBF-Erat	Cette étude
<i>Escherichia coli</i> DH5 α + pTPBF-Erat-eGFP	Cette étude
<i>Escherichia coli</i> DH5 α + pTPBF-GPR	Cette étude
<i>Escherichia coli</i> DH5 α + pTPBF-NECAP2	Cette étude
<i>Escherichia coli</i> DH5 α + pTPBF-OSF	Cette étude

1.3. Culture d'*Escherichia coli* DH5 α

La bactérie *Escherichia coli* DH5 α a étéensemencée sur boîte de pétri contenant du milieu Lysogeny Broth (LB) gélosé composé de : 1 % de tryptone; 1 % de NaCl, 0,5% d'extrait de levure et 1,5 % d'agar. Quand la culture liquide était nécessaire, une colonie a été inoculée dans du milieu LB liquide composé de : 1 % de tryptone; 1 % de NaCl, 0,5% d'extrait de levure. De l'ampicilline à 100 µg/mL a été ajoutée au milieu comme pression de sélection pour les bactéries possédant le plasmide pTPBF-eGFP et les plasmides créés durant cette étude. Les boîtes de pétri et les cultures liquides ont été incubées environ 24 heures à 37°C dans un incubateur à température contrôlée, sans ajout de CO₂ et à l'obscurité. Les cultures liquides ont été incubées sous agitation (180 rpm).

1.4. Infection d'*A. castellanii* par *L. pneumophila*

Afin de tester la surexpression des protéines sur la croissance intracellulaire de *L. pneumophila*, une quantité de $5 \cdot 10^4$ amibes a été inoculée par puits dans une plaque 24 puits. Quatre puits par condition ont été inoculés : un puits correspond à la condition « non infectée » et les trois autres correspondent aux trois réplicats techniques « infectée ». La plaque a été incubée 1 heure à 30 °C pour que les amibes adhèrent.

Pour les infections réalisées à une MOI de 10 (Multiplicity of infection : correspond à la quantité de bactérie pour une cellule eucaryote), le surnageant des cellules a été jeté et remplacé par 1 ml d'une suspension bactérienne de *L. pneumophila* dans du tampon PAS à une concentration de $5 \cdot 10^5$ bactéries/ml. La plaque a été centrifugée (700 g, 10 min) afin de favoriser le contact entre les amibes et les bactéries. Après une heure d'incubation à 30 °C, les cellules ont été rincées deux fois avec du milieu PYG. Du milieu PYG contenant 100 µg/ml de gentamicine a été ajouté dans chaque puits, ce qui correspondait au temps t0. Après 2 heures d'incubation, le milieu PYG+Gentamicine a été remplacé par du milieu PYG sans antibiotique. Après 2, 24, 48 et 72 heures d'infection à 30 °C, les amibes ont été récupérées par décollement (aspiration-refoulement à la micropipette) avant d'être transférées dans des tubes de lyse FastPrep (sans microbilles). Les amibes ont ensuite été lysées trois fois au FastPrep (5,0 m/s, 35 s) avec une incubation de 5 min dans la glace entre chaque lyse. Les suspensions ont été centrifugées (12 000g, 10 min) afin de compléter la lyse des amibes, puis diluées et étalées sur gélose BCYE. La croissance intracellulaire de *L. pneumophila* a été estimée après comptage des unités formant colonies.

Pour les infections réalisées à une MOI 0,1, le contact des bactéries avec les amibes a été réalisé directement dans le milieu PYG. La plaque a été centrifugée (700 g, 10 min) puis incubée sans changement du milieu de culture et sans ajout de PYG+Gentamicine. Deux temps de contact supplémentaires ont été ajoutés : le temps 96 h et 120 h d'infection.

Afin de suivre l'évolution de l'expression des gènes d'*A. castellanii* durant l'infection par *L. pneumophila*, une extraction d'ARN totaux à différents temps d'infection (0 h, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h, 48 h) a été réalisée. L'infection a été réalisée à une MOI de 10 en utilisant le même protocole décrit précédemment avec quelques

modifications. Les amibes ont été inoculées initialement à une quantité de 5.10^4 amibes par puits dans une plaque 6 puits. Aux différents temps étudiés, deux puits par condition ont été décollés par aspiration-refoulement, puis transférés dans un microtube 1,5 ml avant d'être centrifugés (700 g, 5 min). Une extraction des ARN totaux, un traitement DNase (Désoxyribonucléase) et une transcription inverse ont été réalisés afin de quantifier l'expression des gènes par RT-qPCR (Reverse transcription – quantitative polymerase chain reaction).

2. Techniques de biologie moléculaire

2.1. Extraction et traitement DNase des ARN totaux

Les extractions d'ARN totaux ont été réalisées à l'aide du kit d'extraction « RNeasy Mini » (Qiagen) en suivant les recommandations du fournisseur. La lyse des cellules d'*A. castellanii* a été réalisée directement en puits pour les expériences d'enkystement, ou en microtube pour les expériences d'infection d'*A. castellanii* par *L. pneumophila*. Dans ce dernier cas, les cellules ont été détachées par aspiration-refoulement à la micropipette, puis ont été transférées dans un tube eppendorf de 1,5 ml avant d'être centrifugées (700 g, 5 min). Le culot a ensuite été resuspendu dans le tampon de lyse fourni dans le kit. Cette étape a été réalisée du fait que les amibes infectées par *L. pneumophila* s'arrondissent et rapidement n'adhèrent plus au fond du puits. L'élution des ARN a été réalisée dans de l'eau RNase-free.

Les échantillons d'ARN ont ensuite été traités à l'aide du kit « TURBO DNA-free kit » (Invitrogen™) selon les recommandations du fournisseur. Cette étape a permis l'élimination d'ADN résiduels dans les échantillons.

Les échantillons d'ARN ont été conservés à -80°C .

2.2. Extraction de plasmides

Les extractions d'ADN plasmidique ont été réalisées à partir de 5 à 10 mL d'une culture liquide d'*E. coli* en phase stationnaire, à l'aide du kit « Nucleospin® plasmid easypure » (Macherey-Nagel) en suivant les recommandations du fournisseur.

Lorsqu'une grande quantité de plasmide était nécessaire, le kit « Nucleobond® Xtra Midi/Maxi » (Macherey-Nagel) a été utilisé à partir d'un volume de 200 à 300 mL d'une culture liquide d'*E. coli* en phase stationnaire.

Les échantillons de plasmides ont été conservés à -20°C.

2.3. Transcription inverse (RT), PCR quantitative (qPCR)

Afin de quantifier l'expression des gènes au cours de l'infection ou du processus d'enkystement, une transcription inverse a été réalisée sur les échantillons d'ARN afin de former de l'ADNc, à l'aide du kit « Goscript Reverse Transcriptase » (Promega) selon les recommandations du fournisseur. La quantité en ARN a été normalisée entre chaque condition durant cette étape.

La détermination de l'expression des gènes d'*A. castellanii* a été réalisée par qPCR en utilisant les échantillons d'ADNc obtenus après RT. La qPCR a été réalisée à l'aide du kit « LightCycler FastStart DNA Master plus SYBR Green I » (Roche Applied Science). Les réactions ont été effectuées en suivant les recommandations du fournisseur. Les amorces utilisées sont regroupées dans le **Tableau 4**, et ont été construites de façon à ce qu'elles puissent être toutes utilisées aux mêmes cycles d'amplifications. Le cycle de qPCR a été composé d'une dénaturation initiale (95°C, 5min), de 45 cycles composés de trois étapes avec une dénaturation (95°C, 10 sec), une étape d'hybridation des amorces (60°C, 10 sec) et une phase d'élongation (72°C, 10 sec). Une analyse de la courbe de fusion (65°C à 95°C) a été réalisée afin de vérifier la spécificité de l'amplicon.

La quantification relative de l'expression des gènes a été réalisée par la méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen 2001). Le gène codant l'ARNr 18S a été utilisé comme gène de référence pour les expériences d'infection et la vérification de l'expression des plasmides. Le gène TPBF a été utilisé comme gène de référence pour les expériences sur l'enkystement.

Tableau 4 : Amorces utilisées pour la qPCR.

Nom de l'amorce	Séquence (5' ---->)	Source
qErat_Fwd	TTTCGCCCAGAAGCCCAGAG	Cette étude
qErat_Rev	TCGTTTCAGGTGGCGTAGCAG	Cette étude
qNECAP2_Fwd	GAGCGAAGGACTGGAACATC	Cette étude
qNECAP2_Rev	CGAGACGAATGACGCACATC	Cette étude
qCBS1_Fwd	AGACTAGCGTCGTCGTCAAG	Cette étude
qCBS1_Rev	GTCGCTGATGCTGAAGTTGG	Cette étude
qOSF_Fwd	TCTCAGCCAGCTCGTGAAGG	Cette étude
qOSF_Rev	TCGTGATGCGCCGAGTAGTG	Cette étude
q2GPR_Fwd	GGCCTCATTACAAGCTCTC	Cette étude
q2GPR_Rev	TCGCCATCTCCATCACAC	Cette étude
qAc-CS_F2	GGTCTCCATGTCCCTCTACG	Cette étude
qAc-CS_R2	CAGTTGGGGATCTTGAAGCG	Cette étude
qAc-cdc2b_Fwd	ATGCAAGCCAAACCCAGTC	Mengue et al., 2016
qAc-cdc2b_Rev	GAATCGCTGGTTCTCGGTATC	Mengue et al., 2016
qAc_18S_Fwd	TCCAATTTTCTGCCACGAA	Moon et al., 2009
qAc_18S_Rev	ATCATTACCCTAGTCCTCGCGC	Moon et al., 2009
qAc_TPBF_Fwd	GCCGGACAAGAAGCGAAGGAAG	Cette étude
qAc_TPBF_Rev	GTCGGTGAAGTAGACGCGGAAG	Cette étude

2.4. Amplification par PCR

La PCR est une technique de biologie moléculaire qui permet d'amplifier *in vitro* un fragment d'ADN afin d'en avoir une quantité importante. Durant ces travaux de thèse, deux types de PCR ont été réalisés.

Pour l'amplification des séquences codantes à insérer dans les plasmides, la PCR a été réalisée en utilisant l'ADN polymérase Phusion (ThermoFischer) en respectant les recommandations du fournisseur. La matrice d'ADN correspond à de l'ADNc obtenu après transcription inverse d'ARN extraits sur une culture d'*A. castellanii* cultivée à 30°C. Les séquences des amorces utilisées pour l'amplification de l'insert sont renseignées dans le **Tableau 5**.

Afin de vérifier la présence des plasmides construits, les colonies transformantes ont été analysées par PCR à l'aide de l'ADN polymérase GoTaq en utilisant les amorces pTPBF_Fwd (5' AGAGCTCACGATTTGTCTTGT) et pTPBF_Rev (5' GACTCTAGAGGTACCACGCG), qui s'hybrident sur le plasmide.

Tableau 5 : Amorces utilisées pour l'amplification de la séquence codante à insérer dans le plasmide. Les nucléotides en gras correspondent à ceux qui s'hybrident spécifiquement à la séquence cible. Les nucléotides soulignés correspondent aux sites de restriction. « Fwd » correspond à amorce sens (forward) et « Rev » correspond à amorce antisens (reverse).

Nom de l'amorce	Séquence (5' ----)	Source
CBS1_Fwd_Ndel	TTTTTTCATATGGAGCGCGTGAATAACC	cette étude
CBS1_Rev_Sall	TTTTTGTCTGACTCAGAGCTGCAGGAAGGCGC	cette étude
GPR_Fwd_Ndel	TTTTTCATATGATGCGCGATCGGAGG	cette étude
GPR_Rev_Sall	TTTTTGTCTGACCTAGTTGATGGTGACGTCGATG	cette étude
NECAP2_Fwd_Ndel	TTTTTTCATATGGACGACGACTACGAGGAG	cette étude
NECAP2_Rev_Sall	TTTTTGTCTGACTCAAAGCCCCATTTCGTTGG	cette étude
OSF_Fwd_Ndel	TTTTTTCATATGGCCGAATACGAAGCG	cette étude
OSF_Rev_Bsal	TTTTTTCGAGGAGACCGTTCTAGTCGTCGAAGTCGCC	cette étude
Erat_Fwd_Ndel	TTTTTTCATATGGACTGCACAACAGAC	cette étude
Erat_Rev_XhoI	TTTTTCTCGAGTCAACTGGGTGCCGC	cette étude
Erat-GFP_Rev_Ndel	TTTTTTCATATGACTGGGTGCCGCATC	cette étude

2.5. Construction des plasmides

Afin de construire les vecteurs d'expression, une amplification par PCR a été réalisée en utilisant les amorces décrites dans le **Tableau 5** à l'aide de l'ADN polymérase Phusion (ThermoFischer).

Par la suite une digestion enzymatique du vecteur plasmidique pTPBF-eGFP a été réalisée à l'aide des enzymes de restriction NdeI et XhoI (**Figure 10**) (Bateman 2010). Pour le plasmide pTPBF-Erat-eGFP, la digestion a été réalisée seulement avec l'enzyme de restriction NdeI. Les plasmides ont ensuite été déphosphorylés par

l'intermédiaire de la Phosphatase rSAP (New England Biolabs) selon les recommandations du fournisseur. Les inserts ont été digérés à l'aide des enzymes NdeI, XhoI, Sall ou BsaI, qui sont indiquées sur le nom des amorces utilisées (**Tableau 5**). Pour la génération des amorces, quand cela était possible, le site de restriction XhoI a été choisi préférentiellement. A défaut, les enzymes Sall ou BsaI ont été utilisées. Ce sont des enzymes de restriction dites compatibles qui vont reconnaître un site de restriction différent, mais qui vont générer un bout collant compatible avec le site de restriction XhoI. Les plasmides et les inserts digérés ont été purifiés par l'intermédiaire du kit « PCR clean-up » (Macherey-Nagel) selon les recommandations du fournisseur.

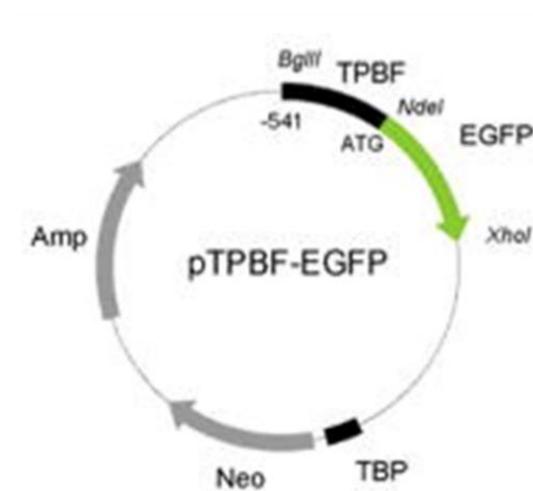


Figure 10 : Carte du plasmide pTPBF-eGFP (d'après [Bateman, 2010](#)).

Une ligation des fragments de PCR purifiés et digérés avec le plasmide digéré a été réalisée par l'intermédiaire de l'ADN ligase T4 (Promega), selon les recommandations du fournisseur.

Pour la génération du plasmide pTPBF-vide, une digestion enzymatique par les enzymes de restrictions NdeI et XhoI a été réalisée. Les extrémités 5' ont été complétées à l'aide de la « DNA polymerase I Large (Klenow) » (Promega), puis le plasmide a été re-circularisé en utilisant de l'ADN ligase T4 (Promega), selon les recommandations des fournisseurs.

Les produits de ligation ont ensuite été transformés dans des *E. coli* DH5 α ultra-compétentes. Les colonies transformantes ont été analysées par PCR. Une extraction plasmidique a ensuite été réalisée afin de vérifier par séquençage la bonne insertion et l'absence de mutation dans la séquence codante. Les plasmides utilisés et construits durant cette étude sont regroupés dans le **Tableau 6**.

Tableau 6 : Plasmides utilisés durant cette étude.

Plasmide	Description	Source
pTPBF-eGFP	Permet la surexpression de eGFP (plasmide de base)	Bateman, 2010
pTPBF-vide	Plasmide délété de la séquence eGFP et re-circularisé	Cette étude
pTPBF-CBS1	Permet la surexpression de CBS1	Cette étude
pTPBF-GPR	Permet la surexpression de GPR	Cette étude
pTPBF-NECAP2	Permet la surexpression de NECAP2	Cette étude
pTPBF-OSF	Permet la surexpression d'OSF	Cette étude
pTPBF-Erat	Permet la surexpression d'Erat	Cette étude
pTPBF-Erat-eGFP	Permet la surexpression d'Erat-eGFP	Cette étude

2.6. Transformation bactérienne

La préparation des *E. coli* DH5 α a été effectuée en utilisant un protocole publié, avec quelques modifications ([Inoue et al. 1990](#)). A partir du stock à -80°C, les bactéries ont étéensemencées sur une gélose LB, puis la boîte a été incubée à 37°C sur la nuit. Le lendemain, une dizaine de colonies ont été prélevées et inoculées dans un erlenmeyer de 1L contenant 250 mL de milieu SOB (0,5 % extrait de levure, 2 % tryptone, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂, 10 mM de MgSO₄). Cette culture a été incubée à 18°C sous agitation (200 rpm) jusqu'à atteindre une DO_{600nm} de 0,6. L'Erlenmeyer a ensuite été mis dans de la glace pendant 10 min, puis la culture bactérienne a été récupérée et centrifugée (4 000 rpm, 10 min, 4°C). Le surnageant a été jeté, et le culot a été resuspendu délicatement dans 80 mL de milieu TB froid (10 mM de PIPES, 15 mM de CaCl₂, 250 mM de KCl, 55 mM de MnCl₂, pH 6,7). Après une incubation de 10 min dans la glace, une centrifugation a été effectuée (4000 rpm, 10 min, 4°C). Le surnageant a été jeté et le culot a été resuspendu délicatement dans

20 mL de milieu TB froid supplémentés avec 1,4 mL de DMSO. Les bactéries ultra-compétentes ont été aliquotées à 100 µl par tube et ont ensuite été congelées rapidement à l'azote liquide avant d'être conservées à -80°C.

Afin de réaliser la transformation bactérienne, un aliquot de bactéries ultra-compétentes conservé à -80°C (volume de 100 µl) a été décongelé sur glace. Un volume de 1 à 10 µL de produit de ligation a été ajouté dans le tube. Le contenu du tube a été homogénéisé par tapotements, puis a été incubé sur glace pendant 10 minutes (Inoue et al. 1990). Un volume de 1 mL de milieu LB préchauffé à 37°C a été ajouté, puis le tube a été incubé pendant 1 heure à 37°C. Le contenu du tube a été étalé sur une gélose LB contenant l'antibiotique permettant la sélection des bactéries transformées (ici, Ampicilline à 100 µg/ml) avant d'être incubée à 37°C.

La vérification de la présence des plasmides a été réalisée par PCR sur colonie, puis migration des amplicons sur gel d'agarose (1 à 2 %). En parallèle, la colonie prélevée utilisée a étéensemencée sur une gélose LB contenant de l'ampicilline (LB+Amp : 100 µg/ml) afin de conserver le clone.

2.7. Séquençage des plasmides

Les plasmides obtenus après extraction de bactéries transformées ont été validés par séquençage SANGER. Pour cela, une amplification par l'intermédiaire du kit de séquençage « ABI Prism BigDye terminator v3.1 » (Applied Biosystems) a été réalisée. Les amorces « pTPBFseq2_Fwd » (5' GTAGCCGGTCGATAAGAATG) et « pTPBFseq_Rev » (5' AAAACCTCCCACATCTCCC) ont été utilisées pour le séquençage des plasmides exprimant une protéine sans tag et le plasmide pTPBFvide. Les amorces « pTPBFseq2_Fwd » et « plasmGFPseq_Rev » (5' CGGACACGCTGAACTTGTGG) ont été utilisées pour le séquençage du plasmide pTPBF-Erat-eGFP. Les amplicons obtenus ont été analysés par l'intermédiaire du séquenceur « ABI Prism 3730 genetic analyser » (Applied Biosystems). Les séquences obtenues ont été vérifiées et analysées en utilisant les logiciels « BioEdit sequence alignment editor » et « SerialCloner ».

2.8. Dosage des acides nucléiques

La détermination de la concentration des échantillons d'ARN a été réalisée par spectrophotométrie (NanoDrop™ One Spectrophotometer, Thermo Scientific).

3. Techniques de biologie cellulaire

3.1. Transfection des amibes

Afin d'introduire les vecteurs d'expression plasmidiques dans *A. castellanii* Neff, une transfection utilisant un vecteur lipidique (Viafect™ transfection reagent, Promega) a été réalisée. Le milieu d'enkystement a été utilisé pendant la première phase de la transfection afin d'éviter de faire précipiter le transfectant.

Un volume par puits de 125 µl d'une suspension cellulaire à 1.10^6 cellules/ml dans du milieu d'enkystement a été déposé dans une plaque 24 puits. Par la suite, 5 µl de transfectant ont été mis en contact avec 1 µg d'ADN plasmidique dans 150 µl de milieu d'enkystement avant d'être incubés 15 minutes à température ambiante. Cette préparation a ensuite été ajoutée directement dans le puits et la plaque a été incubée pendant 3 heures à 30°C sans agitation, puis 750 µl de milieu PYG ont été ajoutés dans le puits. Après une incubation de 24 heures, le contenu du puits a été transféré dans une flasque de culture de 25 cm² contenant du milieu PYG supplémenté de 25 µg/ml de généticine G418 (Sigma). La flasque a été incubée pendant deux semaines à 30°C, puis la concentration en généticine G418 a été augmentée à 50 µg/ml afin de mieux sélectionner la population cellulaire ayant reçu le plasmide.

Une estimation de la viabilité de ces amibes transfectées a été réalisée en utilisant le bleu trypan (BT) et l'iodure de propidium (IP).

Le bleu trypan (BT) est un colorant soluble dans l'eau qui est utilisé pour distinguer une cellule viable, d'une cellule non-viable par test d'exclusion. En effet, c'est un colorant qui rentre dans les cellules, mais lorsque cette dernière est vivante, la molécule va être éjectée dans le milieu extérieur. Dans le cas des cellules mortes, le colorant s'accumule et les colorent en bleu. L'observation se fait par microscopie photonique. Afin de tester la viabilité des amibes transfectées, les cellules ont été décollées 5 jours après l'augmentation de la concentration en G418, et ont ensuite été

diluées dans du bleu trypan à une concentration finale de 0,2 %. Le comptage a été effectué trois fois pour chacune des conditions en utilisant les lames de comptage FastRead 102® (Biosigma).

L'iodure de propidium (IP) est un agent intercalant des acides nucléiques et est également fluorescent. Lorsque la cellule perd son intégrité membranaire, dans le cas d'une mort cellulaire, la molécule pénètre dans la cellule et joue son rôle d'intercalant. Afin de tester la viabilité cellulaire par l'intermédiaire de l'IP, les cellules ont été décollées 5 jours après l'augmentation de la concentration en G418 et ont ensuite été incubées avec de l'IP (1 µl d'IP pour 200µl de suspension cellulaire) et ont été analysées en cytométrie de flux (Cytoflex, Beckman Coulter). Les cellules détectées comme positives au marquage IP ont été considérées comme non-viables. Trois répétitions ont été effectuées indépendamment.

3.2. Estimation de la croissance ambiante

Afin de tester l'effet de la surexpression des protéines sur la croissance des amibes, 1 ml de tampon PAS contenant une quantité de $5 \cdot 10^4$ cellules a été inoculé dans une plaque 24 puits. La plaque a ensuite été incubée à 30 °C pendant 1 heure afin que les amibes adhèrent. Par la suite, le tampon PAS a été remplacé par du milieu PYG, ce qui correspond au temps 0, et la plaque a été incubée à 30 °C. Les cellules ont été décollées après 2, 24, 48 et 72 heures et comptées par l'intermédiaire d'une lame de comptage FastRead 102® (Biosigma).

3.3. Dosage de la production d'ATP

Afin de tester l'effet de la surexpression sur la production d'ATP, une analyse par l'intermédiaire du kit CellTiter-Glo® (Promega) a été réalisée. Le mélange fourni par le kit induit une lyse des cellules et génère un signal luminescent qui sera proportionnel à la quantité d'ATP présent (**Figure 11**). Une quantité de $5 \cdot 10^4$ amibes dans 100 µl de milieu PYG a été inoculée dans des puits d'une plaque 96 puits. La plaque a ensuite été incubée à température ambiante pendant 30 minutes. Un volume de 100 µl de produit de réaction (CellTiter-Glo®, Promega) a été ajouté à chacun des puits, puis la plaque a été incubée pendant 2 min sur un agitateur de plaque afin de lyser les cellules. La plaque a ensuite été incubée pendant 10 minutes à température ambiante et à l'obscurité. La quantification du signal lumineux a été effectuée par l'intermédiaire du lecteur de microplaques multimode TriStar² (Berthold). L'expérience

a été répétée trois fois de façon indépendante, et trois réplicats par expérience ont été analysés.



Figure 11 : Réaction chimique médiée par la Luciférase (d’après la fiche produit du kit CellTiter-Glo®, Promega). En présence d’adénosine triphosphate (ATP), de Mg²⁺, et d’O₂, l’Ultra-Glo™ RLuciférase va induire une mono-oxygénation de la luciférine en oxyluciférine ce qui génère un signal lumineux.

3.4. Quantification du lucifer yellow internalisé

L’effet de la surexpression sur le processus d’endocytose a été testé par cytométrie en flux en utilisant le lucifer yellow (LY), une molécule fluorescente. Cette molécule ne traverse pas la membrane plasmique par diffusion, son internalisation s’effectue donc par endocytose. Pour cela, un volume de 1 ml de milieu PYG contenant 10⁵ cellules a été inoculé dans une plaque 24 puits. La plaque a ensuite été incubée à 30 °C pendant 24 h heures. La molécule LY a ensuite été ajoutée à une concentration de 0,025 % final dans du PYG dans chacun des puits. La plaque a été incubée durant 15 min à l’obscurité et à 30 °C. Les amibes ont finalement été lavées deux fois dans du tampon PAS, puis décollées par aspiration-refoulement dans 1 ml de tampon PAS.

La quantification du LY internalisé dans les amibes a été effectuée par cytométrie de flux (Cytotflex, Beckman Coulter) en déterminant l’intensité médiane de fluorescence de la molécule détectée dans la population totale amibienne. Trois répétitions ont été réalisées pour cette expérience. Des amibes contrôles non-transfectées qui n’ont pas été incubées avec la LY ont été utilisées afin de calibrer la détection du signal fluorescent du cytomètre de flux.

3.5. Enkystement des amibes

Dans le but de tester l'effet de la surexpression des gènes sur le processus d'enkystement, un suivi du pourcentage de kystes par microscopie à fluorescence a été réalisé. Pour cela, les *A. castellanii* transfectées ou non transfectées ont été inoculées dans une plaques 24 puits, à une densité de $5 \cdot 10^4$ amibes/puits dans du tampon PAS. La plaque a ensuite été incubée durant 1 h à 30 °C sans agitation afin de faire adhérer les cellules. Le tampon a été enlevé, puis du milieu d'enkystement a été ajouté, ce moment correspondant aux temps 0 h de l'enkystement. La plaque a ensuite été incubée à 30 °C. Après 24, 48 et 72 heures, du calcofluor white, une molécule fluorescente qui se lie à des glycopolymères, a été ajouté dans le puits en suivant les recommandations du fournisseur. Les cellules ont ensuite été observées en microscopie à fluorescence (Olympus IX51). Les cellules marquées par le calcofluor white sont considérées comme des cellules enkystées, tandis que les autres correspondent à des trophozoïtes. Afin d'estimer le % de cellules enkystées, un ratio des kystes sur les cellules totales a été calculé. Plus de 800 cellules par condition ont été comptées. Cette expérience a été répétée trois fois de façon indépendante.

Afin de suivre l'évolution de l'expression des gènes d'*A. castellanii* durant le processus d'enkystement, une extraction d'ARN à différents temps après induction de l'enkystement (0 h, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h) a été réalisée. A partir d'une flasque d'amibes à une confluence d'environ 80%, une quantité de 10^5 amibes a été inoculée dans 2 ml de tampon PAS dans des puits d'une plaque 6 puits. Les plaques ont été incubées pendant 1 h 30 à 30 °C (phase d'adhérence). Le tampon PAS a ensuite été remplacé par 4 ml de milieu d'enkystement, ce qui correspond au temps 0 h de la cinétique. Aux temps étudiés, une extraction d'ARN, un traitement DNase et une RT ont été réalisés. Le suivi de l'expression des gènes a été réalisé par qPCR.

4. Protéome d'*A. castellanii* Neff infectée par *L. pneumophila* Paris

4.1. Infection d'*A. castellanii* par *L. pneumophila*

Le jour avant l'infection, trois flasques de culture (75 cm²) ont été inoculées par condition, avec $4 \cdot 10^5$ amibes/flasque dans 30 mL de milieu PYG. Ces flasques ont été

incubées pendant 24 heures à 30 °C sans agitation. Les bactéries ont été préparées comme décrit précédemment.

Le jour de l'infection, les amibes ont été infectées à une MOI de 10 en ajoutant les *L. pneumophila* directement dans la flasque. Les flasques ont ensuite été incubées pendant 24 ou 48 heures à 30 °C. Aux temps concernés, les amibes ont été décollées par tapotements de la flasque et les suspensions amibiennes des trois flasques ont été regroupées dans une seule. Une quantification de la concentration de chaque suspension cellulaire a été réalisée par l'intermédiaire de cellules de comptage FastRead 102® (Biosigma) en utilisant un microscope photonique.

4.2. Extraction des protéines et analyse LC-MS/MS

Un volume contenant une quantité de $5 \cdot 10^6$ amibes a été prélevé pour chacune des conditions, puis a été centrifugé (500 g, 5 min, température ambiante). Le surnageant a été jeté, et le culot a été resuspendu dans 20 mL de tampon PAS. Le tube a été de nouveau centrifugé (500 g, 5 min, température ambiante). Le surnageant a été jeté, et le culot a été resuspendu dans un 1,5 mL de tampon PAS et transféré dans un tube eppendorf. Les tubes ont été centrifugés une nouvelle fois (500 g, 5 min, température ambiante). Le culot a été resuspendu dans 1,5 mL de tampon d'extraction (TrisHCl pH 8 à 50 ; Urée 8 M) et le contenu des tubes a été transféré dans des tubes de lyse pour FastPrep contenant des microbilles de silices. Les cellules ont été lysées par trois cycles au FastPrep (vitesse 6,0 ; 30 sec) avec une pause de 5 min dans la glace entre chaque cycle. Les lysats ont ensuite été centrifugés (16 000 g, 10 min, 4 °C) afin d'éliminer les débris cellulaires. Un volume de 1 mL de surnageant a été récupéré pour l'analyse protéomique. L'excédent a été conservé. Ces échantillons de protéines totales extraites ont été conservés à -80 °C.

Les échantillons ont été préparés et analysés par LC-MS/MS (Q exactive HF ou QExactive plus) par la plateforme protéomique de l'institut Pasteur.

L'analyse des protéines dont la quantité est modifiée au cours de l'infection a été réalisée en utilisant le logiciel en ligne « DAVID bioinformatics tools » (<https://david.ncifcrf.gov>; Huang *et al.*, 2009a; Huang *et al.*, 2009b).

Chapitre 4 :
Protéome d'*A. castellanii*
infectée par *L. pneumophila*

5. Modulation de l'expression protéique d'*A. castellanii* en réponse à l'infection par *L. pneumophila*

Afin de rechercher des gènes d'*A. castellanii* impliqués dans l'interaction avec *L. pneumophila*, une première analyse protéomique a été initiée avant mon arrivée au laboratoire. Les protéines totales d'amibes non infectées (ctrl), d'amibes infectées pendant 24h (WT24h) ou 48h (WT48h) ont été extraites avant d'être analysées par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS).

L'analyse du génome de la souche d'*A. castellanii* Neff prédit 15 455 gènes (Clarke et al. 2013). Lors de notre analyse, 1 695 protéines ont été identifiées. Une liste de protéines ayant une quantité significativement modifiée au cours de l'infection a été déterminée en comparant chacune des conditions d'infection à la condition d'amibes non infectées (WT24h vs ctrl, WT48h vs ctrl). Nos résultats montrent que l'expression protéique de 306 protéines d'*A. castellanii* est modifiée au cours de l'infection par *L. pneumophila* (Annexe 1 à 4). Parmi les protéines sous-exprimées, 15 le sont après 24 h d'infection, 263 après 48 h d'infection et 9 protéines sont retrouvées dans les deux conditions (Figure 12). Parmi les protéines surexprimées, une seule est identifiée après 24 h et 36 sont retrouvées après 48 h d'infection.

Ces premiers résultats tendent à montrer que *L. pneumophila* semble plutôt réprimer l'expression des protéines lors de l'infection d'*A. castellanii*.

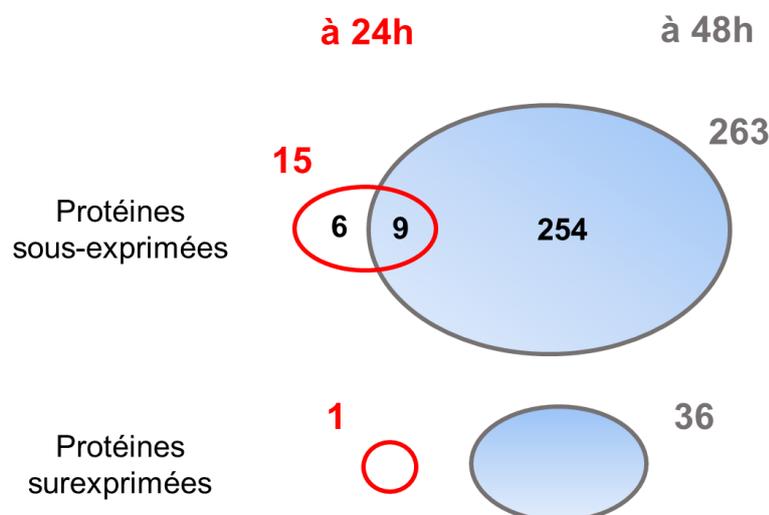


Figure 12 : Nombre de protéines dont la quantité est significativement modifiée durant l'infection d'*A. castellanii* par *L. pneumophila*.

6. Analyse des protéines par assignation de termes GO (Gene Ontology)

Une annotation des protéines régulées a été effectuée par assignement de terme(s) GO (Gene Ontology), par l'intermédiaire de l'outil bio-informatique en ligne « DAVID » (<https://david.ncifcrf.gov>; Huang *et al.*, 2009a; Huang *et al.*, 2009b). L'annotation d'un gène par un terme GO se base sur la fonction de ce gène. Trois niveaux d'assignement sont définis : la composante cellulaire (correspond à la localisation de la protéine active), la fonction moléculaire (correspond à l'activité moléculaire de la protéine), ainsi que les voies ou les processus biologiques dans lesquels la protéine intervient. De plus, cet outil permet d'analyser les termes GO qui sont le plus retrouvés, afin de mettre en évidence une signification biologique à un ensemble de données soumis.

L'analyse a été effectuée sur l'ensemble des protéines amibiennes régulées à 24 et 48 heures après l'infection par *L. pneumophila*, qu'elles soient sur- ou sous-exprimées. Le logiciel « DAVID » a reconnu 294 protéines sur les 306 protéines initialement déterminées. Les douze protéines exclues correspondent à des protéines dont aucun code « ACA1_ » n'a été attribué et sont majoritairement issues de gènes mitochondriaux (exemple : COX3, PKC17, NAD7 ...). Par ailleurs, environ 70% des protéines ne sont pas représentées dans l'analyse des termes GO les plus retrouvés, à cause d'une annotation absente, insuffisante ou parce qu'elles ne sont pas impliquées dans des fonctions/processus similaires.

Les résultats obtenus suggèrent que l'infection par *L. pneumophila* modifie l'expression de protéines ribosomiques et cytoplasmiques chez l'hôte amibien (**Figure 13A**). Au niveau des fonctions moléculaires amibiennes, il est retrouvé majoritairement des protéines impliquées dans la structure des ribosomes, ainsi que des groupes de protéines qui sont impliquées dans des liaisons avec d'autres molécules de nature variées telles que des ARN, des ions magnésium, du NAD (nicotinamide adénine dinucléotide), des ARNt (ARN de transfert) ou du guanosine triphosphate (GTP) (**Figure 13B**). Concernant les processus biologiques, un nombre important de protéines intervenant dans les fonctions de traduction ou de biogenèse des ribosomes est observé, en lien avec les termes précédemment décrits (**Figure 13C**). Il est également retrouvé des protéines impliquées dans le transport de protéines intracellulaires ou le transport médié par des vésicules. Enfin, une richesse de

protéines impliquées dans la biosynthèse d'acides aminés aromatiques, de bases puriques, de glycogène ou dans la gluconéogenèse est observé, suggérant que l'infection par *L. pneumophila* modifie le fonctionnement de voies métaboliques chez *A. castellanii* (Figure 13C).

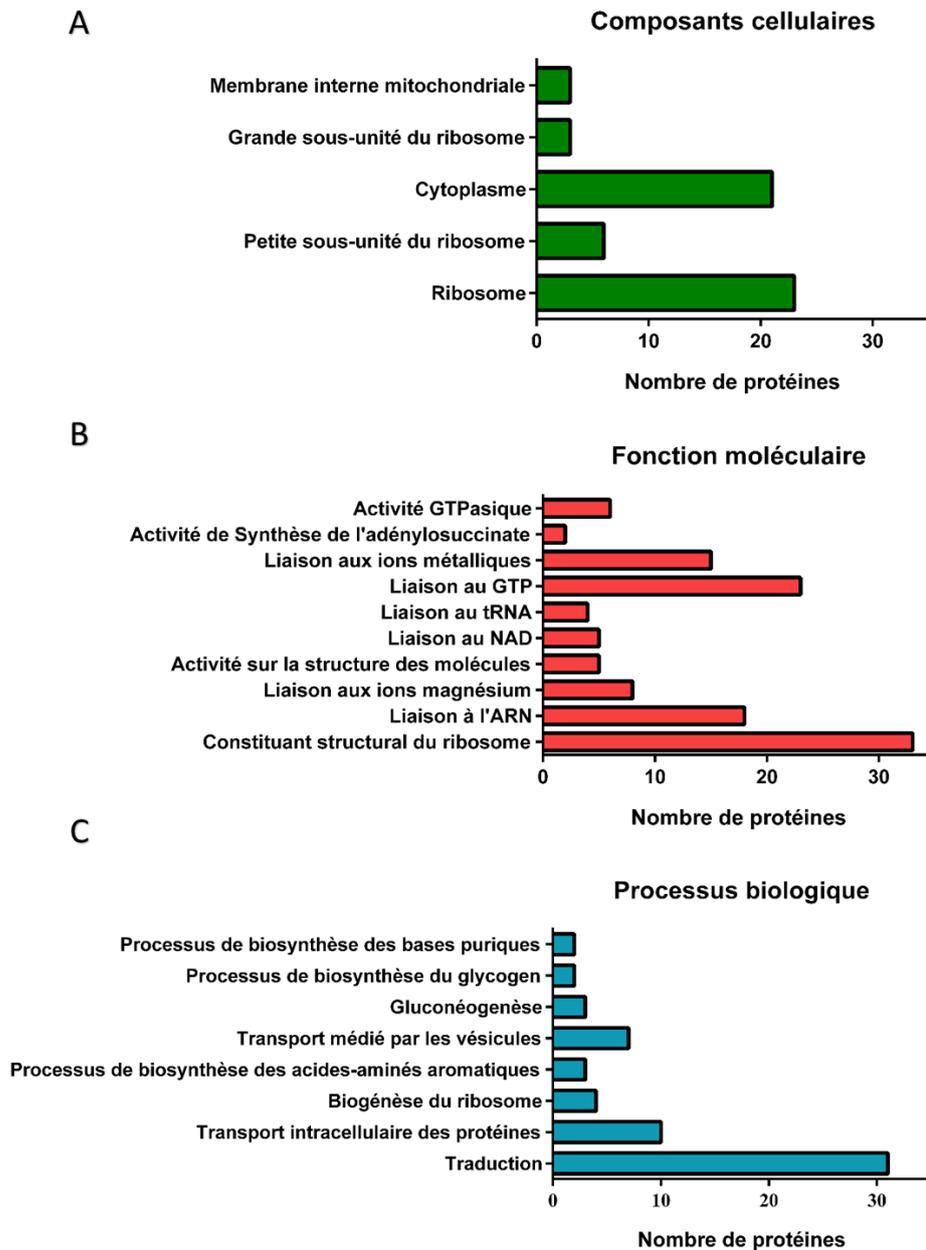


Figure 13 : Quantification du nombre de protéines associées aux termes GO les plus représentés à partir des résultats du protéome. Les analyses ont été effectuées par l'intermédiaire de l'outil en ligne 'DAVID'. Les figures représentent le nombre de protéines associées aux termes GO, pour les trois niveaux : les composants cellulaires où la protéine est retrouvée (A), la fonction moléculaire (B) ou le processus biologique (C).

7. Regroupement de gènes en fonction de leurs termes GO

Une autre fonctionnalité de l'outil d'analyse bio-informatique 'DAVID' est de pouvoir générer des groupes fonctionnels de protéines ayant des terminologies similaires. A partir des 294 protéines assignées au cours de l'analyse, dix groupes de protéines ont été générés (**Annexe 5**). Cependant, il est important de noter que 180 protéines n'ont pas été prises en compte et ne sont donc pas retrouvées parmi ces groupes de protéines, du fait qu'une annotation GO soit absente ou insuffisante, ou bien insuffisamment décrite concernant le groupe fonctionnel. Le **premier groupe** correspond à des protéines du ribosome dont l'annotation commune correspond à des constituants structuraux du ribosome (GO : 0003735) et impliquées dans la traduction (GO : 0006412). Le **deuxième groupe** correspond à des ligases impliquées dans la liaison d'acides aminés aux ARNt et qui sont regroupées pour leur fonction de liaison à l'ATP (GO : 0005524), pour leur présence cytoplasmique (GO :0005737) et pour la présence d'un site conservé et spécifique des « aminoacyl-tRNA synthetase » de classe I (IPR001412). Le **troisième groupe** correspond à des protéines regroupées pour leur fonction de liaison à l'ATP (GO : 0005524) et pour la présence d'un domaine « P-loop NTPase » (IPR027417). Le **quatrième groupe** correspond à des protéines possédant une activité de GTPase (GO :0003924) et donc ayant une capacité de liaison au GTP (GO : 0005525). Le **cinquième groupe** correspond à des protéines pouvant se lier à l'ATP (GO : 0005524) et possédant un domaine hélicase en position C-terminale (IPR001650). Le **sixième groupe** correspond à des protéines regroupées pour leur fonction de liaison au GTP (GO : 0005525), pour la présence d'un domaine « P-loop NTPase » (IPR027417) et pour certaines d'entre elles pour leur répartition intracellulaire (GO : 0005622) ou pour leur fonction de transduction de signal médiée par les petites GTPases (GO : 0007264). Il est notamment retrouvé des protéines de la famille des Ras, Rap et Rab dans ce groupe. Le **septième groupe** correspond à des protéines possédant une fonction de liaison à l'ATP (GO : 0005524) et la présence de domaines proches de protéines kinases. Le **huitième groupe** correspond à des protéines contenant un domaine avec un motif de reconnaissance à l'ARN (IPR000504) et qui ont de fait, une capacité fonctionnelle à se lier aux acides nucléiques (GO : 0003676). Le **neuvième groupe** correspond à des protéines caractérisées par la présence de répétitions ankyrine (IPR002110). Enfin, le **dixième groupe** correspond à des protéines classées par leur localisation trans-membranaire

(GO : 0016021). Parmi ces groupes, certaines protéines, notamment celles du groupe 1, 2 et 6 sont déjà rapportées dans la littérature pour leur implication dans les interactions amibes-bactéries.

8. Discussion sur le protéome

La compréhension de la réponse globale de l'hôte face à un pathogène est importante d'un point de vue fondamental. Cela permet de mieux comprendre comment se fait l'infection, mais cela permet également de mettre en évidence des protéines qui seront potentiellement ciblées par le pathogène, afin de favoriser son cycle d'infection. *L. pneumophila* est une bactérie environnementale qui a la capacité de se répliquer dans de très nombreux protistes incluant l'amibe *A. castellanii*. Afin de mieux comprendre le processus infectieux dans cet hôte amibien, un protéome d'*A. castellanii* infectée par *L. pneumophila* Paris a été effectué.

L'analyse de ce protéome montre que sur les 1695 protéines d'*A. castellanii* détectées, 306 ont une quantité modifiée au cours de l'infection. A l'heure actuelle, la quasi-totalité des protéomes d'hôtes infectés par *L. pneumophila* correspondent à des VCL purifiées chez plusieurs lignées de macrophages ou chez *D. discoideum* (Urwyler et al. 2009; Hoffmann et al. 2014a; Naujoks et al. 2016; Schmolders et al. 2017). Du point de vue de la réponse transcriptionnelle, *L. pneumophila* induit des réponses de stress, altère la fusion et l'adressage des vésicules intracellulaires, mais aussi régule le métabolisme de *D. discoideum* (Farbrother et al. 2006). Plus récemment, des études montrent que la réponse chez les macrophages induit une surexpression des gènes impliqués dans les voies de l'inflammation et anti-apoptotiques. Au contraire, une répression de gènes impliqués dans la synthèse protéique est observée et semble d'ailleurs nécessaire pour la réponse immunitaire (Fontana et al. 2011; Price and Abu Kwaik 2014; Barry et al. 2017).

Un deuxième protéome a été réalisé au cours de ma thèse dans les mêmes conditions que le premier protéome. Ce protéome montre 5 942 protéines différentes d'*Acanthamoeba* qui ont été détectées sur l'ensemble des conditions analysées. Par comparaison avec le premier protéome, plus de trois fois plus de protéines ont été détectées au cours de cette analyse, incluant 907 protéines à 24 h d'infection et 1 610 protéines à 48 h d'infection et dont la quantité est statistiquement modifiée au cours de l'infection. De par le nombre plus important de protéines, l'analyse de ce protéome

pourrait permettre une mise en évidence de nouveaux processus biologiques potentiellement détournés par *L. pneumophila*. Mais, ce protéome n'a pas encore été analysé, bien qu'il ait été utilisé afin de comparer le comportement de protéines cibles avec le premier protéome.

L'analyse des protéines régulées au cours de l'infection dans notre protéome par l'outil DAVID montre un nombre important de protéines possédant un ou plusieurs termes GO assignés aux ribosomes et au processus de traduction. De plus, les groupes fonctionnels n°1, n°2 et n°4 regroupent respectivement des protéines ribosomales, des ARNt ligases et des facteurs d'élongation impliqués dans la traduction (**Annexe 5**). Le détournement de la traduction a déjà été décrit lors de l'infection par *L. pneumophila* (Fontana et al. 2011; Hempstead and Isberg 2015). Par exemple, l'effecteur LegK4 (*Legionella* kinase 4) inhibe la traduction en phosphorylant la protéine Hsp70 (Moss et al. 2019). De plus, trois glucosyltransférases nommées Lgt1, Lgt2 et Lgt3, inhibent le facteur d'élongation eukaryotic 1A (eEF1A) par une modification post-traductionnelle (Belyi et al. 2006, 2008). L'effecteur SidI bloque la traduction des ARNm en se liant à eEF1A et à eEF1B β , un autre facteur d'élongation (Shen et al. 2009). Cependant, aucune de ces études n'a montré une régulation du taux de ces protéines bien qu'elles soient la cible d'effecteurs bactériens. Dans notre protéome, trois facteurs d'élongation potentiels (ACA1_090090, ACA1_385380 et ACA1_322560) ont un taux diminué au cours de l'infection, alors que la protéine ACA1_138040 a un taux augmenté. Les résultats de notre protéome montrent tout de même seize protéines dont la quantité est augmentée au cours de l'infection, ce qui suggère que l'inhibition de la traduction est un processus finement régulé. D'ailleurs, une étude récente montre que l'inhibition de la traduction chez les macrophages par *L. pneumophila* conduit à une réponse « frustrée » de la voie MAPK, c'est-à-dire que les gènes impliqués dans cette voie sont transcrits, mais ne sont pas traduits. Cependant, certaines cytokines (molécules impliquées dans la réponse immunitaire) sont tout de même synthétisées, suggérant que l'inhibition de la traduction n'est pas totale, ou que des voies alternatives sont possibles (Asrat et al. 2014).

Un nombre important de protéines dont la quantité est diminuée au cours de l'infection présentent des termes GO en lien avec le transport intracellulaire et/ou le transport médié par les vésicules, ce qui correspond au groupe fonctionnel n°6 (**Annexe 5**). Ce groupe comprend des protéines de la famille des petites GTPases

pouvant se lier au GTP et possédant une activité GTPasique. Ces petites GTPases sont impliquées dans de très nombreux processus cellulaires et sont divisées en sous-familles composées des protéines Ras (transduction de signal), des protéines Rho (forme et mobilité cellulaire), des protéines Rab (trafic vésiculaire), des protéines Ran (transport de protéines et d'ARN entre le noyau et le cytoplasme), ou encore des protéines Arf/Arf-like (trafic membranaire, voies de signalisation et dynamique du cytosquelette) (Wennerberg et al. 2005; Peurois et al. 2018). Elles peuvent se lier au GTP (forme active) et au GDP (forme inactive) ce qui permet de réguler leurs activités. De par leur implication dans de nombreuses fonctions cellulaires, les petites GTPases sont des cibles durant l'infection par *L. pneumophila*. Les petites GTPases de la famille Arf, Rab et Ran sont majoritairement ciblées par les effecteurs de *L. pneumophila* (Aktories 2011; Finsel and Hilbi 2015; Steiner et al. 2018b). Parmi les quinze protéines formant le groupe fonctionnel n°6, la protéine Arf1 (ADP-ribosylation factor 1, putative) est retrouvée. C'est une protéine hautement conservée qui est impliquée dans le contrôle du transport vésiculaire du réticulum endoplasmique vers le Golgi, et du Golgi vers la membrane plasmique (Cherfils 2014; Jackson and Bouvet 2014). C'est également une protéine qui est recrutée à la membrane de la VCL par l'effecteur RalF, nécessaire pour la réplication intracellulaire de *L. pneumophila* (Kagan and Roy 2002; Nagai et al. 2002). Dans ce groupe fonctionnel se retrouvent également trois protéines putatives dont la quantité est diminuée après 48 h d'infection dans le premier protéome : RAP1A (ACA1_215900), Rap-1 putative (ACA1_278840) et RAP1B-putative (ACA1_045310). Dans le second protéome, RAP1A et RAP1B ont également une quantité diminuée après 48h d'infection. La protéine Rap1 est retrouvée sous deux isoformes, RAP1A et RAP1B et est importante pour la polarité cellulaire, l'adhérence cellulaire et d'autres processus impliquant le cytosquelette d'actine (Wittchen et al. 2011; Hilbi and Kortholt 2019). Rap-1 a été identifiée à partir d'un protéome de VCL purifiée chez les macrophages et chez *D. discoideum*. De plus, cette protéine est indispensable pour la réplication intracellulaire de *L. pneumophila* chez *D. discoideum* (Hoffmann et al. 2014a; Schmölders et al. 2017). D'autres protéines de ce groupe possèdent des homologues retrouvés dans les VCL purifiées de macrophages, telles que la protéine Rab21 inhibant la croissance intracellulaire de *L. pneumophila* et la protéine Rab32, qui à l'inverse la favorise (Hoffmann et al. 2014a). La protéine Sey1, présente à la surface de la VCL chez *D. discoideum*, est impliquée dans l'extension de la VCL et de fait favorise la croissance intracellulaire de *L. pneumophila* (Steiner et

al. 2018a, 2018b). Une diminution de la quantité des protéines d'*Acanthamoeba* putatives Arf1, RAP1A, RAP1B et Sey1 est observée dans les deux protéomes après 48 h d'infection. Les études portant sur leurs homologues dans d'autres organismes montrent qu'elles ont un rôle important, voire indispensable, dans le cycle de vie intracellulaire de *L. pneumophila*. Cependant, la diminution étant observée après 48 h d'infection (et non 24 h), ces résultats pourraient suggérer que ces protéines sont nécessaires dans les premières étapes de l'infection sans pour autant nécessiter leur présence en fin d'infection. Ces protéines n'ayant pas été étudiées chez *Acanthamoeba* sp., ni lors de l'interaction avec *L. pneumophila*, pourraient très bien ne pas être impliquées dans le processus d'infection chez *Acanthamoeba*.

Parmi les protéines du groupe fonctionnel n°3, on retrouve une protéine inhibitrice des ribonucléases de type L (ACA1_325180). De façon intéressante, deux protéines de *L. pneumophila* avec une activité ribonucléase (RNase) sont nécessaires pour la réplication intracellulaire dans des hôtes amibiens. La première, SrnA, est nécessaire pour la réplication intracellulaire chez *V. vermiformis* et *A. castellanii*, mais pas dans les macrophages (Rossier et al. 2009). La deuxième protéine, Cas2, possède une activité RNase et DNase. Elle est nécessaire pour la réplication intracellulaire chez *A. castellanii*, *V. vermiformis* et *Willaertia magna*, mais pas chez *Naegleria lovaniensis* (Gunderson and Cianciotto 2013; Gunderson et al. 2015). Ces études suggèrent qu'une activité RNase semble requise pour la réplication de *L. pneumophila* dans certains hôtes amibiens. En partant de ce constat, l'inhibition de la protéine inhibitrice des ribonucléases de type L pourrait permettre d'induire une plus forte activité RNase et ainsi favoriser la croissance de *L. pneumophila*.

Parmi les autres groupes fonctionnels, on peut distinguer des protéines se liant à l'ATP (groupe n°3 et 5), des protéines kinases (groupe n°7), des protéines se liant à des ARN (groupe n°8), des protéines présentant des domaines ankyrines (groupe n°9) et des protéines transmembranaires (groupe n°10). Cependant, leurs rôles restent à définir.

L'analyse du protéome montre également quelques protéines impliquées dans le métabolisme des bases puriques, dans la biosynthèse du glycogène, dans la gluconéogénèse et dans la biosynthèse des acides aminés aromatiques. L'analyse de la réponse transcriptionnelle de *D. discoideum* face à l'infection montre une dérégulation de voies impliquées dans le métabolisme, par exemple, la voie de

biosynthèse des acides aminés ou la biosynthèse des bases nucléotidiques (Farbrother et al. 2006). L'inhibition du métabolisme de l'hôte pourrait être un moyen d'induire la phase transmissive de *L. pneumophila*, lui permettant de déclencher la fin du cycle intracellulaire et induire sa sortie de l'hôte.

D'autres protéines identifiées dans ce travail et qui ne sont pas présentes dans les groupes fonctionnels générés, sont également impliquées dans l'interaction avec *L. pneumophila*. Par exemple, la sous-unité 3 du complexe Arp2/3 (ACA1_149260) est phosphorylée par l'effecteur LegK2 ce qui induit un remodelage de l'actine au niveau du phagosome. Ce remodelage perturbe la fusion du phagosome avec les endosomes et lysosomes et permet la transition du phagosome en vacuole répllicative (Michard et al. 2015).

L'originalité de ces protéomes porte sur le fait que l'on s'intéresse à la réponse globale d'*A. castellanii*, un réservoir naturel pour *L. pneumophila*, et qu'aucun protéome n'a actuellement été publié sur cet hôte. Les études précédentes utilisaient *D. discoideum* qui n'est pas un hôte naturel pour cette bactérie, ou les macrophages de mammifères. De plus, la technique utilisée pour réaliser notre protéome ne nécessite pas de marquage des protéines, permet la quantification d'un très grand nombre de protéines en simultané et nécessite peu de matériel biologique. Enfin, les protéomes actuellement publiés portent sur la compréhension des acteurs moléculaires bactériens et de l'hôte présents sur la VCL isolée et purifiée chez *D. discoideum* et dans différentes lignées de macrophages (Urwyler et al. 2009; Hoffmann et al. 2014a; Bruckert and Abu Kwaik 2015; Naujoks et al. 2016; Schmölders et al. 2017).

Parmi les protéines régulées, un grand nombre n'ont pas encore de fonctions définies chez *Acanthamoeba*, ou chez d'autres organismes. C'est notamment le cas des protéines qui ne se retrouvent pas au sein de groupes fonctionnels. Ainsi une caractérisation de leur(s) rôle(s) est dans un premier temps nécessaire afin de pouvoir mettre en évidence leur implication potentielle au cours de l'infection par *L. pneumophila*. Finalement, l'utilisation de ce protéome comme point de départ pour la mise en évidence de gènes d'*A. castellanii* impliqués dans l'interaction avec *L. pneumophila*, est confortée par la présence de nombreuses études portant sur des homologues décrits chez le macrophage ou chez l'amibe *D. discoideum*. En effet, ces

derniers sont impliqués dans le cycle d'infection de *L. pneumophila*, et pour certains, y jouent un rôle essentiel.

Chapitre 5 :
Étude de gènes d'*A. castellanii*
sélectionnés à partir de l'analyse
du protéome

1. Sélection de gènes à étudier

À partir de l'analyse protéomique, plusieurs gènes ont été sélectionnés afin de caractériser leur implication potentielle dans les interactions entre *A. castellanii* et *L. pneumophila*. Beaucoup de contraintes ont été rencontrées du fait de l'absence d'assignement pour de très nombreuses protéines. Par exemple, 11,1% des protéines sont annotées comme des « uncharacterized protein » et 18,6% sont nommées par la présence d'un domaine (X-domain containing protein). De plus, quand cela était annoté, peu d'informations fonctionnelles étaient réellement décrites dans la littérature pour *A. castellanii*, qui reste un organisme peu étudié. Pour les autres protéines, certaines ont déjà des fonctions prédites par l'homologie de séquences chez d'autres organismes. C'est le cas des protéines constitutives du ribosome (11,4%) et/ou impliquées dans la traduction, ou des protéines impliquées dans le transport intracellulaire (**Annexe 1 à 4**).

Parmi les 306 protéines identifiées dans cette étude, un premier choix de 15 protéines a été effectué sur différents critères. L'objectif était de construire des plasmides permettant une surexpression de la protéine d'intérêt dans l'amibe et de voir l'effet qui en découle sur l'infection par *L. pneumophila*, mais également sur la physiologie de l'amibe. Le premier critère de choix était d'avoir des résultats similaires entre les réplicats. Le deuxième critère était de sélectionner préférentiellement des protéines régulées 24h après l'infection (9 parmi les 15). Le troisième critère a été d'exclure des protéines liées aux ribosomes, du fait que de nombreuses études avaient déjà montré que *L. pneumophila* altérerait la traduction de son hôte ([Fontana et al. 2011](#); [Levanova et al. 2019](#); [Moss et al. 2019](#)).

Parmi ces quinze protéines, des contraintes liées au clonage tel qu'un problème d'amplification à partir de l'ADNc, une amplification non spécifique ou la présence de sites de restriction dans la séquence, ont contribué à éliminer certaines protéines sélectionnées. De plus, par manque de temps, deux protéines ont également été exclues de l'étude. Ces protéines, au nombre de dix, sont regroupées dans le **Tableau 7**, et n'ont donc pas été étudiées au cours de cette thèse.

Tableau 7 : Protéines sélectionnées initialement, mais exclues de l'étude.

Nom du gène	Annotation du gène	Problèmes rencontrés
ACA1_188490	COP9 signalosome complex subunit 3 (Signalosome subunit 3), putative	Séquence codante non amplifiée par PCR
ACA1_294920	PCI domain containing protein	Séquence codante non amplifiée par PCR
ACA1_325450	CBS domain containing protein	Séquence codante non amplifiée par PCR
ACA1_157860	FAD binding domain containing protein	Séquence codante non amplifiée par PCR
ACA1_245660	Uncharacterized protein	Séquence codante non amplifiée par PCR
ACA1_203650	Dynamin domain containing protein	Séquence codante non amplifiée par PCR
ACA1_092980	Serine/threonine kinase	Amplification aspécifique
ACA1_040840	Programmed cell death 6 interacting protein, putative	Site de restriction présent dans la séquence codante du gène
ACA1_368860	Universal stress domain containing protein	Amplification spécifique mais clonage non réalisé
ACA1_201480	Alcohol dehydrogenase	Amplification spécifique mais clonage non réalisé

Au final, cinq protéines ont été étudiées : NECAP2 et GPR présentent des homologues décrits et étudiés chez d'autres organismes, contrairement à CBS1, Erat et OSF. Le **Tableau 8** résume le nom des protéines et du gène correspondant, l'annotation qui leur a été attribuée, ainsi que les résultats de l'analyse protéomique associés.

Par ailleurs au cours de ma thèse, j'ai réalisé un second protéome afin de confirmer les résultats de la première analyse, en intégrant une condition supplémentaire : « infection pendant 24h et 48h d'*A. castellanii* par une souche de *L. pneumophila* mutés dans le gène *dotA* ». L'utilisation du mutant $\Delta dotA$ sert à mettre en évidence l'implication potentielle du système de sécrétion type IV (SST4) et de ses effecteurs associés, dans la régulation des protéines de l'hôte amibien.

Les résultats du deuxième protéome montrent que les protéines CBS1 et NECAP2 ne sont pas régulées contrairement au premier protéome (**Tableau 8**). Pour la protéine GPR, la diminution est seulement observée à 48 h après l'infection contrairement au premier protéome où elle était observée à 24h et 48h. Pour la

protéine OSF, le profil est différent entre les deux protéomes puisqu'une sous-expression à 24h était observée, alors que le deuxième protéome montre au contraire une surexpression après 48 h d'infection. Pour la protéine Erat, le même profil est observé dans les deux protéomes. De façon intéressante, la sous-expression de cette protéine n'est pas retrouvée lorsque la condition « WT48h » est comparée à la condition « Δ dotA48h », suggérant une potentielle implication du SST4-B Dot/lcm et de ses effecteurs (**Tableau 8**).

Les analyses pour ces cinq protéines ayant déjà débuté avant l'obtention des résultats du second protéome, le choix a été de continuer l'étude de ces derniers malgré un résultat contradictoire entre les protéomes pour CBS1 et NECAP2. Cette différence sera présentée dans la discussion générale.

Tableau 8 : Résultat simplifié de l'analyse du protéome d'*A. castellanii* infectée par *L. pneumophila* pour les cinq protéines étudiées durant cette thèse.

Les cases rouges signifient une diminution significative du taux de protéine. Les cases vertes signifient une augmentation significative du taux de protéine. Les cases grises indiquent que le taux n'est pas changé de façon significative.

Nom	Reference du gène	Annotation	Protéome 1		Protéome 2			
			WT p/r Ctrl		WT p/r Ctrl		WT p/r Δ dotA	
			24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
CBS1	ACA1_232430	CBS domain containing protein	-	-	=	=	=	=
NECAP2	ACA1_321190	Adaptin earbinding coat-associated protein 2 (NECAP-2)	=	-	=	=	=	=
GPR	ACA1_383450	G-protein coupled receptor	-	-	=	-	=	-
Erat	ACA1_384820	Uncharacterized protein	=	-	=	-	=	=
OSF	ACA1_182370	Osteoclast-stimulating factor	-	=	=	+	=	+

2. Analyse bio-informatique des gènes sélectionnés

La taille des protéines putatives, la prédiction de domaines conservés, la recherche de séquences homologues chez d'autres organismes par BLAST ainsi que la conservation des gènes dans les génomes d'*Acanthamoeba* spp. ont été étudiés.

2.1. ACA1_232430 : CBS-domain containing protein (CBS1)

Le gène ACA1_232430 coderait une protéine composée de 308 acides aminés. Le nom attribué lors de l'annotation du génome est « CBS-domain containing protein » (CBS1). A partir de la séquence codante du gène *cbs1*, une recherche de domaine protéique a été effectuée par l'intermédiaire de l'outil en ligne InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>). Cette prédiction montre la présence de quatre domaines « Cystathionine Beta Synthase » (CBS), répartis sur toute la séquence (**Figure 14**). Ces domaines peuvent être retrouvés seuls ou en présence d'autres domaines et vont être retrouvés dans les trois grands domaines du vivant. Les protéines portant ces domaines seraient impliquées dans la régulation d'une grande variété de protéines, aboutissant à une régulation de processus cellulaires tels que le transport d'ions, l'activité du pyrophosphate, la régulation de l'osmose ou encore le transport du nitrate (Baykov et al. 2011; Ereño-Orbea et al. 2013).

Afin de rechercher des gènes homologues chez d'autres organismes, une analyse BLASTp a été effectuée en utilisant la séquence codante protéique contre la base de données NCBI (NCBI non-redundant protein sequence database). Les trois résultats avec les meilleurs scores correspondent à des « hypothetical protein » identifiées chez *Dictyostelium purpureum* (DICPUDRAFT_151118), *Dictyostelium discoideum* AX4 (DDB_G0269358) et *Heterostelium album* (PPL_03239). Il est ensuite retrouvé trois gènes d'*A. castellanii* str. Neff annotés comme « CBS domain containing protein » : ACA1_147740, ACA1_369610 et ACA1_015330 (**Tableau 9**).

Ainsi, ces résultats suggèrent la présence d'homologues protéiques dans d'autres genres amibiens tel que *Dictyostelium*. De plus, d'autres protéines similaires contenant ce genre de domaines sont retrouvées chez *A. castellanii*.

Tableau 9 : Résultats d'analyse BLASTp des 10 premières séquences homologues à la séquence protéique de CBS1 (ACA1_232430). « Accession » correspond au code d'accès des séquences sur NCBI. « Couv. » correspond à la couverture de la séquence soumise à l'analyse. « %id. » correspond au pourcentage d'identité. (Analyse réalisée en juin 2019)

Accession	Description du gène	Score total	Couv.	E-value	% id.
XP_004340971.1	CBS domain containing protein [Acanthamoeba castellanii str. Neff]	633	100%	0.0	100.00%
XP_003287064.1	hypothetical protein DICPUDRAFT_151118 [Dictyostelium purpureum]	154	95%	1,00E-40	31.92%
XP_020436282.1	hypothetical protein PPL_03239 [Heterostelium album PN500]	153	98%	2,00E-40	31.23%
XP_645900.1	hypothetical protein DDB_G0269358 [Dictyostelium discoideum AX4]	150	97%	2,00E-39	29.39%
XP_004335278.1	CBS domain containing protein [Acanthamoeba castellanii str. Neff]	143	97%	2,00E-36	29.71%
XP_004340238.1	CBS domain containing protein [Acanthamoeba castellanii str. Neff]	131	99%	3,00E-32	28.34%
XP_004334118.1	CBS domain containing protein [Acanthamoeba castellanii str. Neff]	130	96%	6,00E-32	30.59%
KYR01508.1	hypothetical protein DLAC_01497 [Tieghemostelium lacteum]	124	85%	7,00E-30	29.14%
XP_004341247.1	CBS domain containing protein [Acanthamoeba castellanii str. Neff]	123	94%	4,00E-29	31.23%
XP_004355130.1	cyclophilin B [Cavenderia fasciculata]	126	55%	4,00E-29	35.80%

2.2. ACA1_383450 : G protein coupled receptor, putative (GPR)

Le gène ACA1_383450 code une protéine putative composée de 456 acides aminés. Le nom attribué lors de l'annotation du génome est « G protein coupled receptor, putative » (GPR). La recherche de domaines prédit la présence d'un peptide signal en position N-terminal suggérant son adressage à un compartiment cellulaire, ainsi que sept domaines transmembranaires dont l'ensemble représente un domaine retrouvé dans un groupe de protéine transmembranaire incluant les « mammalian lung seven transmembrane receptor GPR107 and 108 » (**Figure 14**).

L'analyse BLASTp montre des homologues chez d'autres amibes (*D. discoideum*, *Heterostelium album* etc...) mais également des mammifères (*Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, *Homo sapiens*, ...) (**Tableau 10**). La recherche d'homologue chez des mammifères montre une homologie avec la protéine humaine GPR107 et la protéine murine GPR108. Ces protéines sont localisées dans le trans-Golgi et semblent être impliquées dans le transport rétrograde des protéines. De plus, GPR107 est indispensable pour l'activité de l'exotoxine A chez *Pseudomonas aeruginosa*, une toxine ciblant la traduction de l'hôte (Tafesse et al. 2014). Il n'a pas

été trouvé d'homologues chez les procaryotes, ce qui est en lien avec les domaines prédits et notamment le signal d'adressage qui est typiquement eucaryote. De plus, ces résultats montrent que cette protéine est bien conservée chez les eucaryotes.

Tableau 10 : Résultats d'analyse BLASTp des 10 premières séquences homologues à la séquence protéique de GPR (ACA1_383450). « Accession » correspond au code d'accès des séquences sur NCBI. « Couv. » correspond à la couverture de la séquence soumise à l'analyse. « %id. » correspond au pourcentage d'identité. (Analyse réalisée en juin 2019)

Accession	Description du gène	Score total	Couv.	E-value	% id.
XP_004338827.1	G protein coupled receptor, putative [Acanthamoeba castellanii str. Neff]	934	100%	0.0	100.00%
XP_020432478.1	seven transmembrane domain protein [Heterostelium album PN500]	376	86%	1,00E-123	47.82%
XP_012748526.1	hypothetical protein SAMD00019534_116630 [Acytostelium subglobosum LB1]	367	92%	4,00E-120	46.59%
XP_013762250.1	GPR108 protein [Thecamonas trahens ATCC 50062]	357	91%	9,00E-116	43.22%
XP_004357792.1	seven transmembrane domain protein [Cavenderia fasciculata]	356	87%	1,00E-115	48.19%
PRP82284.1	seven transmembrane domain protein [Planoprotostelium fungivorum]	350	89%	5,00E-112	43.99%
KYQ89580.1	seven transmembrane domain protein [Tieghemostelium lacteum]	337	87%	2,00E-108	45.18%
XP_637699.2	seven transmembrane domain protein [Dictyostelium discoideum AX4]	331	90%	9,00E-106	40.05%
GAQ85191.1	hypothetical protein KFL_002230120 [Klebsormidium nitens]	316	88%	5,00E-100	43.06%
EWM24893.1	Transmembrane receptor, eukaryota [Nannochloropsis gaditana]	317	90%	1,00E-99	41.34%

2.3. ACA1_321190 : Adaptin ear-binding coat-associated protein 2 (NECAP2)

Le gène ACA1_321190 code une protéine putative composée de 214 acides aminés. Le nom attribué lors de l'annotation du génome est « Adaptin ear-binding coat-associated protein 2 (NECAP-2) isoform2, putative » (NECAP2). La recherche de domaines prédit la présence d'un domaine NECAP_PHear (IPR012466) en position N-terminale (**Figure 14**). Ce domaine possède une affinité avec le motif FxDxF qui est retrouvé sur les protéines accessoires de l'endocytose ([Ritter et al. 2007](#)).

L'analyse BLASTp montre des résultats de protéines homologues chez *Dictyostelium* sp., mais elles sont annotées comme « hypothetical protein ». De plus, des protéines assignées NECAP-1, NECAP-2-like ou NECAP-2 ont également été identifiées dans d'autres organismes eucaryotes, tels que des champignons (**Tableau 11**).

Tableau 11 : Résultats d'analyse BLASTp des 10 premières séquences homologues à la séquence protéique de NECAP2 (ACA1_321190). « Accession » correspond au code d'accès des séquences sur NCBI. « Couv. » correspond à la couverture de la séquence soumise à l'analyse. « %id. » correspond au pourcentage d'identité. (Analyse réalisée en juin 2019)

Accession	Description du gène	Score total	Couv.	E-value	% id.
XP_004334025.1	Adaptin earbinding coat-associated protein 2 (NECAP-2) isoform 2, putative [Acanthamoeba castellanii str. Neff]	445	100%	2,00E-158	100.00%
XP_003288793.1	hypothetical protein DICPUDRAFT_48138 [Dictyostelium purpureum]	227	91%	9,00E-71	54.82%
XP_640902.1	hypothetical protein DDB_G0281235 [Dictyostelium discoideum AX4]	214	93%	1,00E-65	51.20%
KYR00304.1	hypothetical protein DLAC_03473 [Tieghemostelium lacteum]	209	92%	5,00E-65	53.50%
RUS17387.1	adaptin ear-binding coat-associated protein 1 [Endogone sp. FLAS-F59071]	204	90%	5,00E-63	54.59%
CDH52641.1	adaptin ear-binding coat-associated protein 1 necap-1 [Lichtheimia corymbifera JMRC:FSU:9682]	202	74%	2,00E-62	61.49%
CDS09945.1	hypothetical protein LRAMOSA02622 [Lichtheimia ramosa]	202	74%	3,00E-62	60.87%
ORX55634.1	adaptin ear-binding coat-associated protein 1 NECAP-1 [Hesseltinella vesiculosa]	202	91%	5,00E-62	52.74%
AWP02822.1	putative adaptin ear-binding coat-associated protein 2 isoform 2 [Scophthalmus maximus]	200	94%	2,00E-61	51.49%
XP_016606898.1	hypothetical protein SPPG_05828 [Spizellomyces punctatus DAOM BR117]	201	80%	3,00E-61	55.06%

2.4. ACA1_182370 : Osteoclast stimulating factor, putative (OSF)

Le gène ACA1_182370 code une protéine putative composée de 147 acides aminés. Le nom attribué lors de l'annotation du génome est « osteoclast stimulating factor, putative » et par simplification, sera annoté dans ce manuscrit par « OSF ». La recherche de domaine prédit la présence de trois répétitions ankyrines (IPR002110) en position N-terminale (**Figure 14**). Les répétitions ankyrines sont impliquées dans l'interaction entre protéines et vont être retrouvées sur de très nombreuses protéines, principalement d'origine eucaryote.

L'analyse BLASTp montre des « hypothetical protein » chez *Dictyostelium purpureum* (DICPUDRAFT_91602) et *Dictyostelium discoideum* AX4 (DDB_G0276623). Parmi les résultats suivants, des protéines assignées comme « hypothetical protein », « osteoclast-stimulating factor » ou « Ankyrin-repeat domain containing protein » ont également été identifiées (**Tableau 12**).

Tableau 12 : Résultats d'analyse BLASTp des 10 premières séquences homologues à la séquence protéique de OSF (ACA1_182370). « Accession » correspond au code d'accès des séquences sur NCBI. « Couv. » correspond à la couverture de la séquence soumise à l'analyse. « %id. » correspond au pourcentage d'identité. (Analyse réalisée en juin 2019)

Accession	Description du gène	Score total	Couv.	E-value	% id.
XP_004345879.1	osteoclaststimulating factor, putative [Acanthamoeba castellanii str. Neff]	301	100%	2,00E-103	100.00%
XP_643059.1	hypothetical protein DDB_G0276623 [Dictyostelium discoideum AX4]	100	79%	1,00E-23	42.50%
XP_003285907.1	hypothetical protein DICPUDRAFT_91602 [Dictyostelium purpureum]	97.4	79%	1,00E-22	43.33%
XP_012747971.1	hypothetical protein SAMD00019534_123020 [Acytostelium subglobosum LB1]	95.5	74%	7,00E-22	44.55%
XP_008857836.1	ankyrin repeat protein, putative [Entamoeba nuttalli P19]	84.0	96%	2,00E-17	32.87%
PRP76746.1	integral membrane sensor hybrid histidine kinase [Planoprotostelium fungivorum]	88.6	78%	2,00E-17	41.53%
XP_652122.1	ankyrin repeat protein, putative [Entamoeba histolytica HM-1:IMSS]	83.6	96%	2,00E-17	32.87%
XP_012751871.1	hypothetical protein SAMD00019534_085260 [Acytostelium subglobosum LB1]	84.0	80%	3,00E-17	37.19%
XP_020430475.1	hypothetical protein PPL_09001 [Heterostelium album PN500]	83.6	80%	3,00E-17	38.02%
XP_001734435.1	osteoclast-stimulating factor [Entamoeba dispar SAW760]	83.2	96%	4,00E-17	32.87%

2.5. ACA1_384820 : hypothetical protein (Erat)

Le gène *ACA1_384820* code une protéine putative composée de 345 acides aminés. Le nom attribué lors de l'annotation du génome est « hypothetical protein » appelée Erat par la suite (voir Publication n°1). La recherche de domaine prédit la présence d'un domaine GNAT (GCN5-N-acetyl-transferase) à l'extrémité N-terminale (**Figure 14**).

L'analyse BLASTp montre uniquement des séquences de bactéries ou d'archées. Les séquences obtenues correspondent à des acétyltransférases de la famille des GNAT (**Tableau 13**). Cette famille regroupe de très nombreuses enzymes impliquées dans le transfert d'un groupe acétyle sur une large diversité de substrats ([Vetting et al. 2005](#)). Une étude approfondie de ce gène a été effectuée et est présentée dans une autre partie de ce manuscrit (**Résultats, partie 5.4.3**).

Tableau 13 : Résultats d'analyse BLASTp des 10 premières séquences homologues à la séquence protéique de Erat (ACA1_384820). « Accession » correspond au code d'accès des séquences sur NCBI. « Couv. » correspond à la couverture de la séquence soumise à l'analyse. « %id. » correspond au pourcentage d'identité. (Analyse réalisée en juin 2019)

Accession	Description du gène	Score total	Couv.	E-value	% id.
XP_004347128.1	hypothetical protein ACA1_384820 [Acanthamoeba castellanii str. Neff]	687	100%	0.0	97.68%
HAX80819.1	TPA: GNAT family N-acetyltransferase [Cyanobacteria bacterium UBA11372]	105	94%	3,00E-22	27.36%
WP_089127465.1	GNAT family N-acetyltransferase [Tolypothrix sp. NIES-4075]	103	94%	7,00E-22	28.57%
WP_127079033.1	GNAT family N-acetyltransferase [Calothrix desertica]	103	94%	1,00E-21	26.23%
RUT10312.1	acetyltransferase [Calothrix desertica PCC 7102]	101	93%	7,00E-21	26.40%
KIF38312.1	GCN5 family acetyltransferase [Hassallia byssoidea VB512170]	100	93%	1,00E-20	29.25%
HAZ50088.1	TPA: GNAT family N-acetyltransferase [Cyanobacteria bacterium UBA11371]	99.8	60%	2,00E-20	31.31%
WP_073622284.1	GNAT family N-acetyltransferase [Calothrix sp. HK-06]	99.0	94%	4,00E-20	25.86%
RIK44937.1	GNAT family N-acetyltransferase [Chloroflexi bacterium]	99.0	96%	5,00E-20	30.42%
PLS85850.1	GNAT family N-acetyltransferase [Actinobacteria bacterium]	98.6	94%	6,00E-20	28.40%

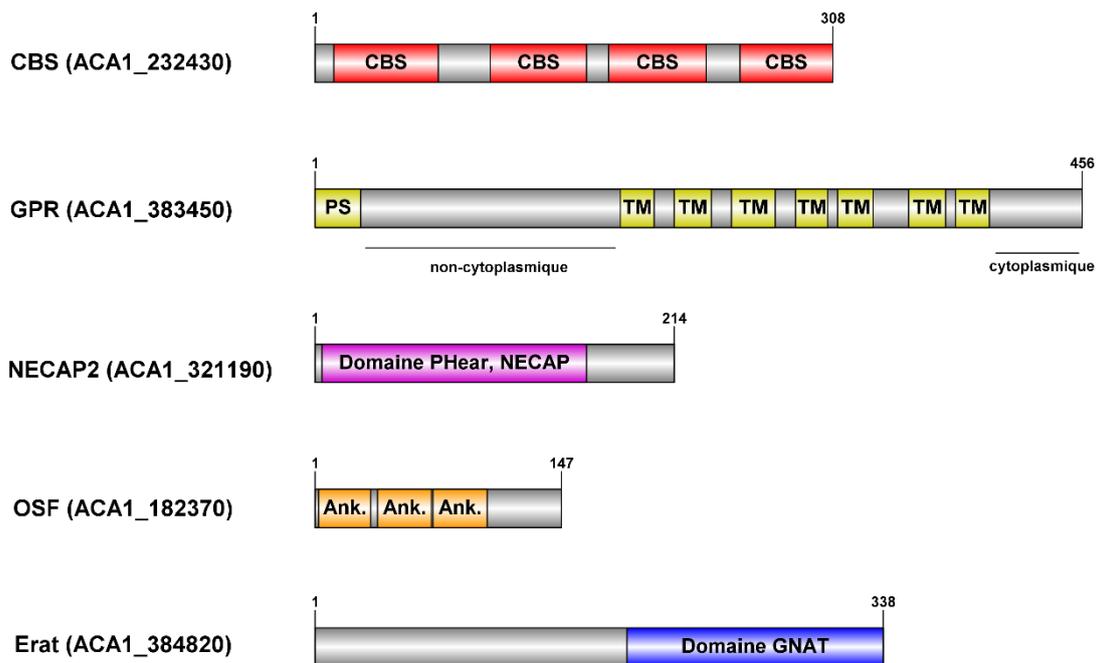


Figure 14 : Prédiction des domaines protéiques pour les 5 protéines putatives étudiées.

Les séquences protéiques putatives ont été analysées par l'intermédiaire de l'outil en ligne InterPro. La représentation visuelle des domaines a été effectuée par l'intermédiaire du logiciel « illustrator of biological sequences » ou « IBS » (Liu et al. 2015).

2.6. Conservation des cinq gènes dans les génomes d'*Acanthamoeba* spp.

Seul un génome du genre *Acanthamoeba* est actuellement publié et annoté (Clarke et al. 2013) bien que quatorze autres génomes aient été séquencés. Les quinze génomes disponibles dans les bases de données ont été récupérés et une analyse BLAST a été effectuée à partir de la séquence nucléotidique de chacun des gènes sélectionnés afin d'estimer leur conservation dans le genre *Acanthamoeba*. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 14**. Pour les cinq gènes étudiés, un ou plusieurs gènes homologues sont retrouvés dans les génomes d'*A. lugdunensis*, *A. rhyodes*, *A. mauritaniensis*, *A. polyphaga*, *A. percei* et *A. palestinensis*. Le gène *osf* n'a pas été détecté dans le génome d'*A. quina* contrairement aux quatre autres gènes. Un ou deux homologues du gène *cbs1* sont retrouvés dans le génome de *A. lenticulata* et *A. healyi*, mais les quatre autres gènes n'ont pas été détectés. Cependant pour *A. astronyxis*, *A. culbertsoni*, *A. comandoni*, *A. divionensis* et *A. royreba*, aucun gène homologue n'a été retrouvé pour les cinq gènes étudiés. Comme seul un génome d'*A. castellanii* a été annoté et publié dans la littérature, ne pas retrouver de gènes homologues dans certains génomes ne signifie pas forcément que le gène est absent. En effet, bien que ces génomes soient indiqués comme complet, un très grand nombre de contig est observé (en général plus de 200 000), signifiant un assemblage non terminé. Cette recherche de gènes homologues a néanmoins permis d'identifier que les cinq gènes étudiés sont conservés dans le genre *Acanthamoeba*.

Tableau 14 : Conservation des gènes étudiés dans les 15 génomes du genre *Acanthamoeba*. (Données obtenues avec l'aide de Cyril Noël). Les espèces colorées en rouge, signifie que des doutes ont été émis sur ces protéomes (Partie Introduction 2.5.2).

Souches	CBS1	GPR	NECAP2	Erat	OSF
<i>A. castellanii</i>	1	1	1	1	1
<i>A. quina</i>	4	2	1	1	0
<i>A. lugdunensis</i>	3	1	0	1	2
<i>A. rhyodes</i>	3	1	2	2	1
<i>A. mauritaniensis</i>	3	3	1	2	2
<i>A. astronyxis</i>	0	0	0	0	0
<i>A. culbertsoni</i>	0	0	0	0	0
<i>A. lenticulata</i>	2	0	0	0	0
<i>A. polyphaga</i>	2	1	1	1	1
<i>A. pearcei</i>	1	2	3	2	2
<i>A. palestinensis</i>	3	1	1	1	2
<i>A. comandoni</i>	0	0	0	0	0
<i>A. divionensis</i>	0	0	0	0	0
<i>A. royreba</i>	0	0	0	0	0
<i>A. healyi</i>	1	0	0	0	0

3. Modulation de l'expression des gènes

Afin d'identifier et de caractériser la fonction des différentes protéines lors de l'infection par *L. pneumophila* et dans les processus physiologiques d'*A. castellanii*, des expériences menant à moduler l'expression des gènes ont été envisagées. Cette modulation de gènes peut s'effectuer soit en inactivant le gène aboutissant à une absence de production de la protéine (knock-out), soit en diminuant l'expression de ces gènes (knock-down), soit en augmentant l'expression d'une séquence codante aboutissant à la sur-production de la protéine dans la cellule (vecteurs d'expression plasmidiques).

Au cours de mes travaux de thèse et au vu des outils disponibles, il a été choisi d'utiliser des ARN interférents, et des plasmides d'expression. Du fait que les protéines sélectionnées ont une expression diminuée au cours de l'infection, le choix s'est dans un premier temps orienté vers l'étude des gènes sélectionnés en favorisant leur

expression et de voir l'effet qui en découle. Ainsi, des vecteurs d'expression plasmidiques ont été construits.

3.1. Construction des plasmides d'expression

La description dans la littérature de plasmides d'expression pour *A. castellanii* reste limitée. Il est retrouvé un plasmide d'expression dit transitoire du fait qu'il ne possède pas de gène de sélection (Kong and Pollard 2002). Plus récemment, deux plasmides d'expression dit stables ont été décrits. Ces plasmides présentent un gène de sélection à la généticine G418, et permettent l'expression de la eGFP sous le contrôle du promoteur TPBF ou GAPDH (Figure 4) (Bateman 2010). Le plasmide utilisé au cours de mes travaux de thèse est le plasmide pTPBF-eGFP (Figure 10).

Pour la construction des vecteurs d'expression plasmidiques, plusieurs approches ont été envisagées. La première approche était d'exprimer la séquence codante de notre gène d'intérêt sans aucune modification. Cette stratégie offre l'avantage d'obtenir une surexpression de la protéine sous sa forme native, mais en contrepartie la vérification par western-blot est impossible dû à l'absence d'anticorps spécifique de la protéine. La deuxième approche était d'ajouter un « tag » (une séquence connue fusionnée à la protéine), tel que les tags His, FLAG ou HA. L'inconvénient de cette stratégie est que le tag peut déstabiliser la conformation de la protéine, l'adressage ou la capacité d'interaction avec d'autres protéines, aboutissant à une modification de son activité dans la cellule.

Pour débiter le projet de thèse, le choix s'est porté sur la construction de plasmide permettant d'exprimer uniquement la séquence codante de notre gène d'intérêt afin de ne pas modifier la fonction de la protéine.

Des plasmides permettant la surexpression de la séquence codante pour les 5 gènes d'intérêts sélectionnés ont été construits : pTPBF-CBS1, pTPBF-GPR, pTPBF-NECAP2, pTPBF-OSF, pTPBF-Erat, ainsi qu'un plasmide contrôle « vide » (pTPBF-vide ; sans eGFP). Ces six plasmides, qui ont servi de base pour l'étude, sont décrits dans le **Tableau 15**.

Tableau 15 : Plasmides construits et utilisés lors de cette étude.

Plasmide	Description	Origine
pTBPF-eGFP	Plasmide de base	Bateman, 2010
pTBPF-vide	Délétion de eGFP par excision NdeI/XhoI et re-ligation	Cette étude
pTBPF-CBS1	Insertion dans NdeI/XhoI (à la place de la eGFP)	Cette étude
pTBPF-GPR	Insertion dans NdeI/XhoI (à la place de la eGFP)	Cette étude
pTBPF-NECAP2	Insertion dans NdeI/XhoI (à la place de la eGFP)	Cette étude
pTBPF-OSF	Insertion dans NdeI/XhoI (à la place de la eGFP)	Cette étude
pTBPF-Erat	Insertion dans NdeI/XhoI (à la place de la eGFP)	Cette étude

3.2. Transfection des amibes

Afin d'obtenir des lignées d'amibes surexprimant la séquence codante de nos gènes d'intérêts, la souche *A. castellanii* Neff (ATCC 30010) a été transfectée avec les différents plasmides par l'intermédiaire d'un transfectant de nature lipidique (Viafect, Promega). De plus, des lignées d'amibes « contrôles » ont été transfectées avec le plasmide initial exprimant la eGFP ou un plasmide sans la séquence codante de la eGFP, nommé « vide » (**Tableau 15**).

Tous les plasmides utilisés ont permis de sélectionner une population résistante au G418 après transfection d'*A. castellanii*, à l'exception du plasmide pTPBF-NECAP2, pour lequel la population amibienne obtenue semble très majoritairement non viable. En effet, pour cette lignée, après augmentation de la généticine G418 à 50 µg/ml (meilleure sélection des amibes transfectées), très peu d'amibes sous forme trophozoïte adhèrent au fond de la plaque et aucune croissance ne semble être observée. Pour les amibes non transfectées, aucune cellule n'est viable, ce qui montre que le G418 joue son rôle de sélection des amibes transfectées.

Afin d'évaluer l'impact de la généticine G418 et de l'expression du plasmide, un marquage des cellules avec de l'iodure de propidium (IP) ou du bleu trypan (BT) est effectué cinq jours après l'ajout de G418 à 50 µg/mL. Le BT est un marqueur de la viabilité cellulaire tandis que l'IP est un marqueur de l'intégrité membranaire. On observe une proportion de plus de 80% de cellules marquées par l'IP (**Figure 15A**) ou par le BT (**Figure 15B**) pour les amibes transfectées avec le plasmide pTPBF-

NECAP2, ainsi que pour les amibes non transfectées. Pour les autres cellules transfectées, une faible proportion d'amibes est marquée à l'iodure de propidium et au bleu trypan.

Ces premiers résultats montrent que le protocole de transfection semble fonctionner puisque des cellules amibiennes transfectées viables sont obtenues. D'autre part, la surexpression de la séquence codante du gène NECAP2 semble avoir un effet délétère sur la viabilité de l'amibe.

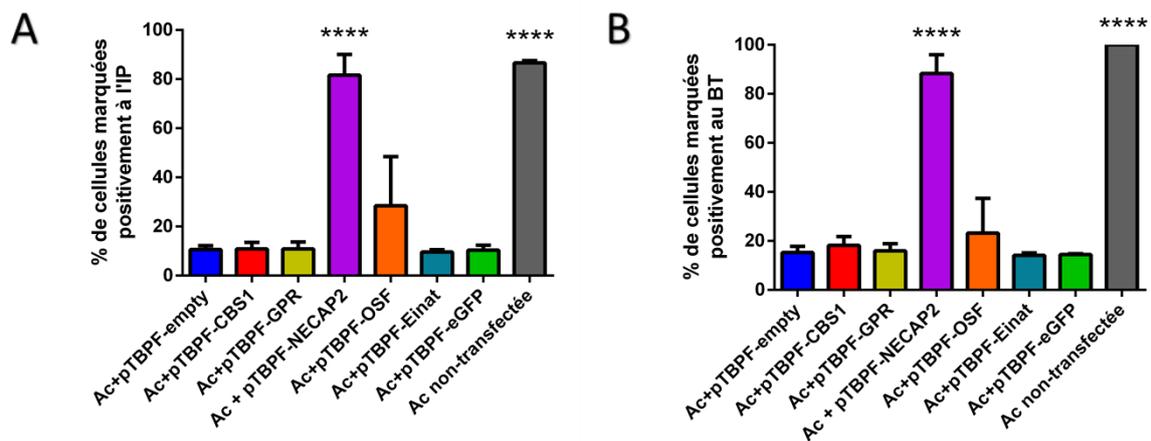


Figure 15 : Viabilité des amibes après transfection et sélection avec de la G418.

(A) Pourcentage d'amibes marquées positivement à l'iodure de propidium (IP) et analysées en cytométrie de flux. (B) Pourcentage d'amibes marquées positivement au bleu trypan. Les résultats correspondent à une moyenne de trois expériences indépendantes, et les barres d'erreurs montrent les erreurs types de la moyenne. Les analyses statistiques ont été réalisées par le test ANOVA avec un test *post-hoc* de Tukey (**** $p < 0,0001$).

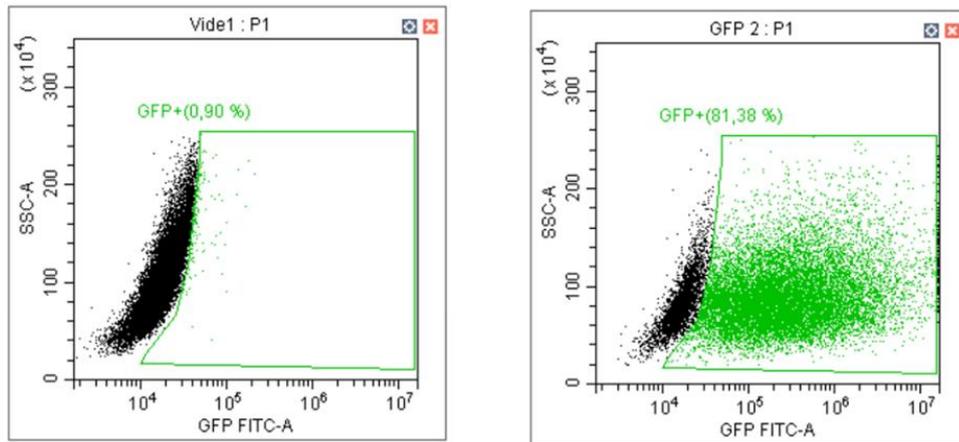
3.3. Vérification de l'expression protéique

A partir des lignées amibiennes obtenues, une vérification de la transfection est effectuée. Pour cela, les amibes transfectées par le plasmide pTPBF-eGFP sont utilisées comme amibes « contrôles ». En effet, la protéine eGFP est une protéine fluorescente, il est donc possible de l'observer directement en microscopie à fluorescence. Des amibes fluorescentes ont été observées montrant que le vecteur d'expression est fonctionnel dans l'amibe. De plus, afin de s'assurer que la population est majoritairement constituée d'amibes fluorescentes, les cultures amibiennes maintenues dans du milieu contenant de la généticine G418 ont été analysées par cytométrie en flux. Plus de 80% des amibes de la population transfectée par le plasmide pTPBF-eGFP sont détectées positives pour la GFP (**Figure 16A**). Ces résultats confirment que la transfection fonctionne, et que le gène *gfp* porté par le plasmide est bien exprimé.

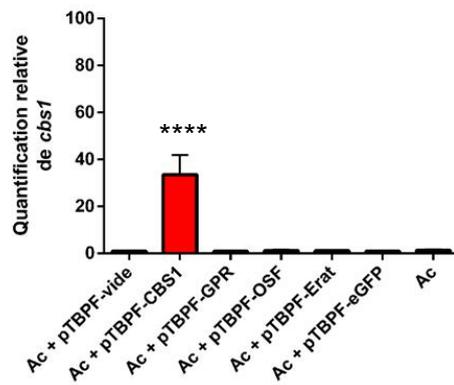
Pour les amibes transfectées avec les gènes d'intérêt, il n'a pas été possible de valider la présence des protéines, du fait que les protéines produites ne sont pas fusionnées à la eGFP ou ne présentent pas de tag. De fait, une analyse par RT-qPCR a été effectuée afin de vérifier la surexpression des gènes d'intérêt dans les lignées correspondantes. Les résultats obtenus montrent une surexpression des gènes dans les cellules transfectées (variation comprise entre 20 et 60 fois) (**Figure 16B-E**).

L'ensemble des résultats montrent qu'il est possible de surexprimer des gènes dans les cellules d'*A. castellanii*. Les lignées obtenues seront par la suite utilisées afin de caractériser le rôle des gènes sélectionnés lors de l'infection par le pathogène intracellulaire *L. pneumophila*, ainsi que dans certains processus physiologiques de l'amibe tels que la croissance ou encore l'enkystement.

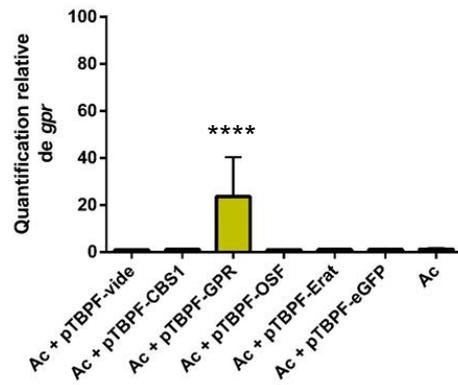
A



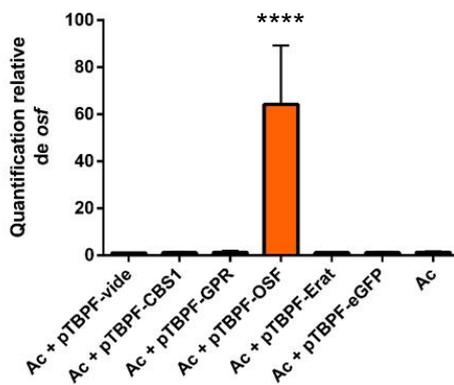
B



C



D



E

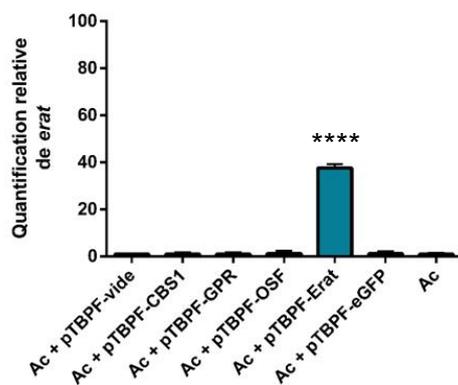


Figure 16 : Vérification de la transfection des amibes.

Résultats de cytométrie de flux pour la détection des amibes GFP positives sur la population transfectée par le plasmide pTPBF-*vide* (à gauche) et pTPBF-*eGFP* (à droite) (A). Résultats de RT-qPCR sur les lignées d'amibes transfectées pour vérifier la surexpression de *cbs1* (B), *gpr* (C), *osf* (D) et *erat* (E) dans la lignée correspondante. Les résultats ont été normalisés par le gène de référence *ARNr 18S*, et sur la condition de référence « Ac + pTPBF-*vide* ». Les résultats correspondent à une moyenne de la quantification relative effectuée par la méthode du $\Delta\Delta Ct$, et les barres d'erreurs montrent les erreurs types de la moyenne. Les analyses statistiques ont été effectuées par l'intermédiaire du test paramétrique ANOVA avec un test post-hoc de Tukey (**** $p < 0,0001$).

4. Interaction entre *A. castellanii* et *L. pneumophila*

4.1. Suivi de l'expression des gènes au cours de l'infection

Les résultats de la première analyse protéomique ont montré que la quantité de protéines synthétisées à partir des cinq gènes étudiés (*cbs1*, *gpr*, *osf*, *necap2*, *unk1*) diminuait au cours de l'infection d'*A. castellanii* par *L. pneumophila*. Afin de savoir si cette diminution pouvait être liée à un mécanisme de régulation de l'expression des gènes, un suivi de leur expression a été effectué à différents temps d'infection (t0, t2, t4, t8, t24, t48) par RT-qPCR sur des amibes non infectées (Ac), infectées par *L. pneumophila* Paris (Ac + Lp wt) ou infectées par une souche *L. pneumophila* Paris mutée dans le gène *dotA* (Ac + Lp Δ *dotA*). Ce mutant présente une virulence fortement atténuée du fait que la bactérie ne possède pas un système de sécrétion de type IV fonctionnel (Berger et al. 1994). Le gène *cdc2b* sert de gène contrôle puisqu'il a été décrit comme étant sous-exprimé en début d'infection par *L. pneumophila* (Mengue et al. 2016). De plus, lors de nos deux analyses protéomiques, il a été observé que la protéine Cdc2b était sous-exprimée après 48h d'infection d'*A. castellanii* par *L. pneumophila* (données personnelles non publiées). Comme observé sur la **Figure 17**, la quantification relative des 6 gènes montre des résultats similaires pour les amibes non infectées par *L. pneumophila* ou lorsqu'elles le sont avec le mutant Δ *dotA* (Ac + Lp dotA). Ainsi, si une diminution est observée pour un des gènes, cela pourrait résulter d'un ou plusieurs effecteur(s) du système de sécrétion de type IV. L'expression du gène *cbs1* diminue entre 2 et 8 heures après l'infection, mais cette expression n'est pas maintenue à 24 et 48 heures (**Figure 17A**). Une augmentation de l'expression du gène *gpr* est observée à 8 et 48 heures après l'infection, et à 2 et 4 heures pour le gène *erat* (**Figure 17A**, **Figure 17E**). L'expression du gène *necap2* est légèrement diminuée 4 heures après l'infection (**Figure 17C**) et reste stable aux autres temps de prélèvement. Pour le gène *osf*, une diminution de l'expression est observée à 4 heures après infection (**Figure 17D**). Comme attendu, l'expression de *cdc2b* est diminuée en début d'infection, à 2 et 4 heures, puis redevient similaire à la condition « non infectée » ou « infectée par Lp Δ *dotA* » par la suite.

Ces résultats suggèrent que pour certains gènes incluant *cbs1*, *necap2*, *osf*, *cdc2b*, la diminution de la quantité de protéines remarquée lors des analyses protéomiques pourrait résulter d'une régulation de ces gènes durant l'infection d'*A. castellanii* par *L. pneumophila*. Cependant, pour les gènes *gpr* et *erat*, il est observé

une augmentation des transcrits, ce qui suggère l'intervention d'une régulation différente en réponse à l'infection.

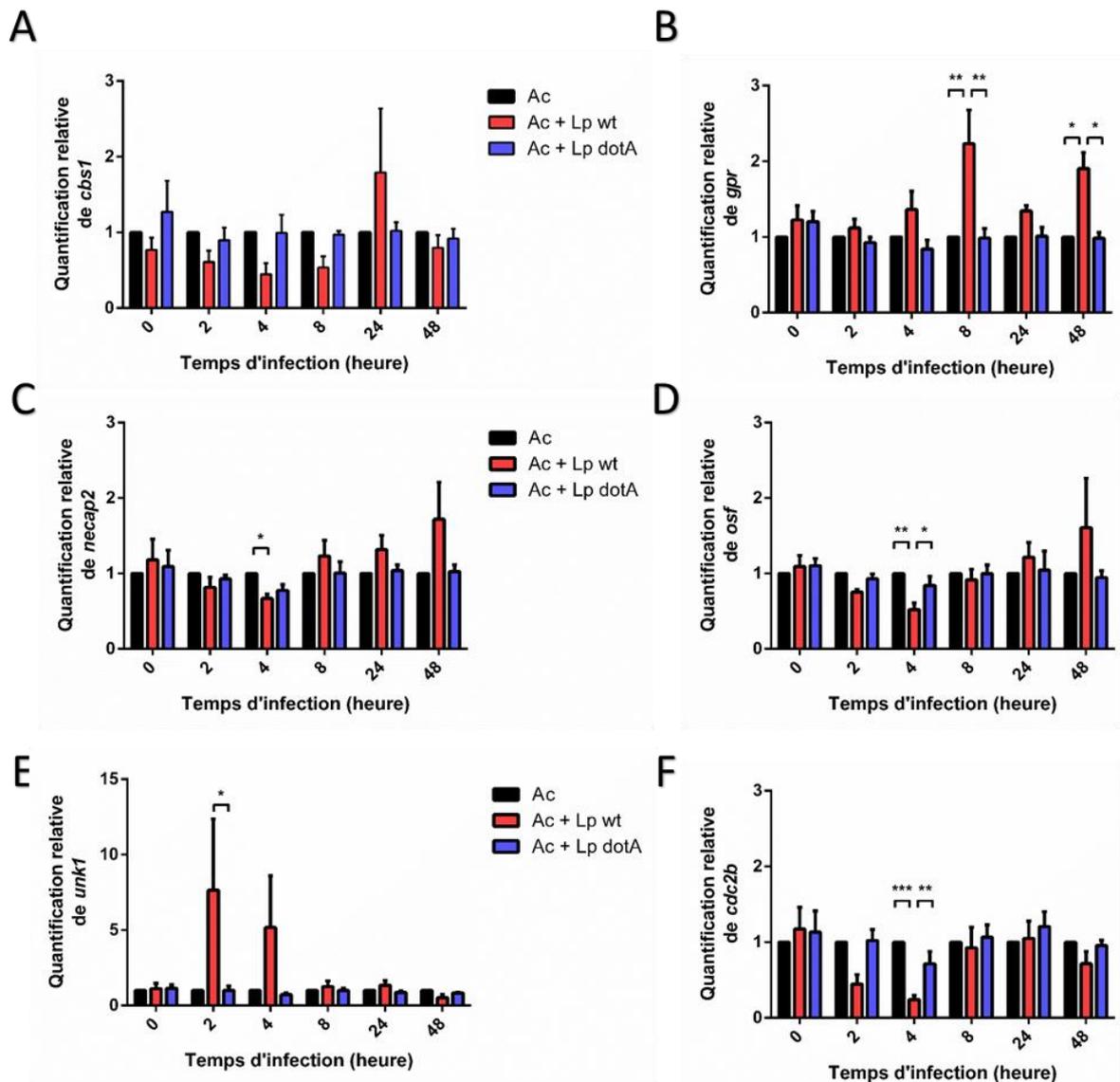


Figure 17 : Évolution de l'expression des gènes d'intérêt au cours de l'infection d'*A. castellanii* par *L. pneumophila str. Paris*.

L'expression relative de *cbs1* (A), *gpr* (B), *necap2* (C), *osf* (D), *erat* (E) et de *cdc2b* (F) a été analysée par RT-qPCR à partir des ARN totaux extraits à différents temps d'infection (MOI 10) et en utilisant le gène de référence *ARNr 18S*, avant d'être normalisée à chaque temps avec la condition d'amibes non infectée (Ac). Les résultats correspondent à une moyenne de quatre expériences indépendantes, et les barres d'erreurs montrent les erreurs types de la moyenne. Les analyses statistiques ont été effectuées par l'intermédiaire du test paramétrique ANOVA avec un test *post-hoc* de Tukey sur les données de ΔCt (*p<0.05, **p<0,01, ***p<0,001).

4.2. Suivi de la croissance intracellulaire de *L. pneumophila*

Les résultats de l'analyse protéomique ont montré que les protéines étudiées étaient réprimées au cours de l'infection par *L. pneumophila*. Ainsi, on voulait voir si induire et maintenir une surexpression de la protéine au cours de l'infection pouvait modifier la croissance intracellulaire de *L. pneumophila*. Afin de vérifier cela, des amibes surexprimant la séquence codante des gènes étudiés ont été infectées par *L. pneumophila*. Les amibes ont ensuite été lysées pour estimer la croissance intracellulaire de *L. pneumophila* par le comptage d'unité formant colonie (UFC). Dans les conditions à 30°C, à une MOI de 10, la croissance intracellulaire de *L. pneumophila* est similaire dans les différentes cellules transfectées (**Figure 18A**). A 37°C, à MOI de 0,1, la même tendance est observée, avec une superposition des courbes de croissance (**Figure 18B**).

Ces deux résultats suggèrent que la surexpression des gènes étudiés n'affecte pas la croissance intracellulaire de *L. pneumophila*.

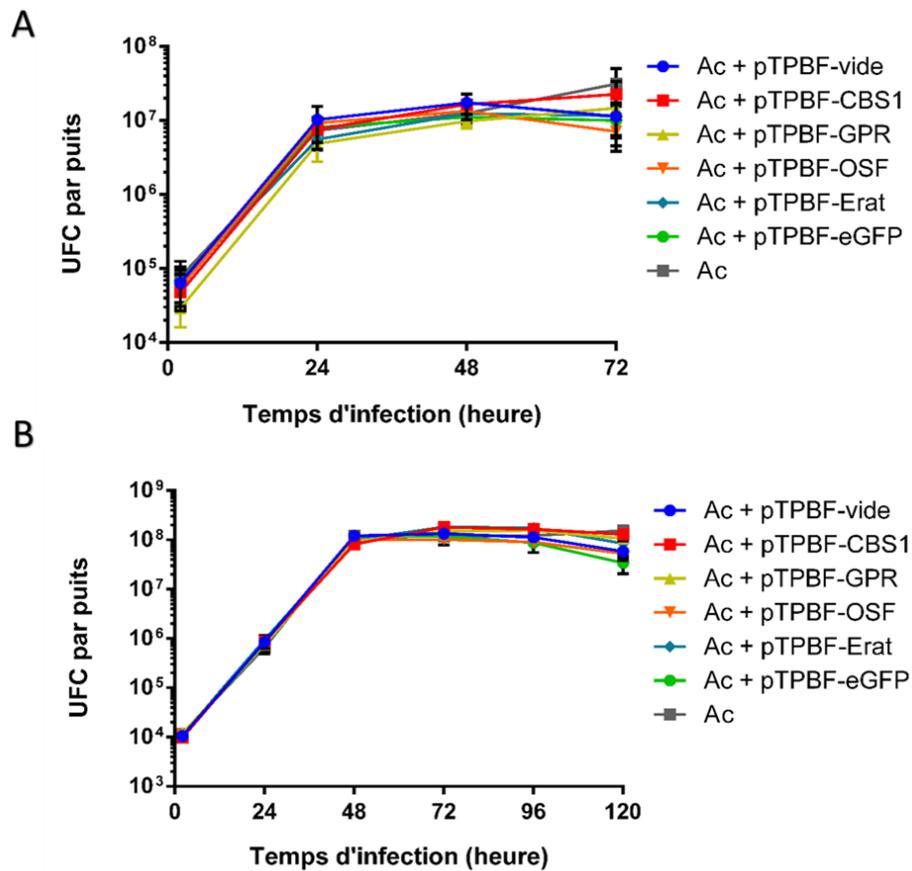


Figure 18 : Croissance intracellulaire de *L. pneumophila* après surexpression de gènes chez *A. castellanii*.

Les amibes transfectées ont été infectées par *L. pneumophila* str. *Paris* à une MOI de 10 et incubées à 30°C (A) ou à une MOI de 0,1 et incubées à 37°C (B). Les résultats présentés correspondent à la moyenne de trois expériences indépendantes, et les barres d'erreurs montrent les erreurs types de la moyenne.

5. Impact des gènes sélectionnés sur les processus physiologiques de l'amibe

Peu d'informations sur la fonctionnalité des gènes d'*A. castellanii* sont disponibles dans la littérature. Pour les gènes d'intérêt ciblés, quelques prédictions de domaines ont été acquises lors de nos analyses bio-informatiques, mais leurs fonctions sur la physiologie de l'amibe reste à déterminer. Dans ce but, les amibes transfectées avec nos différentes constructions plasmidiques ont été utilisées afin d'étudier l'implication des gènes d'intérêts sur plusieurs processus physiologiques de l'amibe qui incluent la croissance, la production d'ATP, l'endocytose ou encore l'enkystement.

5.1. Effet sur la croissance des amibes

Afin de tester l'influence de la surexpression des gènes d'intérêts sur la croissance d'*A. castellanii*, les amibes transfectées ou non, ont été incubées dans du milieu de culture classique (PYG) à 30°C pendant 72 heures. Aucun effet sur la croissance des amibes n'a été observé lorsque l'on surexprime la séquence codante des gènes *cbs1* (**Figure 19A**), *gpr* (**Figure 19B**), *osf* (**Figure 19C**) et *erat* (**Figure 19D**) comparée aux cellules non transfectées, et aux deux lignées « contrôle ». Ces résultats montrent que la surexpression des gènes d'intérêts n'a pas d'impact majeur sur la croissance amibienne.

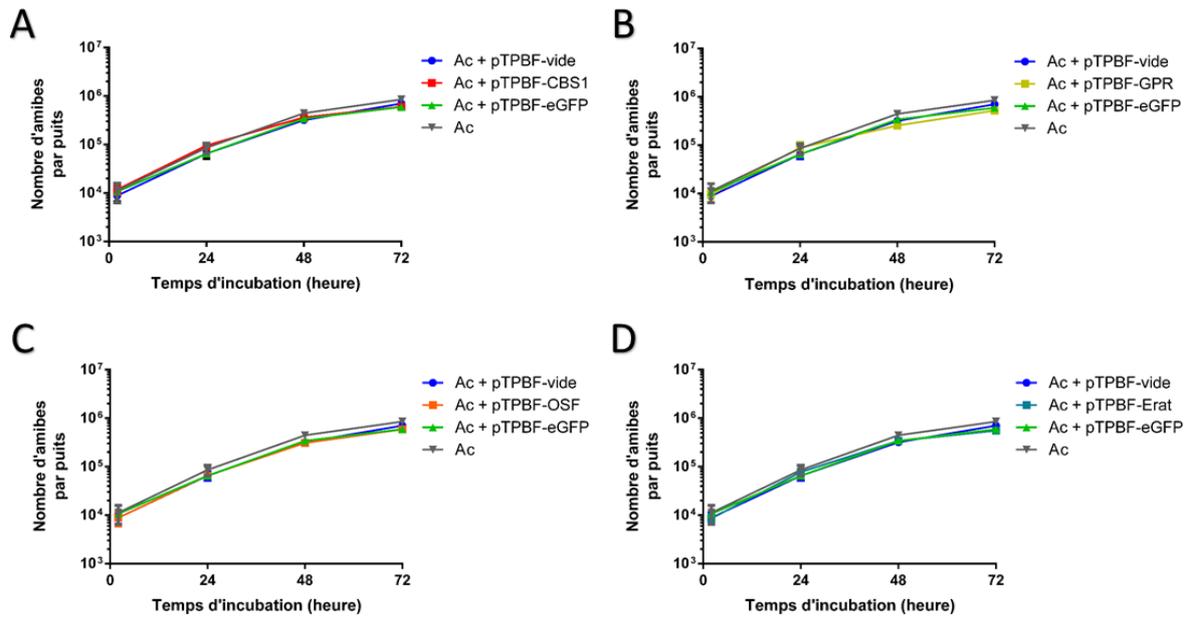


Figure 19 : Effet de la transfection et de la surexpression des gènes d'intérêt sur la croissance d'*A. castellanii*.

Les amibes ont été incubées dans du milieu de culture (PYG) à 30°C pendant 72h. Le comptage a été effectué en cellules de comptage Fast-Read 102®, après décollage des amibes. Les amibes surexprimant les protéines CBS1 (A), GPR (B), OSF (C) et Erat (D) sont représentées avec les amibes non transfectées (Ac), ou les amibes transfectées contrôles (Ac + pTPBF-vidé et Ac + pTPBF-eGFP). Les résultats présentés correspondent à la moyenne de trois expériences indépendantes, et les barres d'erreurs montrent les erreurs types de la moyenne.

5.2. Effet sur la production d'ATP

Afin d'estimer l'impact de la surexpression des gènes étudiés sur le métabolisme énergétique des amibes, une mesure de la production d'ATP a été effectuée par dosage luminescent CellTiter Glo (Promega).

Les résultats montrent que la présence du plasmide vide ou exprimant la eGFP ne modifie pas la production d'ATP (**Figure 20**) en comparaison avec la condition où les amibes ne sont pas transfectées (Ac). Lorsque les protéines CBS1, GPR et OSF sont surexprimées, aucune modification de la production d'ATP n'est observée alors que pour la protéine Erat, une légère diminution non significative avec le test utilisé est observée.

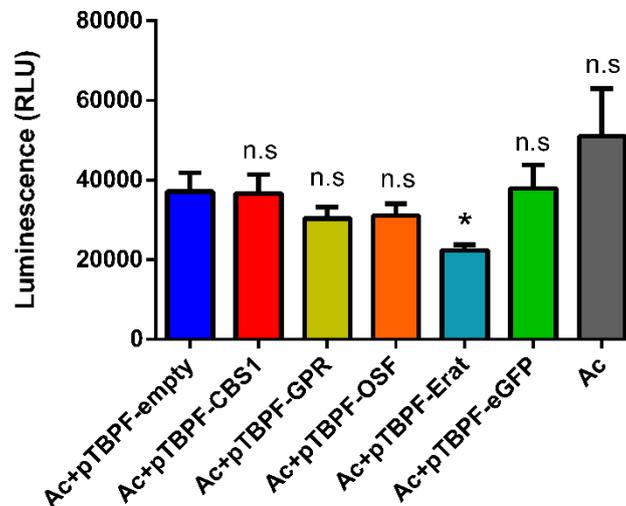


Figure 20 : Effet de la transfection et de la surexpression sur la production d'ATP chez *A. castellanii*.

La quantité d'ATP a été quantifiée par l'intermédiaire d'un dosage luminescent (CellTiter Glo). Les données sont donc représentées par une unité relative de luminescence. Les résultats présentés correspondent à la moyenne de trois expériences indépendantes, et les barres d'erreurs montrent les erreurs types de la moyenne. Les analyses statistiques ont été effectuées par l'intermédiaire du test paramétrique ANOVA avec un test *post-hoc* de Tukey (* $p < 0,05$).

5.3. Effet sur l'endocytose

Afin de tester l'effet de la surexpression des gènes étudiés sur la capacité d'internalisation d'*A. castellanii*, des cultures amibiennes ont été incubées avec du lucifer yellow, une molécule fluorescente qui ne peut pas traverser la membrane plasmique par diffusion, et donc son internalisation s'effectue par endocytose. La quantification du lucifer yellow internalisé a été effectuée par cytomètre de flux en déterminant l'intensité médiane de fluorescence de chaque population amibienne.

Aucune différence n'a été observée entre les différentes lignées (**Figure 21**). Ces résultats montrent que la transfection d'un vecteur vide, ou exprimant une séquence codante n'influe pas sur le processus d'endocytose. De plus, la surexpression des gènes d'intérêt ne semble pas impliquée dans l'internalisation de la Lucifer Yellow.

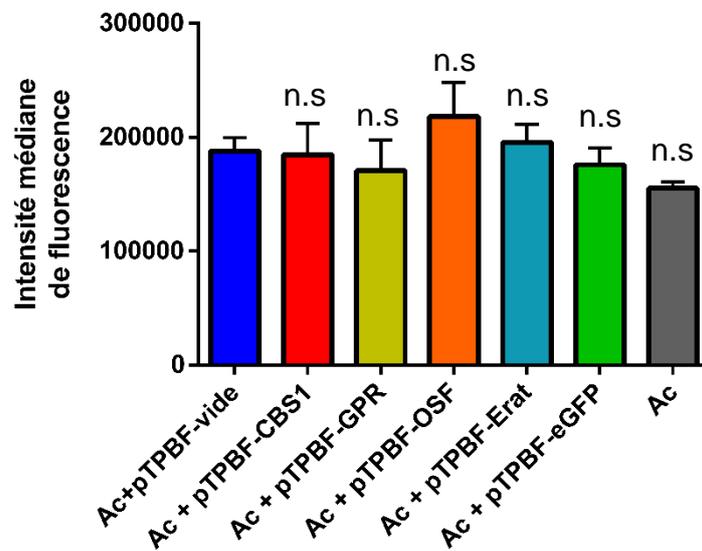


Figure 21 : Effet de la transfection et de la surexpression de gènes d'intérêt au cours du processus d'internalisation.

L'intensité médiane de fluorescence présente dans les amibes a été quantifiée par cytométrie de flux. Les résultats présentés correspondent à la moyenne de quatre expériences indépendantes, et les barres d'erreurs montrent les erreurs types de la moyenne. Les analyses statistiques ont été effectuées par l'intermédiaire du test paramétrique ANOVA avec un test *post-hoc* de Tukey.

5.4. Effet sur le processus d'enkystement

5.4.1. Influence de la surexpression des gènes d'intérêt sur la formation du kyste

Afin de tester l'influence de la surexpression des gènes d'intérêts sur le processus d'enkystement chez *A. castellanii*, un suivi de la formation de kyste a été effectué sur les lignées d'amibes surexprimant la séquence codante correspondante. Après 24 heures dans du milieu d'enkystement (**Figure 22A**), environ 65% de kystes sont observés dans les conditions étudiées, sauf dans la condition où le gène *gpr* est surexprimé (Ac + pTPBF-GPR), pour laquelle il est observé environ 40% de kyste. De plus, une légère diminution du pourcentage de kyste est également observée lorsque le gène *erat* est surexprimé (Ac + pTPBF-Erat). Le profil observé à 24 heures est également observé à 48 heures (**Figure 22B**) et à 72 heures (**Figure 22C**). La présence du plasmide vide ou contenant uniquement la séquence codant la eGFP n'affecte pas le processus d'enkystement, puisque le taux de kyste est similaire pour ces deux conditions, aux deux temps étudiés. Cependant la surexpression des gènes *gpr* et *erat* semble limiter la formation de kyste. Pour les gènes *cbs1* et *osf*, il n'y a pas de différence dans le pourcentage de kyste suggérant que leur surexpression n'influe pas sur la formation des kystes.

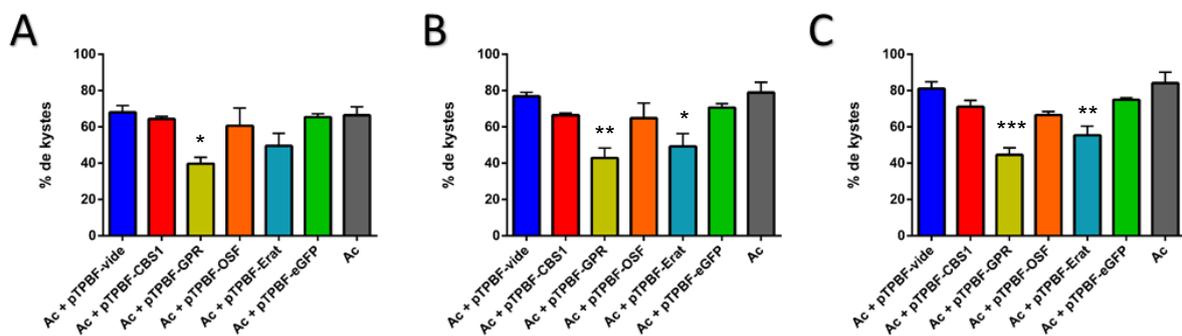


Figure 22 : Effet de la transfection et de la surexpression des gènes d'intérêt sur la capacité de formation de kyste.

L'estimation du pourcentage de kyste a été effectuée après 24 heures (A), 48 heures (B) et 72 heures (C) après ajout du milieu d'enkystement, par coloration au calcofluor white et détection en microscopie à fluorescence. Les cellules marquées positivement par le calcofluor white ont été considérées comme des kystes. Les résultats présentés correspondent à une moyenne de trois expériences indépendantes. Plus de 800 cellules ont été comptées pour chacune des conditions, dans chaque expérience. Les analyses statistiques ont été effectuées par l'intermédiaire du test paramétrique ANOVA avec un test *post-hoc* de Tukey (* $p < 0.05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

5.4.2. Suivi de l'expression des gènes au cours de l'enkystement

L'enkystement est un processus physiologique essentiel pour l'amibe, lui permettant de résister dans l'environnement aux conditions défavorables. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à l'évolution de l'expression de nos 5 gènes d'intérêt lors de ce processus. Pour cela, une analyse par RT-qPCR a été effectuée à différents temps après induction de l'enkystement (0 h, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h). Il est décrit dans la littérature que le gène de la cellulose synthase a une expression forte 24 heures après induction de l'enkystement (Aqeel et al. 2013; Moon et al. 2014). Le suivi de l'expression de ce gène a été inclus dans cette étude comme contrôle positif de l'enkystement.

Le profil d'expression pour le gène *cbs1* montre que ce gène est réprimé en début d'enkystement (2 h), mais que cette répression n'est pas maintenue au cours du temps (**Figure 23A**). Pour le gène *gpr*, une répression est observée à 2 et 4 heures, ce qui correspond au début d'enkystement (**Figure 23B**). Le gène *osf* a une expression stable jusqu'à 8 heures mais est ensuite réprimé à 24 heures (**Figure 23C**). Le gène *necap2* est réprimé d'un facteur 2 et cette répression est stable jusqu'à 24 heures (**Figure 23D**). De façon intéressante, le profil du gène *erat* montre une très forte répression qui se manifeste dès le début du processus d'enkystement et qui se maintient au moins jusqu'à 24 heures (**Figure 23E**). Le gène de la cellulose synthase, considéré comme gène contrôle de l'enkystement, est surexprimé après 24 heures d'incubation dans du milieu d'enkystement (**Figure 23F**), confirmant les données de la littérature.

L'ensemble de ces résultats montre des profils d'expression différents selon les gènes étudiés lors du processus d'enkystement.

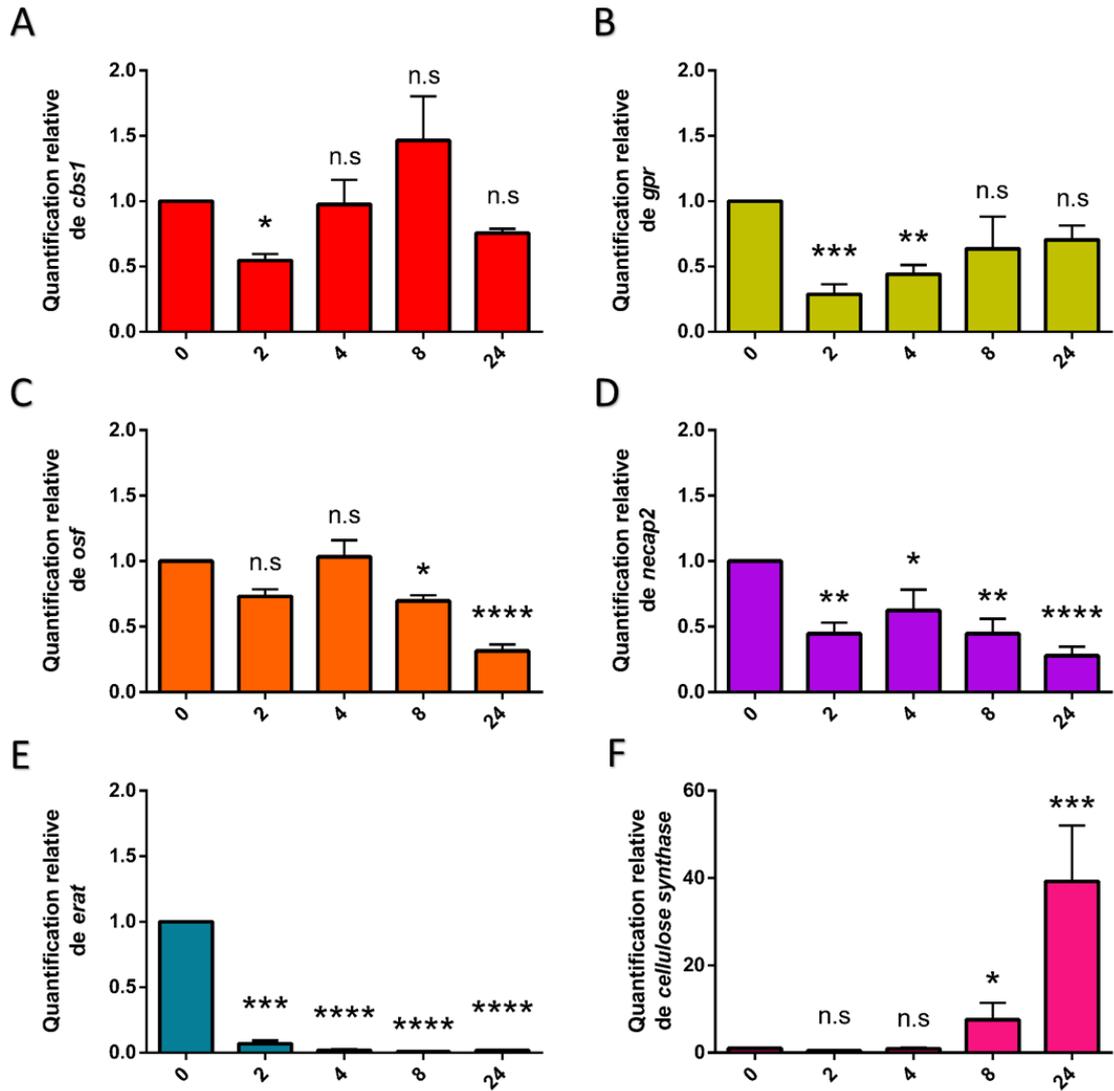


Figure 23 : Evolution de l'expression des gènes étudiés au cours de l'enkystement d'*A. castellanii*.

Les expressions relatives des gènes *cbs1* (A), *gpr* (B), *osf* (C), *necap2* (D), *erat* (E) et du gène codant la cellulose synthase (F) ont été analysées par RT-qPCR à partir des ARN totaux extraits à différents temps après induction de l'enkystement, en utilisant le gène de référence *TPBF*. Les résultats ont été normalisés avec les données obtenues au temps t0. Les résultats correspondent à une moyenne de trois expériences indépendantes, et les barres d'erreurs montrent les erreurs types de la moyenne. Les analyses statistiques ont été effectuées par l'intermédiaire du test paramétrique ANOVA avec un test *post-hoc* de Tukey (* $p < 0.05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

5.4.3. Publication n°1 : Erat, a newly described protein impairs encystment in the amoeba *Acanthamoeba castellanii*

Une publication présentant les résultats obtenus sur la caractérisation du gène *erat* a été soumise dans le journal scientifique « Protist ». Un premier retour des rapporteurs a été obtenu, mais le texte présenté ci-après n'a pas été modifié suite aux remarques effectuées.

Title page

Title: Erat, a newly described protein impairs encystment in the amoeba *Acanthamoeba castellanii*

Running title: Erat impairs *Acanthamoeba* encystment

Authors: Steven Rolland, Luce Mengue, Cyril Noël, Stéphanie Crapart, Anne Mercier, Willy Aucher, Yann Héchard, Ascel Samba-Louaka

Affiliations : UMR CNRS 7267 Ecologie et Biologie des Interactions, Université de Poitiers, 86073 Poitiers, France

Corresponding author:

Ascel Samba-Louaka

E-mail: ascel.samba@univ-poitiers.fr

Postal address: UMR CNRS 7267 Ecologie et Biologie des Interactions Université de Poitiers, Pôle Biologie-Santé, Bât. B36/B37, 1 rue Georges Bonnet, TSA 51106 86073 Poitiers Cedex 9, France.

Abstract

Acanthamoeba castellanii is a ubiquitous free-living amoeba (FLA). Pathogenic strains are causative agents of a rare fatal infection called granulomatous amoebic encephalitis and *Acanthamoeba* keratitis. In response to environmental stresses, *Acanthamoeba* can differentiate into a resisting form called “cyst”. The differentiation process named “encystment” involves several proteins but is still largely unknown. The cyst remains an elusive problem in spite of advances in antimicrobial chemotherapy. The aim of this study is to identify and characterize the role of the *ACA1_384820* *Acanthamoeba* gene during encystment. This gene encodes a putative N-acetyltransferase belonging to Gcn5-related N-acetyltransferase (GNAT) family. Research of homologues in other organisms shows their presence mainly in prokaryotes. During encystment, the gene *ACA1_384820* was down-regulated as early as 2 hours after induction of encystment. We propose to rename the *ACA1_384820* gene “*erat*” for encystment-repressed N-acetyltransferase. The overexpression of the coding sequence impaired formation of cysts and the fused protein *Erat-eGFP* was localized both in cytoplasm and nucleus. Altogether, these results describe a new *Acanthamoeba* protein, likely from a prokaryotic origin, which interferes with encystment process and could be a target to maintain its expression for cyst clearance.

Keywords

Acanthamoeba castellanii, Amoeba, encystment, GNAT family, N-acetyltransferase, gene transfer.

Introduction

Acanthamoeba sp. are free-living amoebae (FLA), commonly found in diverse natural environments such as soil, water and air, but also in artificial facilities including tap water systems, cooling towers, sewage and air conditioning systems (Rodríguez-Zaragoza 1994; Thomas et al. 2010). Pathogenic strains are causative agents of a rare fatal infection of the central nervous system, called granulomatous amoebic encephalitis (GAE), and *Acanthamoeba* keratitis (AK), a painful progressive eye disease (Martinez and Visvesvaraz 1997; Marciano-Cabral and Cabral 2003). AK is generally associated with contact lens wearers and remains an elusive problem in spite of advances in antimicrobial chemotherapy and eye care (Chawla et al. 2014). Furthermore, FLA act as “Trojan horses” of the microbial world and they are considered as training ground for pathogenic bacteria as the passage through amoebae is associated to an increase of bacterial virulence (Greub and Raoult 2004). The analysis of FLA genomes suggests genetic exchanges underlying the role of amoebae in allowing genes exchange with and between intra-cellular organisms (Clarke et al. 2013; Chelkha et al. 2018).

Acanthamoeba has a life cycle presenting two forms: a metabolically active trophozoite and a metabolically inactive dormant cyst (Martinez and Visvesvaraz 1997). Encystment is a reversible process which allows formation of the cyst. It is induced by harsh conditions, such as lack of nutrients, change in osmotic pressure or pH (Fouque et al. 2012; Lloyd 2014). The cyst represents a resistant and resting form that protects the amoeba against adverse conditions. It may persist during many years (Mazur T. et al. 1995). The cyst is surrounded by a double-layered wall, consisting of exocyst, composed mostly of proteins and polysaccharides, and endocyst, composed mostly of cellulose (Garajová et al. 2019; Magistrado-Coxen et al. 2019). Many studies focalize to the elucidation of molecular actors involved in the formation of the cysts. In *Acanthamoeba* cells, several genes associated with cell wall synthesis, such as glycogen phosphorylase, cellulose synthase, xylose isomerase were identified and their repression prevents the formation of cysts (Lorenzo-Morales et al. 2008; Aqeel et al. 2013). Moreover, genes associated with autophagy, including those encoding Atg8, Atg8 isoform, Atg3 and Atg16 were reported as involved in encystment (Moon et al. 2009, 2011, 2013; Song et al. 2012). Indeed, the rapid degradation and recycling of cellular components by autophagy seem essential during encystment (Moon et al.

2015). Intense cysteine and serine protease activities within *Acanthamoeba* were described to be involved in the cyst formation (Dudley et al. 2008; Leitsch et al. 2010). Recent studies showed the possible involvement of epigenetic modifications mediated by protein during encystment, such as the involvement of protein arginine methyltransferase 1 and 5 (Moon et al. 2016, 2017b). Cyst resistance to therapeutic agents and the recurrence of infection due to the reversibility of encystment remains a challenge that is yet to be addressed (Anwar et al. 2018).

Here, we are investigating the role of the *ACA1_384820* *Acanthamoeba* gene during the *A. castellanii* encystment process. This gene encodes a putative N-acetyltransferase belonging to Gcn5-related N-Acetyltransferase (GNAT) family and seems to have a prokaryotic origin. This gene was down-regulated during encystment, and the overexpression of its coding sequence impaired formation of cysts. We propose to rename the *ACA1_384820* gene “*erat*” for encystment-repressed N-acetyltransferase.

Results

The *ACA1_384820* gene expression was repressed during encystment

In order to study the expression of the *ACA1_384820* gene during encystment of *A. castellanii*, a real-time qPCR was conducted at 0, 2, 4, 8 and 24 hours after encystment induction. The expression of cellulose synthase gene was also performed as a marker of encystment (Moon et al. 2014). As observed on **Figure 1**, the expression level of *ACA1_384820* gene was repressed during encystment. This down-regulation occurred early after the induction of encystment (2 hours post-induction), and persisted up to 24 hours. In contrast, as expected, the cellulose synthase gene was overexpressed at 24h after the induction of encystment. These results show that *ACA1_384820* was early and highly repressed during encystment of *A. castellanii*.

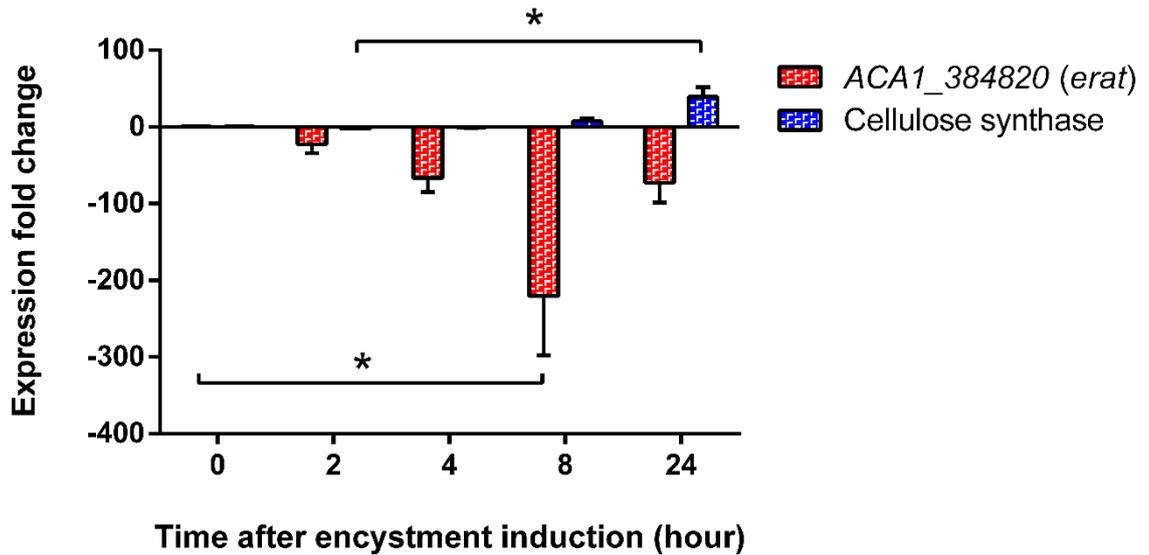


Figure 1. The expression of the *ACA1_384820* gene is repressed during encystment. mRNA expression level of cellulose synthase and *ACA1_384820* genes performed by RT-qPCR during encystment. Results represent the average value of the three independent experiments, and error bars represent the standard error of the mean (\pm SEM). Statistical analysis was performed using the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's *post-hoc* test (* $p < 0.05$).

The *ACA1_384820* gene encodes a putative N-acetyltransferase protein that presents homologies with prokaryotic sequences

A bioinformatics analysis was performed to characterize the putative function of the *ACA1_384820* gene. From annotated genome available on AmoebaDB (Aurrecochea et al. 2011), *ACA1_384820* gene encodes a putative protein predicted to have 345 amino acids. The coding sequence of *ACA1_384820* was amplified from cDNA and a nucleotide sequence was obtained with 21 nucleotides missing corresponding to 7 amino acids. This deletion does not change the reading frame and had no impact on the putative active domain of the predicted protein.

The identification of specific domains with InterPro shows the presence of a Gcn5-related N-acetyltransferase (GNAT) domain in the C-terminal region (**Fig. 2A**). No additional domain has been predicted. Accordingly, the *ACA1_384820* protein could be a putative N-acetyltransferase, a family of protein involved in the transfer of

acetyl group from acetyl-CoA to a substrate. We propose to rename ACA1_384820 with Erat for “encystment-repressed N-acetyltransferase”.

In order to search for homologous sequences to the Erat protein sequence, a BLAST sequence analysis was performed against the NCBI non-redundant protein sequence database. The best hits (e-value threshold < 1e-10) were affiliated to GNAT-family N-acetyltransferase functions with around 30% of identity belonging to the Bacteria and Archaea domains. Interestingly, no homology was found with Eukaryota. In addition, an in-depth analysis of the presence of *erat* within all available amoeba genomes (annotated and non-annotated) was conducted. Thus, 14 other genomes of *Acanthamoeba* sp. were investigated, 5 from *Dictyostelium* sp., 5 from *Entamoeba* sp. and 3 from *Naegleria* sp. Homologous genes were found in *A. pearcei*, *A. quina*, *A. lugdunensis*, *A. polyphaga*, *A. rhyssodes*, *A. palestinensis* and *A. mauritaniensis* (Supplementary 1), but not detected in other species of the genus *Acanthamoeba*. No homologous genes were found in the genomes of *Naegleria*, *Entamoeba*, and *Dictyostelium*.

As observed on the **Figure 2B**, the phylogenetic analysis shows the presence of two main groups supported by strong bootstrap values. The first one was mainly represented by Firmicutes sequences with an apparent divergent structural evolution of the protein. The second group, where the protein Erat was positioned, was composed predominantly of Actinobacteria, Chlorobacteria, and Cyanobacteria. The closest organism was *Heimdallarchaeota archaeon*, a member of Asgard archaea. Altogether, these results suggest a prokaryotic origin for Erat.

Figure 2. The *A. castellanii* ACA1_384820 gene encodes a putative N-acetyltransferase that present homology with prokaryotic sequences. (A) Representation of domain prediction for ACA1_384820 gene by InterPro and the GNAT domain coloured in red in the coding sequence of Erat. (B) Phylogenetic tree based on homologous sequences of the Erat putative amino-acids sequence identified by BLAST. Sequences of *A. castellanii* are written in black.

Overexpression of the *erat* gene impairs the formation of cysts.

To better characterize the function of the *erat* gene, we examined if its overexpression could affect the encystment process. A plasmid called pTPBF-Erat, with the *erat* coding sequence and a control plasmid called pTPBF-empty, which does not express a coding sequence, were constructed. Plasmids were transfected into *A. castellanii* and their viability was assessed using Trypan blue (TB) and propidium iodide (PI). The two markers gave similar results, showing that only twenty percent of transfected cells were positive for both TB and PI, while non-transfected cells were all TB- or PI-positive (**Fig. 3A-B**). To assess if the *Erat* coding sequence was overexpressed within the transfected cells, the transcript level was analysed by RT-qPCR. In cells transfected with the pTPBF-Erat, an increase of *erat* mRNA was observed (**Fig. 3C**). In contrast, cells transfected with pTPBF-empty or pTPBF-eGFP display similar level of *erat* mRNA compare to untransfected cells (**Fig. 3C**).

In order to assess whether the overexpression of the *erat* gene altered or not the growth of amoebae, they were counted within the PYG growth medium at 30°C for 72 h. No growth defect was observed for amoebae overexpressing the *erat* gene compared to non-transfected cells, or those which were transfected with the two control plasmids pTPBF-eGFP and pTPBF-empty (**Fig. 3D**). Altogether, these results show that the overexpression of the *erat* coding sequence did not disturb the growth of *A. castellanii*.

Then, we tested the influence of the overexpression of *erat* on encystment of *A. castellanii*. Encystment of the transfected amoebae was induced and the percentage of cyst, which were stained with the calcofluor white, was estimated at different time points (24 h, 48 h and 72 h). At 24 h, a decrease of the percentage of cysts was observed. This effect was even more pronounced at 48 h and 72 h after the beginning of encystment (**Fig. 4**). In conclusion, the overexpression of *erat* impaired formation of cysts.

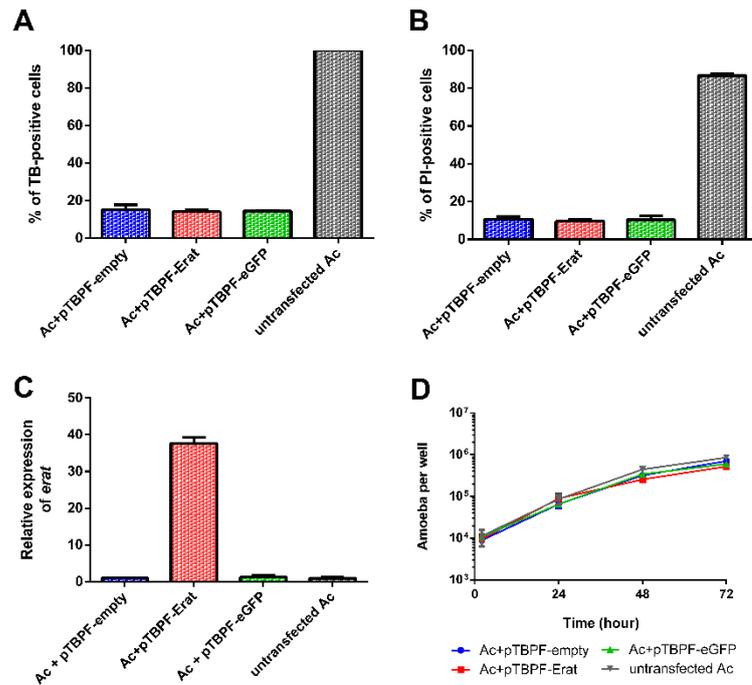


Figure 3. The overexpression of the *erat* gene does not strongly affect the growth of *A. castellanii*. Evaluation of cell viability using (A) Trypan Blue (TB) or (B) propidium iodide (PI) on the transfected cells, five days after the increase of G418 antibiotic concentration. TB- or PI-positive cells were considered as non-viable cells. (C) Relative expression of *erat* gene in the transfected and untransfected Ac by RT-qPCR. (D) Evaluation of the impact of the plasmid transfection in the growth of *A. castellanii* ATCC30010 in PYG medium at 30°C. Results are average of three independent experiments, and error bars represent the standard error of the mean (\pm SEM). Statistical analysis was performed using the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's *post-hoc* test with comparison of each sample to condition “Ac + pTPBF-empty”.

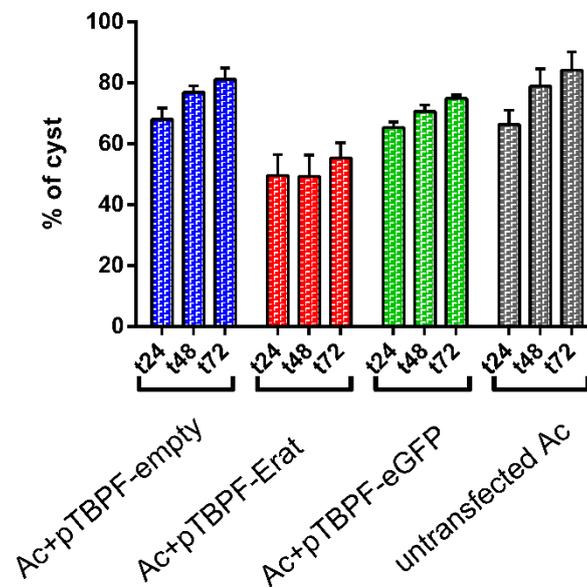


Figure 4. The overexpression of Erat coding sequence slightly prevents formation of cysts. The encystment of *A. castellanii* was induced in encystment medium. At 24h, 48h and 72h, calcofluor white was added into the wells and the estimation of percentage of calcofluor-positive cells was estimated on total population. Results are average of three independent experiments, and error bars represent the standard error of the mean (\pm SEM). Statistical analysis was performed using the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's *post-hoc* test with comparison of each sample, at each time, to the condition "Ac+pTPBF-empty".

The Erat putative protein was localized in both the cytoplasm and the nucleus

To determine the intracellular localization of the Erat protein, *A. castellanii* were transfected with the plasmid containing the eGFP-fused Erat (pTPBF-Erat-eGFP) or eGFP alone (pTPBF-eGFP). Its localization was examined by fluorescence microscopy at trophozoite stage (before encystment) and 24 hours after induction of encystment. As shown in **Figure 5A-B**, the distribution of eGFP protein in trophozoites and cysts exhibited a diffuse fluorescence pattern in the cytoplasm, with an accumulation in nucleus. This pattern was expected because the eGFP protein was described to translocate itself in the nucleus (Seibel et al. 2007). The distribution of Erat-eGFP fused protein in trophozoites and cysts exhibited a diffuse fluorescence pattern in the cytoplasm and the nucleus (**Fig. 5A-B**).

To verify the expression of Erat-eGFP, a western-blot was performed on total protein extraction from transfected cells. *A. castellanii* expressing eGFP was used as control. In the eGFP expressing cells, a band of approximately 27 kDa was observed corresponding to eGFP protein size at both 0 h and 24 h. For the Erat-eGFP overexpressing cells, at t0, three main bands were observed corresponding to the Erat-eGFP size (67kDa) and two additional bands around 48 and 29 kDa. Only the band around 29 kDa was detected 24 hours after induction of encystment (**Fig. 5C**). The Erat-eGFP could be degraded during encystment.

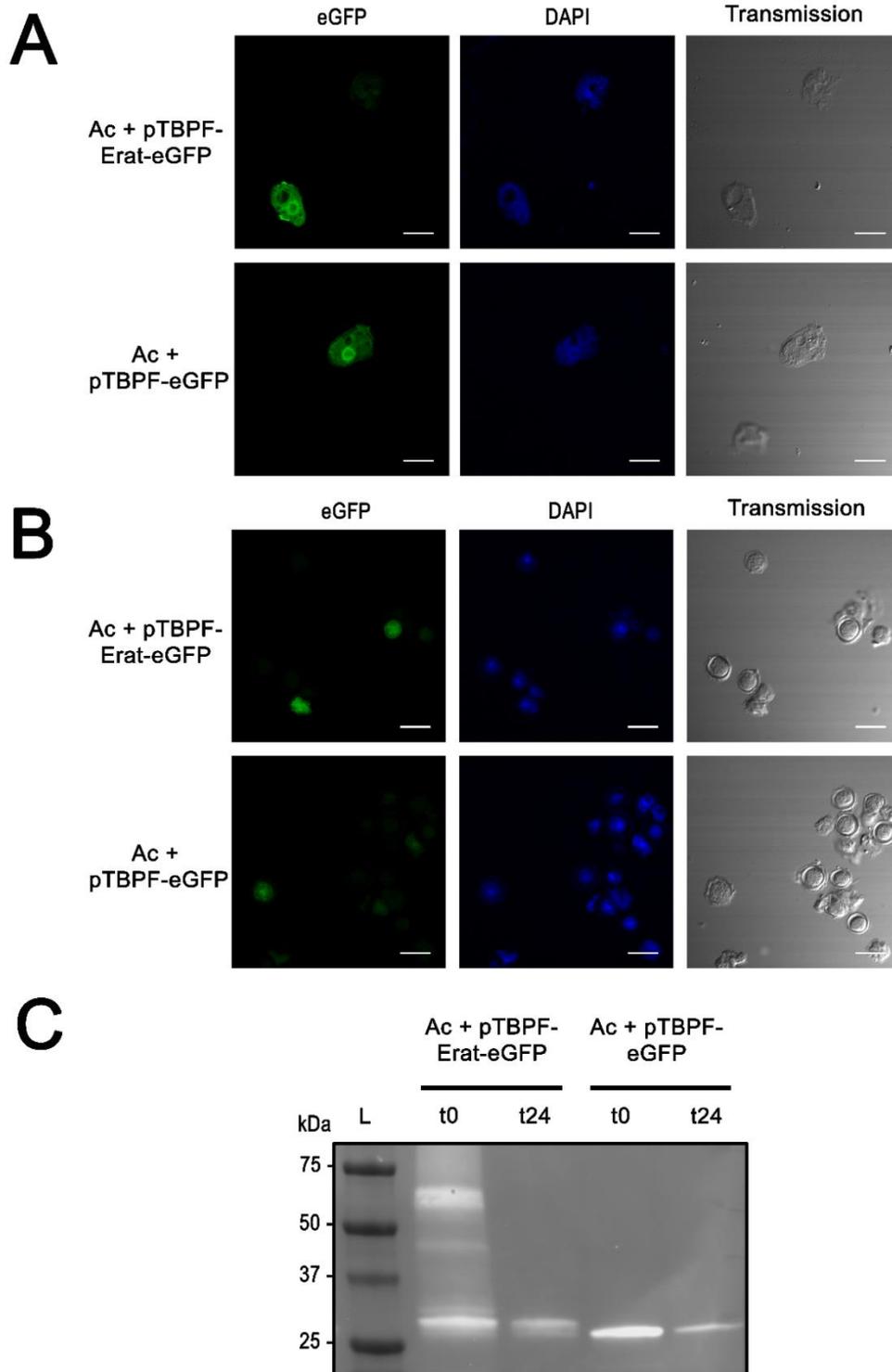


Figure 5. The Erat-eGFP fused protein is localized in both the cytoplasm and the nucleus. Confocal microscopic images of *A. castellanii* with stable transfection of pTPBF-ERAT-eGFP or pTPBF-eGFP for intracellular localization of Erat-eGFP and eGFP in trophozoite **(A)** or cyst **(B)** 24 hours after induction of encystment. Scale bar (in white) represents 15 μ m. **(C)** Western-blot results using anti-GFP antibody on cells in form trophozoite (t0) and cyst (t24). “L” corresponds to the ladder.

Discussion

The context of this study is to find new potential proteins involved in the formation of *Acanthamoeba* cysts. Erat is likely an acetyltransferase, according to the domain prediction which shows the presence of a GCN5-related N-acetyltransferase (GNAT) domain. Its expression is down-regulated early during encystment and its over-expression impairs formation of mature cysts.

GNATs is a very large family of enzymes, with more than 10,000 members, identified in all kingdoms of life (Vetting et al. 2005). The GNATs catalyse the transfer of an acetyl group from acetyl CoA to the primary amine of a large range of substrates, ranging from small molecules to macromolecules. More globally, post-translational modifications (PTM), like acetylation, are able to modulate the function of the target molecule, which can give resistance to antibiotics or to modulate gene expression by histone acetylation for example (Favrot et al. 2016). Some N-acetyltransferase have been described to be involved in encystment of other eukaryotes. In *Giardia intestinalis*, the cyst-specific carbohydrate component (67%) of the cyst wall is a unique homopolymer composed of N-acetylgalactosamine (GalNAc). Its precursors, UDP-GalNAc is synthesized by a pathway of five inducible enzymes, including one glucosamine 6-phosphate N-acetyltransferase (EC 2.3.1.4, GNA) (Timothy Macechko et al. 1992; Lopez et al. 2003). In *Toxoplasma gondii*, it has been shown that the knock-out of TgGCN5-A, a lysine acetyltransferase with an histone acetyltransferase activity, prevented the up-regulation of 74% of the stress response gene that are normally induced during alkaline stress mediated encystment. Complementation of the TgGCN5-A knock-out restored this expression and the capacity to resist alkaline stress, showing a role of a N-acetyltransferase in the encystment (Naguleswaran et al. 2010). These two examples show the diversity of the functions of GNATs members. Recently, it has been shown the presence of a DNA methylation system for gene regulation in encysting *Acanthamoeba* (Moon et al. 2017a) and the involvement of protein arginine methyltransferase 1 and 5, which could be involved in the histone modification in the nucleus (Moon et al. 2016, 2017b). The catalytic activity and the function of the Erat protein remain to be explored.

The analysis of the 15 available genomes of *Acanthamoeba* showed that *erat* is conserved in some species of *Acanthamoeba*, but is absent in the *Dictyostelium*,

Entamoeba and *Naegleria* genera. The comparison of the protein sequence with other organisms using the BLAST tool showed lots of genes present in prokaryotes, mainly to the phyla of Chlorobacteria, Cyanobacteria and Firmicutes. In the environment, amoebae are in contact with several bacteria that they graze on (de Jonckheere 1991). Due to putative gene exchanges between amoebae and intra-cellular bacteria, it was not surprising to find an *Acanthamoeba* gene with a prokaryotic origin. The study of the *Acanthamoeba* genome shows the presence of more than 450 genes, which corresponds to 2.9 % of the genome, predicted to have arisen through lateral gene transfer (Clarke et al. 2013). Among these genes, we observed at least 5 genes annotated as “acetyltransferase, GNAT superfamily protein”. Further studies should investigate importance of each acetyltransferase in *Acanthamoeba* physiology, especially in the encystment. Moreover, the genome of *A. castellanii* contains a gene annotated as “xylose isomerase domain-containing protein” that was acquired through lateral gene transfer (Clarke et al. 2013). Xylose isomerase is an enzyme which has been found to be up-regulated during encystment and its knock-down by siRNA decreases the capacity to differentiate into cyst (Aqeel et al. 2013). These data suggest that amoebae have acquired bacterial genes that can regulate encystment of the host.

The overexpression of Erat during encystment might modulate the function of a molecular target involved in encystment, and thereby could decrease the capacity to form mature cyst. The subcellular localization showed the presence of Erat-eGFP in both cytoplasm and nucleus and does not allow to hypothesize the action of this protein. Interestingly, the western-blot analysis shows that Erat-eGFP fused protein could be cleaved in trophozoïte and completely degraded during encystment. This is consistent with the fact that an important protease activity is observed during encystment (Dudley et al. 2008; Leitsch et al. 2010).

In conclusion, we describe a new gene repressed during encystment of *A. castellanii* and its overexpression prevents the formation of cyst. The putative function of the ACA1_384820 *Acanthamoeba* protein, which we propose to rename as Erat, could be an N-acetyltransferase. Further studies are needed to determine the activity of this protein, which gene could have been acquired by lateral gene transfer from prokaryotes.

Methods

Amoeba strains and cultural conditions

A. castellanii ATCC 30010 strain were grown at 30°C without shaking, in culture flask containing Peptone Yeast Glucose (PYG) medium (2 % proteose peptone, 0.1 % yeast extract, 0.1 M glucose, 4 mM MgSO₄, 0.4 mM CaCl₂, 0.1 % sodium citrate dehydrate, 0.05 mM Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ 6H₂O, 2.5 mM NaH₂PO₃, 2.5 mM K₂HPO₃, pH 6.5). For the transfected cells, G418 (Geneticin) was used at 50 µg/mL of PYG medium to maintain selection.

For the growth assay, *A. castellanii* trophozoites were seeded onto 24-well plates at a density of 5 x 10⁴ cells per well in 1 ml of Page's Amoeba Saline solution (PAS) (4 mM MgSO₄, 0.4 mM CaCl₂, 0.1 % sodium citrate dehydrate, 0.05 mM Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ 6H₂O, 2.5 mM NaH₂PO₃, 2.5 mM K₂HPO₃, pH 6.5) and incubate at 30°C during 1 hour for cell adhesion. Then, PAS buffer was replaced by PYG growth medium (correspond to time 0) and incubate at 30°C. Cells were harvested at 2 h, 24 h, 48 h and 72 h and counted using plastic counting slides FastRead 102® (Biosigma). All samples were counted three times and in three independent experiments.

Encystment assay

A. castellanii transfected and non-transfected trophozoites were seeded onto 24-well plates at a density of 5x 10⁴ cells per well in PAS buffer and incubated at 30°C during 1 hour for cell adhesion. Medium was replaced by encystation media (0.1 M KCl, 8 mM MgSO₄, 0.4 mM CaCl₂, 1 mM NaHCO₃ and 20 mM 2-amino-2-methyl-1,3-propanediol, pH 8.8) and incubated at 30°C (corresponding to time 0) up to 72 hours. At 24 h, 48 h, and 72 h, calcofluor white, a dye that binds to cellulose, was added into the wells following the manufacturer's recommendations. The cysts were observed in fluorescence microscopy (Olympus IX51). More than 800 cells were counted per condition and per experiment. This experiment was done in three independent replicates.

Plasmid constructions and cloning

The *ACA1_384820* coding sequence from *A. castellanii* was amplified by PCR from total cDNA with flanking NdeI and XhoI restriction sites, using primers Erat_Fwd_NdeI and Erat_Rev_XhoI (**Table1**). PCR fragments were cloned into the NdeI/XhoI sites of the expression plasmid pTPBF-eGFP (Bateman 2010). For the pTPBF-Erat-eGFP, PCR fragments amplified using primers Erat_Fwd_NdeI and Erat-eGFP_Rev_NdeI were cloned into the NdeI sites of the expression plasmid pTPBF-eGFP. For the pTPBF-empty, pTPBF-eGFP was digested by NdeI and XhoI (NEB), and the sticky 5'-overhangings ends of the vector was filled using DNA Polymerase I Large (Klenow) Fragment (Promega) and ligated (T4 DNA Ligase, Promega) following producer's recommendations.

All plasmids constructs were transferred in chemically-competent *Escherichia coli* DH5 α and validated by SANGER sequencing. DNA sequencing was completed with the ABI Prism BigDye terminator v3.1 sequencing kit (Applied Biosystems) and then analysed by an automatic ABI Prism 3730 genetic analyser (Applied Biosystems).

Transfection of cells

A. castellanii trophozoites were seeded into 24-well plates at a density of 1.25×10^5 cells per well in 125 μ L of encystation medium. The Viafect™ transfection reagent (Promega) was used to transfect plasmid into *A. castellanii*. One μ g of plasmid vectors was incubated with the transfection reagent at a ratio of 5:1 (transfection reagent [μ l]/plasmid [μ g]) in 150 μ L of encystation medium and incubate 15 min at room temperature. Transfection medium was added directly on wells and incubated 3 h at 30°C without shaking, before addition of 750 μ L of PYG medium. After incubation of 24 h, the well content was transferred into a culture flask containing PYG medium supplemented with 20 μ g/mL of G418 (Sigma) for two weeks. The concentration of G418 was increased to 50 μ g/mL to select transfected population.

Five days after the increase of G418, cell viability was tested using Trypan Blue (TB) and propidium iodide (PI). For TB experiment, the cells were diluted in 2X Trypan Blue and counted in triplicate for each condition using plastic counting slides FastRead 102® (Biosigma). For PI experiment, the cells were incubated with propidium iodide and analysed by flow cytometry (Cytotflex, Beckman Coulter). This experiment was done in three independent replicates.

RNA extraction and reverse transcription – quantitative PCR (RT-qPCR)

Total RNAs was extracted using the RNeasy Mini Kit (Qiagen). The RNA samples were treated with RNase-free DNase I (Turbo DNA-free kit, Invitrogen) and reverse transcribed with the Goscript reverse transcriptase kit (Promega) according to the manufacturer's recommendation. The reverse transcription products were used to carry out real-time quantitative PCR. All primer sequences are shown in **Table 1**. Quantitative RT-PCR was carried out using the LightCycler FastStart DNA Master plus SYBR Green I (Roche Applied Science). Reactions were prepared in a total volume of 20 µl containing 10 µl of 2X SYBR mix, 6 µl of ddH₂O, 2 µl of diluted cDNA template, and 2 µl of 10 µM primers.

The reactions were performed under the following conditions: an initial denaturation step of 95°C for 5 min, followed by a three-step thermal cycling profile of denaturation at 95°C for 10 s, primer annealing at 60°C for 10 s, and extension at 72°C for 10 s. This procedure was conducted for 45 cycles. To verify the specificity of the amplicon for each primer pair, a melting curve analysis was performed ranging from 65°C to 95°C.

The relative quantification method ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) was used to evaluate quantitative variation between replicates (Livak and Schmittgen 2001). The transcripts expression levels of *ACA1_384820* and cellulose synthase genes were normalized towards *TPBF* gene. Three technical replicates were performed for each sample to ensure the accuracy of the results.

Localization of protein

A. castellanii trophozoites expressing eGFP or Erat-eGFP were seeded on sterilized coverslips (15 mm of diameter) at a density of 2×10^5 cells per well in 12 well plate in 1 mL of PAS buffer. After 1 h of adhesion at 30°C, the buffer was removed and replaced by encystation medium. The cells were fixed at the indicated time with PBS supplemented with 4% of paraformaldehyde for 15 minutes and washed two times with PBS. The coverslips containing cells were stained with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) and mounted with VECTASHIELD® Vibrance™ antifade mounting medium. The samples were examined with a laser scanning confocal microscope (Olympus FV1000, Japan). 405nm diode and 488nm HeNe laser was used for excitation of DAPI and eGFP, respectively. Emission of fluorescence was recorded

sequentially through spectral detection channels between 425-475nm and 500-600 nm for blue and green fluorescence emission. 800x800 pixels images were acquired with UPLAPO 60X OSC NA:1.40 objective lens. Numerical zooming (2x) to 0.13 μ m pixel size was done in respect to oversampling Nyquist criteria.

Western-Blot

For protein analysis, a quantity of 2×10^5 amoebae was lysed with 2X Laemmli buffer (Laemmli 1970). Prior to running the samples on a polyacrylamide gel, they were sonicated to disrupt DNA and boiled at 95°C for 5 min. Gels were transferred using a Trans-Blot Turbo transfer system (Bio-rad), blocked in 5% Bovine Serum Albumin (BSA) for 1 hour at room temperature (RT), incubated with primary antibody (anti-GFP, ref A-6455, ThermoFischer) for 1 h at RT, washed with 0.1 % Tween in 1X TBS three times (each wash for 5 min), and incubated for an hour at RT with fluorescent secondary antibody (StarBright Blue 700 Goat IgG, Bio-rad). Blots were washed three times with 0.1% Tween in 1X TBS and revealed by fluorescence on ChemiDoc MP (Bio-rad).

Bioinformatics analysis of the *ACA1_384820* gene

The phylogenetic positioning of the *ACA1_384820* gene was determined using homologous genes selected by BLASTp search against the NCBI nr database. Only genes with E-value < 1e-10 were selected. Multiple alignments were performed with MUSCLE (Edgar 2004). Through IQ-TREE (Nguyen et al. 2015), the best-fitting substitution model was identified according to the BIC criterion using ModelFinder (Kalyaanamoorthy et al. 2017). The maximum likelihood (ML) estimation of the phylogenetic tree was performed assessing branch supports with ultrafast bootstrap approximations (1,000 iterations) and single branch tests (1,000 bootstrap replicates). The phylogenetic tree was drawn using FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Table 1: Primers used for RT-qPCR and plasmid constructions. “Fwd” for forward primer and “Rev” for reverse primer. The restriction site added was underlined.

Name of primer	Sequence 5' -> 3'	use	Source
qErat_Fwd	TTTCGCCCAGAAGCCCAGAG	RT-qPCR	This study
qErat_Rev	TCGTTTCAGGTGGCGTAGCAG	RT-qPCR	This study
TBPF_Fwd	GCCGGACAAGAAGCGAAGGAAG	RT-qPCR	This study
TBPF_Rev	GTCGGTGAAGTAGACGCGGAAG	RT-qPCR	This study
Ac18S_Fwd	TCCAATTTTCTGCCACCGAA	RT-qPCR	Moon et al., 2009
Ac18S_Rev	ATCATTACCTAGTCCTCGC	RT-qPCR	Moon et al., 2009
Erat_Fwd_Ndel	TTTTTTCATATGGACTGCACAACAGAC	Cloning	This study
Erat_Rev_XhoI	TTTTTTCCTCGAGTCAACTGGGTGCCGC	Cloning	This study
Erat-GFP_Rev2_Ndel	TTTTTTCATATGACTGGGTGCCGC	Cloning	This study

Acknowledgements

This work has benefited from the facilities and expertise of ImageUP platform (Université de Poitiers). We thank Anne Cantereau (STIM-ERL 7368 CNRS, Université de Poitiers) for her help on analysis in microscopy. We thank as well Marie-Laure Mollichella for her help with cytometer analysis. We gratefully acknowledge Dr. Hong Yeonchul for providing the pTPBF-eGFP plasmid. We thank Nathalie Thiriet (LNEC, INSERM U1084, Université de Poitiers) for the gift of anti-GFP antibody.

Conflict of interest

The authors declare no competing or financial interests.

Funding

This work was partly supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-17-CE13-00001-01 “Amocyst”) and by the region Nouvelle Aquitaine and Europe through the Habisan CPER-FEDER program.

References

- Anwar A, Khan NA, Siddiqui R (2018) Combating *Acanthamoeba* spp. cysts: What are the options? *Parasites and Vectors* 11:4–6
- Aqeel Y, Siddiqui R, Khan NA (2013) Silencing of xylose isomerase and cellulose synthase by siRNA inhibits encystation in *Acanthamoeba castellanii*. *Parasitol Res* 112:1221–1227
- Aurrecochea C, Barreto A, Brestelli J, Brunk BP, Caler E V, Fischer S, Gajria B, Gao X, Gingle A, Grant G, Harb OS, Heiges M, Iodice J, Kissinger JC, Kraemer ET, Li W, Nayak V, Pennington C, Pinney DF, Pitts B, Roos DS, Srinivasamoorthy G, Stoeckert CJ, Treatman C, Wang H (2011) AmoebaDB and MicrosporidiaDB: functional genomic resources for Amoebozoa and Microsporidia species. *Nucleic Acids Res* 39:D612–D619
- Bateman E (2010) Expression plasmids and production of EGFP in stably transfected *Acanthamoeba*. *Protein Expr Purif* 70:95–100
- Chawla A, Armstrong M, Carley F (2014) *Acanthamoeba* keratitis-An increasing incidence. *Contact Lens Anterior Eye* 37:120
- Chelkha N, Levasseur A, Pontarotti P, Raoult D, Scola B La, Colson P (2018) A phylogenomic study of *Acanthamoeba polyphaga* draft genome sequences suggests genetic exchanges with giant viruses. *Front Microbiol* 9:1–14
- Clarke M, Lohan AJ, Liu B, Lagkouvardos I, Roy S, Zafar N, Bertelli C, Schilde C, Kianianmomeni A, Bürglin TR, Frech C, Turcotte B, Kopec KO, Synnott JM, Choo C, Paponov I, Finkler A, Heng Tan CS, Hutchins AP, Weinmeier T, Rattei T, Chu JSC, Gimenez G, Irimia M, Rigden DJ, Fitzpatrick DA, Lorenzo-Morales J, Bateman A, Chiu CH, Tang P, Hegemann P, Fromm H, Raoult D, Greub G, Miranda-Saavedra D, Chen N, Nash P, Ginger ML, Horn M, Schaap P, Caler L, Loftus BJ (2013) Genome of *Acanthamoeba castellanii* highlights extensive lateral gene transfer and early evolution of tyrosine kinase signaling. *Genome Biol* 14:R11
- Dudley R, Alsam S, Khan NA (2008) The role of proteases in the differentiation of *Acanthamoeba castellanii*. *FEMS Microbiol Lett* 286:9–15

- Edgar RC (2004) MUSCLE: A multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* 5:1–19
- Favrot L, Blanchard JS, Vergnolle O (2016) Bacterial GCN5-related N-Acetyltransferases: from resistance to regulation. *Biochemistry* 55:989–1002
- Fouque E, Trouilhé M-C, Thomas V, Hartemann P, Rodier M-H, Héchard Y (2012) Cellular, biochemical, and molecular changes during encystment of free-living amoebae. *Eukaryot Cell* 11:382–387
- Garajová M, Mrva M, Vaškovicová N, Martinka M, Melicherová J, Valigurová A (2019) Cellulose fibrils formation and organisation of cytoskeleton during encystment are essential for *Acanthamoeba* cyst wall architecture. *Sci Rep* 9:4466
- Greub G, Raoult D (2004) Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin Microbiol Rev* 17:413–33
- De Jonckheere JF (1991) Ecology of *Acanthamoeba*. *Rev Infect Dis* 13:S385–S387
- Kalyaanamoorthy S, Minh BQ, Wong TKF, von Haeseler A, Jermini LS (2017) ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nat Methods* 14:587–589
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–5
- Leitsch D, Köhler M, Marchetti-Deschmann M, Deutsch A, Allmaier G, König L, Sixt BS, Duchêne M, Walochnik J (2010) Proteomic aspects of *Parachlamydia acanthamoebae* infection in *Acanthamoeba* spp. *ISME J* 4:1366–1374
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25:402–408
- Lloyd D (2014) Encystment in *Acanthamoeba castellanii*: A review. *Exp Parasitol* 145:S20–S27
- Lopez AB, Sener K, Jarroll EL, van Keulen H (2003) Transcription regulation is demonstrated for five key enzymes in *Giardia intestinalis* cyst wall polysaccharide biosynthesis. *Mol Biochem Parasitol* 128:51–57

- Lorenzo-Morales J, Kliescikova J, Martinez-Carretero E, De Pablos LM, Profotova B, Nohynkova E, Osuna A, Valladares B (2008) Glycogen phosphorylase in *Acanthamoeba* spp.: Determining the role of the enzyme during the encystment process using RNA interference. *Eukaryot Cell* 7:509–517
- Magistrado-Coxen P, Aqeel Y, Lopez A, Haserick JR, Urbanowicz BR, Costello CE, Samuelson J (2019) The most abundant cyst wall proteins of *Acanthamoeba castellanii* are lectins that bind cellulose and localize to distinct structures in developing and mature cyst walls. *PLoS Negl Trop Dis* 13:e0007352
- Marciano-Cabral F, Cabral G (2003) *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin Microbiol Rev* 16:273–307
- Martinez AJ, Visvesvaraz GS (1997) Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. *Brain Pathol* 583–598
- Mazur T., Hadas E., Iwanicka I. (1995) The duration of the cyst stage and the viability and virulence of *Acanthamoeba* isolates. *Trop Med Parasitol* 46:102–108
- Moon E-KK, Kim S-HH, Hong Y, Chung D-I II, Goo Y-KK, Kong H-HH (2015) Autophagy Inhibitors as a Potential Antiamoebic Treatment for *Acanthamoeba* Keratitis. *Antimicrob Agents Chemother* 59:4020–4025
- Moon E, Hong Y, Chung D, Goo Y, Kong H (2016) Identification of protein arginine methyltransferase 5 as a regulator for encystation of *Acanthamoeba*. *Korean J Parasitol* 54:133–138
- Moon EK, Chung D II, Hong Y, Kong HH (2011) Atg3-mediated lipidation of atg8 is involved in encystation of *Acanthamoeba*. *Korean J Parasitol* 49:103–108
- Moon EK, Chung D II, Hong YC, Kong HH (2009) Autophagy protein 8 mediating autophagosome in encysting *Acanthamoeba*. *Mol Biochem Parasitol* 168:43–48
- Moon EK, Hong Y, Chung D II, Goo YK, Kong HH (2014) Down-regulation of cellulose synthase inhibits the formation of endocysts in *Acanthamoeba*. *Korean J Parasitol* 52:131–135
- Moon EK, Hong Y, Chung D II, Kong HH (2013) Identification of Atg8 isoform in encysting *Acanthamoeba*. *Korean J Parasitol* 51:497–502

- Moon EK, Hong Y, Lee HA, Quan FS, Kong HH (2017a) DNA methylation of gene expression in *Acanthamoeba castellanii* encystation. *Korean J Parasitol* 55:115–120
- Moon EK, Kong HH, Hong Y, Lee HA, Quan FS (2017b) Identification and characterization of protein arginine methyltransferase 1 in *Acanthamoeba castellanii*. *Korean J Parasitol* 55:109–114
- Naguleswaran A, Elias E V., McClintick J, Edenberg HJ, Sullivan WJ (2010) *Toxoplasma gondii* lysine acetyltransferase GCN5-A functions in the cellular response to alkaline stress and expression of cyst genes. *PLoS Pathog* 6:e1001232
- Nguyen L-T, Schmidt HA, von Haeseler A, Minh BQ (2015) IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol Biol Evol* 32:268–274
- Rodríguez-Zaragoza S (1994) Ecology of free-living amoebae. *Crit Rev Microbiol* 20:225–241
- Seibel NM, Eljouni J, Nalaskowski MM, Hampe W (2007) Nuclear localization of enhanced green fluorescent protein homomultimers. *Anal Biochem* 368:95–99
- Song SM, Han BI, Moon EK, Lee YR, Yu HS, Jha BK, Danne DBS, Kong HH, Chung D II, Hong Y (2012) Autophagy protein 16-mediated autophagy is required for the encystation of *Acanthamoeba castellanii*. *Mol Biochem Parasitol* 183:158–165
- Thomas V, McDonnell G, Denyer SP, Maillard JY (2010) Free-living amoebae and their intracellular pathogenic microorganisms: Risks for water quality. *FEMS Microbiol Rev* 34:231–259
- Timothy Macechko P, Steimle PA, Lindmark DG, Erlandsen SL, Jarroll EL (1992) Galactosamine-synthesizing enzymes are induced when *Giardia* encyst. *Mol Biochem Parasitol* 56:301–309
- Vetting MW, Luiz LP, Yu M, Hegde SS, Magnet S, Roderick SL, Blanchard JS (2005) Structure and functions of the GNAT superfamily of acetyltransferases. *Arch Biochem Biophys* 433:212–226

6. Discussion

6.1. La protéine NECAP2

Une des protéines choisies dans cette étude est la protéine NECAP2 (Adaptin earbinding coat-associated protein 2 isoform2, putative). Des homologues de cette protéine chez les cellules de mammifères ont déjà été décrits dans la littérature, et constituent une famille de protéines (NECAPs) identifiée sur des vésicules recouvertes de clathrine (Wasiak et al. 2002; Ritter et al. 2003; Blondeau et al. 2004). Les deux membres de la famille NECAP partagent une grande similitude de séquence et de structure, et présentent un domaine « Pleckstrin Homology (PH)-like » en position N-terminale qui permet l'interaction avec des protéines (Ritter et al. 2007). De plus, un motif peptidique est retrouvé en position C-terminale, ce qui permet l'interaction avec les complexes adaptateurs de la clathrine : AP-1 et AP-2 (Ritter et al. 2004). NECAP1 est impliquée dans l'endocytose dépendante de la clathrine et coopère avec la protéine adaptatrice AP-2 (Ritter et al. 2013). De plus, NECAP1 est également impliquée dans la modulation de la taille et le nombre de structures de l'endocytose (Ritter et al. 2013). La protéine NECAP2 est impliquée dans le recrutement de la protéine adaptatrice AP-1 au niveau des endosomes précoces lors du recyclage de récepteurs membranaires (Ritter et al. 2013; Chamberland et al. 2016).

L. pneumophila est connue pour réguler le trafic vésiculaire (Kagan and Roy 2002; Ku et al. 2012; Finsel et al. 2013; Weber and Faris 2018). De ce fait, moduler les processus d'endocytose ou de recyclage des récepteurs à la membrane pourrait permettre à cette bactérie de mieux infecter ses hôtes. Dans nos expériences d'infection, l'expression du gène *necap2* reste similaire à la condition « amibes non infectées » jusqu'à 48 heures d'infection, bien qu'une faible diminution puisse être observée à 4 heures d'infection. La diminution observée dans le premier protéome aurait pu s'expliquer par un mécanisme de dégradation des protéines, cependant, le deuxième protéome ne montre pas de modification de la quantité de cette protéine.

Les vertébrés codent deux formes relativement proches (NECAP1 et NECAP2) tandis que la plupart des invertébrés et des champignons codent pour une seule forme (Manna et al. 2015; Dergai et al. 2016). Cependant, la fonction de la protéine sous forme unique dans un organisme n'est pas décrite. D'ailleurs, chez *A. castellanii*, seule une forme a été détectée. Afin de caractériser sa fonction, il serait dans un premier temps intéressant de voir si les fonctions décrites chez les protéines de mammifères

NECAP1 et NECAP2 sont retrouvées chez celle-ci. Par exemple, la capacité de NECAP2 à interagir avec les protéines adaptatrices AP-1 et AP-2 (GST-pull down, co-immunoprecipitation...), son influence de cette protéine sur les endosomes (Microscopie à fluorescence) ou l'étude de l'endocytose médié par la clathrine. Cependant, l'impact de la surexpression de cette protéine dans la physiologie et lors de l'infection par *L. pneumophila* n'a pas pu être vérifié puisque les cellules obtenues après transfection n'étaient pas viables. De manière intéressante, en présence d'antibiotique de sélection, certaines cellules ont adhéré au fond de la flasque contrairement aux amibes non transfectées, mais cela n'était pas suffisant pour permettre de générer une population amibienne surexprimant NECAP2. Ces résultats suggèrent que la surexpression de la protéine inhibe la croissance de l'amibe ou est toxique pour cette dernière. De plus, bien que les données n'aient pas été publiées, Chamberland *et al.*, ont observé que la surexpression de NECAP2 induisait une mauvaise localisation des protéines se liant à NECAP-2, incluant la protéine AP-1 (Chamberland *et al.* 2016). La surexpression de NECAP-2 pourrait induire un dérèglement trop important pour la cellule et donc bloquer sa prolifération ou induire sa mort. Afin de confirmer cela, il aurait été intéressant de marquer des protéines pouvant se lier à NECAP2 et regarder en microscopie à fluorescence leur localisation. De plus, la vérification de la présence du plasmide dans les cellules adhérentes après transfection aurait renforcé l'hypothèse que la surexpression est bien toxique pour l'amibe. Finalement, une approche par sous-expression du gène avec des ARN interférents aurait permis une meilleure étude de ce gène.

6.2. La protéine CBS1

L'analyse protéomique a permis d'identifier quatre protéines contenant un domaine CBS. Ces protéines correspondent à ACA1_232430 (annotée CBS1), ACA1_325450 (annotée CBS2), ACA1_067770 et ACA1_015330. Elles possèdent toutes une séquence protéique de longueur similaire avec respectivement 308, 319, 302 et 307 acides aminés. La prédiction de domaines montre la présence de quatre domaines CBS répartis sur toute la séquence de la protéine. Les domaines CBS ou « cystathionine beta synthase » sont composés d'environ 60 acides aminés et sont retrouvés par deux ou par quatre sur des protéines qui peuvent présenter d'autres domaines sur leur séquence. Ils sont retrouvés à la fois chez les protéines procaryotes et eucaryotes (Ignoul and Eggermont 2005). Ces domaines peuvent se lier à des

nucléotides, principalement l'adénosine monophosphate (AMP), et vont former des modules senseurs d'énergie qui peuvent réguler l'activité de protéines qui leurs sont associées (Baykov et al. 2011; Ereño-Orbea et al. 2013). Le rôle des protéines qui présentent ces domaines reste mal compris et peu étudié, mais certaines sont à l'origine de maladies héréditaires chez l'Homme suggérant l'importance de ce type de protéines.

Afin d'étudier le rôle de ces protéines dans la physiologie d'*A. castellanii* et en interaction avec *L. pneumophila*, deux d'entre elles ont été sélectionnées (CBS1 et CBS2) du fait que leur quantité semblait être diminuée à la fois à 24 et 48 heures d'infection (protéome 1). Cependant, seule la protéine CBS1 a finalement été étudiée puisque des soucis au cours de l'amplification de la séquence codante de CBS2 ont été rencontrés et n'ont pas permis de construire le plasmide d'expression.

D'après nos résultats, la surexpression de CBS1 dans *A. castellanii* n'affecte pas la croissance intracellulaire de *L. pneumophila*. De plus, elle n'affecte pas non plus la croissance des amibes, la production d'ATP, le processus d'endocytose et le processus d'enkystement. Au cours de l'infection, le niveau des transcrits diminue d'environ deux fois après 4 et 8 heures d'infection mais reste similaire à la condition « non infectée » aux autres temps testés. Au cours du processus d'enkystement, le gène est réprimé de deux fois après 2 heures, mais cette répression n'est pas maintenue aux autres temps étudiés.

Notre étude n'a pas permis de montrer un rôle putatif de la protéine CBS1 dans la physiologie de l'amibe ou lors de l'interaction avec *L. pneumophila*. Le deuxième protéome ne montre pas de diminution de la quantité de cette protéine au cours de l'infection. Sachant qu'aucun homologue de cette protéine n'a été décrit dans la littérature, il est difficile d'envisager de nouvelles expériences pour déterminer le rôle de cette protéine, à moins de cibler d'autres processus biologiques ou de voir l'effet de la sous-expression du gène par l'intermédiaire des ARN interférents par exemple.

6.3. La protéine OSF

La protéine OSF pour "facteur stimulant les ostéoclastes" (*osteoclast-stimulating factor*, putative) est une protéine putative prédite pour posséder un domaine composé de répétitions ankyrines. Ces répétitions sont retrouvées principalement chez les protéines eucaryotes, mais sont également retrouvées chez certaines bactéries pathogènes comme *L. pneumophila*, *Coxiella burnetii* ou *Anaplasma phagocytophilum* (Habyarimana et al. 2008; Al-Khodori et al. 2010; Richards et al. 2013). Ces répétitions ankyrines vont réguler les interactions entre protéines impliquées dans de nombreux processus cellulaires comme la mobilité cellulaire, la signalisation cellulaire, la division, la régulation de la transcription ou encore l'oncogénèse (Batchelor et al. 1998; Michel et al. 2001; Amstutz et al. 2005). Certains effecteurs de *L. pneumophila* présentent des répétitions ankyrines incluant les effecteurs AnkB, AnkH et AnkJ qui sont nécessaires lors de l'infection chez les macrophages, ou chez les amibes (Al-Khodori et al. 2008; Habyarimana et al. 2008).

Le premier protéome montre que la quantité de cette protéine est diminuée après 24 heures d'infection, ce qui n'est pas confirmé par le second protéome puisqu'à l'inverse, une augmentation est observée. De plus, cette augmentation est également retrouvée en comparaison avec la condition où *A. castellanii* est infectée avec le mutant $\Delta dotA$, suggérant que cette augmentation pourrait être causée par un effecteur du SST4-B Dot/Icm. Par conséquent, il serait intéressant d'étudier les effecteurs de *L. pneumophila* qui présentent ce type de domaines afin de faire un éventuel lien entre cette protéine de l'hôte et les effecteurs.

La protéine OSTF1 humaine (initialement décrite comme SH3P2) présente un domaine SH3 en plus des répétitions ankyrines (Tong et al. 2009). Cette protéine a initialement été décrite dans l'activation des ostéoclastes et la résorption osseuse régulée par ces ostéoclastes (Reddy et al. 1998). Les ostéoclastes sont des macrophages multi-nucléés présents dans le tissu osseux, qui vont avoir un rôle important dans le remodelage du tissu osseux. La surexpression de OSTF1 dans des cellules HeLa inhibe la mobilité cellulaire et induit un changement morphologique des cellules, comme un arrondissement et une taille plus petite que les cellules contrôles (Tanimura et al. 2011). Dans nos expériences, la surexpression d'OSF chez *A. castellanii* n'a pas induit de changement morphologique des cellules après observation en microscopie photonique. De plus, cela n'affecte pas non plus l'endocytose, la

croissance des amibes, la production d'ATP ou encore le processus d'enkystement. Enfin, le gène associé semble réprimé après 24 heures d'enkystement.

Lors de l'interaction avec *L. pneumophila*, la surexpression d'OSF n'a pas modifié la croissance intracellulaire de la bactérie. Le suivi de l'expression du gène dans des amibes non transfectées montre une diminution d'un facteur deux après 4 heures d'infection, mais est similaire à la condition « non infectée » pour les autres temps testés. Cette étude n'a pas permis de mettre en évidence un rôle pour cette protéine dans la physiologie de l'amibe ou lors de l'infection, cependant, l'approche inverse, consistant à inhiber l'expression du gène (RNA interférents) pourrait apporter de nouvelles informations sur cette protéine.

6.4. La protéine Erat

La protéine ACA1_384820 annotée comme « uncharacterized protein » a été renommée Erat (pour encystment-repressed N-Acetyltransferase-like). L'étude de cette protéine dans le processus d'enkystement a été soumise dans le journal scientifique « Protist ». Le gène code pour une N-acetyltransferase-like de la famille des GNATs et a une origine potentielle procaryote. Le gène codant cette protéine est très rapidement et fortement réprimé au cours de l'enkystement, suggérant un rôle dans ce processus. De manière intéressante, la surexpression de cette protéine dans *A. castellanii* perturbe le processus d'enkystement, puisque moins de kystes sont formés. Cependant, sa cible moléculaire reste à caractériser afin de mieux comprendre comment cette protéine inhibe l'enkystement.

Initialement, cette protéine a été choisie pour plusieurs raisons. Premièrement, c'est une protéine dont la quantité est diminuée à 48 heures dans le premier protéome, et cette diminution a également été retrouvée dans le second protéome. Deuxièmement, une origine potentielle procaryote lui a été prédite lors de l'annotation du génome d'*A. castellanii* (Clarke et al. 2013). Enfin, lors de l'annotation du génome d'*A. castellanii*, une expérience de suivi de la transcription de ce gène lors de l'infection par *L. pneumophila* avait été réalisé et montrait une forte expression du gène en début d'infection (Clarke et al. 2013). Cette surexpression a également été retrouvée par RT-qPCR avec une augmentation de l'expression de ce gène à 2 et 4 heures d'infection. Cependant, lorsque l'on surexprime cette protéine dans *A. castellanii*, cela n'affecte pas la croissance intracellulaire de *L. pneumophila*. Les résultats précédents montrant une surexpression du gène, avec une diminution de la quantité de cette protéine dans

le cas de nos protéomes, suggèrent l'implication d'un mécanisme de régulation en réponse à l'infection. Cela peut s'expliquer par une dégradation de la protéine au cours de l'infection, mais également par une inhibition de la traduction des protéines de l'hôte, cette dernière étant décrite comme un processus utilisé par *L. pneumophila* pour mieux se répliquer dans ses hôtes (Belyi et al. 2006, 2008; Fontana et al. 2011; Hempstead and Isberg 2015; Moss et al. 2019).

La famille des GNATs regroupant de nombreuses protéines présentant un domaine N-acétyltransferase, il est difficile à l'heure actuelle de trouver une fonction de cette protéine sans connaître sa ou ses potentielles cibles. Ainsi, des expériences menant à la caractérisation de la cible d' Erat, par exemple par double-hybride ou par co-immunoprecipitation, permettraient de mieux comprendre le rôle de cette protéine dans la physiologie de l'amibe, dont l'enkystement, et également dans le processus d'infection. De plus, l'utilisation de protéines taguées, afin de suivre par microscopie le devenir de cette protéine au cours de l'infection pourrait être un moyen de montrer un potentiel recrutement de cette protéine à la VCL.

6.5. La protéine GPR

Afin de pouvoir répondre à un stress environnemental, et ainsi mieux survivre, les organismes vivants ont développé des réponses cellulaires spécifiques, par exemple une signalisation par les protéines G hétérotrimérique. C'est un système conservé chez les eucaryotes qui permet la réception et la transmission de signaux, et implique trois composants : un récepteur couplé à des protéines G (GPCR), des protéines G hétérotrimériques et des effecteurs (Li et al. 2007; Oldham and Hamm 2008). Le mécanisme simplifié comprend une reconnaissance du ligand par le GPCR, induisant un changement de conformation de ce récepteur et une activation des protéines G associées. Ces dernières vont par la suite activer des protéines effectrices conduisant à une signalisation au sein de la cellule.

Les GPCR forment une large famille de récepteurs membranaires. Cette famille est caractérisée par la présence d'un domaine composé de sept hélices trans-membranaires. Cette famille est divisée en 6 sous-familles (Bockaert and Pin 1999; Fredriksson and Schiöth 2005). Le génome d'*A. castellanii* Neff code 35 GPCRs ce qui représente 4 des 6 grandes familles des GPCR décrites chez les mammifères. Pour comparaison, le génome de *D. discoideum* code 61 GPCR. La protéine GPR qui a été étudiée, correspond à une GPCR putative. Des homologues sont retrouvés chez

d'autres eucaryotes, et de manière intéressante, l'analyse BLASTp montre une homologie avec la protéine GPR107 humaine et la protéine GPR108 murine. Des études ont montré que la protéine GPR107 était nécessaire pour l'internalisation de l'exotoxine A de *Pseudomonas aeruginosa* (Tafesse et al. 2014). Cet exotoxine A est toxique pour la cellule hôte par l'intermédiaire de son activité ADP-ribosyltransférase qui va bloquer la synthèse des protéines et va ainsi conduire à la mort cellulaire (Weldon and Pastan 2011). *L. pneumophila* n'est pas décrite pour produire une exotoxine. Toutefois, des effecteurs du SST4-B Dot/lcm, comme LegK4, SidL, Lgt1, Lgt2 ou Lgt3 sont décrits pour induire une inhibition de la traduction (Belyi et al. 2006, 2008; Shen et al. 2009; Moss et al. 2019).

L'homologue humain GPR107 est une protéine impliquée dans le transport rétrograde des vésicules et est localisée dans le trans-Golgi (Tafesse et al. 2014). La formation de la vacuole répllicative lors de l'infection par *L. pneumophila* nécessite une régulation du trafic vésiculaire et notamment du transport rétrograde (Finsel et al. 2013; Bärlocher et al. 2017). Ainsi, en ciblant cette GPCR, *L. pneumophila* pourrait favoriser son cycle infectieux chez son hôte. Dans le premier protéome, la quantité de la protéine GPR est diminuée à 24 et 48 heures d'infection, ce qui est confirmé par le second protéome puisqu'une diminution est observée à 48 heures d'infection. De plus, ce second protéome suggère la potentielle implication d'un ou plusieurs effecteurs du SST4-B Dot/lcm. Le suivi de l'expression de ce gène au cours de l'infection montre une surexpression (>2fois) après 8 heures d'infection. La divergence entre la surexpression du gène et la quantité protéique qui diminue, suggère une régulation au niveau de la traduction de la protéine, comme pour la protéine Erat précédemment décrite. La surexpression de la protéine dans *A. castellanii* ne modifie pas la croissance intracellulaire de *L. pneumophila* dans les conditions utilisées. L'implication de GPCR lors de l'infection par *L. pneumophila* est peu décrite. Chez *D. discoideum*, la GPCR RpkA montre un rôle dans la phagocytose et la défense anti-microbienne. En effet, la mutation de ce gène entraîne une susceptibilité plus importante à l'infection par *L. pneumophila* (Riyahi et al. 2011).

La surexpression de la protéine GPR chez *A. castellanii* a montré une inhibition partielle du processus d'enkystement. Cependant, dans des amibes non transfectées, le gène *gpr* est réprimé au début du processus d'enkystement, à 2 et 4 heures après induction. Aucun effet de la surexpression n'est observé lors de la croissance des

amibes, sur la production d'ATP ou au cours de l'endocytose. Les protéines GPCR étant au cœur de la signalisation cellulaire, il ne serait pas étonnant que la surexpression induise un changement de la physiologie des amibes.

Chapitre 6 :

Discussion générale

La réponse de l'amibe *A. castellanii* à l'infection par la bactérie *L. pneumophila* reste peu étudiée. C'est dans ce contexte, qu'un protéome a été réalisé et a servi de point de départ à ces travaux de thèse. Le but était de sélectionner des protéines de l'hôte et de les étudier afin de déterminer leurs rôles lors dans la physiologie de l'amibe ainsi que lors de l'infection par *L. pneumophila*. Dans un contexte plus large, il est en général plus facile d'étudier les effecteurs bactériens puis de trouver la cible ou la fonction qui est détournée chez l'hôte. Cependant, dans le cas de l'infection par *L. pneumophila*, la présence de nombreux effecteurs, ayant pour certains des activités redondantes, complexifie l'étude de ces derniers. En effet, la mutation d'un effecteur est souvent contrebalancée par l'activité d'un autre. C'est dans ce cadre, qu'une approche visant à cibler les protéines de l'hôte a été réalisée durant cette étude.

Parmi les quinze protéines choisies, une diminution de leur quantité a été observée dans le premier protéome. De ce fait, une approche par surexpression des gènes par l'intermédiaire de vecteurs plasmidiques a été choisie. Les premières contraintes rencontrées ont été au niveau de la génération des plasmides d'expression, puisqu'au final, cinq plasmides différents ont été générés, éliminant d'autres gènes candidats intéressants, comme la sous-unité 3 du complexe COP9, ou la protéine PCD6iP (Programmed cell-death 6 interacting protein, putative).

Au cours de mes travaux de thèse, un deuxième protéome a été réalisé, mais n'a pas été analysé. Il a tout de même permis de comparer le comportement de nos protéines d'intérêt qui ont été sélectionnées à partir du premier protéome. La première grande différence entre ces deux protéomes est la quantité de protéines de l'amibe qui ont été détectées. En effet, 1 695 protéines d'amibes ont été détectées dans le premier protéome contre 5 942 dans le second. Cette augmentation de détection pourrait être en lien avec les protocoles de préparation des échantillons effectués par la plateforme protéomique. En effet, bien que les étapes soient similaires, quelques différences sont observées comme une incubation légèrement plus importante des échantillons protéiques avec la trypsine (12 heures pour le premier protéome contre 14 heures pour le deuxième) ou les spectromètres de masse utilisés qui sont différents d'un protéome à l'autre : Q-Exactive HF (premier protéome) et Q-Exactive Plus (deuxième protéome). Bien qu'une étude montre que le Q-Exactive HF semble plus efficace que le Q-Exactive Plus ([Scheltema et al. 2014](#)), le premier protéome de notre étude présente moins de protéines détectées. Deux conditions supplémentaires ont été réalisées dans

le second protéome (infectée par *L. pneumophila* $\Delta dotA$), ce qui augmente la probabilité d'avoir de nouvelles protéines détectées sur l'ensemble des échantillons. Le premier protéome a été réalisé début 2015 contrairement au second qui a été réalisé fin 2017. Entre ces deux dates, une potentielle mise à jour de la base de données d'*A. castellanii* a peut-être été effectuée ce qui aurait facilité la détection des protéines dans le protéome le plus récent. La seconde différence entre ces deux protéomes est que le fait qu'un plus grand nombre de protéines soient détectées dans le second protéome a également impacté le nombre de protéines dont la quantité est statistiquement modifiée au cours de l'infection. En effet, 306 protéines le sont dans le premier protéome contre 2 517 pour le second (en excluant les conditions non présentes dans le premier protéome). Enfin, la troisième grande différence est que des profils différents sont observés pour CBS1, NECAP2 et OSF, contrairement à GPR et Erat. Cela pourrait s'expliquer par le fait que lors du premier protéome, un des trois échantillons, qui correspondaient au temps 48 heures, avait un profil protéique différent des deux autres. Cet échantillon a été exclu de l'analyse statistique et a ainsi réduit la puissance statistique en comparaison avec l'analyse effectuée sur le second protéome. De ce fait, la probabilité d'avoir de faux positifs (protéines non régulées mais statistiquement positives) et de faux négatifs est augmentée.

De manière intéressante, les cinq gènes étudiés sont relativement bien conservés parmi le genre *Acanthamoeba*, puisque des gènes homologues ont été retrouvés chez d'autres espèces qu'*A. castellanii*. L'absence d'homologue dans certaines espèces peut s'expliquer par la présence de génomes incomplets ou non annotés. Par ailleurs, pour certains génomes d'*Acanthamoeba*, des erreurs d'attribution de nom d'espèce ont été trouvées après analyse du gène codant l'ARNr 18S. Ainsi, ne pas avoir détecté d'homologue dans ces espèces ne signifie pas forcément leur absence totale.

La surexpression des gènes par l'intermédiaire de vecteurs plasmidiques chez *A. castellanii* n'a pas montré d'effet sur la croissance intracellulaire de *L. pneumophila*. Récemment, une étude a montré que la surexpression de la cycline D1 qui est une protéine nécessaire au cycle cellulaire et qui est dégradée au cours de l'infection par *L. pneumophila*, ne permet pas de restaurer le cycle cellulaire durant l'infection. De plus, cette étude montre que *L. pneumophila* induit une plus forte dégradation de la cycline D1 au cours de l'infection (Sol et al. 2019). La surexpression de protéines

uniques de l'hôte semblerait insuffisante pour compenser les fonctions des multiples autres protéines dérégulées par *L. pneumophila*. Il serait intéressant d'effectuer d'autres expériences complémentaires, qui n'ont pas été réalisées dans le cadre de ces travaux de thèse. Nous pourrions regarder si les amibes transfectées survivent mieux à l'infection sans pour autant affecter la croissance intracellulaire de la bactérie. De plus, une analyse par microscopie de la morphologie de la vacuole répliquative ou du potentiel recrutement des protéines étudiées sur cette vacuole pourrait également être envisagée.

La surexpression des gènes étudiés n'a pas montré d'effet sur la croissance des amibes, la production d'ATP ou encore le processus d'endocytose. L'absence d'effet pourrait résider dans la polyploïdie de l'amibe (Maciver 2016). En effet, si l'amibe possède (et exprime) déjà plusieurs copies de ces gènes, leur surexpression pourrait modifier la physiologie de façon marginale. La surexpression de NECAP2 n'a pas permis d'obtenir d'amibes viables, suggérant que cette approche par surexpression peut ne pas convenir à l'étude de certaines protéines. En effet, si cette dernière est finement régulée d'un point de vue quantitatif, forcer la cellule à en produire plus induira une toxicité aboutissant à la mort cellulaire.

L'enkystement est un processus biologique de l'amibe qui est finement régulé et qui aboutit à la formation d'un kyste permettant à l'amibe de résister à des conditions défavorables. Ce processus nécessite une régulation importante de gènes. Il est ainsi montré que la transcription par l'ARN polymérase II semble augmenter contrairement aux ARN polymérases I et III (Orfeo and Bateman 1998). De plus, certains gènes comme l'ubiquitine, la myosine ou encore la tubuline sont réprimés durant ce processus, contrairement à TPBF dont le niveau de transcrits n'est pas modifié (Orfeo and Bateman 1998). Le suivi de l'expression des gènes étudiés dans ces travaux de thèse montre globalement une diminution de l'expression de ces derniers au cours de l'enkystement. Mais lorsque l'on force le maintien de l'expression des gènes étudiés par l'intermédiaire du promoteur TPBF, il est observé que les protéines GPR et Erat inhibent la formation de kystes contrairement à la protéine eGFP, CBS1 et OSF. Ces résultats suggèrent qu'Erat et GPR possèdent un rôle qui empêche le processus d'enkystement. Les fonctions de ces deux protéines ne sont pas connues chez *A. castellanii*, il serait ainsi nécessaire de mieux les caractériser afin de comprendre leur rôle dans ce processus essentiel pour l'amibe. De plus, d'un point de vue applications,

cibler ce genre de protéines en maintenant leur expression pourrait faciliter le traitement de pathologies infectieuses induites par *Acanthamoeba*.

De manière générale, une approche par inhibition de l'expression (ARN interférents) permettrait de compléter l'ensemble des résultats obtenus durant ces travaux de thèses. Plusieurs publications attestent de la fonctionnalité des ARN interférents ([Dudley et al. 2008b](#); [Lorenzo-Morales et al. 2010](#); [Aqeel et al. 2013](#); [Moon et al. 2014](#)). Cependant, dans nos conditions d'expériences, les premiers essais de transfection de siRNA chez *A. castellanii* n'ont pas permis d'obtenir de diminution des transcrits du gène ciblé (données non montrées). Il serait ainsi important d'optimiser cette technique dans le laboratoire, ce qui permettrait d'étudier les gènes au cas par cas, ou de permettre l'accès à des analyses à haut débit en utilisant ces ARN interférents. De plus, la présence d'un génome polyploïde chez *A. castellanii*, complique l'utilisation de techniques visant à muter le gène ([Maciver 2016](#)). L'utilisation des ARN interférents est ainsi une bonne alternative.

L'étape critique de ces travaux de thèse est la phase de choix des protéines à étudier. Avec le recul des trois années passées et la nouvelle analyse protéomique, les candidats choisis ne seraient pas forcément les mêmes. En effet, travailler sur cinq protéines en parallèle, dont chacune possède une fonction différente et qui ne sont pas impliquées dans le même processus prend beaucoup de temps et complexifie leur étude. De plus, l'approche utilisée durant mes travaux de thèse reposait sur les résultats du protéome qui montraient une quantité plus faible de ces protéines. Lors de la caractérisation d'une protéine, il est nécessaire d'avoir recours à ce genre de techniques de surexpression, cependant, la génération des plasmides peut prendre du temps. Choisir un ou plusieurs gènes déjà décrits dans l'infection par *L. pneumophila* et présents dans les résultats du protéome, aurait permis d'avoir une protéine contrôle et de ce fait, aurait consolidé l'approche choisie. Les données du deuxième protéome ayant été obtenues plus tard, ces informations n'ont pas été utilisées pour le choix des protéines. La comparaison de ces deux protéomes pourrait permettre de mettre en évidence des candidats qui possèdent des profils similaires et donc avoir plus de confiance sur ces derniers. L'utilisation d'autres analyses globales, comme le transcriptome, le protéome de la VCL issue d'*A. castellanii*, ou encore des criblages à haut débit par siRNA, pourraient être réalisées et renforcerait également le choix de candidats protéiques. Les outils actuellement disponibles pour l'étude d'*A.*

castellanii reste peu développés, ce qui complexifie l'étude de ce modèle. Ainsi, le développement de nouveaux outils, et notamment le développement de techniques pouvant inactiver totalement un gène, par exemple par recombinaison ou par CRISPR, est nécessaire. L'accès à ces techniques permettrait de pouvoir générer des banques de mutants chez *A. castellanii* et ainsi favoriserait la mise en évidence de gènes pouvant être impliqués dans un processus physiologique donné ou lors de l'interaction avec des bactéries intracellulaires. Un autre point important, est que l'approche choisie durant mes travaux de thèse vise à étudier une protéine en particulier, et non l'ensemble de la voie ou du processus qui l'implique. Finalement, étudier une voie dans sa globalité en première approche renforcerait l'étude et la compréhension des mécanismes détournés par *L. pneumophila*.

Chapitre 7 :

Conclusion générale

Les objectifs de mes travaux de thèse étaient la mise en évidence de gènes d'*A. castellanii* pouvant être impliqués dans l'interaction avec la bactérie *L. pneumophila* ou impliqués dans la physiologie de l'amibe grâce au développement de nouveaux outils moléculaires.

A partir d'un protéome d'*A. castellanii* infectée par *L. pneumophila*, cinq protéines ont été étudiées durant mes travaux de thèse. Une diminution de leur quantité a été observée dans un protéome, de ce fait, une approche se basant sur la surexpression des gènes dans l'amibe a été réalisée, afin de voir si maintenir leur expression pouvait altérer la croissance intracellulaire de *L. pneumophila*.

Peu d'outils moléculaires sont disponibles pour l'amibe modèle *A. castellanii*. Des vecteurs plasmidiques d'expression ont été développés. Un protocole de transfection a également été mis au point, ce qui a permis de générer des amibes *A. castellanii* qui surexpriment les protéines d'intérêt. Cependant, l'obtention d'une lignée cellulaire viable n'a pas été obtenue lorsque l'on surexprime la protéine **NECAP2**, suggérant un effet toxique de cette protéine. Cet effet toxique pourrait s'expliquer par l'implication des protéines de la famille NECAP2 dans l'endocytose dépendante de la clathrine et/ou le recyclage des récepteurs à la membrane.

Au cours de mes travaux de thèse, aucune surexpression de gènes n'a montré d'effet sur la croissance intracellulaire de *L. pneumophila*. Cependant, d'autres expériences sont à prévoir avant d'exclure leurs rôles putatifs dans l'infection. De plus, aucun effet n'a été observé sur certains processus physiologiques de l'amibe comme la croissance, la production d'ATP ou le processus d'endocytose.

Ces travaux ont tout de même permis de mettre en évidence deux protéines d'*A. castellanii* qui sont impliquées dans le processus d'enkystement. La première protéine qui a été renommée **Erat** est en soumission pour une publication scientifique. La surexpression de cette protéine chez *A. castellanii* montre une inhibition partielle de la capacité à former des kystes, suggérant un effet antagoniste sur ce processus. D'ailleurs, lorsque l'on s'intéresse à l'expression du gène au cours de l'enkystement, une rapide et forte diminution des transcrits est observée. De plus, la recherche bio-informatique de domaines et d'homologues chez d'autres organismes montrent que c'est potentiellement une N-acétyltransferase de la famille des GNAT et qu'elle pourrait avoir une origine procaryote. La seconde protéine est la protéine GPR, une protéine

homologue putative de la protéine humaine GPR107 et murine GPR108. C'est un récepteur couplé aux protéines G, une famille de protéines qui sont au cœur des voies de signalisation et de transmission de signaux au sein de la cellule. La surexpression de cette protéine chez *A. castellanii* inhibe partiellement le processus d'enkystement comme la protéine Erat. Une valorisation sous forme d'article scientifique est prévue pour la protéine GPR.

Au cours de ma thèse, j'ai également eu l'opportunité de participer à un projet montrant que la bactérie *L. pneumophila* inhibait la mobilité cellulaire de son hôte *A. castellanii*. Ce projet a été valorisé sous forme d'article scientifique publiée dans le journal scientifique « *Experimental Parasitology* » (Annexe 6).

Pour conclure, l'ensemble des travaux réalisés au cours de ce projet de thèse a permis de développer des outils moléculaires tels que la construction de plasmides d'expression sur le modèle *A. castellanii*. Bien que l'interaction d'*A. castellanii* avec *L. pneumophila* a été étudiée, la surexpression des protéines choisies ne semblent pas empêcher la croissance intracellulaire de cette bactérie. Finalement, ces travaux ont également permis d'améliorer la connaissance actuelle sur la physiologie de l'amibe et notamment sur le processus d'enkystement par l'intermédiaire des protéines GPR et Erat.

Chapitre 8 :

Références bibliographiques

- Abdel-Nour M, Duncan C, Prashar A, Rao C, Ginevra C, Jarraud S, Low DE, Ensminger AW, Terebiznik MR, Guyard C (2014)** The *Legionella pneumophila* collagen-like protein mediates sedimentation, autoaggregation, and pathogen-phagocyte interactions. *Appl Environ Microbiol* 80:1441–1454
- Abu-zant A, Jones S, Asare R, Suttles J, Price C, Graham J, Kwaik YA (2007)** Anti-apoptotic signalling by the Dot/Icm secretion system of *L. pneumophila*. *Cell Microbiol* 9:246–264
- Adams RJ, Pollard TD (1989)** Binding of myosin I to membrane lipids. *Nature* 340:565–568
- Adl SM, Bass D, Lane CE, Lukeš J, Schoch CL, Smirnov A, Agatha S, Berney C, Brown MW, Burki F, Cárdenas P, Čepička I, Chistyakova L, del Campo J, Dunthorn M, Edvardsen B, Eglit Y, Guillou L, Hampel V, Heiss AA, Hoppenrath M, James TY, Karnkowska A, Karpov S, Kim E, Kolisko M, Kudryavtsev A, Lahr DJG, Lara E, Le Gall L, Lynn DH, Mann DG, Massana R, Mitchell EAD, Morrow C, Park JS, Pawlowski JW, Powell MJ, Richter DJ, Rueckert S, Shadwick L, Shimano S, Spiegel FW, Torruella G, Youssef N, Zlatogursky V, Zhang Q (2019)** Revisions to the classification, nomenclature, and diversity of eukaryotes. *J Eukaryot Microbiol* 66:4–119
- Ahmadzada T, Reid G, McKenzie DR (2018)** Fundamentals of siRNA and miRNA therapeutics and a review of targeted nanoparticle delivery systems in breast cancer. *Biophys Rev* 10:69–86
- Ahmed Khan N (2011)** The neuropathogenesis of *Acanthamoeba* encephalitis: Barriers to Overcome. *J Cell Sci Ther* 2:1–7
- Aksozek A, McClellan K, Howard K, Niederkorn JY, Alizadeh H (2002)** Resistance of *Acanthamoeba castellanii* cysts to physical, chemical, and radiological conditions. *J Parasitol* 88:621–3
- Aktories K (2011)** Bacterial protein toxins that modify host regulatory GTPases. *Nat Rev Microbiol* 9:487–498
- Al-Bana BH, Haddad MT, Garduño RA (2014)** Stationary phase and mature infectious forms of *Legionella pneumophila* produce distinct viable but non-culturable cells. *Environ Microbiol* 16:382–395
- Al-Khodor S, Al-Quadani T, Abu Kwaik Y (2010)** Temporal and differential regulation of expression of the eukaryotic-like ankyrin effectors of *Legionella pneumophila*. *Environ Microbiol Rep* 2:677–684
- Al-Khodor S, Price CT, Habyarimana F, Kalia A, Abu Kwaik Y (2008)** A Dot/Icm-translocated ankyrin protein of *Legionella pneumophila* is required for intracellular proliferation within human macrophages and protozoa. *Mol Microbiol* 70:908–23
- Amstutz P, Binz HK, Parizek P, Stumpp MT, Kohl A, Grütter MG, Forrer P, Plückthun A (2005)** Intracellular kinase inhibitors selected from combinatorial libraries of designed ankyrin repeat proteins. *J Biol Chem* 280:24715–24722
- Anand CM, Skinner AR, Malic A, Kurtz JB (1983)** Interaction of *L. pneumophila* and a free living amoeba (*Acanthamoeba palestinensis*). *J Hyg (Lond)* 91:167–178

- Anwar A, Khan NA, Siddiqui R (2018)** Combating *Acanthamoeba* spp. cysts: What are the options? *Parasites and Vectors* 11:4–6
- Aqeel Y, Siddiqui R, Khan NA (2013)** Silencing of xylose isomerase and cellulose synthase by siRNA inhibits encystation in *Acanthamoeba castellanii*. *Parasitol Res* 112:1221–1227
- Arroyo-Begovich A, Cárabez-Trejo A, Ruíz-Herrera J (1980)** Identification of the structural component in the cyst wall of *Entamoeba invadens*. *J Parasitol* 66:735–41
- Asrat S, Dugan AS, Isberg RR (2014)** The frustrated host response to *Legionella pneumophila* is bypassed by MyD88-dependent translation of pro-inflammatory cytokines. *PLoS Pathog* 10:e1004229
- Atlas R, Williams J, Microbiol. MH-AE, 1995 U (1995)** *Legionella* contamination of dental-unit waters. *Appl Environ Microbiol* 61:1208–1213
- Aurrecoechea C, Barreto A, Brestelli J, Brunk BP, Caler E V., Fischer S, Gajria B, Gao X, Gingle A, Grant G, Harb OS, Heiges M, Iodice J, Kissinger JC, Kraemer ET, Li W, Nayak V, Pennington C, Pinney DF, Pitts B, Roos DS, Srinivasamoorthy G, Stoeckert CJ, Treatman C, Wang H (2011)** AmoebaDB and MicrosporidiaDB: functional genomic resources for Amoebozoa and Microsporidia species. *Nucleic Acids Res* 39:D612–D619
- Bandyopadhyay P, Lang EAS, Rasaputra KS, Steinman HM (2013)** Implication of the VirD4 coupling protein of the Lvh type 4 secretion system in virulence phenotypes of *Legionella pneumophila*. *J Bacteriol* 195:3468–75
- Bandyopadhyay P, Liu S, Gabbai CB, Venitelli Z, Steinman HM (2007)** Environmental mimics and the Lvh type IVA secretion system contribute to virulence-related phenotypes of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* 75:723–35
- Banga S, Gao P, Shen X, Fiscus V, Zong WX, Chen L, Luo ZQ (2007)** *Legionella pneumophila* inhibits macrophage apoptosis by targeting pro-death members of the Bcl2 protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:5121–5126
- Barbaree JM, Fields BS, Feeley JC, Gorman GW, Martin WT (1986)** Isolation of protozoa from water associated with legionellosis outbreak and demonstration of intracellular multiplication of *Legionella pneumophila*. *Appl Environ Microbiol* 51:422–424
- Bardill JP, Miller JL, Vogel JP (2005)** IcmS-dependent translocation of SdeA into macrophages by the *Legionella pneumophila* type IV secretion system. *Mol Microbiol* 56:90–103
- Bärlocher K, Welin A, Hilbi H (2017)** Formation of the *Legionella* replicative compartment at the crossroads of retrograde trafficking. *Front Cell Infect Microbiol* 7:482
- Barrett RA, Alexander M (1977)** Resistance of cysts of amoebae to microbial decomposition. *Appl Environ Microbiol* 33:670–4
- Barry KC, Ingolia NT, Vance RE (2017)** Global analysis of gene expression reveals mRNA superinduction is required for the inducible immune response to a bacterial pathogen. *Elife* 6:1274–1285

- Bass D, Howe AT, Mylnikov AP, Vickerman K, Chao EE, Edwards Smallbone J, Snell J, Cabral C, Cavalier-Smith T (2009)** Phylogeny and Classification of Cercomonadida (Protozoa, Cercozoa): Cercomonas, Eocercomonas, Paracercomonas, and Cavernomonas gen. nov. *Protist* 160:483–521
- Batchelor AH, Piper DE, de la Brousse FC, McKnight SL, Wolberger C (1998)** The structure of GABP/: an ETS domain- ankyrin repeat heterodimer bound to DNA. *Science* (80-) 279:1037–1041
- Bateman E (2010)** Expression plasmids and production of EGFP in stably transfected *Acanthamoeba*. *Protein Expr Purif* 70:95–100
- Bateman E, Paule MR (1986)** Regulation of eukaryotic ribosomal RNA transcription by RNA polymerase modification. *Cell* 47:445–450
- Baykov AA, Tuominen HK, Lahti R (2011)** The CBS domain: a protein module with an emerging prominent role in regulation. *ACS Chem Biol* 6:1156–1163
- Behera HS, Satpathy G, Tripathi M (2016)** Isolation and genotyping of *Acanthamoeba* spp. from *Acanthamoeba* meningitis/ meningoencephalitis (AME) patients in India. *Parasit Vectors* 9:442
- Bellinger-Kawahara C, Horwitz MA (1990)** Complement component C3 fixes selectively to the major outer membrane protein (MOMP) of *Legionella pneumophila* and mediates phagocytosis of liposome-MOMP complexes by human monocytes. *J Exp Med* 172:1201–1210
- Belyi Y, Niggeweg R, Opitz B, Vogelsgesang M, Hippenstiel S, Wilm M, Aktories K (2006)** *Legionella pneumophila* glucosyltransferase inhibits host elongation factor 1A. *Proc Natl Acad Sci* 103:16953–16958
- Belyi Y, Tabakova I, Stahl M, Aktories K (2008)** Lgt: a family of cytotoxic glucosyltransferases produced by *Legionella pneumophila*. *J Bacteriol* 190:3026–3035
- Berger KH, Merriam JJ, Isberg RR (1994)** Altered intracellular targeting properties associated with mutations in the *Legionella pneumophila dotA* gene. *Mol Microbiol* 14:809–22
- Berk SG, Ting RS, Turner GW, Ashburn RJ (1998)** Production of respirable vesicles containing live *Legionella pneumophila* cells by two *Acanthamoeba* spp. *Appl Environ Microbiol* 64:279–86
- Bínová E, Bína D, Ashford DA, Thomas-Oates J, Nohýnková E (2017)** Trehalose during two stress responses in *Acanthamoeba*: differentiation between encystation and pseudocyst formation. *Protist* 168:649–662
- Blondeau F, Ritter B, Allaire PD, Wasiak S, Girard M, Hussain NK, Angers A, Legendre-Guillemain V, Roy L, Boismenu D, Kearney RE, Bell AW, Bergeron JJM, McPherson PS (2004)** Tandem MS analysis of brain clathrin-coated vesicles reveals their critical involvement in synaptic vesicle recycling. *Proc Natl Acad Sci* 101:3833–3838
- Boamah DK, Zhou G, Ensminger AW, O'Connor TJ (2017)** From many hosts, one accidental pathogen: the diverse protozoan hosts of *Legionella*. *Front Cell Infect Microbiol* 7:477

- Bockaert J, Pin JP (1999)** Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J* 18:1723–9
- Bogler SA, Zarley CD, Burianek LL, Fuerst PA, Byers TJ (1983)** Interstrain mitochondrial DNA polymorphism detected in *Acanthamoeba* by restriction endonuclease analysis. *Mol Biochem Parasitol* 8:145–163
- Borella P, Guerrieri E, Marchesi I, Bondi M, Messi P (2005)** Water ecology of *Legionella* and protozoan: environmental and public health perspectives. *Biotechnol Annu Rev* 11:355–380
- Bowers B (1977)** Comparison of pinocytosis and phagocytosis in *Acanthamoeba castellanii*. *Exp Cell Res* 110:409–417
- Bowers B, Korn ED (1969)** The fine structure of *Acanthamoeba castellanii* (Neff strain). II. Encystment. *J Cell Biol* 41:786–805
- Bowers B, Olszewski TE (1983)** *Acanthamoeba* discriminates internally between digestible and indigestible particles. *J Cell Biol* 97:317–322
- Brassinga AKC, Kinchen JM, Cupp ME, Day SR, Hoffman PS, Sifri CD (2010)** *Caenorhabditis* is a metazoan host for *Legionella*. *Cell Microbiol* 12:343–361
- Brennand A, Gualdrón-López M, Coppens I, Rigden DJ, Ginger ML, Michels PAM (2011)** Autophagy in parasitic protists: Unique features and drug targets. *Mol Biochem Parasitol* 177:83–99
- Brenner DJ, Steigerwalt AG, McDade JE (1979)** Classification of the Legionnaires' disease bacterium: *Legionella pneumophila*, genus novum, species nova, of the family Legionellaceae, familia nova. *Ann Intern Med* 90:656–658
- Brindley N, Matin A, Khan NA (2009)** *Acanthamoeba castellanii*: high antibody prevalence in racially and ethnically diverse populations. *Exp Parasitol* 121:254–256
- Brown MW, Spiegel FW, Silberman JD (2009)** Phylogeny of the “forgotten” cellular slime mold, *Fonticula alba*, reveals a key evolutionary branch within Opisthokonta. *Mol Biol Evol* 26:2699–2709
- Bruckert WM, Abu Kwaik Y (2015)** Complete and ubiquitinated proteome of the *Legionella*-containing vacuole within human macrophages. *J Proteome Res* 14:236–248
- Bruggemann H, Hagman A, Jules M, Sismeiro O, Dillies M-A, Gouyette C, Kunst F, Steinert M, Heuner K, Coppee J-Y, Buchrieser C (2006)** Virulence strategies for infecting phagocytes deduced from the in vivo transcriptional program of *Legionella pneumophila*. *Cell Microbiol* 8:1228–1240
- Brzeska H, Young R, Tan C, Szczepanowska J, Korn ED (2001)** Calmodulin-binding and autoinhibitory domains of *Acanthamoeba* myosin I heavy chain kinase, a p21-activated kinase (PAK). *J Biol Chem* 276:47468–47473
- De Buck E, Anne J, Lammertyn E (2007)** The role of protein secretion systems in the virulence of the intracellular pathogen *Legionella pneumophila*. *Microbiology* 153:3948–3953

- Byrne B, Swanson MS (1998)** Expression of *Legionella pneumophila* virulence traits in response to growth conditions. *Infect Immun* 66:3029–34
- Castellani A (1930)** An amoeba growing in cultures of a yeast. *Nature* 126:823
- Cavalier-Smith T (2004)** Only six kingdoms of life. *Proc R Soc B Biol Sci* 271:1251–1262
- Cavalier-Smith T, Chao EE, Lewis R (2016)** 187-gene phylogeny of protozoan phylum Amoebozoa reveals a new class (Cutosea) of deep-branching, ultrastructurally unique, enveloped marine Lobosa and clarifies amoeba evolution. *Mol Phylogenet Evol* 99:275–296
- Cazalet C, Rusniok C, Brüggemann H, Zidane N, Magnier A, Ma L, Tichit M, Jarraud S, Bouchier C, Vandenesch F, Kunst F, Etienne J, Glaser P, Buchrieser C (2004)** Evidence in the *Legionella pneumophila* genome for exploitation of host cell functions and high genome plasticity. *Nat Genet* 36:1165–1173
- Chamberland JP, Antonow LT, Dias Santos M, Ritter B (2016)** NECAP2 controls clathrin coat recruitment to early endosomes for fast endocytic recycling. *J Cell Sci* 129:2625–2637
- Chambers JA, Thompson JE (1972)** A scanning electron microscopic study of the excystment process of *Acanthamoeba castellanii*. *Exp Cell Res* 73:415–421
- Chang B, Kura F, Amemura-Maekawa J, Koizumi N, Watanabe H (2005)** Identification of a Novel Adhesion Molecule Involved in the Virulence of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* 73:4272–4280
- Chávez-Munguía B, Omaña-Molina M, González-Lázaro M, González-Robles A, Bonilla P, Martínez-Palomo A (2005)** Ultrastructural study of encystation and excystation in *Acanthamoeba castellanii*. *J Eukaryot Microbiol* 52:153–158
- Chávez-Munguía B, Salazar-Villatoro L, Lagunes-Guillén A, Omaña-Molina M, Espinosa-Cantellano M, Martínez-Palomo A (2013)** *Acanthamoeba castellanii* cysts: new ultrastructural findings. *Parasitol Res* 112:1125–1130
- Chen J, Felipe KS de, Clarke M, Lu H, Anderson OR, Segal G, Shuman HA (2004a)** *Legionella* effectors that promote nonlytic release from protozoa. *Science* (80-) 303:1358–1361
- Chen L, Orfeo T, Gilmartin G, Bateman E (2004b)** Mechanism of cyst specific protein 21 mRNA induction during *Acanthamoeba* differentiation. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1691:23–31
- Chen L, Peng Z, Bateman E (2004c)** In vivo interactions of the *Acanthamoeba* TBP gene promoter. *Nucleic Acids Res* 32:1251–1260
- Cherfils J (2014)** Arf GTPases and their effectors: assembling multivalent membrane-binding platforms. *Curr Opin Struct Biol* 29:67–76

- Chien M, Morozova I, Shi S, Sheng H, Chen J, Gomez SM, Asamani G, Hill K, Nuara J, Feder M, Rineer J, Greenberg JJ, Steshenko V, Park SH, Zhao B, Teplitskaya E, Edwards JR, Pampou S, Georghiou A, Chou I-C, Iannuccilli W, Uiz ME, Kim DH, Geringer-Sameth A, Goldsberry C, Morozov P, Fischer SG, Segal G, Qu X, Rzhetsky A, Zhang P, Cayanis E, De Jong PJ, Ju J, Kalachikov S, Shuman HA, Russo JJ (2004)** The genomic sequence of the accidental pathogen *Legionella pneumophila*. *Science* 305:1966–8
- Choy A, Dancourt J, Mugo B, O'Connor TJ, Isberg RR, Melia TJ, Roy CR (2012)** The *Legionella* effector RavZ inhibits host autophagy through irreversible Atg8 deconjugation. *Science* (80-) 338:1072–1076
- Christie PJ, Vogel JP (2000)** Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trends Microbiol* 8:354–360
- Christie PJ, Whitaker N, González-Rivera C (2014)** Mechanism and structure of the bacterial type IV secretion systems. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1843:1578–1591
- Cianciotto NP (2013)** Type II Secretion and *Legionella* Virulence. *Current topics in microbiology and immunology*. pp 81–102
- Cirillo JD, Cirillo SL, Yan L, Bermudez LE, Falkow S, Tompkins LS (1999)** Intracellular growth in *Acanthamoeba castellanii* affects monocyte entry mechanisms and enhances virulence of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* 67:4427–34
- Cirillo JD, Falkow S, Tompkins LS (1994)** Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion. *Infect Immun* 62:3254–61
- Cirillo SL, Bermudez LE, El-Etr SH, Duhamel GE, Cirillo JD (2001)** *Legionella pneumophila* entry gene rtxA is involved in virulence. *Infect Immun* 69:508–17
- Cirillo SLG, Yan L, Samrakandi MM, Cirillo JD (2002)** Regulation of the *Legionella pneumophila* rtxA gene and its role in phagocytic cells. *Abstr Gen Meet Am Soc Microbiol* 102:46
- Clarke M, Lohan AJ, Liu B, Lagkouvardos I, Roy S, Zafar N, Bertelli C, Schilde C, Kianianmomeni A, Bürglin TR, Frech C, Turcotte B, Kopec KO, Synnott JM, Choo C, Paponov I, Finkler A, Heng Tan CS, Hutchins AP, Weinmeier T, Rattei T, Chu JSC, Gimenez G, Irimia M, Rigden DJ, Fitzpatrick DA, Lorenzo-Morales J, Bateman A, Chiu CH, Tang P, Hegemann P, Fromm H, Raoult D, Greub G, Miranda-Saavedra D, Chen N, Nash P, Ginger ML, Horn M, Schaap P, Caler L, Loftus BJ (2013)** Genome of *Acanthamoeba castellanii* highlights extensive lateral gene transfer and early evolution of tyrosine kinase signaling. *Genome Biol* 14:R11
- Colson P, La Scola B, Raoult D (2017)** Giant viruses of amoebae: a journey through innovative research and paradigm changes. *Annu Rev Virol* 4:61–85
- Comas I (2016)** *Legionella* effectors reflect strength in diversity. *Nat Genet* 48:115–116

- Correia AM, Ferreira JS, Borges V, Nunes A, Gomes B, Capucho R, Gonçalves J, Antunes DM, Almeida S, Mendes A, Guerreiro M, Sampaio DA, Vieira L, Machado J, Simões MJ, Gonçalves P, Gomes JP (2016)** Probable person-to-person transmission of legionnaires' disease. *N Engl J Med* 374:497–498
- Corsaro D, Walochnik J, Köhler M, Rott MB (2015)** *Acanthamoeba* misidentification and multiple labels: redefining genotypes T16, T19, and T20 and proposal for *Acanthamoeba micheli* sp. nov. (genotype T19). *Parasitol Res* 114:2481–2490
- Costa TRD, Felisberto-Rodrigues C, Meir A, Prevost MS, Redzej A, Trokter M, Waksman G (2015)** Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. *Nat Rev Microbiol* 13:343–359
- Coxon PY, Summersgill JT, Ramirez JA, Miller RD (1998)** Signal transduction during *Legionella pneumophila* entry into human monocytes. *Infect Immun* 66:2905–13
- Creasey EA, Isberg RR (2012)** The protein SdhA maintains the integrity of the *Legionella*-containing vacuole. *Proc Natl Acad Sci* 109:3481–3486
- Cursons RT, Brown TJ, Keys EA, Moriarty KM, Till D (1980)** Immunity to pathogenic free-living amoebae: role of humoral antibody. *Infect Immun* 29:401–7
- Daggett PM, Lipscomb D, Sawyer TK, Nerad TA (1985)** A molecular approach to the phylogeny of *Acanthamoeba*. *Biosystems* 18:399–405
- Dana H, Chalbatani GM, Mahmoodzadeh H, Karimloo R, Rezaiean O, Moradzadeh A, Mehmandoost N, Moazzen F, Mazraeh A, Marmari V, Ebrahimi M, Rashno MM, Abadi SJ, Gharagouzlo E (2017)** Molecular Mechanisms and Biological Functions of siRNA. *Int J Biomed Sci* 13:48–57
- Dart JKG, Radford CF, Minassian D, Verma S, Stapleton F (2008)** Risk factors for microbial keratitis with contemporary contact lenses: a case-control study. *Ophthalmology* 115:1647–54, 1654.e1–3
- Dart JKG, Saw VPJ, Kilvington S (2009)** *Acanthamoeba* Keratitis: diagnosis and treatment update 2009. *Am J Ophthalmol* 148:487–499.e2
- Declerck P (2010)** Biofilms: the environmental playground of *Legionella pneumophila*. *Environ Microbiol* 12:557–566
- Degtyar E, Zusman T, Ehrlich M, Segal G (2009)** A *Legionella* effector acquired from protozoa is involved in sphingolipids metabolism and is targeted to the host cell mitochondria. *Cell Microbiol* 11:1219–1235
- Dergai M, Iershov A, Novokhatska O, Pankivskiy S, Rynditch A (2016)** Evolutionary changes on the way to clathrin-mediated endocytosis in animals. *Genome Biol Evol* 8:588–606
- Diederer BMW (2008)** *Legionella* spp. and Legionnaires' disease. *J Infect* 56:1–12
- Dietersdorfer E, Kirschner A, Schrammel B, Ohradanova-Repic A, Stockinger H, Sommer R, Walochnik J, Cervero-Aragó S (2018)** Starved viable but non-culturable (VBNC) *Legionella* strains can infect and replicate in amoebae and human macrophages. *Water Res* 141:428–438

- Dolezal P, Aili M, Tong J, Jiang JH, Marobbio CM, Lee S fung, Schuelein R, Belluzzo S, Binova E, Mousnier A, Frankel G, Giannuzzi G, Palmieri F, Gabriel K, Naderer T, Hartland EL, Lithgow T (2012)** *Legionella pneumophila* secretes a mitochondrial carrier protein during infection. PLoS Pathog 8:e1002459
- Ducret A, Chabaliere M, Dukan S (2014)** Characterization and resuscitation of “non-culturable” cells of *Legionella pneumophila*. BMC Microbiol 14:3
- Dudley R, Alsam S, Khan NA (2007)** Cellulose biosynthesis pathway is a potential target in the improved treatment of *Acanthamoeba* keratitis. Appl Microbiol Biotechnol 75:133–140
- Dudley R, Alsam S, Khan NA (2008a)** The role of proteases in the differentiation of *Acanthamoeba castellanii*. FEMS Microbiol Lett 286:9–15
- Dudley R, Alsam S, Khan NA (2008b)** The role of proteases in the differentiation of *Acanthamoeba castellanii*. FEMS Microbiol Lett 286:9–15
- Dudley R, Jarroll EL, Khan NA (2009)** Carbohydrate analysis of *Acanthamoeba castellanii*. Exp Parasitol 122:338–343
- Duncan C, Prashar A, So J, Tang P, Low DE, Terebiznik M, Guyard C (2011)** Lcl of *Legionella pneumophila* is an immunogenic GAG binding adhesin that promotes interactions with lung epithelial cells and plays a crucial role in biofilm formation. Infect Immun 79:2168–2181
- Eichinger L, Pachebat J a, Glöckner G, Rajandream M, Sucgang R, Berriman M, Song J, Olsen R, Szafranski K, Xu Q, Tunggal B, Kummerfeld S, Madera M, Konfortov B a, Rivero F, Bankier a T, Lehmann R, Hamlin N, Davies R, Gaudet P, Fey P, Pilcher K, Chen G, Saunders D, Sodergren E, Davis P, Kerhornou a, Nie X, Hall N, Anjard C, Hemphill L, Bason N, Farbrother P, Desany B, Just E, Morio T, Rost R, Churcher C, Cooper J, Haydock S, van Driessche N, Cronin a, Goodhead I, Muzny D, Mourier T, Pain a, Lu M, Harper D, Lindsay R, Hauser H, James K, Quiles M, Madan Babu M, Saito T, Buchrieser C, Wardroper a, Felder M, Thangavelu M, Johnson D, Knights a, Loulseged H, Mungall K, Oliver K, Price C, Quail M a, Urushihara H, Hernandez J, Rabbinowitsch E, Steffen D, Sanders M, Ma J, Kohara Y, Sharp S, Simmonds M, Spiegler S, Tivey a, Sugano S, White B, Walker D, Woodward J, Winckler T, Tanaka Y, Shaulsky G, Schleicher M, Weinstock G, Rosenthal a, Cox EC, Chisholm RL, Gibbs R, Loomis WF, Platzer M, Kay RR, Williams J, Dear PH, Noegel a a, Barrell B, Kuspa a (2005)** The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. Nature 435:43–57
- Elliott JA, Winn WC (1986)** Treatment of alveolar macrophages with cytochalasin D inhibits uptake and subsequent growth of *Legionella pneumophila*. Infect Immun 51:31–6
- Ereño-Orbea J, Oyenarte I, Martínez-Cruz LA (2013)** CBS domains: ligand binding sites and conformational variability. Arch Biochem Biophys 540:70–81
- Escoll P, Mondino S, Rolando M, Buchrieser C (2015)** Targeting of host organelles by pathogenic bacteria: a sophisticated subversion strategy. Nat Rev Microbiol 14:5–19

- Escoll P, Rolando M, Gomez-Valero L, Buchrieser C (2013)** From amoeba to macrophages: exploring the molecular mechanisms of *Legionella pneumophila* infection in both hosts. *Current topics in microbiology and immunology*. pp 1–34
- Farbrother P, Wagner C, Na J, Tunggal B, Morio T, Urushihara H, Tanaka Y, Schleicher M, Steinert M, Eichinger L (2006)** *Dictyostelium* transcriptional host cell response upon infection with *Legionella*. *Cell Microbiol* 8:438–456
- Faucher SP, Mueller CA, Shuman HA (2011)** *Legionella pneumophila* transcriptome during intracellular multiplication in human macrophages. *Front Microbiol* 2:
- Feehan CJ, Johnson-Mackinnon J, Scheibling RE, Lauzon-Guay J-S, Simpson AGB (2013)** Validating the identity of *Paramoeba invadens*, the causative agent of recurrent mass mortality of sea urchins in Nova Scotia, Canada. *Dis Aquat Organ* 103:209–27
- Fenner L, Richet H, Raoult D, Papazian L, Martin C, La Scola B (2006)** Are clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* more virulent than hospital environmental isolates in amebal co-culture test? *Crit Care Med* 34:823–828
- Fields BS (1996)** The molecular ecology of legionellae. *Trends Microbiol* 4:286–290
- Fields BS, Barbaree JM, Shotts EB, Feeley JC, Morrill WE, Sanden GN, Dykstra MJ (1986)** Comparison of guinea pig and protozoan models for determining virulence of *Legionella* species. *Infect Immun* 53:553–9
- Fields BS, Benson RF, Besser RE (2002)** Legionella and Legionnaires' Disease: 25 Years of Investigation. *Clin Microbiol Rev* 15:506–526
- Finsel I, Hilbi H (2015)** Formation of a pathogen vacuole according to *Legionella pneumophila*: how to kill one bird with many stones. *Cell Microbiol* 17:935–950
- Finsel I, Ragaz C, Hoffmann C, Harrison CF, Weber S, Van Rahden VA, Johannes L, Hilbi H (2013)** The *Legionella* effector RidL inhibits retrograde trafficking to promote intracellular replication. *Cell Host Microbe* 14:38–50
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998)** Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806–811
- Flieger A, Frischknecht F, Häcker G, Hornef MW, Pradel G (2018)** Pathways of host cell exit by intracellular pathogens. *Microb cell (Graz, Austria)* 5:525–544
- Fliermans CB, Cherry WB, Orrison LH, Smith SJ, Tison DL, Pope DH (1981)** Ecological distribution of *Legionella pneumophila*. *Appl Environ Microbiol* 41:9–16
- Fontana MF, Banga S, Barry KC, Shen X, Tan Y, Luo Z-Q, Vance RE (2011)** Secreted Bacterial Effectors That Inhibit Host Protein Synthesis Are Critical for Induction of the Innate Immune Response to Virulent *Legionella pneumophila*. *PLoS Pathog* 7:e1001289
- Fouque E, Trouilhé M-C, Thomas V, Hartemann P, Rodier M-H, Héchard Y (2012)** Cellular, Biochemical, and Molecular Changes during Encystment of Free-Living Amoebae. *Eukaryot Cell* 11:382–387
- Franco IS, Shuman HA (2012)** A pathogen's journey in the host cell. *Bioarchitecture* 2:38–42

- Fraser DW, Tsai TR, Orenstein W, Parkin WE, Beecham HJ, Sharrar RG, Harris J, Mallison GF, Martin SM, Mcdade JE, Shepard CC, Brachman PS (1977)** Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. *N Engl J Med* 297:1189–1197
- Fredriksson R, Schiöth HB (2005)** The repertoire of G-protein-coupled receptors in fully sequenced genomes. *Mol Pharmacol* 67:1414–1425
- Fuche F, Vianney A, Andrea C, Doublet P, Gilbert C (2015)** Functional type 1 secretion system involved in *Legionella pneumophila* virulence. *J Bacteriol* 197:563–71
- Fuerst PA, Booton GC, Crary M (2015)** Phylogenetic Analysis and the Evolution of the 18S rRNA Gene Typing System of *Acanthamoeba*. *J Eukaryot Microbiol* 62:69–84
- Garajová M, Mrva M, Vaškovicová N, Martinka M, Melicherová J, Valigurová A (2019)** Cellulose fibrils formation and organisation of cytoskeleton during encystment are essential for *Acanthamoeba* cyst wall architecture. *Sci Rep* 9:4466
- García MT, Jones S, Pelaz C, Millar RD, Abu Kwaik Y (2007)** *Acanthamoeba polyphaga* resuscitates viable non-culturable *Legionella pneumophila* after disinfection. *Environ Microbiol* 9:1267–1277
- Garduño RA, Garduño E, Hoffman PS (1998)** Surface-associated hsp60 chaperonin of *Legionella pneumophila* mediates invasion in a HeLa cell model. *Infect Immun* 66:4602–10
- Gast RJ, Ledee DR, Fuerst PA, Byers TJ (1996)** Subgenus Systematics of *Acanthamoeba*: Four Nuclear 18S rDNA Sequence Types. *J Eukaryot Microbiol* 43:498–504
- Ge J, Xu H, Li T, Zhou Y, Zhang Z, Li S, Liu L, Shao F (2009)** A *Legionella* type IV effector activates the NF- κ B pathway by phosphorylating the I κ B family of inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:13725–13730
- Gelman BB, Rauf SJ, Nader R, Popov V, Borkowski J, Chaljub G, Nauta HW, Visvesvara GS (2001)** Amoebic encephalitis due to *Sappinia diploidea*. *JAMA* 285:2450
- Ghosal D, Jeong KC, Chang Y-W, Gyore J, Teng L, Gardner A, Vogel JP, Jensen GJ (2019)** Molecular architecture, polar targeting and biogenesis of the *Legionella* Dot/Icm T4SS. *Nat Microbiol* 4:1173–1182
- Gomez-Valero L, Buchrieser C (2013)** Genome dynamics in *Legionella*: The basis of versatility and adaptation to intracellular replication. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3:a009993–a009993
- Gomez-Valero L, Rusniok C, Carson D, Mondino S, Pérez-Cobas AE, Rolando M, Pasricha S, Reuter S, Demirtas J, Crumbach J, Descorps-Declere S, Hartland EL, Jarraud S, Dougan G, Schroeder GN, Frankel G, Buchrieser C (2019)** More than 18,000 effectors in the *Legionella* genus genome provide multiple, independent combinations for replication in human cells. *Proc Natl Acad Sci* 116:2265–2273

- Gomez-Valero L, Rusniok C, Rolando M, Neou M, Dervins-Ravault D, Demirtas J, Rouy Z, Moore RJ, Chen H, Petty NK, Jarraud S, Etienne J, Steinert M, Heuner K, Gribaldo S, Médigue C, Glöckner G, Hartland EL, Buchrieser C (2014)** Comparative analyses of *Legionella* species identifies genetic features of strains causing Legionnaires' disease. *Genome Biol* 15:505
- Goy G, Thomas V, Rimann K, Jatou K, Prod'homme G, Greub G (2007)** The Neff strain of *Acanthamoeba castellanii*, a tool for testing the virulence of *Mycobacterium kansasii*. *Res Microbiol* 158:393–397
- Greub G, Raoult D (2004)** Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin Microbiol Rev* 17:413–33
- Guimaraes AJ, Gomes KX, Cortines JR, Peralta JM, Peralta RHS (2016)** *Acanthamoeba* spp. as a universal host for pathogenic microorganisms: One bridge from environment to host virulence. *Microbiol Res* 193:30–38
- Gunderson FF, Cianciotto NP (2013)** The CRISPR-associated gene *cas2* of *Legionella pneumophila* is required for intracellular infection of amoebae. *MBio* 4:e00074-13
- Gunderson FF, Mallama CA, Fairbairn SG, Cianciotto NP (2015)** Nuclease activity of *Legionella pneumophila* Cas2 promotes intracellular infection of amoebal host cells. *Infect Immun* 83:1008–18
- Habyarimana F, Al-khodori S, Kalia A, Graham JE, Price CT, Garcia MT, Kwaik YA (2008)** Role for the Ankyrin eukaryotic-like genes of *Legionella pneumophila* in parasitism of protozoan hosts and human macrophages. *Environ Microbiol* 10:1460–1474
- Harb OS, Venkataraman C, Haack BJ, Gao LY, Kwaik YA (1998)** Heterogeneity in the attachment and uptake mechanisms of the Legionnaires' disease bacterium, *Legionella pneumophila*, by protozoan hosts. *Appl Environ Microbiol* 64:126–32
- Hayashi T, Miyake M, Fukui T, Sugaya N, Daimon T, Itoh S, Oku T, Tsuji T, Toyoshima S, Imai Y (2008)** Exclusion of actin-binding protein p57/coronin-1 from bacteria-containing phagosomes in macrophages infected with *Legionella*. *Biol Pharm Bull* 31:861–865
- Hellebø A, Stene A, Aspehaug V (2017)** PCR survey for *Paramoeba perurans* in fauna, environmental samples and fish associated with marine farming sites for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *J Fish Dis* 40:661–670
- Hempstead AD, Isberg RR (2015)** Inhibition of host cell translation elongation by *Legionella pneumophila* blocks the host cell unfolded protein response. *Proc Natl Acad Sci* 112:E6790–E6797
- Heng B, Goh K, Ng D, Of AL-A of the A, 1997 U (1997)** Surveillance of legionellosis and *Legionella* bacteria in the built environment in Singapore. *Ann Acad Med Singapore* 26:557–562
- Hervet E, Charpentier X, Vianney A, Lazzaroni JC, Gilbert C, Atlan D, Doublet P (2011)** Protein kinase LegK2 is a type IV secretion system effector involved in endoplasmic reticulum recruitment and intracellular replication of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* 79:1936–1950

- Hilbi H, Kortholt A (2019)** Role of the small GTPase Rap1 in signal transduction, cell dynamics and bacterial infection. *Small GTPases* 10:336–342
- Hirukawa Y, Nakato H, Izumi S, Tsuruhara T, Tomino S (1998)** Structure and expression of a cyst specific protein of *Acanthamoeba castellanii*. *Biochim Biophys Acta - Gene Struct Expr* 1398:47–56
- Hoffmann C, Finsel I, Otto A, Pfaffinger G, Rothmeier E, Hecker M, Becher D, Hilbi H (2014a)** Functional analysis of novel Rab GTPases identified in the proteome of purified *Legionella*-containing vacuoles from macrophages. *Cell Microbiol* 16:n/a-n/a
- Hoffmann C, Harrison CF, Hilbi H (2014b)** The natural alternative: Protozoa as cellular models for *Legionella* infection. *Cell Microbiol* 16:15–26
- Hoge CW, Breiman RF (1991)** Advances in the epidemiology and control of *Legionella* Infections. *Epidemiol Rev* 13:329–340
- Hong Y, Kang J-M, Joo S-Y, Song S-M, Lê HG, Thái TL, Lee J, Goo Y-K, Chung D-I, Sohn W-M, Na B-K (2018)** Molecular and biochemical properties of a cysteine protease of *Acanthamoeba castellanii*. *Korean J Parasitol* 56:409–418
- Hong YC, Kong HH, Ock MS, Kim IS, Chung DI (2000)** Isolation and characterization of a cDNA encoding a subtilisin-like serine proteinase (ahSUB) from *Acanthamoeba healyi*. *Mol Biochem Parasitol* 111:441–6
- Hoppe J, Ünal CM, Thiem S, Grimpe L, Goldmann T, Gaßler N, Richter M, Shevchuk O, Steinert M (2017)** PilY1 promotes *Legionella pneumophila* infection of human lung tissue explants and contributes to bacterial adhesion, host cell invasion, and twitching motility. *Front Cell Infect Microbiol* 7:63
- Horwitz MA (1983a)** The Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes. *J Exp Med* 158:2108–26
- Horwitz MA (1983b)** Formation of a novel phagosome by the legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) in human monocytes. *J Exp Med* 158:1319–1331
- Horwitz MA (1984)** Phagocytosis of the legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) occurs by a novel mechanism: Engulfment within a Pseudopod coil. *Cell* 36:27–33
- Horwitz MA, Maxfield FR (1984)** *Legionella pneumophila* inhibits acidification of its phagosome in human monocytes. *J Cell Biol* 99:1936–1943
- Horwitz MA, Silverstein SC (1980)** Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) multiples intracellularly in human monocytes. *J Clin Invest* 66:441–450
- Hu Q, Henney HR (1997)** An *Acanthamoeba* polyubiquitin gene and application of its promoter to the establishment of a transient transfection system. *Biochim Biophys Acta - Gene Struct Expr* 1351:126–136
- Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA (2009a)** Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 4:44–57

- Huang DW, Sherman BT, Zheng X, Yang J, Imamichi T, Stephens R, Lempicki RA (2009b)** Extracting biological meaning from large gene lists with DAVID. *Curr Protoc Bioinforma* 27:13.11.1-13.11.13
- Huang W-P, Klionsky DJ (2002)** Autophagy in yeast: a review of the molecular machinery. *Cell Struct Funct* 27:409–20
- Ignoul S, Eggermont J (2005)** CBS domains: structure, function, and pathology in human proteins. *Am J Physiol - Cell Physiol* 289:C1369–C1378
- Inoue H, Nojima H, Okayama H (1990)** High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96:23–28
- Isberg RR, O'Connor TJ, Heidtman M (2009)** The *Legionella pneumophila* replication vacuole: making a cosy niche inside host cells. *Nat Rev Microbiol* 7:13–24
- Isenberg G, Aebi U, Pollard TD (1980)** An actin-binding protein from *Acanthamoeba* regulates actin filament polymerization and interactions. *Nature* 288:455–459
- Jackson CL, Bouvet S (2014)** Arfs at a glance. *J Cell Sci* 127:4103–9
- Jaenisch R, Bird A (2003)** Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 33 Suppl:245–54
- Jean S, Kiger AA (2012)** Coordination between RAB GTPase and phosphoinositide regulation and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13:463–470
- Jenzer C, Legouis R (2017)** [Multiple functions of autophagy during development]. *Med Sci (Paris)* 33:238–245
- Jeong KC, Ghosal D, Chang Y-W, Jensen GJ, Vogel JP (2017)** Polar delivery of *Legionella* type IV secretion system substrates is essential for virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:8077–8082
- de Jesús-Díaz DA, Murphy C, Sol A, Dorer M, Isberg RR (2017)** Host cell S phase restricts *Legionella pneumophila* intracellular replication by destabilizing the membrane-bound replication compartment. *MBio* 8:
- de Jonckheere JF (1983)** Isoenzyme and total protein analysis by agarose isoelectric focusing, and taxonomy of the genus *Acanthamoeba*. *J Protozool* 30:701–706
- de Jonckheere JF (1991)** Ecology of *Acanthamoeba*. *Rev Infect Dis* 13:S385–S387
- De Jonckheere JF (2002)** A century of research on the amoeboflagellate genus *Naegleria*. *Acta Protozool* 41:309–342
- Joslin CE, Tu EY, Shoff ME, Booton GC, Fuerst PA, McMahon TT, Anderson RJ, Dworkin MS, Sugar J, Davis FG, Stayner LT (2007)** The association of contact lens solution use and *Acanthamoeba* keratitis. *Am J Ophthalmol* 144:169–180
- Kagan JC, Roy CR (2002)** *Legionella* phagosomes intercept vesicular traffic from endoplasmic reticulum exit sites. *Nat Cell Biol* 4:945–954
- Kang S, Tice AK, Spiegel FW, Silberman JD, Pánek T, Cepicka I, Kostka M, Kosakyan A, Alcântara DMC, Roger AJ, Shadwick LL, Smirnov A, Kudryavtsev A, Lahr DJG, Brown MW (2017)** Between a pod and a hard test: the deep evolution of amoebae. *Mol Biol Evol* 34:2258–2270

- Khan NA (2006)** *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. FEMS Microbiol Rev 30:564–595
- Khan NA (2015)** *Acanthamoeba*: biology and pathogenesis. Caister Academic Press,
- Khodr A, Kay E, Gomez-Valero L, Ginevra C, Doublet P, Buchrieser C, Jarraud S (2016)** Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of *Legionella*. Infect Genet Evol 43:108–122
- Khunkitti W, Lloyd D, Furr JR, Russell AD (1998)** *Acanthamoeba castellanii*: growth, encystment, excystment and biocide susceptibility. J Infect 36:43–8
- Khweek AA, Caution K, Akhter A, Abdulrahman BA, Tazi M, Hassan H, Majumdar N, Doran A, Guirado E, Schlesinger LS, Shuman H, Amer AO (2013)** A bacterial protein promotes the recognition of the *Legionella pneumophila* vacuole by autophagy. Eur J Immunol 43:1333–1344
- Kim H-K, Ha Y-R, Yu H-S, Kong H-H, Chung D-I (2003)** Purification and characterization of a 33 kDa serine protease from *Acanthamoeba lugdunensis* KA/E2 isolated from a Korean keratitis patient. Korean J Parasitol 41:189–96
- Kim SH, Moon EK, Hong Y, Chung D II, Kong HH (2015)** Autophagy protein 12 plays an essential role in *Acanthamoeba* encystation. Exp Parasitol 159:46–52
- King CH, Fields BS, Shotts EB, White EH (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
- Kirby JE, Vogel JP, Andrews HL, Isberg RR (1998)** Evidence for pore-forming ability by *Legionella pneumophila*. Mol Microbiol 27:323–336
- Kirschner AKT (2016)** Determination of viable legionellae in engineered water systems: do we find what we are looking for? Water Res 93:276–288
- Kliescikova J, Kulda J, Nohynkova E (2011a)** Stress-induced pseudocyst formation - A newly identified mechanism of protection against organic solvents in *Acanthamoebae* of the T4 genotype. Protist 162:58–69
- Kliescikova J, Kulda J, Nohynkova E (2011b)** Propylene glycol and contact-lens solutions containing this diol induce pseudocyst formation in acanthamoebae. Exp Parasitol 127:326–328
- Köhler M, Leitsch D, Fürnkranz U, Duchêne M, Aspöck H, Walochnik J (2008)** *Acanthamoeba* strains lose their abilities to encyst synchronously upon prolonged axenic culture. Parasitol Res 102:1069–1072
- Koide M, Saito A, Kusano N, Higa F (1993)** Detection of *Legionella* spp. in cooling tower water by the polymerase chain reaction method. Appl Environ Microbiol 59:1943–1946
- Komura T, Yasui C, Miyamoto H, Nishikawa Y (2010)** *Caenorhabditis elegans* as an alternative model host for *Legionella pneumophila*, and protective effects of *Bifidobacterium infantis*. Appl Environ Microbiol 76:4105–4108
- Kong H-H, Pollard TD (2002)** Intracellular localization and dynamics of myosin-II and myosin-IC in live *Acanthamoeba* by transient transfection of EGFP fusion proteins. J Cell Sci 115:4993–5002

- Kong HH, Kim TH, Chung DI (2000)** Purification and characterization of a secretory serine proteinase of *Acanthamoeba healyi* isolated from GAE. *J Parasitol* 86:12–7
- Koronakis V, Eswaran J, Hughes C (2004)** Structure and function of TolC: the bacterial exit duct for proteins and drugs. *Annu Rev Biochem* 73:467–489
- Kot K, Łanocha-Arendarczyk NA, Kosik-Bogacka DI (2018)** Amoebas from the genus *Acanthamoeba* and their pathogenic properties. *Ann Parasitol* 64:299–308
- Kouzarides T (2007)** Chromatin modifications and their function. *Cell* 128:693–705
- Krinos C, High AS, Rodgers FG (1999)** Role of the 25 kDa major outer membrane protein of *Legionella pneumophila* in attachment to U-937 cells and its potential as a virulence factor for chick embryos. *J Appl Microbiol* 86:237–244
- Król-Turmińska K, Olender A (2017)** Human infections caused by free-living amoebae. *Ann Agric Environ Med* 24:254–260
- Ku B, Lee K-H, Park WS, Yang C-S, Ge J, Lee S-G, Cha S-S, Shao F, Heo W Do, Jung JU, Oh B-H (2012)** VipD of *Legionella pneumophila* targets activated Rab5 and Rab22 to interfere with endosomal trafficking in macrophages. *PLoS Pathog* 8:e1003082
- Lakhundi S, Khan NA, Siddiqui R (2014)** The effect of environmental and physiological conditions on excystation of *Acanthamoeba castellanii* belonging to the T4 genotype. *Parasitol Res* 113:2809–2816
- Lang C, Hiller M, Flieger A (2017)** Disulfide loop cleavage of *Legionella pneumophila* PlaA boosts lysophospholipase A activity. *Sci Rep* 7:16313
- Lazdunski A, Guzzo J, Filloux A, Bally M, Murgier M (1990)** Secretion of extracellular proteins by *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie* 72:147–156
- Lee J-YY, Song S-MM, Moon E-KK, Lee Y-RR, Jha BK, Danne D-BS, Cha H-JJ, Yu HS, Kong H-HH, Chung D-I II, Hong Y, Sylvatrie Danne DB, Cha H-JJ, Yu HS, Kong H-HH, Chung D-I II, Hong Y (2013)** Cysteine protease inhibitor (AcStefin) is required for complete cyst formation of *Acanthamoeba*. *Eukaryot Cell* 12:567–574
- Lee YR, Na BK, Moon EK, Song SM, Joo SY, Kong HH, Goo YK, Chung D II, Hong Y (2015)** Essential role for an M17 leucine aminopeptidase in encystation of *Acanthamoeba castellanii*. *PLoS One* 10:
- Leitsch D, Köhler M, Marchetti-Deschmann M, Deutsch A, Allmaier G, Duchêne M, Walochnik J (2010)** Major role for cysteine proteases during the early phase of *Acanthamoeba castellanii* encystment. *Eukaryot Cell* 9:611–8
- Levanova N, Tabakova I, Jank T, Belyi Y (2019)** Purification and analysis of effector glucosyltransferase Lgt1 from *Legionella pneumophila*. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). pp 277–287
- Li L, Wright SJ, Krystofova S, Park G, Borkovich KA (2007)** Heterotrimeric G protein signaling in filamentous fungi. *Annu Rev Microbiol* 61:423–452

- Li Z, Dugan AS, Bloomfield G, Skelton J, Ivens A, Losick V, Isberg RR (2009)** The amoebal MAP kinase response to *Legionella pneumophila* is regulated by DupA. *Cell Host Microbe* 6:253–267
- Lifshitz Z, Burstein D, Peeri M, Zusman T, Schwartz K, Shuman HA, Pupko T, Segal G (2013)** Computational modeling and experimental validation of the *Legionella* and *Coxiella* virulence-related type-IVB secretion signal. *Proc Natl Acad Sci* 110:E707–E715
- Liu W, Xie Y, Ma J, Luo X, Nie P, Zuo Z, Lahrmann U, Zhao Q, Zheng Y, Zhao Y, Xue Y, Ren J (2015)** IBS: an illustrator for the presentation and visualization of biological sequences: Fig. 1. *Bioinformatics* 31:3359–3361
- Liu Y, Luo ZQ (2007)** The *Legionella pneumophila* effector SidJ is required for efficient recruitment of endoplasmic reticulum proteins to the bacterial phagosome. *Infect Immun* 75:592–603
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001)** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25:402–408
- Lloyd D (2014)** Encystment in *Acanthamoeba castellanii*: A review. *Exp Parasitol* 145:S20–S27
- Lloyd D, Turner NA, Khunkitti W, Hann AC, Furr JR, Russell AD (2001)** Encystation in *Acanthamoeba castellanii*: Development of biocide resistance. 48:11–16
- Lorenzo-Morales J, Coronado-Álvarez N, Martínez-Carretero E, Maciver SK, Valladares B (2007)** Detection of four adenovirus serotypes within water-isolated strains of *Acanthamoeba* in the Canary Islands, Spain. *Am J Trop Med Hyg* 77:753–756
- Lorenzo-Morales J, Khan NA, Walochnik J (2015)** An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Parasite* 22:10
- Lorenzo-Morales J, Kliescikova J, Martinez-Carretero E, De Pablos LM, Profotova B, Nohynkova E, Osuna A, Valladares B (2008)** Glycogen phosphorylase in *Acanthamoeba* spp.: Determining the role of the enzyme during the encystment process using RNA interference. *Eukaryot Cell* 7:509–517
- Lorenzo-Morales J, Martín-Navarro CM, López-Arencibia A, Arnalich-Montiel F, Piñero JE, Valladares B (2013)** *Acanthamoeba* keratitis: an emerging disease gathering importance worldwide? *Trends Parasitol* 29:181–187
- Lorenzo-Morales J, Martín-Navarro CM, López-Arencibia A, Santana-Morales MA, Afonso-Lehmann RN, Maciver SK, Valladares B, Martínez-Carretero E (2010)** Therapeutic potential of a combination of two gene-specific small interfering RNAs against clinical strains of *Acanthamoeba*. *Antimicrob Agents Chemother* 54:5151–5155
- Lorenzo-Morales J, Ortega-Rivas A, Foronda P, Abreu-Acosta N, Ballart D, Martínez E, Valladares B (2005)** RNA interference (RNAi) for the silencing of extracellular serine proteases genes in *Acanthamoeba*: Molecular analysis and effect on pathogenicity. *Mol Biochem Parasitol* 144:10–15
- Losick VP, Isberg RR (2006)** NF- κ B translocation prevents host cell death after low-dose challenge by *Legionella pneumophila*. *J Exp Med* 203:2177–2189

- Lu H, Clarke M (2005)** Dynamic properties of *Legionella*-containing phagosomes in *Dictyostelium* amoebae. *Cell Microbiol* 7:995–1007
- Lye D, Fout GS, Crout SR, Danielson R, Thio CL, Paszko-Kolva CM (1997)** Survey of ground, surface, and potable waters for the presence of *Legionella* species by EnviroAmp(R) PCR *Legionella* kit, culture, and immunofluorescent staining. *Water Res* 31:287–293
- Machner MP, Isberg RR (2006)** Targeting of host Rab GTPase function by the intravacuolar pathogen *Legionella pneumophila*. *Dev Cell* 11:47–56
- Maciver SK (2016)** Asexual Amoebae Escape Muller’s Ratchet through Polyploidy. *Trends Parasitol* 32:855–862
- Mackman N, Nicaud JM, Gray L, Holland IB (1986)** Secretion of haemolysin by *Escherichia coli*. *Curr Top Microbiol Immunol* 125:159–81
- Magistrado-Coxen P, Aqeel Y, Lopez A, Haserick JR, Urbanowicz BR, Costello CE, Samuelson J (2019)** The most abundant cyst wall proteins of *Acanthamoeba castellanii* are lectins that bind cellulose and localize to distinct structures in developing and mature cyst walls. *PLoS Negl Trop Dis* 13:e0007352
- Manna PT, Gadelha C, Puttick AE, Field MC (2015)** ENTH and ANTH domain proteins participate in AP2-independent clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Sci* 128:2130–2142
- Marciano-Cabral F, Cabral G (2003)** *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin Microbiol Rev* 16:273–307
- Marrie TJ, Haldane D, Bezanson G (1992)** Nosocomial Legionnaires’ disease: Clinical and radiographic patterns. *Can J Infect Dis* 3:253
- Martínez AJ, Visvesvara GS (2001)** *Balamuthia mandrillaris* infection. *J Med Microbiol* 50:205–207
- Mattana A, Serra C, Mariotti E, Delogu G, Fiori PL, Cappuccinelli P (2006)** *Acanthamoeba castellanii* promotion of in vitro survival and transmission of coxsackie B3 viruses. *Eukaryot Cell* 5:665–671
- Mattar FE, Byers TJ (1971)** Morphological changes and the requirements for macromolecule synthesis during excystment of *Acanthamoeba castellanii*. *J Cell Biol* 49:507–519
- Maycock NJR, Jayaswal R (2016)** Update on *Acanthamoeba* Keratitis: Diagnosis, treatment, and outcomes. *Cornea* 35:713–20
- Mazur T., Hadas E., Iwanicka I. (1995)** The duration of the cyst stage and the viability and virulence of *Acanthamoeba* isolates. *Trop Med Parasitol* 46:102–108
- McClelland MR, Vaszar LT, Kagawa FT (2004)** Pneumonia and osteomyelitis due to *Legionella longbeachae* in a woman with systemic lupus erythematosus. *Clin Infect Dis* 38:e102–e106
- Mcdade JE, Shepard CC, Fraser DW, Tsai TR, Redus MA, Dowdle WR (1977)** Legionnaires’ disease: Isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *N Engl J Med* 297:1197–1203

- Memari F, Niyiyati M, Joneidi Z (2017)** Pathogenic *Acanthamoeba* T4 genotype isolated from mucosal tissue of a patient with HIV infection: A case report. *Iran J Parasitol* 12:143–147
- Mengue L, Régnacq M, Aucher W, Portier E, Héchard Y, Samba-Louaka A (2016)** *Legionella pneumophila* prevents proliferation of its natural host *Acanthamoeba castellanii*. *Sci Rep* 6:36448
- Mengue L, Richard F-J, Caubet Y, Rolland S, Héchard Y, Samba-Louaka A (2017)** *Legionella pneumophila* decreases velocity of *Acanthamoeba castellanii*. *Exp Parasitol* 183:124–127
- Michard C, Sperandio D, Baïlo N, Pizarro-Cerdá J, LeClaire L, Chadeau-Argaud E, Pombo-Grégoire I, Hervet E, Vianney A, Gilbert C, Faure M, Cossart P, Doublet P (2015)** The *Legionella* kinase legk2 targets the arp2/3 complex to inhibit actin nucleation on phagosomes and allow bacterial evasion of the late endocytic pathway. *MBio* 6:1–14
- Michel F, Soler-Lopez M, Petosa C, Cramer P, Siebenlist U, Müller CW (2001)** Crystal structure of the ankyrin repeat domain of Bcl-3: a unique member of the I κ B protein family. *EMBO J* 20:6180–6190
- Miller RD (1983)** *Legionella pneumophila* cell envelope: Permeability to hydrophobic molecules. *Curr Microbiol* 9:349–354
- Mizushima N, Komatsu M (2011)** Autophagy: Renovation of cells and tissues. *Cell* 147:728–741
- Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y (2011)** The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27:107–132
- Moffat JF, Tompkins LS (1992)** A quantitative model of intracellular growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii*. *Infect Immun* 60:296–301
- Molmeret M, Alli OAT, Radulic M, Susa M, Doric M, Kwaik YA (2002)** The C-terminus of lcmT is essential for pore formation and for intracellular trafficking of *Legionella pneumophila* within *Acanthamoeba polyphaga*. *Mol Microbiol* 43:1139–1150
- Molmeret M, Bitar DM, Han L, Kwaik YA (2004)** Cell biology of the intracellular infection by *Legionella pneumophila*. *Microbes Infect* 6:129–39
- Molofsky AB, Swanson MS (2004)** Differentiate to thrive: Lessons from the *Legionella pneumophila* life cycle. *Mol Microbiol* 53:29–40
- Moon E-K, Chung D, Hong Y, Kong H-H (2012a)** Protein kinase C signaling molecules regulate encystation of *Acanthamoeba*. *Exp Parasitol* 132:524–529
- Moon E-KK, Kim S-HH, Hong Y, Chung D-I II, Goo Y-KK, Kong H-HH (2015)** Autophagy inhibitors as a potential antiamebic treatment for *Acanthamoeba* keratitis. *Antimicrob Agents Chemother* 59:4020–4025
- Moon E, Hong Y, Chung D, Goo Y, Kong H (2016)** Identification of protein arginine methyltransferase 5 as a regulator for encystation of *Acanthamoeba*. *Korean J Parasitol* 54:133–138

- Moon EK, Chung D II, Hong Y, Kong HH (2011a)** Atg3-mediated lipidation of atg8 is involved in encystation of *Acanthamoeba*. *Korean J Parasitol* 49:103–108
- Moon EK, Chung D II, Hong Y, Kong HH (2011b)** Expression levels of encystation mediating factors in fresh strain of *Acanthamoeba castellanii* cyst ESTs. *Exp Parasitol* 127:811–816
- Moon EK, Chung D II, Hong YC, Kong HH (2008)** Characterization of a serine proteinase mediating encystation of *Acanthamoeba*. *Eukaryot Cell* 7:1513–1517
- Moon EK, Chung D II, Hong YC, Kong HH (2009)** Autophagy protein 8 mediating autophagosome in encysting *Acanthamoeba*. *Mol Biochem Parasitol* 168:43–48
- Moon EK, Hong Y, Chung D II, Goo YK, Kong HH (2014)** Down-regulation of cellulose synthase inhibits the formation of endocysts in *Acanthamoeba*. *Korean J Parasitol* 52:131–135
- Moon EK, Hong Y, Chung D II, Kong HH (2012b)** Cysteine protease involving in autophagosomal degradation of mitochondria during encystation of *Acanthamoeba*. *Mol Biochem Parasitol* 185:121–126
- Moon EK, Hong Y, Chung D II, Kong HH (2013)** Identification of Atg8 isoform in encysting *Acanthamoeba*. *Korean J Parasitol* 51:497–502
- Moon EK, Hong Y, Lee HA, Quan FS, Kong HH (2017a)** DNA methylation of gene expression in *Acanthamoeba castellanii* encystation. *Korean J Parasitol* 55:115–120
- Moon EK, Kong HH (2012)** Short-cut pathway to synthesize cellulose of encysting *Acanthamoeba*. *Korean J Parasitol* 50:361–364
- Moon EK, Kong HH, Hong Y, Lee HA, Quan FS (2017b)** Identification and characterization of protein arginine methyltransferase 1 in *Acanthamoeba castellanii*. *Korean J Parasitol* 55:109–114
- Moon EK, Xuan YH, Chung D II, Hong Y, Kong HH (2011c)** Microarray analysis of differentially expressed genes between cysts and trophozoites of *Acanthamoeba castellanii*. *Korean J Parasitol* 49:341–347
- Moss SM, Taylor IR, Ruggero D, Gestwicki JE, Shokat KM, Mukherjee S (2019)** A *Legionella pneumophila* kinase phosphorylates the Hsp70 chaperone family to inhibit eukaryotic protein synthesis. *Cell Host Microbe* 25:454–462.e6
- Moura H, Wallace S, Visvesvara GS (1992)** *Acanthamoeba healyi* n. sp. and the isoenzyme and immunoblot profiles of *Acanthamoeba* spp., groups 1 and 3. *J Protozool* 39:573–83
- Mousnier A, Schroeder GN, Stoneham CA, So EC, Garnett JA, Yu L, Matthews SJ, Choudhary JS, Hartland EL, Frankel G (2014)** A new method to determine in vivo interactomes reveals binding of the *Legionella pneumophila* effector PieE to multiple rab GTPases. *MBio* 5:
- Murata T, Delprato A, Ingmundson A, Toomre DK, Lambright DG, Roy CR (2006)** The *Legionella pneumophila* effector protein DrrA is a Rab1 guanine nucleotide-exchange factor. *Nat Cell Biol* 8:971–977

- Nagai H, Kagan JC, Zhu X, Kahn RA, Roy CR (2002)** A bacterial guanine nucleotide exchange factor activates ARF on *Legionella* phagosomes. *Science* (80-) 295:679–682
- Naujoks J, Tabeling C, Dill BD, Hoffmann C, Brown AS, Kunze M, Kempa S, Peter A, Mollenkopf HJ, Dorhoi A, Kershaw O, Gruber AD, Sander LE, Witznath M, Herold S, Nerlich A, Hocke AC, van Driel I, Suttorp N, Bedoui S, Hilbi H, Trost M, Opitz B (2016)** IFNs modify the proteome of *Legionella*-containing vacuoles and restrict infection via IRG1-derived itaconic acid. *PLoS Pathog* 12:e1005408
- Neff RJ, Neff RH (1969)** The biochemistry of amoebic encystment. *Symp Soc Exp Biol* 23:51–81
- Newton HJ, Ang DKY, van Driel IR, Hartland EL (2010)** Molecular pathogenesis of infections caused by *Legionella pneumophila*. *Clin Microbiol Rev* 23:274–298
- Newton HJ, Sansom FM, Dao J, Cazalet C, Bruggemann H, Albert-Weissenberger C, Buchrieser C, Cianciotto NP, Hartland EL (2008)** Significant role for ladC in initiation of *Legionella pneumophila* infection. *Infect Immun* 76:3075–3085
- Niewmierzycka A, Clarke S (1999)** S-adenosylmethionine-dependent methylation in *Saccharomyces cerevisiae*: Identification of a novel protein arginine methyltransferase. *J Biol Chem* 274:814–824
- Oldham WM, Hamm HE (2008)** Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:60–71
- Orfeo T, Bateman E (1998)** Transcription by RNA polymerase II during *Acanthamoeba* differentiation. *Biochim Biophys Acta - Gene Struct Expr* 1443:297–304
- Ott M, Messner P, Heesemann J, Marre R, Hacker J (1991)** Temperature-dependent expression of flagella in *Legionella*. *J Gen Microbiol* 137:1955–1961
- Page FC (1976)** A revised classification of the Gymnamoebia (Protozoa: Sarcodina). *Zool J Linn Soc* 58:61–77
- Pal S, Vishwanath SN, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sif S (2004)** Human SWI/SNF-associated PRMT5 methylates histone H3 arginine 8 and negatively regulates expression of ST7 and NM23 tumor suppressor genes. *Mol Cell Biol* 24:9630–9645
- Palmer C, Tsai Y, ... CP-K-AE, 1993 U (1993)** Detection of *Legionella* species in sewage and ocean water by polymerase chain reaction, direct fluorescent-antibody, and plate culture methods. *Appl Environ Microbiol* 59:3618–3624
- Di Paolo G, De Camilli P (2006)** Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* 443:651–657
- Peng Z, Omaruddin R, Bateman E (2005)** Stable transfection of *Acanthamoeba castellanii*. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1743:93–100
- Petersen H, Luxton M (1982)** A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. *Oikos* 39:288

- Peurois F, Peyroche G, Cherfils J (2018)** Small GTPase peripheral binding to membranes: Molecular determinants and supramolecular organization. *Biochem Soc Trans* 47:13–22
- Picazarri K, Nakada-Tsukui K, Nozaki T (2008)** Autophagy during proliferation and encystation in the protozoan parasite *Entamoeba invadens*. *Infect Immun* 76:278–288
- Pollard TD, Shelton E, Weihing RR, Korn ED (1970)** Ultrastructural characterization of F-actin isolated from *Acanthamoeba castellanii* and identification of cytoplasmic filaments as F-actin by reaction with rabbit heavy meromyosin. *J Mol Biol* 50:91–124
- Popovic D, Vucic D, Dikic I (2014)** Ubiquitination in disease pathogenesis and treatment. *Nat Med* 20:1242–1253
- Portela A, Esteller M (2010)** Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol* 28:1057–1068
- Potter JL, Weisman RA (1971)** Differentiation in *Acanthamoeba*: β -glucan synthesis during encystment. *BBA - Gen Subj* 237:65–74
- Potter JL, Weisman RA (1972)** Correlation of cellulose synthesis in vivo and in vitro during the encystment of *Acanthamoeba*. *Dev Biol* 28:472–479
- Prashar A, Bhatia S, Tabatabaeiyazdi Z, Duncan C, Garduño RA, Tang P, Low DE, Guyard C, Terebiznik MR (2012)** Mechanism of invasion of lung epithelial cells by filamentous *Legionella pneumophila*. *Cell Microbiol* 14:1632–1655
- Price CTD, Abu Kwaik Y (2014)** The transcriptome of *Legionella pneumophila*-infected human monocyte-derived macrophages. *PLoS One* 9:e114914
- Pussard M, Pons R (1977)** Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). *Protistologica* 8:557–598
- Qiu J, Luo ZQ (2017)** *Legionella* and *Coxiella* effectors: Strength in diversity and activity. *Nat Rev Microbiol* 15:591–605
- Raoult D, Boyer M (2010)** Amoebae as genitors and reservoirs of giant viruses. *Intervirology* 53:321–329
- Rechnitzer C, Blom J (1989)** Engulfment of the Philadelphia strain of *Legionella pneumophila* within pseudopod coils in human phagocytes. Comparison with other *Legionella* strains and species. *Apmis* 97:105–14
- Reddy S, Devlin R, Menaa C, Nishimura R, Choi SJ, Dallas M, Yoneda T, Roodman GD (1998)** Isolation and characterization of a cDNA clone encoding a novel peptide (OSF) that enhances osteoclast formation and bone resorption. *J Cell Physiol* 177:636–645
- Richards AM, Von Dwingelo JE, Price CT, Kwaik YA (2013)** Cellular microbiology and molecular ecology of *Legionella*-amoeba interaction. *Virulence* 4:307–314
- Ritter B, Denisov AY, Philie J, Allaire PD, Legendre-Guillemain V, Zylbergold P, Gehring K, McPherson PS (2007)** The NECAP PHear domain increases clathrin accessory protein binding potential. *EMBO J* 26:4066–4077

- Ritter B, Denisov AY, Philie J, Deprez C, Tung EC, Gehring K, McPherson PS (2004)** Two WXXF-based motifs in NECAPs define the specificity of accessory protein binding to AP-1 and AP-2. *EMBO J* 23:3701–3710
- Ritter B, Murphy S, Dokainish H, Girard M, Gudheti M V., Kozlov G, Halin M, Philie J, Jorgensen EM, Gehring K, McPherson PS (2013)** NECAP1 Regulates AP-2 interactions to control vesicle size, number, and cargo during clathrin-mediated endocytosis. *PLoS Biol* 11:e1001670
- Ritter B, Philie J, Girard M, Tung EC, Blondeau F, McPherson PS (2003)** Identification of a family of endocytic proteins that define a new α -adaptin ear-binding motif. *EMBO Rep* 4:1089–1093
- Rittig MG, Jagoda JC, Wilske B, Murgia R, Cinco M, Repp R, Burmester GR, Krause A (1998)** Coiling phagocytosis discriminates between different spirochetes and is enhanced by phorbol myristate acetate and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Infect Immun* 66:627–35
- Riyahi TY, Frese F, Steinert M, Omosigho NN, Glöckner G, Eichinger L, Orabi B, Williams RSB, Noegel AA (2011)** RpkA, a highly conserved GPCR with a lipid kinase domain, has a role in phagocytosis and anti-bacterial defense. *PLoS One* 6:e27311
- Rodgers FG, Gibson FC (1993)** Opsonin-independent adherence and intracellular development of *Legionella pneumophila* within U-937 cells. *Can J Microbiol* 39:718–722
- Rodgers FG, Greaves PW, Macrae AD, Lewis MJ (1980)** Electron microscopic evidence of flagella and pili on *Legionella pneumophila*. *J Clin Pathol* 33:1184–1188
- Rodríguez-Zaragoza S (1994)** Ecology of free-living amoebae. *Crit Rev Microbiol* 20:225–241
- Rolando M, Gomez-Valero L, Buchrieser C (2015)** Bacterial remodelling of the host epigenome: Functional role and evolution of effectors methylating host histones. *Cell Microbiol* 17:1098–1107
- Rossier O, Cianciotto NP (2001)** Type II protein secretion is a subset of the pilD-dependent processes that facilitate intracellular infection by *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* 69:2092–2098
- Rossier O, Dao J, Cianciotto NP (2009)** A type II secreted RNase of *Legionella pneumophila* facilitates optimal intracellular infection of *Hartmannella vermiformis*. *Microbiology* 155:882–890
- Rossier O, Starkenburg SR, Cianciotto NP (2004)** *Legionella pneumophila* type II protein secretion promotes virulence in the A/J mouse model of Legionnaires' disease pneumonia. *Infect Immun* 72:310–321
- Rowbotham TJ (1980)** Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J Clin Pathol* 33:1179–1183
- Rubin RW, Hill MC, Hepworth P, Boehmer J (1976)** Isolation and electrophoretic analysis of nucleoli, phenol-soluble nuclear proteins, and outer cyst walls from *Acanthamoeba castellanii* during encystation initiation. *J Cell Biol* 68:740–751

- Salameh A, Bello N, Becker J, Zangeneh T (2015)** Fatal granulomatous amoebic encephalitis caused by *Acanthamoeba* in a patient with kidney transplant: A case report. *Open Forum Infect Dis* 2:ofv104
- Samba-Louaka A, Delafont V, Rodier M-H, Cateau E, Héchard Y (2019)** Free-living amoebae and squatters in the wild: ecological and molecular features. *FEMS Microbiol Rev* 43:415–434
- Samuelson J, Bushkin GG, Chatterjee A, Robbins PW (2013)** Strategies to discover the structural components of cyst and oocyst walls. *Eukaryot Cell* 12:1578–1587
- Sandström G, Saeed A, Abd H (2011)** *Acanthamoeba*-bacteria: a model to study host interaction with human pathogens. *Curr Drug Targets* 12:936–41
- Sawyer TK (1971)** *Acanthamoeba griffini*, a new species of marine amoeba. *J Protozool* 18:650–654
- Scheltema RA, Hauschild JP, Lange O, Hornburg D, Denisov E, Damoc E, Kuehn A, Makarov A, Mann M (2014)** The Q exactive HF, a benchtop mass spectrometer with a pre-filter, high-performance quadrupole and an ultra-high-field orbitrap analyzer. *Mol Cell Proteomics* 13:3698–3708
- Schmarda L (1871)** Zoologie. WBraumüller Berlin, Ger
- Schmölders J, Manske C, Otto A, Hoffmann C, Steiner B, Welin A, Becher D, Hilbi H (2017)** Comparative proteomics of purified pathogen vacuoles correlates intracellular replication of *Legionella pneumophila* with the small GTPase ras-related protein 1 (Rap1). *Mol Cell Proteomics* 16:622–641
- Schroeder JM, Booton GC, Hay J, Niszl IA, Seal D V., Markus MB, Fuerst PA, Byers TJ (2001)** Use of subgenomic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *Acanthamoebae* from humans with keratitis and from sewage sludge. *J Clin Microbiol* 39:1903–1911
- Schuhmacher MK, Rolando M, Bröhm A, Weirich S, Kudithipudi S, Buchrieser C, Jeltsch A (2018)** The *Legionella pneumophila* methyltransferase RomA methylates also non-histone Proteins during Infection. *J Mol Biol* 430:1912–1925
- La Scola B, Audic S, Robert C, Jungang L, De Lamballerie X, Drancourt M, Birtles R, Claverie JM, Raoult D (2003)** A giant virus in amoebae. *Science* (80-) 299:2033
- Shadwick LL, Brown MW, Tice AK, Spiegel FW (2016)** A new amoeba with protosteloid fruiting: *Luapeleamoeba hula* n. g. n. sp. (*Acanthamoebidae*, *Centramoebida*, *Amoebozoa*). *Acta Protozool* 55:123–134
- Shadwick LL, Spiegel FW, Shadwick JDL, Brown MW, Silberman JD (2009)** Eumycetozoa = Amoebozoa?: SSUrDNA phylogeny of protosteloid slime molds and its significance for the amoebozoan supergroup. *PLoS One* 4:e6754
- Shen X, Banga S, Liu Y, Xu L, Gao P, Shamovsky I, Nudler E, Luo ZQ (2009)** Targeting eEF1A by a *Legionella pneumophila* effector leads to inhibition of protein synthesis and induction of host stress response. *Cell Microbiol* 11:911–926

- Shin S (2012)** Innate immunity to intracellular pathogens. Lessons learned from *Legionella pneumophila*. *Advances in Applied Microbiology*. pp 43–71
- Shin S, Case CL, Archer KA, Nogueira C V., Kobayashi KS, Flavell RA, Roy CR, Zamboni DS (2008)** Type IV secretion-dependent activation of host MAP kinases induces an increased proinflammatory cytokine response to *Legionella pneumophila*. *PLoS Pathog* 4:e1000220
- Siddiqui R, Khan NA (2012)** Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. 5:6
- Smirnov A V., Chao E, Nasonova ES, Cavalier-Smith T (2011)** A revised classification of naked Lobose amoebae (Amoebozoa: Lobosa). *Protist* 162:545–570
- Sol A, Lipo E, de Jesús-Díaz DA, Murphy C, Devereux M, Isberg RR (2019)** *Legionella pneumophila* translocated translation inhibitors are required for bacterial-induced host cell cycle arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116:3221–3228
- Song SM, Han BI, Moon EK, Lee YR, Yu HS, Jha BK, Danne DBS, Kong HH, Chung D II, Hong Y (2012)** Autophagy protein 16-mediated autophagy is required for the encystation of *Acanthamoeba castellanii*. *Mol Biochem Parasitol* 183:158–165
- Steele TW, Moore C V, Sangster N (1990)** Distribution of *Legionella longbeachae* serogroup 1 and other legionellae in potting soils in Australia. *Appl Environ Microbiol* 56:2984–8
- Steenbergen JN, Casadevall A (2003)** The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Microbes Infect* 5:667–675
- Steenbergen JN, Shuman HA, Casadevall A (2001)** *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. *Proc Natl Acad Sci* 98:15245–15250
- Steiner B, Swart AL, Welin A, Weber S, Personnic N, Kaech A, Freyre C, Ziegler U, Klemm RW, Hilbi H (2017)** ER remodeling by the large GTPase atlastin promotes vacuolar growth of *Legionella pneumophila*. *EMBO Rep* 18:1817–1836
- Steiner B, Weber S, Hilbi H (2018a)** Formation of the *Legionella*-containing vacuole: phosphoinositide conversion, GTPase modulation and ER dynamics. *Int J Med Microbiol* 308:49–57
- Steiner B, Weber S, Kaech A, Ziegler U, Hilbi H (2018b)** The large GTPase atlastin controls ER remodeling around a pathogen vacuole. *Commun Integr Biol* 11:1–5
- Steinert M, Emödy L, Amann R, Hacker J (1997)** Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. *Appl Environ Microbiol* 63:2047–53
- Stenmark H (2009)** Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:513–525
- Stewart JR, Weisman RA (1974)** A chemical and autoradiographic study of cellulose synthesis during the encystment of *Acanthamoeba castellanii*. *Arch Biochem Biophys* 161:488–498

- Stone BJ, Abu Kwaik Y (1998)** Expression of multiple pili by *Legionella pneumophila*: identification and characterization of a type IV pilin gene and its role in adherence to mammalian and protozoan cells. *Infect Immun* 66:1768–75
- Stothard DR, Schroeder-Diedrich JM, Awwad MH, Gast RJ, Ledee DR, Rodriguez-Zaragoza S, Dean CL, Fuerst PA, Byers TJ (1998)** The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene Sequence Types. *J Eukaryot Microbiol* 45:45–54
- Sturgill-Koszycki S, Swanson MS (2000)** *Legionella pneumophila* replication vacuoles mature into acidic, endocytic organelles. *J Exp Med* 192:1261–1272
- Swanson MS, Hammer BK (2000)** *Legionella pneumophila* pathogenesis: A fateful journey from amoebae to macrophages. *Annu Rev Microbiol* 54:567–613
- Swart AL, Harrison CF, Eichinger L, Steinert M, Hilbi H (2018)** *Acanthamoeba* and *Dictyostelium* as cellular models for *Legionella* infection. *Front Cell Infect Microbiol* 8:61
- Tafesse FG, Guimaraes CP, Maruyama T, Carette JE, Lory S, Brummelkamp TR, Ploegh HL (2014)** GPR107, a G-protein-coupled receptor essential for intoxication by *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin a, localizes to the Golgi and is cleaved by furin. *J Biol Chem* 289:24005–24018
- Tanimura S, Hashizume J, Kurosaki Y, Sei K, Gotoh A, Ohtake R, Kawano M, Watanabe K, Kohno M (2011)** SH3P2 is a negative regulator of cell motility whose function is inhibited by ribosomal S6 kinase-mediated phosphorylation. *Genes to Cells* 16:514–526
- Tice AK, Shadwick LL, Fiore-Donno AM, Geisen S, Kang S, Schuler GA, Spiegel FW, Wilkinson KA, Bonkowski M, Dumack K, Lahr DJG, Voelcker E, Clauß S, Zhang J, Brown MW (2016)** Expansion of the molecular and morphological diversity of Acanthamoebidae (Centramoebida, Amoebozoa) and identification of a novel life cycle type within the group. *Biol Direct* 11:69
- Tilney LG, Harb OS, Connelly PS, Robinson CG, Roy CR (2001)** How the parasitic bacterium *Legionella pneumophila* modifies its phagosome and transforms it into rough ER: implications for conversion of plasma membrane to the ER membrane. *J Cell Sci* 114:4637–50
- Toker A (1998)** Signaling through protein kinase C. *Front Biosci* 3:D1134-47
- Tomlinson G, Jones EA (1962)** Isolation of cellulose from the cyst wall of a soil amoeba. *BBA - Biochim Biophys Acta* 63:194–200
- Tong S, Zhou H, Gao Y, Zhu Z, Zhang X, Teng M, Niu L (2009)** Crystal structure of human osteoclast stimulating factor. *Proteins Struct Funct Bioinforma* 75:245–251
- Tseng TT, Tyler BM, Setubal JC (2009)** Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. *BMC Microbiol* 9:S2
- Tyndall RL, Domingue EL (1982)** Cocultivation of *Legionella pneumophila* and free-living amoebae. *Appl Environ Microbiol* 44:954–959

- Tyson JY, Pearce MM, Vargas P, Bagchi S, Mulhern BJ, Cianciotto NP (2013)** Multiple *Legionella pneumophila* type II secretion substrates, including a novel protein, contribute to differential infection of the amoebae *Acanthamoeba castellanii*, *Hartmannella vermiformis*, and *Naegleria lovaniensis*. *Infect Immun* 81:1399–1410
- Tyson JY, Vargas P, Cianciotto NP (2014)** The novel *Legionella pneumophila* type II secretion substrate NttC contributes to infection of amoebae *Hartmannella vermiformis* and *Willaertia magna*. *Microbiology* 160:2732–2744
- Urwyler S, Nyfeler Y, Ragaz C, Lee H, Mueller LN, Aebersold R, Hilbi H (2009)** Proteome analysis of *Legionella* vacuoles purified by magnetic immunoseparation reveals secretory and endosomal GTPases. *Traffic* 10:76–87
- Vandersmissen L, De Buck E, Saels V, Coil DA, Anné J (2010)** A *Legionella pneumophila* collagen-like protein encoded by a gene with a variable number of tandem repeats is involved in the adherence and invasion of host cells. *FEMS Microbiol Lett* 306:168–176
- Venkataraman C, Haack BJ, Bondada S, Abu Kwaik Y (1997)** Identification of a Gal/GalNAc lectin in the protozoan *Hartmannella vermiformis* as a potential receptor for attachment and invasion by the Legionnaires' disease bacterium. *J Exp Med* 186:537–547
- Vetting MW, Luiz LP, Yu M, Hegde SS, Magnet S, Roderick SL, Blanchard JS (2005)** Structure and functions of the GNAT superfamily of acetyltransferases. *Arch Biochem Biophys* 433:212–226
- Visvesvara GS (1991)** Classification of *Acanthamoeba*. *Rev Infect Dis* 13:S369–S372
- Visvesvara GS, Moura H, Schuster FL (2007)** Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 50:1–26
- Visvesvara GS, Schuster FL, Martinez AJ (1993)** *Balamuthia mandrillaris*, N. G., N. Sp., agent of amebic meningoencephalitis in humans and other animals. *J Eukaryot Microbiol* 40:504–514
- Volkonsky M (1931)** *Hartmannella castellanii* Douglas, et classification des Hartmannelles. *Arch Zool Exp Gen* 72:317–329
- Walochnik J, Scheikl U, Haller-Schober EM (2015)** Twenty years of *Acanthamoeba* diagnostics in Austria. *J Eukaryot Microbiol* 62:3–11
- Wang H, Huang ZQ, Xia L, Feng Q, Erdjument-Bromage H, Strahl BD, Briggs SD, Allis CD, Wong J, Tempst P, Zhang Y (2001)** Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor. *Science* (80-) 293:853–857
- Wasiak S, Legendre-Guillemain V, Puertollano R, Blondeau F, Girard M, De Heuvel E, Boismenu DL, Bell AW, Bonifacino JS, McPherson PS (2002)** Enthoprotin : A novel clathrin-associated protein identified through subcellular proteomics. *J Cell Biol* 158:855–862

- Watarai M, Derre I, Kirby J, Growney JD, Dietrich WF, Isberg RR (2001)** *Legionella pneumophila* is internalized by a macropinocytotic uptake pathway controlled by the Dot/Icm system and the mouse Lgn1 locus. *J Exp Med* 194:1081–1095
- Weber MM, Faris R (2018)** Subversion of the endocytic and secretory pathways by bacterial effector proteins. *Front Cell Dev Biol* 6:1
- Weber SS, Ragaz C, Hilbi H (2009)** 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* 11:442–460
- Weisman RA (1976)** Differentiation in *Acanthamoeba castellanii*. *Annu Rev Microbiol* 30:189–219
- Weisman RA, Spiegel RS, McCauley JG (1970)** Differentiation in *Acanthamoeba*: Glycogen levels and glycogen synthetase activity during encystment. *BBA - Gen Subj* 201:45–53
- Weldon JE, Pastan I (2011)** A guide to taming a toxin - Recombinant immunotoxins constructed from *Pseudomonas* exotoxin A for the treatment of cancer. *FEBS J* 278:4683–4700
- Wennerberg K, Rossman KL, Der CJ (2005)** The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci* 118:843–846
- White RC, Gunderson FF, Tyson JY, Richardson KH, Portlock TJ, Garnett JA, Cianciotto NP (2018)** Type II secretion-dependent aminopeptidase lapa and acyltransferase plac are redundant for nutrient acquisition during *Legionella pneumophila* intracellular infection of amoebas. *MBio* 9:e00528-18
- Wittchen ES, Aghajanian A, Burridge K (2011)** Isoform-specific differences between Rap1A and Rap1B GTPases in the formation of endothelial cell junctions. *Small GTPases* 2:65–76
- Wittrup A, Lieberman J (2015)** Knocking down disease: A progress report on siRNA therapeutics. *Nat Rev Genet* 16:543–552
- Xu L, Shen X, Bryan A, Banga S, Swanson MS, Luo ZQ (2010)** Inhibition of host vacuolar H⁺-ATPase activity by a *Legionella pneumophila* effector. *PLoS Pathog* 6:e1000822
- Yagita K, Endo T (1990)** Restriction enzyme analysis of mitochondrial DNA of *Acanthamoeba* strains in Japan. *J Protozool* 37:570–575
- Yorimitsu T, Klionsky DJ (2005)** Autophagy: Molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ* 12:1542–1552
- Yu VL (1993)** Could aspiration be the major mode of transmission for *Legionella*? *Am J Med* 95:13–15
- Yu VL, Plouffe JF, Pastoris MC, Stout JE, Schousboe M, Widmer A, Summersgill J, File T, Heath CM, Paterson DL, Cheresky A (2002)** Distribution of *Legionella* species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: An international collaborative survey. *J Infect Dis* 186:127–128

- Zähringer U, Knirel YA, Lindner B, Helbig JH, Sonesson A, Marre R, Rietschel ET (1995)** The lipopolysaccharide of *Legionella pneumophila* serogroup 1 (strain Philadelphia 1): chemical structure and biological significance. *Prog Clin Biol Res* 392:113–39
- Zhu W, Banga S, Tan Y, Zheng C, Stephenson R, Gately J, Luo ZQ (2011)** Comprehensive identification of protein substrates of the Dot/Icm type IV transporter of *Legionella pneumophila*. *PLoS One* 6:e17638
- Zorzi GK, Schuh RS, Maschio VJ, Brazil NT, Rott MB, Teixeira HF (2019)** Box Behnken design of siRNA-loaded liposomes for the treatment of a murine model of ocular keratitis caused by *Acanthamoeba*. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 173:725–732
- Zusman T, Yerushalmi G, Segal G (2003)** Functional similarities between the Icm/Dot pathogenesis systems of *Coxiella burnetii* and *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* 71:3714–3723

Annexes

Annexe 1 : Protéine dont le taux est augmenté après 24 h d'infection d'*A. castellanii* Neff par *L. pneumophila* Paris.

Nom du gène	Annotation du gène	p-value (t-test)
ACA1_040810	Uncharacterized protein	2,61E-03

Annexe 2 : Protéines dont le taux est diminué après 24 h d'infection d'*A. castellanii* Neff par *L. pneumophila* Paris. Les protéines surlignées en jaune correspondent aux protéines étudiées durant les travaux de thèse.

Nom du gène	Annotation du gène	p-value (t-test)
ACA1_157860	FAD binding domain containing protein	4,52E-04
ACA1_232430	CBS domain containing protein	1,87E-04
ACA1_245660	Uncharacterized protein	2,12E-03
ACA1_313730	Glycosyltransferase, group 2 domain containing protein	4,13E-03
ACA1_092980	Serine/threonine kinase	6,22E-03
ACA1_217750	Phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP), putative	5,35E-03
ACA1_383450	G protein coupled receptor, putative	1,84E-03
COX3	Cytochrome c oxidase subunit 3	1,57E-02
ACA1_000210	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 3, putative	4,23E-04
ACA1_182370	Osteoclaststimulating factor, putative	1,94E-05
ACA1_064650	Ribosomal S29 subunit	3,59E-03
ACA1_368860	Universal stress domain containing protein	1,70E-02
ACA1_201480	Alcohol dehydrogenase	1,17E-04
ACA1_325450	CBS domain containing protein	2,24E-04
ACA1_117330	Hydroxylamine reductase	1,37E-04

Annexe 3 : Protéines dont le taux est augmenté après 48 h d'infection d'*A. castellanii* Neff par *L. pneumophila* Paris.

Nom du gène	Annotation du gène	p-value (t-test)
ACA1_143960	60s Acidic ribosomal protein	7,13E-03
N/A	Profilin	3,55E-04
ACA1_360200	60s Acidic ribosomal protein	7,39E-04
ACA1_142080	Uncharacterized protein	4,54E-04
ACA1_138040	Elongation factor 1alpha, somatic form, putative	8,06E-04
ACA1_306860	Acyl carrier protein	1,99E-01
ACA1_029530	Uncharacterized protein	2,14E-03
ACA1_127900	Uncharacterized protein	2,00E-03
ACA1_037200	Uncharacterized protein	1,43E-02
ACA1_131810	40S ribosomal protein S21	4,02E-03
ACA1_234810	Uncharacterized protein	1,29E-02
ACA1_048050	Uncharacterized protein	4,66E-03
ACA1_280720	Calmodulin, putative	8,49E-03
ACA1_116930	Pyrroline-5-carboxylate reductase	1,24E-01
ACA1_374380	Heat shock protein ssa1, putative	1,72E-03
ACA1_068750	Ribosomal protein L35, putative	2,53E-02
ACA1_066010	Nuclear transport factor 2, putative	5,64E-02
ACA1_024230	Subtilisin, putative	1,11E-02
ACA1_142020	Uncharacterized protein	2,41E-02
ACA1_143310	Ribosomal L29e protein family	6,97E-02
ACA1_257540	Ribonuclease, T2 family	9,11E-03
ACA1_040810	Uncharacterized protein	2,77E-02
ACA1_267690	Cytochrome b-c1 complex subunit 6	6,85E-03
ACA1_027750	Peroxiredoxin, putative	1,27E-02
ACA1_063710	Cytochrome b-like heme/steroid binding domain containing protein	3,62E-02
ACA1_139000	Histone H2A	2,38E-02
ACA1_170260	Uncharacterized protein	8,32E-03
ACA1_013670	Copper chaperone Atox1, putative	7,69E-03
ACA1_126440	Glutaredoxin, putative	2,26E-02
ACA1_239500	Copper chaperone, putative	2,91E-02
ACA1_364760	Endonuclease	1,95E-03
ACA1_198710	Uncharacterized protein	3,77E-03
ACA1_025730	Uncharacterized protein	2,07E-02
ACA1_362730	Ankyrin domain protein	1,13E-02
ACA1_335910	MxaD protein	1,10E-03

Annexe 4 : Protéines dont le taux est diminué après 48 h d'infection d'*A. castellanii* Neff par *L. pneumophila* Paris. Les protéines surlignées en jaune correspondent aux protéines étudiées durant les travaux de thèse.

Nom du gène	Annotation du gène	P-value (t-test)
ACA1_164940	Glutathione synthetase	4,79E-04
ACA1_011260	Non-specific serine/threonine protein kinase	1,57E-03
ACA1_042250	Submitted name: Phosphoglucomutase, putative	7,18E-04
ACA1_390420	Submitted name: Endonuclease/exonuclease/phosphatase family protein	8,74E-04
ACA1_141850	NAD(P)H:quinone oxidoreductase, type IV, putative	4,23E-04
ACA1_100600	Uncharacterized protein	2,03E-03
ACA1_257980	5oxoprolinase	4,10E-03
ACA1_074110	Peptidase	9,24E-03
ACA1_093910	WD repeat containing protein	8,22E-03
ACA1_315800	Threonine-tRNA ligase	2,17E-03
ACA1_270360	Phosphoribosylamine-glycine ligase	1,29E-02
ACA1_294920	PCI domain containing protein	1,49E-03
ACA1_012270	Aldehyde dehydrogenase	1,10E-02
ACA1_126680	Ras family protein	8,84E-03
ACA1_061750	Ribosomal protein S26e, putative	1,11E-02
ACA1_094910	Deoxyhypusine synthase	9,75E-03
ACA1_013390	Glucan (1,4alpha-), branching enzyme 1, putative	2,00E-04
ACA1_043260	Long chain acylCoA synthetase	5,23E-03
ACA1_333350	Uroporphyrinogen decarboxylase	5,84E-03
ACA1_114580	Hyaluronan / mrna binding family protein	1,00E-02
ACA1_174900	Rasrelated protein Rab-32, putative	3,83E-04
ACA1_038430	Uncharacterized protein	2,88E-03
ACA1_045310	Ras GTPase rap1b, putative	2,28E-03
ACA1_377410	Uncharacterized protein	1,66E-02
PKC17	Protein kinase C17	5,42E-03
ACA1_365780	Ribosomal protein S4, putative	1,83E-02
ACA1_034550	Ribosomal protein S10p/S20e, putative	5,16E-05
ACA1_244750	Oxysterol binding protein	1,07E-02
ACA1_251570	N-ethylmaleimide-sensitive factor isoform 4, putative	3,47E-03
ACA1_128450	Adenine nucleotide translocator, putative	2,08E-03
ACA1_142690	Pinin/SDK/memA/ protein region protein, putative	9,21E-03
ACA1_182110	MethylcrotonoylCoA carboxylase beta chain, mitochondrial, putative	9,12E-03
ACA1_376500	Isocitrate dehydrogenase subunit 1, mitochondrial, putative	1,51E-03
ACA1_301860	Phosphatidylinositol 3-and 4-kinase	3,86E-03

ACA1_257920	Uncharacterized protein	7,86E-03
ACA1_383450	G protein coupled receptor, putative	2,16E-02
ACA1_322080	RNA recognition motif domain containing protein	1,05E-02
ACA1_110300	RNA polymerase	4,88E-04
ACA1_355850	Methionine aminopeptidase, type I, putative	2,07E-02
ACA1_109790	Glutamate5-semialdehyde dehydrogenase	1,17E-05
ACA1_158810	Epsilon subunit of coatomer protein complex isoform 1, putative	1,46E-02
ACA1_369900	Uncharacterized protein	1,59E-03
ACA1_096950	RNA recognition motif domain containing protein	1,32E-02
ACA1_114500	MACRO domain containing protein 1, putative	3,45E-02
ACA1_038490	Asparagine synthase (Glutaminehydrolyzing), putative	1,64E-02
ACA1_282850	Isoleucyl-tRNA synthetase	6,46E-04
ACA1_058790	GDPassociated inhibitor, putative	3,15E-02
ACA1_064820	Rho family, small GTP binding protein Rac3, putative	1,19E-03
ACA1_038280	Splicing factor 3b subunit 3, putative	3,00E-03
ACA1_277350	p53 inducible protein	1,18E-02
ACA1_148480	I/LWEQ domain containing protein	1,83E-02
ACA1_030800	HMG (High mobility group) box domain containing protein	1,15E-02
ACA1_153610	Uncharacterized protein	4,77E-04
ACA1_236150	DNA-directed DNA polymerase	5,14E-03
ACA1_077830	Poly [ADP-ribose] polymerase	7,42E-03
ACA1_263190	Protein arginine Nmethyltransferase	7,65E-04
ACA1_058740	ATP-citrate synthase	2,37E-03
ACA1_289900	RAB11B protein, putative	8,29E-03
ACA1_040840	Programmed cell death 6 interacting protein, putative	1,04E-02
ACA1_256390	Histidinol dehydrogenase	4,19E-02
ACA1_296830	Peptidase C19 family protein	3,73E-02
ACA1_112160	Dual specificity protein kinase	2,24E-02
ACA1_092980	Serine/threonine kinase	2,18E-02
ACA1_216320	Homogentisate 1,2dioxygenase	9,22E-03
ACA1_234600	KH domain containing protein	5,71E-03
ACA1_231010	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	3,41E-04
ACA1_167070	Clathrin heavy chain	2,57E-03
ACA1_053400	START domain containing protein	4,87E-02
ACA1_063190	START domain containing protein	5,43E-03
ACA1_130840	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)]	4,90E-03
ACA1_076880	Alanine-tRNA ligase	1,86E-02
ACA1_074490	ATP synthase mitochondrial F1 complex assembly factor 2, putative	3,54E-02
ACA1_076210	Uncharacterized protein	1,12E-02

ACA1_063250	MYND finger domain containing protein	4,47E-03
ACA1_365390	Ubiquitin domain containing protein	1,73E-02
ACA1_195230	DIS3-like exonuclease 2	6,40E-02
ACA1_204440	Uncharacterized protein	1,04E-02
ACA1_175620	IQGAPrelated protein	3,56E-03
ACA1_097970	Methionine-tRNA ligase	9,97E-03
ACA1_384820	Uncharacterized protein	3,59E-03
ACA1_165250	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial	4,23E-03
ACA1_291480	Proteasome (Prosome, macropain) 26S subunit, nonATPase, 6, putative	4,25E-03
ACA1_060620	Glutaminefructose-6-phosphate transaminase (Isomerizing), putative	4,68E-03
ACA1_087600	3deoxy-7-phosphoheptulonate synthase	4,04E-02
ACA1_090090	Elongation factor Tu GTP binding domain containing protein	3,40E-02
ACA1_168940	Uncharacterized protein	1,19E-02
ACA1_070630	Rasrelated protein ORAB-1, putative	3,41E-03
ACA1_175430	Uncharacterized protein	3,96E-03
ACA1_219070	Nfrl, putative	1,07E-02
ACA1_145820	Ubiquitinactivating enzyme E1 1, putative	2,86E-02
ACA1_343310	NADH dehydrogenase, extrinsic, putative	1,46E-02
ACA1_059840	Phosphoenolpyruvate carboxylase	3,51E-03
ACA1_067840	Variant sh3 domain containing protein	2,19E-03
ACA1_270690	Lysine--tRNA ligase	6,13E-03
ACA1_341030	CRAL/TRIO domain containing protein	2,39E-02
ACA1_358790	Uncharacterized protein	5,94E-02
NAD7	NADH-ubiquinone oxidoreductase 49 kDa subunit	2,44E-02
ACA1_376690	60S ribosomal protein L27a, putative	2,42E-02
ACA1_149310	MAPEG domain containing protein	2,74E-03
ACA1_340900	Isopentenylidiphosphate delta-isomerase	1,59E-02
ACA1_014360	Calcium/calmodulindependent protein kinase	1,65E-02
ACA1_092970	ADPriboseylation factor 1, putative	1,37E-03
ACA1_093130	Tryptophan-tRNA ligase	6,28E-02
ACA1_067770	CBS domain containing protein	5,43E-02
ACA1_175720	RNA recognition motif domain containing protein	5,96E-03
ACA1_220050	Calponin domain containing protein	1,54E-02
ACA1_277970	Vacuolar protein sortingassociated protein 26, putative	5,07E-02
ACA1_281230	Uncharacterized protein	4,87E-02
ACA1_049990	Aldehyde dehydrogenase	5,85E-04
ACA1_266930	Hydrolase, NUDIX domain containing protein	8,74E-02
ACA1_264110	Ribosomal protein L3, putative	9,80E-03

ACA1_054850	Universal stress domain containing protein (UspA)	2,56E-02
ACA1_064650	Ribosomal S29 subunit	2,31E-02
ACA1_072300	RNA recognition motif domain containing protein	6,49E-04
ACA1_271380	Ribosomal protein L10, putative	5,51E-03
ACA1_097000	40S ribosomal protein S4	8,77E-03
ACA1_378220	Ribosomal L18p/L5e family	2,50E-02
ACA1_348980	3hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase	1,25E-02
ACA1_269340	Amidophosphoribosyltransferase	4,39E-02
ACA1_218600	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	3,96E-03
ACA1_055060	Formin domain containing protein	5,49E-02
ACA1_369850	ATPase with chaperone activity, putative	1,34E-02
ACA1_182320	Adenylosuccinate synthetase	5,44E-02
ACA1_321190	Adaptin earbinding coat-associated protein 2 (NECAP-2) isoform 2, putative	5,78E-03
ACA1_287820	Transketolase	9,82E-04
ACA1_071630	NOL1/NOP2/sun domain containing protein	6,97E-04
ACA1_139550	NADPH--cytochrome P450 reductase	2,64E-03
ACA1_141970	IGR protein motif protein	3,71E-02
ACA1_155650	Metallobeta-lactamase domain containing protein	3,24E-03
ACA1_368860	Universal stress domain containing protein	1,97E-02
ACA1_036040	Ribosomal protein S7e, putative	2,80E-02
ACA1_164510	Leucine rich repeat domain containing protein	6,49E-03
ACA1_392530	Cysteine-tRNA ligase	5,89E-03
ACA1_232480	Ribosomal protein S23 (S12), putative	1,96E-02
ACA1_400910	Sec7 domain containing protein	7,43E-04
ACA1_296070	Uncharacterized protein	1,66E-03
ACA1_074180	HEAT repeat containing protein	9,38E-04
ACA1_366610	DNA binding protein HU superfamily protein	8,40E-03
ACA1_322750	Uncharacterized protein	2,81E-02
ACA1_149260	Actin-related protein 2/3 complex subunit 3	1,10E-01
ACA1_278840	Rasrelated protein Rap-1, putative	4,26E-02
ACA1_288360	Ribosomal protein L4/L1 family	3,76E-03
ACA1_389420	Importin beta domain containing protein	2,19E-02
ACA1_366760	RNA recognition motif domain containing protein	1,42E-02
ACA1_036420	Calponin domain containing protein	1,63E-03
ACA1_264840	Leucine rich repeat domain containing protein	1,81E-02
ACA1_223300	Coatomer subunit beta'2, putative	9,75E-03
ACA1_385380	Eukaryotic translation initiation factor 2, putative	1,06E-03
ACA1_227700	Isocitrate dehydrogenase Icp1, putative	2,43E-02
ACA1_364280	Sporulation protein related, putative	8,90E-03

ACA1_232500	Tryptophan 2,3-dioxygenase	4,02E-02
ACA1_138990	Gammaadaptin 1, putative	1,58E-02
ACA1_229190	MYND finger domain containing protein	1,24E-02
ACA1_376550	Cell division control protein 2b, putative	3,98E-03
ACA1_024380	Myosin1, putative	3,93E-02
PDI	Disulfide-like protein	5,36E-03
ACA1_188490	COP9 signalosome complex subunit 3 (Signalosome subunit 3), putative	3,45E-03
MIB	Myosin heavy chain IB	2,60E-02
ACA1_294900	Cytohesin 2, putative	8,69E-03
ACA1_199070	Uncharacterized protein	5,29E-03
ACA1_183510	Erythronate4-phosphate dehydrogenase domain containing protein	1,07E-03
ACA1_094400	Tetratricopeptide repeat domain containing protein	6,35E-03
ACA1_132360	Glutamine-tRNA ligase	4,78E-03
ACA1_096600	CUE domain containing protein	3,50E-03
ACA1_208090	DnaJ domain containing protein	7,01E-03
ACA1_273780	Uncharacterized protein	4,46E-03
ACA1_224340	Importin beta subunit	1,05E-01
ACA1_165210	Ras subfamily protein	6,47E-04
ACA1_064400	Geranylgeranyl transferase type2 subunit beta, putative	5,43E-03
ACA1_244080	PCI domain containing protein	6,70E-02
ACA1_292850	TBC domain containing protein	2,11E-03
ACA1_125980	ATPdependent RNA helicase DHX8, putative	2,39E-02
ACA1_159850	Uncharacterized protein	2,90E-03
ACA1_048250	RhoGAP domain containing protein	1,16E-02
ACA1_157270	DEAD box RNA helicase	1,20E-02
ACA1_036990	Peptidase M20, putative	1,22E-01
ACA1_271300	Rpl7A, putative	6,27E-03
ACA1_048490	Coatmer subunit alpha	1,18E-02
ACA1_205910	Heat shock protein 90 alpha, putative	2,92E-03
ACA1_298850	Protein transport protein sec23, putative	8,97E-03
ACA1_062590	HEAT repeat domain containing protein	2,68E-02
ACA1_267270	Ribosomal protein L14, putative	1,91E-03
ACA1_034540	Ribosomal protein S13p/S18e, putative	1,30E-03
ACA1_078990	AcylCoA synthetase, putative	7,58E-03
ACA1_255140	Hypoxia induced protein region protein, putative	2,95E-03
ACA1_268880	Ribosomal protein S9, putative	2,33E-03
N/A	3-phosphoglycerate dehydrogenase	1,48E-02
ACA1_069770	Tyrosine--tRNA ligase	8,07E-02
ACA1_295880	Malic enzyme	2,79E-02

ACA1_182950	Farnesyl pyrophosphate synthetase	4,38E-02
ACA1_291510	Ubiquitin carboxylterminal hydrolase 15, putative	9,94E-03
ACA1_265570	Ribosomal proteins l2, RNA binding domain containing protein	4,69E-03
ACA1_002300	Pyruvate carboxylase	1,34E-02
ACA1_224870	X7, putative	1,16E-03
ACA1_175450	Shikimate kinase	3,10E-04
ACA1_288920	40S ribosomal protein S8	3,06E-03
ACA1_361260	Brix domain containing 2, putative	3,37E-03
ACA1_065900	Lgalactose-1-phosphate phosphatase	1,40E-02
ACA1_015330	CBS domain containing protein	2,47E-02
PSD2	Phosphatidylserine decarboxylase proenzyme 2	2,61E-03
ACA1_369870	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E	1,99E-02
ACA1_059460	60S ribosomal protein L13	2,86E-03
ACA1_307520	Phenylalanine-tRNA ligase, B5 domain containing protein	7,53E-05
ACA1_326120	Glycogen synthase Gsy1, putative	1,21E-03
ACA1_376270	Phospho2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase	6,47E-03
ACA1_300880	Valine-tRNA ligase	5,05E-04
NAD11	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit	2,63E-05
ACA1_058760	Coproporphyrinogen III oxidase, aerobic, putative	7,93E-03
ACA1_400020	Pyridoxaldependent decarboxylase conserved domain containing protein	4,11E-02
ACA1_019340	Phosphorylase kinase alpha subunit	2,54E-03
ACA1_293900	AMP-dependent synthetase and ligase	6,95E-03
ACA1_139420	Calcium binding protein 39 (Mo25 protein) isoform 5, putative	1,13E-02
ACA1_204570	Uncharacterized protein	1,66E-02
ACA1_175380	Adenylosuccinate synthetase	9,53E-04
ACA1_069690	Fattyacid synthase complex protein	3,00E-03
ACA1_157930	Protein SEY1 homolog	6,59E-03
ACA1_151080	Ribosomal protein L3, putative	5,75E-04
ACA1_220040	40S ribosomal protein S3a	2,20E-03
ACA1_216400	Uncharacterized protein	2,40E-03
ACA1_080550	FAD binding domain containing protein	6,14E-03
ACA1_034510	Rho family, small GTP binding protein Rac3, putative	6,35E-03
ACA1_379260	Coatomer subunit beta	1,14E-02
ACA1_075290	rRNA pseudouridine synthase, putative	4,81E-04
ACA1_151110	Sec23/Sec24 trunk domain containing protein	6,84E-03
ACA1_217370	Adaptorrelated protein complex 1, beta 1 subunit, isoform 2, putative	3,03E-04
ACA1_325180	Ribonuclease L inhibitor family protein	2,03E-02
ACA1_034590	Helicase conserved Cterminal domain containing protein	4,35E-02

ACA1_329470	Oxysterolbinding protein-like protein 8 isoform b, putative	2,34E-03
ACA1_149890	Ribosomal protein S7p/S5e, putative	5,25E-03
ACA1_374600	DEAD/DEAH box helicase domain containing protein	6,08E-03
ACA1_191170	Ribosomal protein L21e, putative	7,48E-03
ACA1_017740	5'-3' exoribonuclease 1	7,10E-04
ACA1_376480	RabE family small GTPase	7,04E-03
ACA1_218470	Rasrelated protein Rab-21, putative	3,10E-02
PKC25	Protein kinase C25	4,68E-03
ACA1_214340	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	4,91E-05
ACA1_067910	Ribosomal protein S19, putative	1,13E-02
ACA1_271860	Protein serine/threonine kinase	5,34E-03
ACA1_315760	Ribosomal protein L13, putative	4,32E-02
ACA1_157890	RNA binding motif protein	3,06E-02
ACA1_203650	Dynamin domain containing protein	6,86E-04
ACA1_267180	Carbamoylphosphate synthase, large subunit	6,32E-04
ACA1_201480	Alcohol dehydrogenase	1,53E-03
ACA1_093540	Uncharacterized protein	7,61E-03
ACA1_088670	60S ribosomal protein L36	5,36E-04
COX3	Cytochrome c oxidase subunit 3	7,02E-03
ACA1_215900	RAP1A, member of RAS oncogene family	4,21E-03
ACA1_320980	RNA recognition motif domain containing protein	1,00E-03
ACA1_216390	MIF4G domain containing protein	3,85E-04
ACA1_174910	Ribosomal protein L19	1,38E-04
ACA1_069310	CTP synthase	1,29E-02
ACA1_322560	Elongation factor Tu GTP binding domain containing protein	5,43E-04
ACA1_220170	RSL1D1 protein	4,19E-03
ACA1_292890	Ribosomal protein S17, putative	3,37E-04
ACA1_117330	Hydroxylamine reductase	1,60E-02
ACA1_070830	AcetylCoA carboxylase	1,27E-04
ACA1_325450	Ribosomal protein S8, putative	1,01E-04
Cystathionine beta synthase	CBS domain containing protein	1,47E-03
ACA1_232430	CBS domain containing protein	5,45E-02
ACA1_173800	Mitochondrial phosphate transporter, putative	8,53E-04
ACA1_326820	Eukaryotic ribosomal protein L18, putative	2,70E-04
ACA1_144430	Protein casp, putative	2,22E-04
ACA1_325250	Ribosomal protein L44, putative	4,46E-04

Annexe 5 : Regroupement des protéines en 10 groupes fonctionnels basé sur leurs termes GO.

Groupe fonctionnel n°1	Enrichment Score: 22.62
Nom du gène	Annotation du gène
ACA1_131810	ribosomal protein S21e, putative
ACA1_220040	40S ribosomal protein S3a, putative
ACA1_097000	ribosomal family s4e, putative
ACA1_288360	ribosomal protein L4/L1 family
ACA1_149890	ribosomal protein S7p/S5e, putative
ACA1_268880	ribosomal protein S9, putative
ACA1_067910	ribosomal protein S19, putative
ACA1_059460	ribosomal protein L13e, putative
ACA1_061750	ribosomal protein S26e, putative
ACA1_315760	ribosomal protein L13, putative
ACA1_034540	ribosomal protein S13p/S18e, putative
ACA1_265570	ribosomal proteins l2, RNA binding domain containing protein
ACA1_376690	60S ribosomal protein L27a, putative
ACA1_036040	ribosomal protein S7e, putative
ACA1_365780	ribosomal protein S4, putative
ACA1_068750	ribosomal protein L35, putative
ACA1_088670	60S ribosomal protein L36, putative
ACA1_174910	ribosomal protein L19e, putative
ACA1_325250	ribosomal protein L44, putative
ACA1_360200	60s Acidic ribosomal protein
ACA1_326820	eukaryotic ribosomal protein L18, putative
ACA1_151080	ribosomal protein L3, putative
ACA1_232480	ribosomal protein S23 (S12), putative
ACA1_143960	60s Acidic ribosomal protein
ACA1_064650	ribosomal S29 subunit
ACA1_034550	ribosomal protein S10p/S20e, putative
ACA1_267270	ribosomal protein L14, putative
ACA1_264110	ribosomal protein L3, putative
ACA1_191170	ribosomal protein L21e, putative
ACA1_292890	ribosomal protein S17, putative
ACA1_288920	ribosomal protein S8e, putative

Groupe fonctionnel n°2		Enrichment Score: 5.78
Nom du gène	Annotation du gène	
ACA1_093130	tryptophan-tRNA ligase	
ACA1_300880	valine-tRNA ligase	
ACA1_076880	alanine-tRNA ligase	
ACA1_069770	tyrosine-tRNA ligase	
ACA1_282850	isoleucyl-tRNA synthetase	
ACA1_132360	glutamine-tRNA ligase	
ACA1_097970	methionine-tRNA ligase	

Groupe fonctionnel n°3		Enrichment Score: 2.77
Nom du gène	Annotation du gène	
ACA1_251570	N-ethylmaleimide-sensitive factor isoform 4, putative	
ACA1_364280	sporulation proteinrelated, putative	
ACA1_369850	ATPase with chaperone activity, putative	
ACA1_157270	DEAD box RNA helicase	
ACA1_325180	ribonuclease L inhibitor family protein	

Groupe fonctionnel n°4		Enrichment Score: 2.06
Nom du gène	Annotation du gène	
ACA1_138040	elongation factor 1alpha, somatic form, putative	
ACA1_090090	elongation factor Tu GTP binding domain containing protein	
ACA1_385380	eukaryotic translation initiation factor 2, putative	
ACA1_322560	elongation factor Tu GTP binding domain containing protein	

Groupe fonctionnel n°5		Enrichment Score: 1.89
Nom du gène	Annotation du gène	
ACA1_125980	ATPdependent RNA helicase DHX8, putative	
ACA1_374600	DEAD/DEAH box helicase domain containing protein	
ACA1_157270	DEAD box RNA helicase	
ACA1_204440	hypothetical protein	
ACA1_034590	helicase conserved Cterminal domain containing protein	

Groupe fonctionnel n°6	Enrichment Score: 1.52
Nom du gène	Annotation du gène
ACA1_092970	ADPribosylation factor 1, putative
ACA1_215900	RAP1A, member of RAS oncogene family
ACA1_203650	dynamamin domain containing protein
ACA1_157930	protein sey1, putative
ACA1_289900	RAB11B protein, putative
ACA1_034510	Rho family, small GTP binding protein Rac3, putative
ACA1_165210	Ras subfamily protein
ACA1_070630	Rasrelated protein ORAB-1, putative
ACA1_174900	Rasrelated protein Rab-32, putative
ACA1_278840	Rasrelated protein Rap-1, putative
ACA1_218470	rasrelated protein Rab-21, putative
ACA1_126680	Ras family protein
ACA1_376480	RabE family small GTPase
ACA1_064820	rho family, small GTP binding protein Rac3, putative
ACA1_045310	Ras GTPase rap1b, putative

Groupe fonctionnel n°7	Enrichment Score: 1.38
Nom du gène	Annotation du gène
ACA1_271860	protein serine/threonine kinase
ACA1_014360	calcium/calmodulindependent protein kinase
ACA1_112160	dual specificity protein kinase
ACA1_376550	cell division control protein 2b, putative
ACA1_092980	serine/threonine kinase
ACA1_011260	myosin I heavy chain kinase

Groupe fonctionnel n°8	Enrichment Score: 0.87
Nom du gène	Annotation du gène
ACA1_320980	RNA recognition motif domain containing protein
ACA1_072300	RNA recognition motif domain containing protein
ACA1_175720	RNA recognition motif domain containing protein
ACA1_096950	RNA recognition motif domain containing protein
ACA1_366760	RNA recognition motif domain containing protein
ACA1_322080	RNA recognition motif domain containing protein

Groupe fonctionnel n°9	Enrichment Score: 0.19
Nom du gène	Annotation du gène
ACA1_234600	KH domain containing protein
ACA1_182370	osteoclaststimulating factor, putative
ACA1_077830	Poly(ADP-ribose) polymerase catalytic domain containing protein
ACA1_362730	ankyrin domain protein

Groupe fonctionnel n°10	Enrichment Score: 2.01E-6
Nom du gène	Annotation du gène
ACA1_376690	60S ribosomal protein L27a, putative
ACA1_049990	aldehyde dehydrogenase (NAD) family superfamily protein
ACA1_157930	protein sey1, putative
ACA1_173800	mitochondrial phosphate transporter, putative
ACA1_157860	FAD binding domain containing protein
ACA1_149310	MAPEG domain containing protein
ACA1_281230	hypothetical protein
ACA1_128450	adenine nucleotide translocator, putative
ACA1_383450	G protein coupled receptor, putative
ACA1_255140	hypoxia induced protein region protein, putative
ACA1_313730	glycosyltransferase, group 2 domain containing protein
ACA1_234810	hypothetical protein
ACA1_040810	hypothetical protein

Annexe 6 : *Legionella pneumophila* decreases velocity of *Acanthamoeba castellanii* (Mengue et al., 2017)

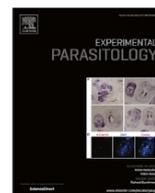
Experimental Parasitology 183 (2017) 124–127



Contents lists available at ScienceDirect

Experimental Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yexpr



Legionella pneumophila decreases velocity of *Acanthamoeba castellanii*



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

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

HIGHLIGHTS

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

ARTICLE INFO

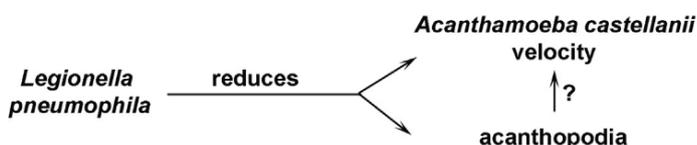
Article history:

Received 29 May 2017
Received in revised form
4 July 2017
Accepted 30 July 2017
Available online 2 August 2017

Keywords:

Acanthamoeba castellanii
Acanthopodia
Free-living amoeba
Legionella pneumophila
Velocity

GRAPHICAL ABSTRACT



ABSTRACT

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

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Amoebae of the genus *Acanthamoeba* are free-living amoebae (FLA) ubiquitous of natural and artificial aquatic environment (Marciano-Cabral and Cabral, 2003). Depending on the environmental conditions, *Acanthamoeba* exhibits two states: a metabolically active form named trophozoite that differentiates, under harsh conditions, into a resting and resistant form named cyst (Fouque et al., 2012). Trophozoites exhibit spine-like structures on

their membrane named acanthopodia used for surface adhesion (Bowers and Korn, 1969; Preston and King, 1984). *Acanthamoeba* moves using amoeboid extensions on a support (Nishigami et al., 2013). These morphological changes that look like a cell crawling are due to internal pressure of cytoplasm inducing projections of cell membrane.

Like every other protozoa, *Acanthamoeba* feed mainly by phagocytosis. In the environment, they engulf other microorganisms such as bacteria, algae, fungi or other protozoa. Several bacteria, called amoeba-resisting bacteria (ARB), have developed the ability to hijack cellular machinery in order to avoid being cleared and possibly multiply inside the host cell (Greub and Raoult, 2004). This characteristic is found in *Legionella pneumophila*, a pathogenic Gram-negative bacterium living in natural and artificial aquatic

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

E-mail address: ascel.samba@univ-poitiers.fr (A. Samba-Louaka).

environment (Borella et al., 2004). *L. pneumophila* is the causative agent of legionellosis, a pulmonary infection which can lead to death (Hilbi et al., 2011; Newton et al., 2010). Numerous studies have shown that *L. pneumophila*, when infecting its host, injects several effectors via its type IV secretion system (T4SS) that allows to modulate host's cell physiology to its own advantage (Ensminger and Isberg, 2009). Thus, *L. pneumophila* was reported to inhibit migration of phagocytes (Simon and Hilbi, 2015). We also recently showed that *Acanthamoeba* infected with *L. pneumophila* became rounded, less adherent and less motile (Mengue et al., 2016). However, how *L. pneumophila* impairs *Acanthamoeba* surface adhesion and cell migration remains unknown.

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

2. Materials and methods

2.1. Strains, culture, media

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

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

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

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

2.2. Time lapse microscopy

A. castellanii (4.5×10^3 cells) were infected with *L. pneumophila* at a MOI of 20 in one µ-Slide 8 well IbiTreat microscopy chamber (Ibidi). In parallel, uninfected *A. castellanii* were also maintained in the PAS solution for 2 h before being incubated in the PYG growth medium containing gentamicin. Live imaging started at the end of infection (or after incubation within the PAS) for about 15 h and was performed as described previously (Mengue et al., 2016).

2.3. Scanning electron microscopy

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

thin cuts using a microtome were performed followed by metallization. Cells were observed with a scanning electron microscopy (JEOL 5600Lv) at 20 kV.

2.4. Trajectory analysis

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

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

2.5. Statistics

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

3. Results

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

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

Moreover, *L. pneumophila* infection also impaired trajectory convolution, as infected individuals performed significantly less turn angle (respectively $2.24 \pm 0.17^\circ$ and $2.83 \pm 0.21^\circ$; *t*-test: $t = -2.14$; *df* = 153; $p < 0.05$) (Fig. 2). However, meander means of infected and uninfected individuals are not significantly different (respectively $2.49 \pm 0.48^\circ/\mu\text{m}$ and $1.60 \pm 0.19^\circ/\mu\text{m}$; *t*-test: $t = 1.68$; *df* = 153; $p < 0.05$). *L. pneumophila* modifies trajectory of *A. castellanii*.

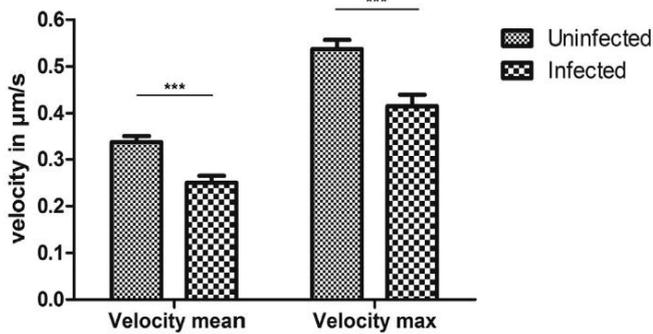


Fig. 1. Velocity mean and Velocity maximum of uninfected and infected *A. castellanii*. *A. castellanii* were infected with *L. pneumophila* at a MOI of 20 and time-lapse microscopy were performed for 15 h. Velocity represents the distance move by amoebae per unit time. The graph shows means and standard errors of the mean. *** represent $p < 0.0001$ for the velocity mean (t -test: $t = -4.49$; $df = 153$) and for the velocity maximum (t -test: $t = -3.99$; $df = 153$).

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

In order to identify how *L. pneumophila* impairs *A. castellanii* velocity, morphological changes were assessed on scanning electron microscopy. Compared to uninfected cells, infection with *L. pneumophila* seemed to induce a slight decrease of acanthopodia number (Fig. 3). *L. pneumophila* modifies the shape of the amoeba *A. castellanii*.

4. Discussion

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

Regarding the speed of mobility of uninfected *Acanthamoeba* in our study, we found $0.338 \mu\text{m/s}$. A previous report estimated an *Acanthamoeba* locomotory rate at $0.8 \mu\text{m/s}$ (Preston et al., 2001). Several parameters can explain the difference between the two studies. Preston and colleagues worked on an environmental fresh isolate that grew feeding *Escherichia coli* and/or *Aeromonas hydrophila*. They performed their locomotory experiment under Volvic mineral water that have a specific conductivity at 22°C (Preston et al., 2001). This latter could affect motility as concentration of electrolytes was shown to modify both *Acanthamoeba* adhesion and motility (Preston and King, 1984). Here, we worked with an axenic strain moving under a PYG medium at 30°C . Our findings suggest that differences in nutrient availability could impact on *A. castellanii* velocity.

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

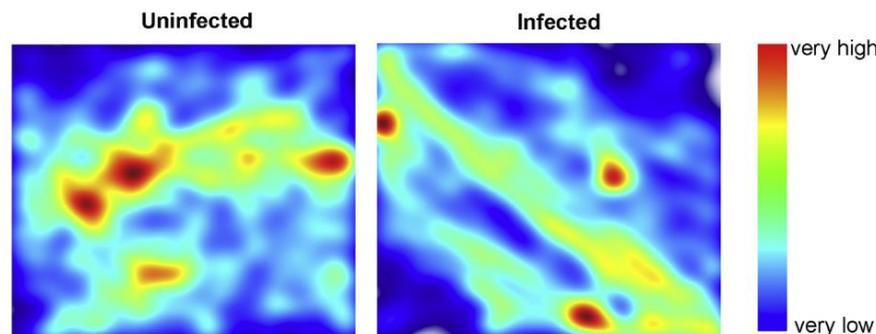


Fig. 2. Trajectory convolution of uninfected and infected *A. castellanii*. Heat maps represent *Acanthamoeba* cumulated trajectory of uninfected cells (left) and *A. castellanii* infected with *L. pneumophila* (right) (respectively $N = 77$ and $N = 78$). Blue and red denote, respectively, area with very low and very high passing.

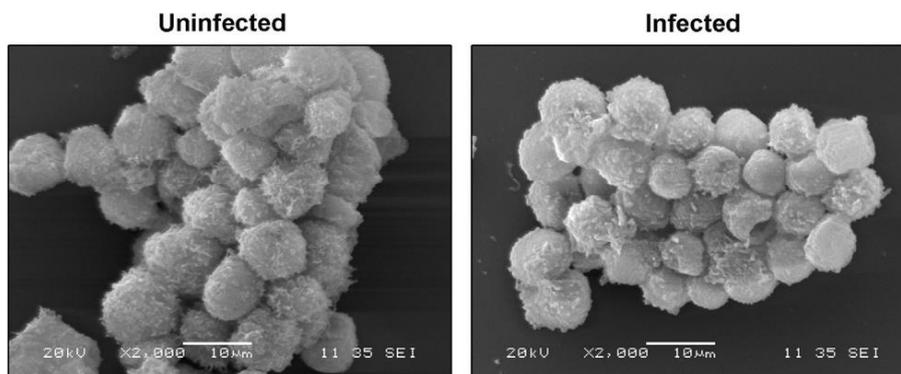


Fig. 3. Acanthopodia of uninfected and infected *A. castellanii*. *A. castellanii* were co-cultured with *L. pneumophila* for 2 h at a MOI of 20 and amoebae were incubated for 15 h. Acanthopodia were observed on scanning electron microscopy and secondary electron imaging (SEI) parameters were as follows: 20 KV, 11 mm for working distance, 35 nm objective lens aperture and a magnification of $\times 2000$.

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

5. Conclusion

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

Acknowledgments

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

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

References

- Borella, P., et al., 2004. Legionella infection risk from domestic hot water. *Emerg. Infect. Dis.* 10 (3), 457–464. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1003.020707>.
- Bowers, B., Korn, E.D., 1969. The fine structure of *Acanthamoeba castellanii* (Neff strain). II. Encystment. *J. Cell Biol.* 41 (3), 786–805.
- Cazalet, C., et al., 2004. Evidence in the *Legionella pneumophila* genome for exploitation of host cell functions and high genome plasticity. *Nat. Genet.* 36 (11), 1165–1173. <http://dx.doi.org/10.1038/ng1447>.
- Chavez-Munguia, B., Salazar-Villatoro, L., Lagunes-Guillen, A., Omana-Molina, M., Espinosa-Cantellano, M., Martinez-Palomo, A., 2013. *Acanthamoeba castellanii* cysts: new ultrastructural findings. *Parasitol. Res.* 112 (3), 1125–1130. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-012-3261-7>.
- Ensminger, A.W., Isberg, R.R., 2009. Legionella pneumophila Dot/Icm translocated substrates: a sum of parts. *Curr. Opin. Microbiol.* 12 (1), 67–73. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2008.12.004>.
- Fouque, E., Trouilhe, M.C., Thomas, V., Hartemann, P., Rodier, M.H., Hechard, Y., 2012. Cellular, biochemical, and molecular changes during encystment of free-living amoebae. *Eukaryot. Cell* 11 (4), 382–387. <http://dx.doi.org/10.1128/EC.05301-11>.
- Gonzalez-Robles, A., Salazar-Villatoro, L., Omana-Molina, M., Lorenzo-Morales, J., Martinez-Palomo, A., 2013. *Acanthamoeba royreba*: morphological features and in vitro cytopathic effect. *Exp. Parasitol.* 133 (4), 369–375. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2013.01.011>.
- Greub, G., Raoult, D., 2004. Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin. Microbiol. Rev.* 17 (2), 413–433.
- Guo, Z., Stephenson, R., Qiu, J., Zheng, S., Luo, Z.Q., 2014. A Legionella effector modulates host cytoskeletal structure by inhibiting actin polymerization. *Microbes Infect.* 16 (3), 225–236. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2013.11.007>.
- Hilbi, H., Hoffmann, C., Harrison, C.F., 2011. Legionella spp. outdoors: colonization, communication and persistence. *Environ. Microbiol. Rep.* 3 (3), 286–296. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1758-2229.2011.00247.x>.
- Liu, Y., Zhu, W., Tan, Y., Nakayasu, E.S., Staiger, C.J., Luo, Z.Q., 2017. A Legionella effector disrupts host cytoskeletal structure by cleaving actin. *PLoS Pathog.* 13 (1), e1006186. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1006186>.
- Marciano-Cabral, F., Cabral, G., 2003. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin. Microbiol. Rev.* 16 (2), 273–307.
- Mengue, L., Regnacq, M., Aucher, W., Portier, E., Hechard, Y., Samba-Louaka, A., 2016. Legionella pneumophila prevents proliferation of its natural host *Acanthamoeba castellanii*. *Sci. Rep.* 6, 36448. <http://dx.doi.org/10.1038/srep36448>.
- Newton, H.J., Ang, D.K., van Driel, I.R., Hartland, E.L., 2010. Molecular pathogenesis of infections caused by Legionella pneumophila. *Clin. Microbiol. Rev.* 23 (2), 274–298. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00052-09>.
- Nishigami, Y., et al., 2013. Reconstruction of active regular motion in amoeba extract: dynamic cooperation between sol and gel states. *PloS one* 8 (8), e70317. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0070317>.
- Okude, M., et al., 2012. Environmental chlamydiae alter the growth speed and motility of host acanthamoebae. *Microbes Environ.* 27 (4), 423–429.
- Preston, T.M., King, C.A., 1984. Amoeboid locomotion of *Acanthamoeba castellanii* with special reference to cell-substratum interactions. *J. general Microbiol.* 130 (9), 2317–2323. <http://dx.doi.org/10.1099/00221287-130-9-2317>.
- Preston, T.M., Richards, H., Wotton, R.S., 2001. Locomotion and feeding of *Acanthamoeba* at the water-air interface of ponds. *FEMS Microbiol. Lett.* 194 (2), 143–147.
- Rothmeier, E., et al., 2013. Activation of Ran GTPase by a Legionella effector promotes microtubule polymerization, pathogen vacuole motility and infection. *PLoS Pathog.* 9 (9), e1003598. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1003598>.
- Simon, S., Hilbi, H., 2015. Subversion of cell-autonomous immunity and cell migration by Legionella pneumophila effectors. *Front. Immunol.* 6, 447. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2015.00447>.
- Simon, S., Wagner, M.A., Rothmeier, E., Muller-Taubenberger, A., Hilbi, H., 2014. Icm/Dot-dependent inhibition of phagocyte migration by Legionella is antagonized by a translocated Ran GTPase activator. *Cell. Microbiol.* 16 (7), 977–992. <http://dx.doi.org/10.1111/cmi.12258>.

Résumé :

Les amibes libres sont des protistes qui colonisent des systèmes aqueux naturels ou artificiels. Certaines souches parmi le genre *Acanthamoeba* sont responsables de pathologie infectieuse chez l'Homme. Par ailleurs, en réponse à des stress environnementaux, les amibes se différencient en une forme de résistance appelée kyste, les protégeant ainsi contre les conditions de vie défavorable. Les amibes libres sont décrites comme des réservoirs environnementaux pour de nombreux pathogène de l'Homme, telle que la bactérie *Legionella pneumophila*, agent responsable d'une forme grave de pneumonie : la légionellose.

Durant ma thèse, nous nous sommes intéressés aux gènes d'amibes libres pouvant être impliqués dans la biologie de l'amibe, notamment l'enkystement, et lors de l'interaction avec *L. pneumophila*. Pour cela, plusieurs protéines d'*A. castellanii* ont été sélectionnées à partir d'une analyse protéomique d'amibes infectées par cette bactérie. La surexpression de ces gènes dans l'amibe n'affecte pas la croissance intracellulaire de *L. pneumophila*. Cependant, la surexpression de deux de ces gènes inhibe partiellement le processus d'enkystement. L'une d'entre elles, la protéine Erat, a été analysée plus en détails. C'est une N-acétyltransferase-like de la famille des GNATs, d'origine possiblement procaryotique, et dont l'expression est fortement réprimée durant l'enkystement.

L'ensemble de ces travaux a permis de développer des outils moléculaires sur le modèle *A. castellanii*, ainsi que d'améliorer la connaissance sur la physiologie de l'amibe et notamment sur le processus d'enkystement.

Mots-clefs : *Acanthamoeba castellanii*, *Legionella pneumophila*, Encystement, N-acétyltransferase, GNAT, Amibes libres

Abstract:

Free-living amoebae are protists who colonize natural and artificial environments. Some strains of the genus *Acanthamoeba* are human pathogens. In addition, in response to environmental stresses, amoebae can differentiate into a resistant form called cyst, protecting them from adverse conditions. Free-living amoebae are described as environmental reservoirs for many bacterial pathogens, such as *Legionella pneumophila*, a bacteria responsible for a serious form of pneumonia, called legionellosis.

During this study, we were interested in the genes of *A. castellanii* that could be involved in amoebal physiology, especially encystment, and during interaction with *L. pneumophila*. For this purpose, several proteins of *A. castellanii* were selected from a proteomic analysis of *L. pneumophila* infected amoebae. The gene overexpression in the amoeba did not affect the intracellular growth of *L. pneumophila*. However, the overexpression of two of these genes partially inhibited the encystment process. One of them, the Erat protein, was analyzed in more details. It is an N-acetyltransferase-like of the GNAT family, has a potential prokaryotic origin, and its expression was strongly repressed during encystment.

To conclude, this work led to the development of molecular tools on the *A. castellanii* model, as well as to improve knowledge on the amoebal physiology and in particular on the encystment process.

Key words: *Acanthamoeba castellanii*, *Legionella pneumophila*, Encystment, N-acetyltransferase, GNAT family, Free-living amoeba