THESE

Pour l'obtention du Grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS

FACULTE DES SCIENCES FONDAMENTALES ET APPLIQUEES
(Diplôme National - Arrêté du 25 mai 2016)
Ecole Doctorale : Gay Lussac – Sciences pour l'environnement
Secteur de Recherche : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

- -

Identification et caractérisation de composés produits par des bactéries environnementales pour la lutte biologique contre *Legionella pneumophila*

- -

Présentée par :

Marie-Hélène CORRE

Directeurs de Thèse :
Jean-Marc BERJEAUD, Professeur, Université de Poitiers
Julien VERDON, Maître de Conférences, Université de Poitiers

Soutenue le 10 Décembre 2018 devant la Commission d'Examen

Rapporteurs :
Ali LADRAM, Professeur, Sorbonne Université
Isabelle SCHALK, Directeur de recherche CNRS, Strasbourg

Examinateurs :
Sylvie CHEVALIER, Professeur, Université de Rouen
Sophie LECOMTE, Directeur de recherche CNRS, Bordeaux
Christophe GINEVRA, Docteur, Université de Lyon
Julien VERDON, Maître de Conférences, Université de Poitiers
Jean-Marc BERJEAUD, Professeur, Université de Poitiers

THESE

Pour l'obtention du Grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS

FACULTE DES SCIENCES FONDAMENTALES ET APPLIQUEES
(Diplôme National - Arrêté du 25 mai 2016)
Ecole Doctorale : Gay Lussac – Sciences pour l'environnement
Secteur de Recherche : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

- -

Identification et caractérisation de composés produits par des bactéries environnementales pour la lutte biologique contre *Legionella pneumophila*

- -

Présentée par :

Marie-Hélène CORRE

Directeurs de Thèse :
Jean-Marc BERJEAUD, Professeur, Université de Poitiers
Julien VERDON, Maître de Conférences, Université de Poitiers

Soutenue le 10 Décembre 2018 devant la Commission d'Examen

Rapporteurs :
Ali LADRAM, Professeur, Sorbonne Université
Isabelle SCHALK, Directeur de recherche CNRS, Strasbourg

Examinateurs :
Sylvie CHEVALIER, Professeur, Université de Rouen
Sophie LECOMTE, Directeur de recherche CNRS, Bordeaux
Christophe GINEVRA, Docteur, Université de Lyon
Julien VERDON, Maître de Conférences, Université de Poitiers
Jean-Marc BERJEAUD, Professeur, Université de Poitiers

Dans la vie, rien est à craindre, tout est à comprendre
Marie Curie

À ma famille,

Remerciements

Je n'aurai pu réaliser cette thèse sans la générosité, les conseils et la bonne humeur d'un très grand nombre de personnes. J'aimerai donc les remercier d'avoir participé à ce travail et de m'avoir soutenue pendant ces trois années.

Tout d'abord, je souhaite adresser ma gratitude à ***Didier Bouchon*** *(ancien directeur du laboratoire EBI) et à* ***Jean-Marc Berjeaud*** *(directeur actuel) pour m'avoir permise de développer ce travail de thèse au sein de leur laboratoire.*
J'aimerai remercier ***Isabelle Schalk*** *et* ***Ali Ladram****, rapporteurs de ce manuscrit, pour m'avoir fait l'honneur d'évaluer ce travail. Je souhaite également remercier Sophie Lecomte, Christophe Ginevra et Sylvie Chevalier pour avoir bien voulu faire partie de ce jury de thèse.*
Encore une fois, je tiens à remercier très sincèrement ***Jean-Marc Berjeaud****, directeur de la thèse, pour toute la confiance qu'il m'a accordé pour mener à bien ce projet. Je lui suis reconnaissante pour sa disponibilité, pour son écoute, pour ses conseils et pour les opportunités qu'il a su m'offrir (ma participation à l'ESGLI, au GDR MufoPAM). Je lui exprime également ma gratitude pour son accompagnement motivationnel lors de ma présentation à MT180. Je tiens à le remercier aussi pour ses grandes qualités humaines, sa franchise et ses valeurs. J'exprime mes remerciements à* ***Julien Verdon****, co-directeur de cette thèse, sans qui ce projet n'aurait pas pu être mis en place. Je le remercie pour toutes les opportunités qu'il a su m'offrir pendant ces trois années (la Gordon en Californie, les projets secondaires, les collaborations). Nous avons beaucoup voyagé scientifiquement tous les deux. Un de nos plus beaux moments restera aussi un des plus douloureux : la randonnée au parc Griffith de Los Angeles... Je le remercie également pour son aide pour la valorisation scientifique associée à ce travail et pour son aide dans les moments de stress. Nous avons bien rigolé tous les trois, MERCI. J'aimerai que vous sachiez tous les deux que je me suis vraiment amusée pendant ces trois années !*
Je remercie les membres de mon comité de suivi de thèse, ***Ali Ladram****,* ***Anabelle Merieau****,* ***Richard Cordaux*** *et* ***Sophie Lecomte*** *pour leur présence à mi-parcours et leurs conseils.*
J'aimerai remercier chaleureusement l'Institut de Recherche sur la Biologie de l'Insecte (IRBI) à Tours et particulièrement ***David Giron*** *et* ***Ali Khalil*** *(désolée pour le coup de la panne), pour notre collaboration et pour m'avoir accueillie dans votre laboratoire.*

Je souhaite remercier ***Vincent Delafont*** *pour sa générosité. Tu m'as beaucoup aidée dans mon travail de thèse, par ton écoute et tes conseils. Je te remercie aussi pour la relecture du manuscrit et pour la valorisation de la collection. Enfin, merci pour les pauses clopes, toujours accompagnées de bonne humeur ! Je remercie également* ***Emilie Portier*** *pour avoir bien voulu relire une partie du manuscrit.*
J'aimerai remercier très sincèrement ***Laurence Belligot****,* ***Sylvie Clercy-Morel*** *et* ***Karine Demangeau*** *pour toute la gestion administrative autour de ce projet et autour de la vie de laboratoire. Rien ne tournerai sans vous, vous êtes formidables et attentionnées et on peut toujours compter sur vous, y compris dans l'urgence.*

Je tiens à remercier ***Daniel Guyonnet****, pour sa disponibilité pour passer mes séquences, pour son écoute, les pauses café, les petits déjeuners. Tu as toujours été là pour m'écouter me plaindre et ça n'a pas dû être facile tous les jours. Alors merci à toi, pour tes valeurs humaines, ton humour, ton implication au laboratoire et ta bienveillance envers moi.*
Thomas Becking*, j'aimerai te remercier pour les moments que tu m'as accordés et pour nos échanges. Mais plus encore je te remercie pour tes qualités humaines, ton ouverture d'esprit, ton soutien et ton écoute lors de cette dernière année.*

*Je souhaite remercier **Benoit Porcheron**, pour sa grande disponibilité pour passer mes échantillons au lyoph et pour sa gentillesse. Je désire également remercier **Willy Aucher**, pour tout le temps qu'il a consacré à mes questions et pour ses conseils.*
*J'exprime ma gratitude envers **Christine Braquart-Varnier** et **Marie-Hélène Rodier** pour leurs attentions envers moi. Merci également pour votre humour contagieux.*
*Je remercie mes compagnons de bureau, **Clémence Loiseau** lors de ma première année et **Alexandre Crepin** pour le reste de la thèse. J'ai passé de bons moments avec vous. Merci Alex pour les relectures, et les critiques sur certains de mes travaux. On a bien rigolé !*
*Je tiens à remercier **Dominique Beguin** pour toutes les discussions que nous avons eu pendant la première année. Tous les matins à 7h30, j'avais mon petit bonjour dans le bureau. Tu as été d'une grande écoute et d'un bon soutien pour moi, alors je te remercie du fond du cœur pour ça. J'aimerai remercier **Christophe Souil**, pour tout le travail qu'il a fait pour nous permettre de manipuler dans de bonnes conditions et pour la préparation des milieux de culture.*

*Je désire également remercier chaleureusement **François Baty-Sorel** pour son écoute et ses conseils, de même que pour ses formations très enrichissantes. Je lui suis reconnaissante pour son accompagnement pour « ma thèse en 180 secondes ».*

*Je remercie **Stéphanie Crapart** et **Céline Lebon** pour tout leur travail associé à la préparation des salles de TPs. J'aimerai également dire merci à Stéphanie pour sa grande efficacité au laboratoire. J'aimerai exprimer ma gratitude envers les étudiants de Licence Sciences du Vivant (2016-2019) et les Master 1 PNBCM (2016-2019) de l'Université de Poitiers pour m'avoir accompagnée dans le développement de ma pédagogie universitaire.*

*J'aimerai également dire merci à **Camille Juin** avec qui j'ai tellement partagé d'émotions.. de la tristesse, de la joie (l'annonce du bébé à côté du plus bel appareil du laboratoire), c'était super ! Merci de m'avoir écouté et d'avoir été là, on a beaucoup rigolé toutes les deux.*
*Je remercie tous les doctorants, ingénieurs et stagiaires du labo (et leurs conjoints) pour tous les moments agréables que nous avons passés ensemble en Bretagne, en congrès, autour d'un café, d'un BBQ, d'une cigarette, au camping, en soirée, au canoë, au badminton ou même au tennis : **Aurélien Alifaci**, **Clément Bernard**, **Manon Dechêne-Tempier**, **Antoine Desrut**, **Florine Ecale**, **Anasthasia Legrand**, **Elodie Maisonneuve**, **Luce Mengue**, **Marie-Laure Mollichela**, **Yoann Perrin**, **Steven Rolland**, **Etienne Robino**, **Vincent Rochard**, **Marion Rocher**, **Meg Rouxel** et **Marine Vitry**. Particulièrement, j'aimerai remercier les doctorants avec qui nous avons traversé ensemble un chemin commun et parfois sinueux... **Florine** je te remercie pour ta gentillesse et ta générosité. Merci également à toi de m'avoir soulagée de quelques séances pour la fin de la thèse. Tu es une personne dévouée dans le laboratoire et à mes yeux, c'est une grande force d'avoir quelqu'un comme toi, alors ne change rien. **Meg**, tu es une fille géniale, incroyablement empathique et vivante, tant de belles qualités que j'ai toujours apprécié chez toi et pour lesquelles je te remercie. Merci à toi également pour le soutien que tu m'as accordé pendant la rédaction du manuscrit. **Steven**, tu es une personne très attachante et drôle, et moi je suis un bon public pour ce genre de choses. Alors merci à toi d'être aussi pénible car c'est une de tes plus belles qualités. Merci aussi de m'avoir pris quelques séances de TP sur la fin de thèse. En tout cas, grâce à moi, tu ne verras plus la Bretagne de la même manière. **Clément**, je te remercie pour ton incroyable générosité et ton humilité. Tu es celui avec qui j'ai partagé cette aventure au plus près, car nous sommes pratiquement arrivés ensemble au laboratoire. Je te remercie également du fond du cœur pour ta présence pendant ma rédaction, pour tes attentions et ton soutien. Pour toi **Yoann**, j'aimerai te dire merci pour ta franchise et pour ta sensibilité face à l'adversité, ce sont deux très belles qualités que tu en as en toi et qui ont fait que j'ai apprécié échanger avec toi.. **Luce**, tu es un ange tombé dans ma vie. Je te remercie du fond du cœur pour avoir été*

là pour moi, pour m'avoir écoutée dans les moments qui m'étaient difficiles et pour m'avoir soutenue. ***Antoine****, je te remercie pour ton écoute et ton empathie envers moi et pour les quelques moments sportifs que nous avons partagés.* ***Elodie****, merci à toi d'avoir été là pour moi quand ça n'allait pas. Tu as toujours eu une oreille attentive pour les confidences et tu es incroyablement douée pour me remonter le moral.* ***Aurélien****, même si nous nous sommes uniquement croisés sur cette aventure, je te remercie pour ta générosité et ton écoute. Je tiens également à remercier les stagiaires qui ont participé à ce travail. Je commencerai par* ***Anasthasia****, pour tout le travail qu'elle a accompli sur la partie criblage anti-Legionella et anti-amibe. C'était un vrai plaisir de travailler à tes côtés. Je souhaite également remercier* ***Manon****, que j'ai eu l'occasion d'encadrer en stages de Licence et en Master 2. Tu es une personne entière, ce qui m'a vraiment procuré une bouffée d'air frais sur cette troisième année ! Je suis certaine que tu t'adapteras à n'importe quel environnement grâce à ton authenticité. Je te remercie également pour ton travail de Master 2 sur la caractérisation de composés anti-amibe. Cela n'a pas toujours été facile, puisque c'était un projet qui démarrait pour nous deux, mais tu as su persévérer et aller au bout des choses et je te suis reconnaissante pour tout ça. Je souhaite remercier les autres membres de l'équipe MDE,* ***Yann Héchard****,* ***Marion Girardot****,* ***Ascel Samba*** *et* ***Christine Imbert*** *pour leur gentillesse et nos échanges pendant ces trois années.*

J'aimerai dire merci à toutes ces personnes merveilleuses avec qui j'ai passé de bons moments pendant ces 3 années : ***Pauline****,* ***Céliane****,* ***Geoffrey****,* ***Eretria****,* ***Emmanuel****,* ***Flo****,* ***Mag****,* ***Dorian****,* ***Sylvain****,* ***Loïck****,* ***Manon****,* ***Adeline****,* ***JC****,* ***Myriam****,* ***Christophe****,* ***Aurore****,* ***Stéphane****,* ***Simone****,* ***Michel****,* ***Marion****,* ***Marianne****,* ***Angéline****,* ***Sébastien****,* ***Camille****,* ***Margaux****,* ***Bertrand****,* ***Séverine****,* ***Elodie****,* ***Emilie*** *&* ***Julie****,* ***Titi****,* ***Estelle****,* ***Heïdi****,* ***Bruno****,* ***Fleur****,* ***Hugues****,* ***Côme****,* ***Flore****,* ***Paul****,* ***Chiara****,* ***Lorenzo****,* ***Franz****,* ***Momo****,* ***Alexandra****,* ***Nathan****,* ***Camille****,* ***Elisa, Sibylle, Doudy, Dude, Louise, Anya****. Sachez qu'il n'y a pas de « petits » bons moments qui ne soient pas bénéfiques. En réalité vous m'avez permis de souffler, de faire autre chose, ou juste de profiter et je vous en suis très reconnaissante.*

Je désire apporter mes remerciements à ***Roro*** *pour avoir été à mes côtés pendant ces trois années, pour m'avoir supportée dans les petits coups de déprime et accompagnée dans les joies. Sans toi, je n'aurai pas vu ces années de la même manière. MERCI*

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à mes parents, qui ont toujours su m'accorder la plus grande liberté dans mes choix de vie et qui m'ont soutenue dans chaque moment difficile. Je vous remercie également d'avoir partagé avec moi les joies de mes réussites. Vous avez su être de vrais tuteurs dans mon accomplissement personnel et dans le développement de mon estime, MERCI. De même, je souhaite remercier mes grands-parents, qui ont été pour moi une source d'inspiration à tous niveaux. Vous avez su, à travers votre amour, votre générosité, votre altruisme et vos valeurs, faire naître en moi des choix de passion.

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale 1

Partie 1 : Étude bibliographique 3

Chapitre 1. Le genre *Legionella* 3

1.1. Généralités 3

1.1.1. Historique 3

1.1.2. Taxonomie et classification 3

1.1.3. Morphologie et caractères biochimiques 4

1.1.4. Caractéristiques génomiques de *Legionella* 6

1.2. Besoins nutritionnels de *Legionella* 7

1.2.1. Besoin en L-cystéine 8

1.2.2. Besoin en fer 9

1.2.2.1. Importance du fer dans la croissance de *Legionella* 9

1.2.2.2. Homéostasie du fer chez *Legionella* 10

1.3. La légionellose 14

1.3.1. Symptômes 14

1.3.2. Diagnostic et traitements 15

1.3.3. Epidémiologie de la légionellose 17

1.3.4. Sources de contamination et facteurs de risque 18

Chapitre 2. Ecologie de *Legionella* dans les environnements d'eau douce 21

2.1. Généralités en écologie microbienne des eaux douces 21

2.1.1. Diversité microbienne des eaux douces 22

2.1.1.1. Le domaine Bacteria 22

2.1.1.2. Les Protistes 23

2.1.2. Associations microbiennes dans l'eau 24

2.1.3. Compétition bactérienne 26

2.1.3.1. Compétition par exploitation 26

2.1.3.2. Compétition par interférence 27

2.2. Interactions de *Legionella* avec d'autres microorganismes 31

2.2.1. Interactions favorisant la croissance ou la survie de *Legionella* 31

2.2.1.1. Interactions avec des bactéries chimiotrophes 31
2.2.1.2. Interactions avec des cyanobactéries 32
2.2.1.3. Interactions avec des protistes 33
2.2.2. Interactions inhibant la croissance de *Legionella* 36
2.2.2.1. Parasitisme de *Legionella* : cas de *Bdellovibrio bacteriovorus* 36
2.2.2.2. Inhibition de *Legionella* par compétition bactérienne 38
Chapitre 3. Traitements anti-*Legionella* **40**
3.1. Modes de désinfection actuels 40
3.1.1. Normes et législation françaises 40
3.1.2. Traitements physiques 41
3.1.3. Traitements chimiques 42
3.1.3.1. Biocides oxydants 42
3.1.3.2. Biocides non-oxydants 43
3.1.4. Limites des traitements actuels et problématique écologique 45
3.1.4.1. Toxicité des sous-produits chlorés 45
3.1.4.2. Corrosion des réseaux d'eau 46
3.1.4.3. Survie des légionelles dans les réseaux 46
3.2. Lutte biologique contre *Legionella* 50
3.2.1. Huiles essentielles 50
3.2.2. Composés protéiques issus d'organismes eucaryotes 52
3.2.2.1. Protéines 52
3.2.2.2. Peptides dérivés de protéines 53
3.2.2.3. Peptides antimicrobiens 54
3.2.3. Composés produits par des bactéries 55
3.2.3.1. Peptides anti-*Legionella* produit par *Staphylococcus* spp. 55
3.2.3.2. Surfactines produites par *Bacillus subtilis* 57
Objectifs de la thèse **60**
Partie 2 : Matériel et méthodes **61**
Chapitre 1. Techniques de microbiologie **61**
1.1. Échantillonnage et isolement des bactéries environnementales 61
1.2. Microorganismes et conditions de culture **62**
1.2.1. Souches microbiennes de référence 62
1.2.1.1. *Legionella pneumophila* Lens 62
1.2.1.2. *Pseudomonas fluorescens* MFE01 63

1.2.1.3. *Acanthamoeba castellanii* 63
1.2.2. Souches bactériennes environnementales 64
1.2.2.1. *Aeromonas bestiarum* PoW 257 64
1.2.2.2. *Flavobacterium* sp. PW 52 64
1.2.2.3. *Rahnella aquatilis* PoW 265 64
1.3. Mesures d'activité des bactéries environnementales sur *L. pneumophila* 65
1.3.1. Évaluation de l'activité par test de diffusion en gélose 65
1.3.2. Évaluation de l'activité par test d'inhibition à longue distance 66
1.3.3. Activité des surnageants de culture bactériens et des composés purifiés 68
1.3.3.1. Test d'activité par diffusion en gélose 68
1.3.3.2. Test d'activité par mesure de densité optique 68
1.4. Évaluation de l'activité anti-amibe de surnageants bactériens 70
Chapitre 2. Techniques de biologie moléculaire et d'analyse bio-informatique 71
2.1. Extraction d'ADN 71
2.2. Identification bactérienne par séquençage du gène codant l'ARNr 16S 71
2.2.1. Amplification du gène codant l'ARNr 16S par PCR 71
2.2.2. Séquençage 72
2.2.3. Alignement des séquences et analyse phylogénétique 74
2.3. Identification bactérienne par typage MLSA 74
2.3.1. Amplification des gènes de ménage par PCR 74
2.3.2. Séquençage 77
2.3.3. Analyse de la qualité des séquences et assemblage 78
2.3.4. Analyse phylogénétique 79
Chapitre 3. Techniques de biochimie 80
3.1. Détermination de la nature des composés anti-*Legionella* 80
3.2. Analyse et quantification de sidérophore chez *R. aquatilis* PoW 265 par la méthode au ChromeAzurol (CAS) 80
3.2.1. Détection de sidérophore en milieu CAS gélosé 81
3.2.3. Dosage de sidérophore en milieu CAS liquide 81
3.3. Mise en évidence de biosurfactants par test de diminution de la tension de surface 81
Chapitre 4. Techniques séparatives et analytiques 83
4.1. Etude d'un sidérophore anti-*Legionella* : l'aquabactine 83
4.1.1. Préparation du surnageant de culture de *R. aquatilis* PoW 265 83

4.1.2. Enrichissement de composés chélateurs de fer par chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés (IMAC) 83
4.1.3. Purification de l'aquabactine par chromatographie liquide à haute performance en phase inverse (RP-HPLC). 84
4.2. Étude d'un peptide anti-*Legionella* : la bestiaricine 85
4.2.1. Précipitation de la bestiaricine produite par *A. bestiarum* PoW 257 au sulfate d'ammonium 85
4.2.2. Pré-purification de la bestiaricine par Extraction sur Phase Solide C18 (SPE-C18) 86
4.2.3. Purification de la bestiaricine par RP-HPLC 86
4.3. Étude de biosurfactants produits par *Flavobacterium* sp. PW 52 : les flavolipides 87
4.3.1. Extraction des flavolipides à l'acétate d'éthyle 87
4.3.2. Analyse des flavolipides par RP-HPLC 87
4.4. Identification des composés par Chromatographie à Ultra haute Performance couplée à la Spectrométrie de Masse (UPLC-MS) 88
4.5. Caractérisation de composés organiques volatiles (COVs) produits par *Pseudomonas* spp. 89
4.5.1. Préparation des échantillons 89
4.5.2. Extraction des COVs par MicroExtraction sur Phase Solide (SPME) 90
4.5.3. Identification des COVs par Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (GC-MS) 90

Partie 3 : Résultats 92

Chapitre 1. Impact des bactéries environnementales dans la lutte biologique contre *L. pneumophila* 92

Publication 1 : Exploiting the richness of environmental waterborne bacterial species to find natural anti-*Legionella* active biomolecules 93

Chapitre 2. Le genre *Pseudomonas* dans la lutte biologique contre *Legionella* 121

2.1. Étude de la diversité taxonomique de *Pseudomonas* spp. isolés de communautés microbiennes d'eaux douces. 121
2.2. Caractérisation de molécules diffusibles à activité anti-*Legionella* produites par *Pseudomonas* spp. 124
2.3. Caractérisation de molécules volatiles à activité anti-*Legionella* produites par *Pseudomonas* spp. 124
2.3.1 **Publication 2** : Long-range aerial warfare : A volatile interference between *Pseudomonas* sp. and *Legionella pneumophila* 125

2.3.2. Résultats complémentaires 153
Chapitre 3. Le genre *Aeromonas* comme producteur de peptides anti-*Legionella* 155
3.1. Diversité des isolats d'*Aeromonas* spp. Issus de communautés d'eaux douces. 155
3.2. Caractérisation de la bestiaricine, un peptide anti-*Legionella* 157
3.2.1. Identification d'*A. bestiarum* PoW 257 157
3.2.2. Détermination de la nature du composé impliqué dans l'activité anti-*Legionella* 158
3.2.3. Purification et identification du peptide anti-*Legionella* 159
Chapitre 4. L'aquabactine, un sidérophore de type catécholate, agit comme composé anti-*Legionella* 162
4.1. Production d'un composé anti-*Legionella* par la souche *R. aquatilis* PoW 265 162
4.2. Purification et identification de l'aquabactine 164
4.3. Expériences complémentaires 168
Chapitre 5. Les flavolipides, une classe de biosurfactant encore non explorée pour son activité antimicrobienne 170
5.1. Distribution de *Flavobacterium* spp. au sein des communautés d'eaux douces. 170
5.2. Activité anti-*Legionella* des flavolipides produits par *Flavobacterium* sp. PW52 172
5.2.1. Détermination de la nature du composé impliqué dans l'activité anti-*Legionella* 172
5.2.2. Caractérisation des flavolipides produits par *Flavobacterium* sp. PW 52 174
5.2.3. Étude de l'activité anti-amibe des flavolipides produits par Flavobacterium sp. PW 52 178
Partie 4. Discussion 181
Conclusion générales et perspectives 200
Références bibliographiques 205
Annexe 238

Liste des abréviations

ACES : Acide N-2-acétamido-amino-éthano-sulfonique

ApoLp-III : Apolipophorine III

BCYE : *Buffered Charcoal Yeast Extract*

BYE : *Buffered Yeast Extract*

Cad-OH : Cadavérine Hydroxylée

CAS : ChromeAzurol S

CDI : Inhibition Contact-Dépendant

Cit : Acide Citrique

ClO_2 : Dioxyde de Chlore

CMIT : 5-chloro-2-méthyl-4-isothiazolin-3-one

COVs : Composés Organiques Volatiles

CSA : Culot Sulfate Ammonium

Da : Dalton

DBNPA : 2,2-dibromo-3-nitro-propianomide

DHB : 2,3-dihydroxybenzène

EB : Extrait Brut

ECHA : Agence Européenne des Produits Chimiques

EDTA : Éthylène Diamine TétraAcétique

EPS : Substances Polymériques Extracellulaires

ESI-MS : Spectrométrie de Masse à Ionisation ElectroSpray

FA : Acide Formique

Fe^{2+} : Fer ferreux

Fe^{3+} : Fer ferrique

GC-MS : Chromatographie Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse

GFP : *Green Fluorescent Protein*

HAAs : Acides haloacétiques

HDTMA : HexaDecylTriMethylAmmonium

HE : Huile Essentielle

HPLC : Chromatographie Liquide à Haute Performance

IMAC : Chromatographie d'Affinité sur Ions Immobilisés

InVs : Institut de Veille Sanitaire

iTOL : *Interactive Tree Of Life*

LB : *Lysogeny-Broth*

LBmod : *Lysogeny-Broth* modifié

lbt : Légiobactine

LC-MS : Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse

LCV : *Legionella Containing Vacuole*

LPS : Lipopolysaccharide

MavN : *More regions allowing vacuolar colocalization N*

MEGA : *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*

MFS : Superfamille des facilitateurs majeurs

MIT : 2-méthyl-4-isothiazolin-3-one

MLCV : Membrane de la vacuole réplicative contenant *Legionella*

MLSA : Analyse par Séquençage MultiLocus

MUSCLE : *MUltiple Sequence Comparison by Log-Expectation*

NIST : *National Institute of Standards and Technology*

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PAS : *Page's Amoeba Saline*

PC : Phosphatidylcholine

PCR : Réaction en chaîne par polymérase

PDMS : PolyDiMéthylSiloxane

PoW : *Pond Water*

PW : *Pool Water*

PYG : *Peptone Yeast Glucose*

QS : Quorum Sensing

R2A : *Reasoner's 2 A Agar*

REACH : *Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals*

RW : *River Water*

Sg : Sérogroupe

SPDs : Sous-Produits de Désinfection

SPE : Extraction sur Phase Solide

SPME : MicroExtraction en Phase Solide

T6SS : Système de Sécrétion de Type VI

TAR : Tours AéroRéfrigérantes

TFA : Acide TriFluoroacétique

THMs : Trihalométhanes

TW : *Tap Water*

UFC : Unité Formant une Colonie

UPLC : Chromatographie Liquide à Ultra Haute Performance

UVs : Ultra-Violets

VBNC : Etat Viable mais Non Cultivable

WW : *Well Water*

Liste des figures

Figure 1. Caractéristiques morphologiques de *Legionella*. ---------- 5

Figure 2. Structure de la L-cystéine et de son produit d'oxydation, la cystine. ------ 9

Figure 3. Voies d'acquisition du fer chez *Legionella*. ----------12

Figure 4. Répartition des méthodes de diagnostic de légionellose en France, de 1997 à 2017. ----------16

Figure 5. Taux d'incidence et nombre de cas de légionellose en France entre 1988 et 2017. ----------17

Figure 6. Dissémination de *Legionella* à partir de sources naturelles d'eau douce jusqu'à l'infection chez l'homme. ----------19

Figure 7. Description des écosystèmes d'eau douce naturels et anthropisés. ------21

Figure 8. Structure générale d'un biofilm mature. ----------25

Figure 9. Mécanismes d'inhibition dépendant du contact entre deux bactéries. ---30

Figure 10. Diversité taxonomique des protistes décrits pour héberger des bactéries du genre *Legionella*. ----------34

Figure 11. Cycle de vie intracellulaire de *Legionella*. ----------35

Figure 12. Cycle de prédation de *Bdellovibrio bacteriovorus* chez les bactéries à Gram négatif. ----------37

Figure 13. Analyse des risques en fonction du niveau de désinfection de l'eau.----44

Figure 14. Résistance des amibes aux traitements biocides et survie des légionelles dans les réseaux. ----------47

Figure 15. Huiles essentielles à activité anti-*Legionella*. ----------51

Figure 16. Structure générale des surfactines. ----------57

Figure 17. Test d'inhibition de *L. pneumophila* par diffusion en gélose. ----------65

Figure 18. Test d'inhibition de *L. pneumophila* à longue distance. ----------67

Figure 19. Caractéristiques des populations d'amibes observées par cytométrie de flux. ----------69

Figure 20. Schéma de plaque de séquençage utilisée pour l'identification bactérienne des isolats environnementaux. ----------73

Figure 21. Principe de la technique d'analyse par séquençage multilocus (MLSA) appliquée à l'identification d'une espèce d'*Aeromonas* sp. ----------75

Figure 22. Test de diminution de la tension de surface.----------82

Figure 23. Photo d'un vial utilisé en GC-MS pour l'identification des COVs produits par des souches de *Pseudomonas* spp. ----------90

Figure 24. Distribution des souches environnementales de *Pseudomonas* par sous-collection d'eau en fonction de leur activité anti-*Legionella*. ---------- 121

Figure 25. Profils d'inhibition des isolats de *Pseudomonas* sp. environnementaux contre *L. pneumophila* Lens. ---------- 122

Figure 26. Distribution phylogénétique des isolats de *Pseudomonas* sp. contenus dans les sous-collections d'eaux environnementales. ---------- 123

Figure 27. Quantification par fluorescence de la croissance de *L. pneumophila* Lens GFP en présence de la souche *Pseudomonas* sp. PW 329. ---------- 153

Figure 28. Profil de production des COVs émis par la souche *Pseudomonas* sp. PW 329. ---------- 154

Figure 29. Profils d'inhibition de trois isolats d'*Aeromonas* sp. provenant de trois réservoirs d'eau douce différents. ---------- 155

Figure 30. Distribution taxonomique des isolats d'*Aeromonas* sp. issus de quatre sous-collections d'eau environnementale. ---------- 156

Figure 31. Identification de la souche *A. bestiarum* PoW 257 par analyse MLSA. 157

Figure 32. Activité anti-*Legionella* du surnageant de culture d'*A. bestiarum* PoW 257. ---------- 158

Figure 33. Évaluation de l'activité anti-*Legionella* du composé produit par *A. bestiarum* PoW 257 après précipitation au sulfate d'ammonium et pré-purification par SPE-C18. ---------- 159

Figure 34. Chromatogramme obtenu par HPLC en phase inverse de la fraction F40-80 obtenue après SPE-C18. ---------- 160

Figure 35. Spectre de masse de la bestiaricine obtenu par analyse ESI-MS en mode positif. ---------- 161

Figure 36. *Rahnella aquatilis* PoW 265 produit un composé anti-*Legionella* et un sidérophore. ---------- 162

Figure 37. Production d'un composé actif contre *L. pneumophila* régulée par la disponibilité en fer dans le milieu de croissance.---------- 163

Figure 38. Activité anti-*Legionella* de composés chélateurs de fer (III) produits par *R. aquatilis* PoW 265. ---------- 165

Figure 39. Purification de l'aquabactine par RP-HPLC. ---------- 166

Figure 40. Spectre de masse de l'aquabactine et structure potentielle du sidérophore anti-*Legionella*. ---------- 167

Figure 41. Profils d'activité des souches *E. coli* DH5α, *L. pneumophila* Lens et *R. aquatilis* PoW 265 contre ces mêmes bactéries. ---------- 168

Figure 42. Profils d'inhibition de trois isolats de *Flavobacterium* sp. provenant des trois sous-collections PW, RW et WW.---------- 170

Figure 43. Distribution taxonomique des isolats de *Flavobacterium* sp. associée à leur profils d'activité anti-Legionella. ---------- 171

Figure 44. Production de biosurfactants par la souche *Flavobacterium* sp. PW 52. ---------- 173

Figure 45. Analyse du mélange de composés présents dans l'EB de *Flavobacterium* sp. PW 52 par RP-HPLC.---------- 175

Figure 46. Chromatogramme obtenu après analyse LC-MS de l'EB de flavolipides produits par *Flavobacterium* sp. PW 52. ---------- 176

Figure 47. Identification des flavolipides produits par l'isolat *Flavobacterium* sp. PW 52 par LC-MS.---------- 177

Figure 48. Évaluation de l'effet du surnageant de culture de *Flavobacterium* sp. PW52 sur *A. castellanii*. ---------- 179

Figure 49. Activité anti-amibe des fractions HPLC collectées après analyse de l'EB de flavolipides produits par *Flavobacterium* sp. PW 52.---------- 180

Figure 50. Bilan des composés produits par des bactéries environnementales de l'eau douce pour une lutte biologique contre *L. pneumophila*.---------- 197

Liste des tableaux

Tableau 1. Liste des peptides hémolytiques produits par des bactéries du genre Staphylococcus et ayant des propriétés anti-*Legionella* connues. ----------56

Tableau 2. Liste des gènes utilisés et caractéristiques des amorces associées pour l'identification de la souche *Aeromonas* sp. PoW 257 par analyse MLSA.----------76

Tableau 3. Tailles et positions des séquences utilisées dans l'alignement des six gènes de ménage pour l'analyse MLSA. ----------78

Tableau 4. Gradient d'élution utilisé pour l'enrichissement en composés chélateurs de fer ferrique sur chromatographie d'affinité sur ions immobilisés (IMAC). ---------84

Tableau 5. Gradient d'élution utilisé pour la purification de l'aquabactine par chromatographie en phase inverse. ----------85

Tableau 6. Gradient d'élution utilisé pour la purification de la bestiaricine par chromatographie en phase inverse. ----------86

Tableau 7. Gradient d'élution utilisé pour l'analyse des flavolipides par chromatographie en phase inverse. ----------88

Tableau 8. Gradients d'élution utilisés pour l'identification des composés par couplage LC-MS. ----------89

Introduction générale

Les circuits et réseaux d'eau subissent épisodiquement des problèmes de contamination pouvant entrainer une dégradation de la qualité microbiologique des eaux circulantes. Ils peuvent ainsi constituer des sites de prolifération et de dissémination pour toute une variété de germes pathogènes opportunistes comme *Legionella pneumophila*, l'agent pathogène responsable de la légionellose.

L. pneumophila est un membre des communautés microbiennes naturelles des environnements d'eau douce. À partir de ces réservoirs, elle peut coloniser des sites hydriques artificiels comme les réseaux d'eau chaude sanitaire (ex. robinetteries, douches), les conditionneurs d'air ou encore les tours aéroréfrigérantes (TARs).

Dans les réseaux d'eau, la plupart des microorganismes adhèrent aux surfaces pour y former des biofilms. Ces biofilms constituent des réservoirs importants pour *L. pneumophila*, lui permettant de persister pendant de longues périodes à l'intérieur de ces structures. La présence de *L. pneumophila* dans ces environnements est également corrélée à celle de protistes phagotrophiques comme les amibes. Généralement, ces organismes se nourrissent par phagocytose de bactéries retrouvées principalement à la surface des biofilms. Toutefois, *L. pneumophila* a la capacité de résister à la phagocytose, ce qui lui permet de se multiplier activement à l'intérieur de ces organismes. Une fois cette phase réplicative terminée, *L. pneumophila* est libérée par l'amibe sous forme transmissive dans l'environnement.

Pour réduire le développement de *Legionella* dans les réseaux d'eau, des traitements chimiques sont utilisés. Les traitements principalement utilisés sont des biocides non oxydants (thiazolone, amines halogénées et aldéhydes) et des biocides oxydants (chlore, dioxyde de chlore, monochloramine). Ces biocides présentent l'avantage d'éliminer une large gamme de microorganismes.

Toutefois, malgré l'application de tels traitements, *L. pneumophila* est capable de persister et de se multiplier dans les installations industrielles ou dans les réseaux de distribution d'eau. Outre certains paramètres physico-chimiques (pH, température) qui peuvent influer sur l'efficacité de ce type de traitement, plusieurs paramètres biologiques peuvent également favoriser la persistance de *Legionella* dans les réseaux. Parmi ces paramètres, la résistance des amibes à ces désinfectants est un facteur favorisant la dissémination de *Legionella*. En plus de leur rôle dans la multiplication des légionelles, les amibes fournissent à cette bactérie une protection

face à ce type de biocide. De plus, *Legionella* peut adopter différents états physiologiques dans l'environnement (forme viable mais non cultivable, forme sessile), dont certains ont déjà montré être plus résistants aux biocides, particulièrement en sortie d'amibes. Enfin, l'utilisation de ces biocides n'est pas suffisante pour éliminer les biofilms polymicrobiens des réseaux d'eaux. En effet, ces composés sont souvent capables d'éliminer les microorganismes retrouvés à la surface des biofilms, mais n'éliminent pas les biofilms matures. En conséquence, les désinfectants sont très efficaces sur *Legionella* sous forme planctonique mais présentent un effet limité sur la bactérie lorsqu'elle se trouve à l'intérieur de biofilms.

En plus de ce problème d'efficacité, les biocides oxydants sont responsables de la formation de sous-produits de désinfections (SPDs) tels que les trihalométhanes (THMs) et les acides haloacétiques (HAAs). Ces composés, hautement toxiques pour les organismes aquatiques et pour l'homme, font l'objet de surveillance en Europe (réglementation REACH). Enfin, les désinfectants sont également impliqués dans la corrosion de certains matériaux utilisés dans la conception des réseaux d'eau, ce qui altère la qualité des eaux circulantes dans les processus de potabilisation.

Par conséquent, des molécules d'origine naturelle sont recherchées comme solution alternative dans la lutte contre *Legionella.* Ces molécules doivent être spécifiques de la cible et biodégradables mais aussi présenter un faible impact sur l'homme et l'environnement. Jusqu'à présent, peu de molécules ont été décrites dans la littérature dans un contexte de lutte biologique. Toutefois, il a été montré que certaines bactéries issues de la même niche écologique que *Legionella*, étaient capables d'inhiber la croissance de ce pathogène. À l'exception de la surfactine produite par *Bacillus subtilis* qui présente des propriétés anti-*Legionella*, les composés impliqués dans ce type d'activité n'ont pas été décrits.

Ce projet de thèse avait pour objectif de caractériser de nouveaux agents actifs contre *L. pneumophila* et produits naturellement par des bactéries d'eau douce. La première partie de ce travail a été d'identifier des souches environnementales productrices de molécules anti-*Legionella* issues de différents types d'eaux douces. La deuxième partie de ce travail a consisté à purifier et caractériser les composés anti-*Legionella* produits par quatre souches environnementales et appartenant aux genres *Pseudomonas*, *Rahnella*, *Flavobacterium* et *Aeromonas*.

Partie 1 : Étude bibliographique

Chapitre 1. Le genre *Legionella*

1.1. Généralités

1.1.1. Historique

En juillet 1976, une épidémie de pneumonie se déclara lors du 58ème congrès de la légion américaine à Philadelphie. Parmi les 182 personnes atteintes, 29 d'entre elles décédèrent des suites de l'infection. En 1977, une étude approfondie en épidémiologie proposa le nom de maladie du Légionnaire en hommage aux vétérans décédés lors de ce congrès (Fraser *et al.* , 1977) . Cette même année, J.E. McDade isola pour la première fois l'agent responsable de l'épidémie de Philadelphie, et associa de manière rétrospective son implication dans d'autres cas épidémiques non élucidés (McDade *et al.* , 1977). Le genre bactérien *Legionella* a finalement été établi en 1979 en hommage aux légionnaires touchés lors de l'épidémie de Philadelphie (Brenner *et al.* , 1979).

1.1.2. Taxonomie et classification

Le genre *Legionella* appartient à la famille des *Legionellaceae,* au sein de l'ordre des Legionellales et à la classe gamma du phylum des protéobactéries dans laquelle le seul genre représenté est *Legionella*. En 1980, une étude basée sur des critères biochimiques a proposé d'insérer deux genres supplémentaires dans la famille des *Legionellaceae* : les genres *Fluoribacter* et *Tatlockia* (Garrity *et al.* , 1980). Toutefois, des travaux ultérieurs basés sur le séquençage du gène de l'ARN ribosomique 16S de ces souches ont montré leur appartenance au genre *Legionella* (Fry *et al.* , 1991). Une des espèces les plus proches, d'un point de vue phylogénétique, des bactéries du genre *Legionella* est *Coxiella burnetii*, l'agent responsable de la fièvre Q chez l'homme (Adeleke *et al.* , 1996). Ces deux genres bactériens présentent notamment des caractéristiques communes sur leur mode de vie intracellulaire, de même que sur le mode d'infection de leurs cellules hôtes (Qiu and Luo, 2017; Segal *et al.* , 2005). Toutefois, de récents travaux ont mis en évidence que l'ordre des Légionellales

contiendrait environ 500 genres bactériens différents, alors que seulement six sont actuellement décrits sur la base de données génomiques (*Legionella*, *Occultobacter*, *Berkiella*, *Coxiella*, *Aquicella*, *Ricketsiella*) (Duron *et al.* , 2018; Graells *et al.* , 2018).

Actuellement, le genre *Legionella* comprend 62 espèces et plus de 70 sérogroupes (Bajrai *et al.* , 2016; Campocasso *et al.* , 2012; Edelstein *et al.* , 2012; Fields *et al.* , 2002; Huang *et al.* , 2009; Kuroki *et al.* , 2007; La Scola, 2004; Luck *et al.* , 2010; Palmer *et al.* , 2016; Park *et al.* , 2004; Pearce *et al.* , 2012; Rizzardi *et al.* , 2015; Yang *et al.* , 2012). L'espèce *L. pneumophila* comprend à elle seule quinze sérogroupes, tandis que les espèces *L. bozemanii*, *L. feelei*, *L. hackeliae*, *L. longbeachae*, *L. quinlivanii*, *L. sainthelensi*, *L. erythra* et *L. spiritenis* présentent chacune deux sérogroupes. Les autres espèces ne comprennent qu'un seul sérogroupe. Parmi l'ensemble des espèces décrites à ce jour, 23 ont déjà été impliquées dans des maladies infectieuses (Newton *et al.* , 2010).

1.1.3. Morphologie et caractères biochimiques

Les bactéries de la famille des *Legionellaceae* sont des bacilles à Gram négatif, aérobies, non sporulés et non capsulés. Leur taille est comprise entre 0,3 à 0,9 µm en largeur et entre 2 à 20 µm en longueur (Diederen, 2008). En fonction des conditions environnementales, la plupart des espèces de *Legionella* sont mobiles grâce à la présence d'un flagelle en position polaire ou latérale, à l'exception de *L. oakridgensis*, *L. londiniensis* et *L. longbeachae* (**Figure 1.A.**) (Appelt and Heuner, 2017; Rodgers *et al.* , 1980).

La paroi de *Legionella* présente également certaines particularités de structure au niveau de son lipopolysaccharide (LPS) de même que dans sa composition en ubiquinones et en phospholipides. Son LPS contient 40 à 90% d'acides gras ramifiés à l'inverse d'un grand nombre d'autres bactéries à Gram négatif (Lambert and Moss, 1989; Moss and Dees, 1979; Moss *et al.* , 1977). De plus, chaque espèce de *Legionella* montre un profil distinct dans sa composition en acides gras ramifiés. L'espèce *pneumophila* se distingue des autres espèces par sa grande richesse en acide 14-

méthylpentadécanoïque (iC16:0) (Lambert and Moss, 1989; Verdon *et al.* , 2011) . Cette composition en acides gras branchés affecte notamment la fluidité membranaire de la bactérie (Zhang and Rock, 2008). Enfin, l'antigène O porté par le LPS permet d'informer sur le sérogroupe de chaque souche de *Legionella* (Ciesielski *et al.* , 1986). Ces bactéries sont également caractérisées au niveau de la membrane plasmique par la présence d'ubiquinones comportant 9 à 14 unités isoprénoïques, contrairement à la plupart des bactéries à Gram négatif qui n'en contiennent que 6 à 8 (Benson and Fields, 1998; Lambert and Moss, 1989). Enfin, la membrane de *Legionella* est composée d'environ 30% de phosphatidylcholine (PC), un phospholipide majoritairement trouvé dans les cellules eucaryotes (Conover *et al.* , 2008; Hindahl and Iglewski, 1984).

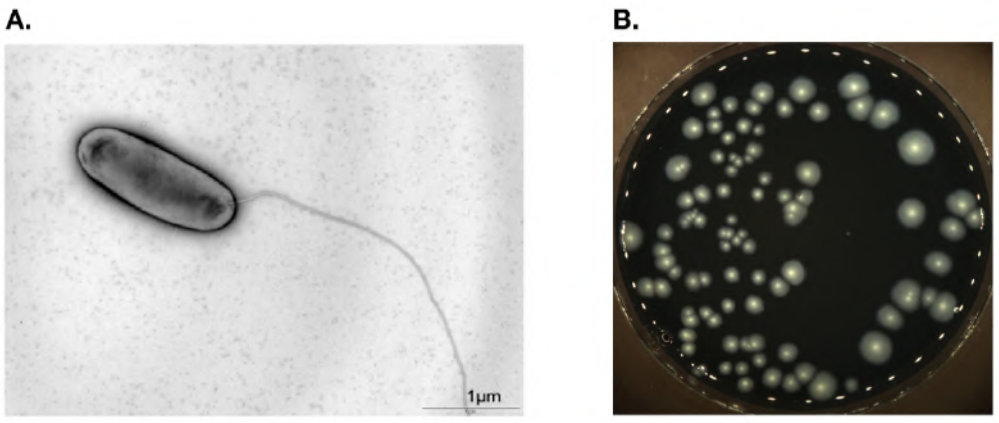


Figure 1. Caractéristiques morphologiques de *Legionella*. A. *Legionella pneumophila* vue en microscopie électronique (Sahr *et al.* , 2009). **B.** Croissance de *Legionella* sur milieu BCYE.

Au niveau de leurs spécificités biochimiques, les bactéries du genre *Legionella* sont toutes organotrophes et utilisent des acides aminés comme source d'énergie et de carbone (Fliermans, 1996). Elles ne sont pas capables de fermenter le glucose, ni de réduire les nitrates. Elles sont uréase-négatives et produisent une ß-lactamase. Ces bactéries sont également toutes catalase-positives et oxydase-négatives à l'exception de *L. worsleiensis (Ox-/Cat-) et L. anisa (Ox+/Cat+)*. Finalement, ces

bactéries produisent un pigment marron, la pyomélanine, qui joue un rôle dans l'acquisition du fer pour leur croissance (Chatfield and Cianciotto, 2007; Zheng *et al.* , 2013). En laboratoire, *Legionella* se développe sur un milieu gélosé BCYE (Buffered Charcoal Yeast Extract) et montre, après 96H de culture, des colonies grises de consistance muqueuse (Feeley *et al.* , 1979) (**Figure 1.B.**).

1.1.4. Caractéristiques génomiques de *Legionella*

Depuis quinze ans, l'analyse et la comparaison des génomes de *Legionella* spp. a grandement facilité la compréhension du mode de vie et de la pathogénie de cette bactérie. Les premières données de génomique proviennent de la publication du génome de trois souches de *L. pneumophila* Sérogroupe 1 (Sg1) en 2004 : les souches Paris, Lens, et Philadelphia 1 (Cazalet *et al.* , 2004; Chien *et al.* , 2004). La souche Lens a été isolée lors d'une épidémie de légionellose en France en 2003, tandis que la souche Paris, initialement isolée en 1987, est retrouvée dans un grand nombre de cas de légionellose d'origine endémique (Aurell *et al.* , 2003; Nguyen *et al.* , 2005). Enfin, la souche Philadelphia 1 dérive de la souche initialement isolée en 1976 lors de l'épidémie aux États-Unis (Fraser *et al.* , 1977). Depuis, cinq autres souches de *L. pneumophila* Sg1 (Corby, Alcoy, 130b, Lorraine, HL06041035), une souche de Sg12 (570-CO-H) et deux de Sg6 (LPE509, Thunder Bay) ont été séquencées (Amaro *et al.* , 2012; D'Auria *et al.* , 2010; Gomez-Valero *et al.* , 2011; Khan *et al.* , 2013; Ma *et al.* , 2013; Schroeder *et al.* , 2010; Steinert *et al.* , 2007).

Le génome des souches de *L. pneumophila* est constitué d'un seul chromosome circulaire allant de 3,3 Mb (Mégabases) à 3,6 Mb et contient un enrichissement en GC d'environ 38%. Récemment, l'espèce *L. polyplacis* a été décrite comme un symbiote mutualiste obligatoire du poux Anoploures (*Polyplax* spp.) (Říhová *et al.* , 2017). Le séquençage du génome de *L. polyplacis* a estimé sa taille à 0,529 Mb. Une telle réduction génomique reste cependant unique au sein du genre *Legionella*.

Les souches de *L. pneumophila* Lens, Paris et Lorraine possèdent chacune un plasmide supplémentaire de 131 Kb (Kilobases), 59 Kb et 150 Kb respectivement

(Cazalet *et al.* , 2004; Gomez-Valero and Buchrieser, 2013; Gomez-Valero *et al.* , 2011). Des analyses comparatives de ces génomes ont également permis de mettre en évidence l'existence de 2405 gènes orthologues (« *core genome* ») au sein de l'espèce *L. pneumophila.* De la même façon, 154 à 271 gènes spécifiques de chaque souche de *L. pneumophila* ont pu être identifiés, correspondant environ à 10% du génome de chacune d'entre elles (Gomez-Valero and Buchrieser, 2013). L'ensemble de ces génomes contient également des régions favorisant la plasticité par échanges horizontaux entre les différentes souches de *Legionella* et concerne le système de sécrétion de type IVA (SST4A) et l'îlot de pathogénicité LpPI-1 (Brassinga *et al.* , 2003; Cazalet *et al.* , 2004; Chien *et al.* , 2004; Doléans-Jordheim *et al.* , 2006; Franco *et al.* , 2009; Gomez-Valero *et al.* , 2011). La connaissance de ces génomes a également permis de mettre en évidence la présence d'un grand nombre de gènes codants des protéines contenant des motifs similaires à ceux trouvés au sein de protéines eucaryotes (Brüggemann *et al.* , 2006; de Felipe *et al.* , 2005; Lurie-Weinberger *et al.* , 2010). Ces protéines, collectivement nommées « eukaryotic-like proteins » sont impliquées dans la modulation des activités cellulaires des cellules hôtes, ce qui représente un processus essentiel dans la réplication intracellulaire et la virulence de *Legionella*. Cette particularité est également observée chez d'autres bactéries intracellulaires telles que *Rickettsia belli* ou *Wolbachia* (Ogata *et al.* , 2006; Walker *et al.* , 2007), mais *Legionella* semble en posséder une plus grande variété (Gomez-Valero and Buchrieser, 2013). Des analyses phylogénétiques suggèrent que beaucoup de ces protéines ont été acquises par transfert horizontal de gènes (Cazalet *et al.* , 2004; 2008; Gomez-Valero and Buchrieser, 2013). Ceci est notamment le cas du gène *spl* provenant du transfert d'un protozoaire à *Legionella* (Rolando *et al.* , 2016).

1.2. Besoins nutritionnels de *Legionella*

Legionella présente des besoins stricts pour sa croissance et ne se développe pas sur des milieux de culture classiques. En laboratoire, le milieu BCYE utilisé pour sa croissance contient du charbon actif permettant de capturer les radicaux libres

toxiques pour *Legionella*, de l'extrait de levure fournissant la plupart des acides aminés essentiels à sa croissance et de l'ACES (acide N2-acétamido-amino-éthano-sulfonique) permettant de favoriser un pH optimum de croissance à 6,9 (Feeley *et al.* , 1979; Hoffman *et al.* , 1983). Certains acides aminés sont essentiels à sa croissance incluant l'arginine, la cystéine, la méthionine, la sérine, la thréonine et la valine (George *et al.* , 1980). En plus de ces acides aminés, la croissance de *Legionella* est stimulée en présence de certains ions métalliques de calcium (Ca^{2+}), de magnésium (Mg^{2+}), de zinc (Zn^{2+}) et de fer (Fe^{2+}/Fe^{3+}) (Reeves *et al.* , 1981). Parmi les besoins en acides aminés et en métaux décrits à ce jour, le fer et la L-cystéine sont deux éléments indispensables pour *Legionella* (Feeley *et al.* , 1979). Ces deux éléments ont donc fait l'objet de plusieurs travaux afin de mieux comprendre leurs rôles dans la croissance de *Legionella.*

1.2.1. Besoin en L-cystéine

L. pneumophila requiert un apport important en L-cystéine dans son milieu de croissance (~ 0,5 mM) (Ewann and Hoffman, 2006). De ce fait, sa concentration dans les milieux de culture bactériologiques est insuffisante pour permettre la croissance de la bactérie. En conséquence, l'auxotrophie de *Legionella* pour cet acide aminé a grandement participé aux difficultés de mise en culture des Légionelles observée initialement en laboratoire (Feeley *et al.* , 1978). En 2006, une étude a montré que l'incapacité de *Legionella* à synthétiser la L-cystéine était liée à l'absence de deux enzymes clés dans sa biosynthèse : la sérine O-acétyltransférase et la cystéine synthase. Cette observation a été complétée par l'absence des gènes codants pour ces enzymes au sein du génome de *L. pneumophila* (Ewann and Hoffman, 2006).

La cystéine est un acide aminé caractérisé par la présence d'un groupement thiol (-SH) au niveau de sa structure (**Figure 2**) et est impliquée dans la formation de ponts disulfures dans les protéines. Cependant, la fonction thiol peut être facilement oxydée en condition aérobie, aboutissant à la formation de la cystine, constituée de deux résidus de cystéines reliés entre eux par un pont disulfure (**Figure 2**). Ce phénomène d'oxydation est notamment favorisé par la présence d'espèces réactives à l'oxygène

(ROS) telles que l'ion superoxyde (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le radical hydroxyle ($OH^\bullet$) (Jones *et al.* , 2004). L'oxydation de la cystéine libre est également favorisée par la présence de pyrophosphate de fer en condition aérobie (Ewann and Hoffman, 2006). Toutefois, *Legionella* ne possède pas la capacité d'utiliser la cystine oxydée pour sa croissance, à la différence d'autres bactéries telles que *Neisseria gonorrhoeae* et *Bordetella pertussi* (Carifo and Catlin, 1973; Pine *et al.* , 1979; Stainer and Scholte, 1970). Des concentrations de L-cystéine en excès (~ 3 mM) sont donc nécessaires pour permettre la croissance de ces bactéries en laboratoire. Enfin, la croissance intracellulaire de *Legionella* n'est pas impactée par l'absence de L-cystéine dans son milieu. Dans cette condition, il a été montré que *Legionella* pouvait directement utiliser la L-cystéine synthétisée par son hôte (Wieland *et al.* , 2005).

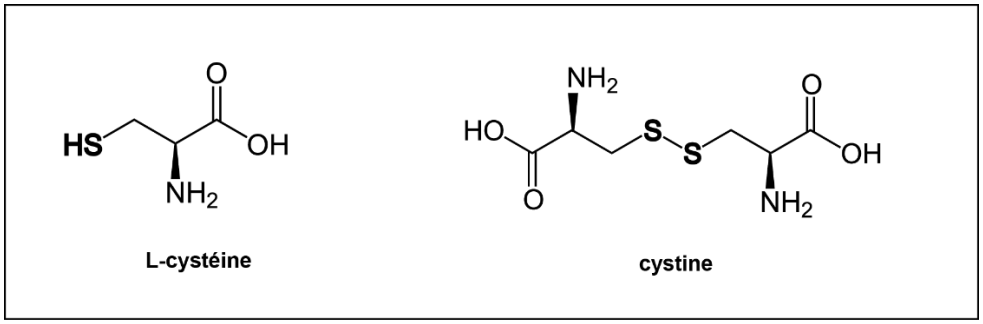


Figure 2. Structure de la L-cystéine et de son produit d'oxydation, la cystine. La L-cystéine est un élément essentiel à la croissance de *Legionella*. Elle est facilement oxydée en présence d'oxygène au niveau de sa fonction thiol (-SH), aboutissant à la formation d'un composé non assimilable par la bactérie, la cystine.

1.2.2. Besoin en fer

1.2.2.1. Importance du fer dans la croissance de *Legionella*

Le fer est un élément clé de la croissance de *L. pneumophila* (Reeves *et al.* , 1981). Sa persistance dans les circuits d'eau en acier (alliage de fer et de carbone) est notamment expliquée par ce besoin nutritionnel (States *et al.* , 1985). Dans l'environnement, le fer est retrouvé sous deux états : une forme ferreuse réduite (Fe^{2+})

et une forme ferrique oxydée (Fe^{3+}). Grâce à cette flexibilité ionique, il agit comme un acteur important d'un grand nombre de réactions cellulaires. Comme chez d'autres bactéries, le fer est utilisé par *L. pneumophila* pour son rôle de cofacteur dans des réactions enzymatiques comprenant la superoxyde dismutase et l'aconitase (Mengaud and Horwitz, 1993). Enfin, des travaux récents suggèrent l'importance du fer dans la croissance intracellulaire de *Legionella* (Isaac *et al.* , 2015; Portier *et al.* , 2014). Pour une croissance optimale, cette bactérie nécessite des concentrations en fer entre 10 et 15 µM (Johnson *et al.* , 1991; Mengaud and Horwitz, 1993; Reeves *et al.* , 1983). Toutefois, en milieu défini *Legionella* requiert une concentration inférieure à 1 µM (James *et al.* , 1995).

1.2.2.2. Homéostasie du fer chez *Legionella*

Bien que le fer soit le quatrième élément le plus abondant de la croûte terrestre, sa biodisponibilité est toutefois réduite dans les milieux aérobies. En présence d'oxygène, le Fe^{3+} sera impliqué dans la formation d'hydroxydes ferriques insolubles (Bullen *et al.* , 1978; Neilands, 1981a; 1981b). Dans ces conditions, le fer sous forme ferrique devient un facteur limitant dans l'environnement, et particulièrement pour le développement de *Legionella*. Le fer ferreux (Fe^{2+}) présente quant à lui une meilleure solubilité. Toutefois cette forme est retrouvée à un pH environnemental faible et dans des conditions anoxiques. En effet, en présence d'oxygène le fer ferreux suivra la réaction de Fenton, conduisant à la formation de Fe^{3+} et d'un radical hydroxyde ($HO^{\bullet}$), ce dernier étant hautement toxique pour les bactéries (Cornelis *et al.* , 2011; Wardman and Candeias, 1996). Pour s'affranchir de ces limites et garantir une homéostasie du fer efficace, *Legionella* utilise différents mécanismes d'acquisition du fer (Cianciotto, 2015).

L'homéostasie cellulaire du fer chez *Legionella* est contrôlée par la protéine Fur (Hickey and Cianciotto, 1994). Cette protéine agit comme répresseur de transcription en réponse à la présence de fer dans le milieu intracellulaire de la bactérie. Lorsque la concentration intracellulaire en fer est suffisante, les ions Fe^{2+} présents s'associent au répresseur Fur, induisant un changement de conformation de la protéine. La

protéine Fur couplée au Fe^{2+} va ensuite se fixer au niveau de la séquence promotrice de gènes impliqués dans l'acquisition du fer (Bagg and Neilands, 1987). En revanche, dans des conditions de carence en fer, la protéine Fur reste libre, induisant la transcription des gènes impliqués dans l'acquisition et le stockage du fer. Dans cette dernière condition, *Legionella* utilise deux principaux modes d'assimilation du fer : une voie d'acquisition du fer ferrique médiée par la production de sidérophores et une voie d'acquisition du fer ferreux par le biais du système FeoB (**Figure 3**).

- **Voie d'acquisition du fer ferrique médiée par la sécrétion de la légiobactine**

Dans le premier mode d'acquisition du fer, l'acquisition du fer ferrique est assurée par la sécrétion de la légiobactine (lbt), un sidérophore de type polycarboxylate de 437 Dalton (Da) (**Figure 3**) (Allard *et al.* , 2009; Burnside *et al.* , 2015; Liles *et al.* , 2000). Sa production est gouvernée à partir de l'expression de deux gènes (*lbtA*, *lbtB*) autorégulés par le fer (Allard *et al.* , 2006). La lbt est dans un premier temps synthétisée grâce à l'enzyme LbtA (Legiobactin biosynthesis protein A), qui présente une homologie avec d'autres synthétases de sidérophores (Allard *et al.* , 2006). La lbt est ensuite transportée à travers la membrane interne de *Legionella* par le biais du transporteur membranaire LbtB, un membre de la superfamille des facilitateurs majeurs (MFS) (Allard *et al.* , 2006; 2009).

Le système de maturation du cytochrome C est également impliqué dans le transport de la lbt. En effet, il a été montré que le cytochrome c4 pouvait faciliter la maturation du sidérophore en donnant des électrons et en maintenant un bon état redox au niveau du périplasme (Naylor and Cianciotto, 2004; Yip *et al.* , 2011). Toutefois le processus d'export de la lbt vers le milieu extracellulaire reste encore à déterminer, bien que ce type de mécanisme ait déjà été décrit chez plusieurs entérobactéries (Grass, 2006).

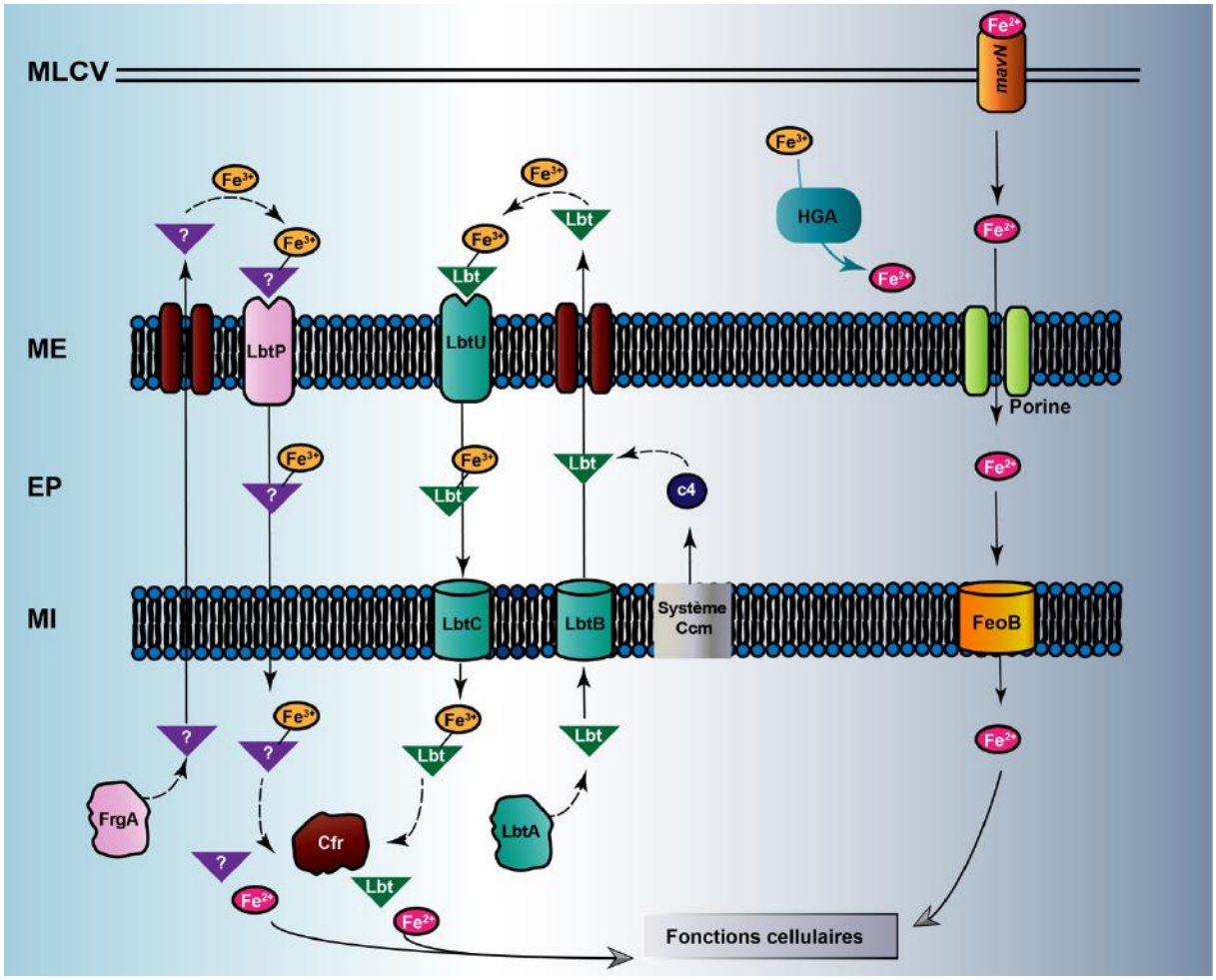


Figure 3. Voies d'acquisition du fer chez *Legionella.* L'assimilation du fer chez *Legionella* est gouvernée par deux systèmes principaux : l'acquisition du fer sous forme ferrique (Fe^{3+}) par la production de sidérophores (à gauche), et l'assimilation du fer ferreux (Fe^{2+}) par le système FeoB (à droite). Abréviations : MLCV (membrane de la vacuole réplicative contenant *Legionella*), ME (membrane externe), EP (espace périplasmique), MI (membrane interne).

Après avoir piégé le fer ferrique environnemental, la ferrilégiobactine (Lbt-Fe^{3+}) est reconnue à la surface cellulaire par le récepteur membranaire LbtU (Chatfield *et al.* , 2011). Récemment un nouveau récepteur LbtP a été décrit chez *L. pneumophila*, ayant un rôle similaire à LbtU (O'Connor *et al.* , 2016). Ces travaux soulèvent l'hypothèse que *Legionella* produit un deuxième sidérophore encore non-identifié qui pourrait être importé par le biais du récepteur LbtP. En corrélation avec cette hypothèse, le gène *frgA* (ferric regulated gene A) code pour une synthétase à sidérophore qui est non essentielle dans la production de la lbt (Allard *et al.* , 2006; Hickey and Cianciotto, 1997). La protéine FrgA est une enzyme présentant de fortes homologies avec plusieurs autres synthétases à hydroxamates produites par d'autres bactéries (Hickey and Cianciotto, 1997). Enfin, la présence de deux boîtes Fur dans la région promotrice du gène *frgA* supporte l'idée d'une régulation par le fer. A la différence d'un grand nombre de récepteurs à sidérophores, LbtU ne montre pas d'homologie de structure avec d'autres récepteurs à sidérophores TonB-dépendants. Cette observation est ajoutée au fait que *L. pneumophila* ne code pas pour des gènes de récepteurs TonB-dépendants, suggérant que LbtU est un nouveau type de récepteur dans l'acquisition du fer qui utilise une mécanistique différente (Chatfield *et al.* , 2011). Après son entrée dans l'espace périplasmique, la Lbt-Fe^{3+} traverse la membrane interne grâce à la protéine LbtC, un autre membre de la famille MFS (Burnside *et al.* , 2015; Chatfield *et al.* , 2012). Après avoir été délivré dans le cytoplasme, le fer est alors réduit sous une forme assimilable (Fe^{2+}) grâce à une réductase (Cfr) (James *et al.* , 1997; Poch and Johnson, 1993). Finalement, une fois dans le cytoplasme, la Lbt pourra être recyclée, comme cela a déjà été décrit chez d'autres bactéries (Cianciotto, 2015).

- **Voie d'acquisition du fer ferreux médiée par le système FeoB**

La deuxième forme d'acquisition du fer chez *L. pneumophila* correspond à l'assimilation du fer ferreux à travers l'action d'une protéine de la membrane interne, FeoB (**Figure 3**) (Robey and Cianciotto, 2002). Dans ce système, le Fe^{2+} libre entre dans l'espace périplasmique par un mécanisme de diffusion à travers une porine

située sur la membrane externe de *Legionella* (Cartron *et al.* , 2006). Des études ont montré que *Legionella* produisait un pigment marron, appelé pyomélanine, qui avait la capacité de réduire le fer ferrique extracellulaire (Chatfield and Cianciotto, 2007; Zheng *et al.* , 2013). La pyomélanine est un mélange d'acide homogentisique (HGA) et d'HGA-mélanine (Steinert *et al.* , 2001). Son action permet de former une importante source de Fe^{2+}, capable d'être assimilée par le système FeoB (Chatfield and Cianciotto, 2007). Plus récemment, des travaux ont également identifié un transporteur membranaire MavN (*More regions allowing vacuolar colocalization N*), responsable de la régulation de l'acquisition du fer ferreux lors de la croissance intracellulaire de *Legionella* (Isaac *et al.* , 2015; Portier *et al.* , 2014). Cette protéine possède 10 domaines transmembranaires et présente la capacité de se fixer au niveau de la surface de la vacuole réplicative de *Legionella* (MLCV), facilitant ainsi l'acquisition du fer ferreux pendant sa croissance intracellulaire (**Figure 3**). Des analyses comparatives de génomes entre différentes espèces de *Legionella* et d'autres bactéries intracellulaires ont récemment permis de mettre en évidence que ce gène *mavN* était également présent chez *Ricketsiella grylii* (Burstein *et al.* , 2016). Par l'assimilation du fer ferreux à l'intérieur de la vacuole réplicative de *Legionella*, MavN fournit également une importante quantité de fer ferreux pouvant être assimilée par la voie FeoB.

1.3. La légionellose

La légionellose est une maladie causée par l'inhalation de microgouttelettes d'eau provenant d'aérosols contaminés. À ce jour, un seul cas de contamination interhumaine a été mis en évidence lors d'une épidémie de légionellose au Portugal (Borges *et al.* , 2016; Correia *et al.* , 2016).

1.3.1. Symptômes

Le terme légionellose inclut trois formes cliniques provoquées par les bactéries du genre *Legionella* : la fièvre de Pontiac, la maladie du légionnaire et une forme extra-pulmonaire de la maladie. La fièvre de Pontiac est un état pseudo-grippal

accompagné d'une fièvre pouvant monter jusqu'à 41°C. Il s'agit d'une forme non-pulmonaire de la maladie qui ne met pas le pronostic vital en jeu (Tossa *et al.* , 2006). Elle se guérit de manière spontanée après 5 jours. Cette affection, de par son évolution bénigne et spontanément résolutive, est rarement diagnostiquée. Cette forme de la maladie doit son nom à une épidémie de fièvre ayant eu lieu dans un bâtiment de la ville de Pontiac dans le Michigan en 1968 (Glick *et al.* , 1978). La deuxième forme de légionellose correspond à maladie du légionnaire. Il s'agit de la forme pulmonaire de la maladie qui peut être de gravité variable (Beauté, 2017). Elle se traduit par des symptômes similaires aux pneumonies causées par d'autres bactéries pathogènes : fièvre supérieure à 39°C, perte d'appétit, bronchite, douleurs musculaires, faiblesse. Les examens radiologiques montrent une atteinte pulmonaire, pouvant être accompagnée d'un épanchement pleural pour un tiers des patients. Enfin, dans 9,3% des cas diagnostiqués, cette maladie entraîne le décès de la personne atteinte. Cette forme de la maladie doit son nom à l'épidémie de légionellose initialement décrite en 1976 lors d'un congrès à Philadelphie (Fraser *et al.* , 1977). Enfin, les manifestations de la légionellose sous une forme extra-pulmonaire peuvent être associées ou non à une pneumonie. Il s'agit d'une forme plus rare de la maladie mais sa gravité est importante. Elle peut se traduire par des atteintes neurologiques, rénales, musculaires, articulaires et des atteintes digestives. Ces manifestations surviennent essentiellement chez les personnes immunodéprimées (McClelland *et al.* , 2004).

1.3.2. Diagnostic et traitements

De par sa ressemblance avec d'autres pneumonies bactériennes, le diagnostic de la légionellose est essentiel et doit se faire rapidement afin de pouvoir instaurer un traitement adapté. Le diagnostic peut être fait par l'utilisation de techniques de culture à partir de sécrétions bronchiques ou de biopsies pulmonaires. Toutefois, cette approche requiert une croissance longue en milieu spécifique pour *Legionella*. Le développement d'une méthode de détection d'antigènes urinaires a grandement amélioré le diagnostic de la maladie et l'initiation rapide d'un traitement approprié

(Berdal *et al.* , 1979) (**Figure 4**). Actuellement, il s'agit du test diagnostic le plus utilisé (Beauté, 2017; Beauté *et al.* , 2013). Depuis les dix dernières années, le nombre de cas déclarés a significativement augmenté grâce à la sensibilité de ce test et à la déclaration obligatoire de la maladie depuis 1987. Toutefois, cette technique, qui ne repose pas sur une étape de mise en culture, est limitée à la détection de *L. pneumophila* Sg1 (Cunha *et al.* , 2016).

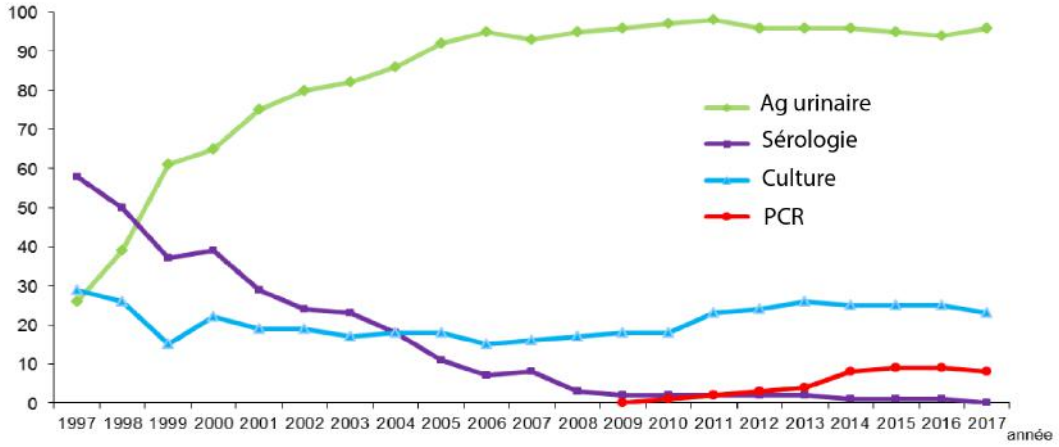


Figure 4. Répartition des méthodes de diagnostic de légionellose en France, de 1997 à 2017 (données InVs, 2017).

Dans les cas de légionellose ne concernant pas les souches de *L. pneumophila* Sg1, des méthodes basées sur l'amplification d'acide nucléiques (PCR) permettent de fournir un diagnostic de haute spécificité pour les autres sérogroupes de *Legionella*. Plusieurs méthodes de PCR rapides basées sur l'identification des *L. pneumophila* non Sg1 ont alors été développées ces dernières années (Maze *et al.* , 2014; Mérault *et al.* , 2011).

Enfin, les bactéries du genre *Legionella* sont des bactéries intracellulaires et les antibiotiques choisis doivent pouvoir agir à l'intérieur des cellules infectées. À l'heure actuelle, les familles d'antibiotiques les plus utilisées pour traiter la légionellose sont les macrolides, les tétracyclines, les kétolides et les quinolones (azithromycine, doxycycline, levofloxacine) (Bruin *et al.* , 2012; Kac and Fagon, 2002; Roig and Rello, 2003).

1.3.3. Epidémiologie de la légionellose

L'institut de veille sanitaire (InVS) est en charge, depuis 1996, de répertorier l'incidence des cas de légionellose afin de suivre son évolution. Depuis dix ans, le nombre de cas déclarés à fortement augmenté en France (206 cas en 1997, 1630 cas en 2017) (Beauté, 2017; Campese *et al.* , 2015; données InVs, 2017) (**Figure 5**).

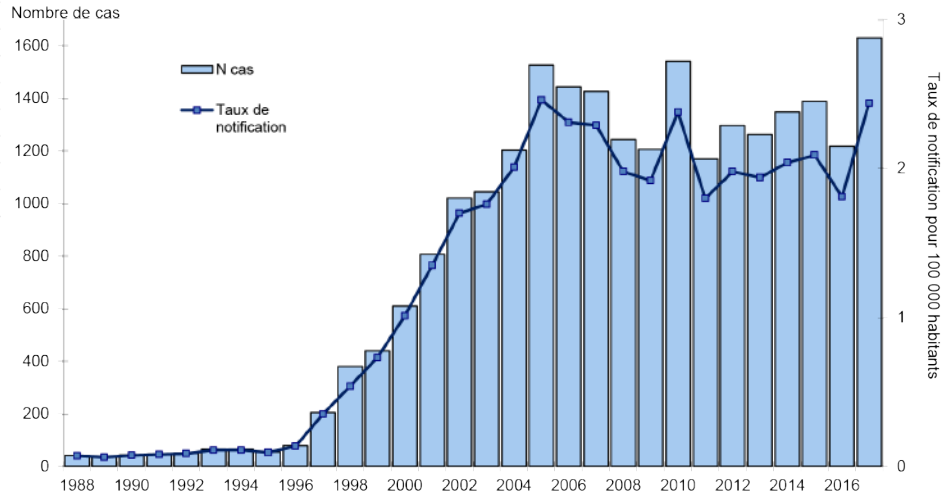


Figure 5. Taux d'incidence et nombre de cas de légionellose en France entre 1988 et 2017 (données InVs, 2017).

Cette augmentation est principalement expliquée par le renforcement du système de surveillance et par l'amélioration des pratiques de diagnostic. Du mois de janvier au mois de juillet 2018, 1 047 cas de légionellose ont été enregistrés en France. En comparaison, 619 cas avaient été enregistrés durant cette même période en 2017. D'après l'ensemble des données fournies par l'InVs, 2017 est l'année qui comptabilise le plus grand nombre de cas de légionellose. En Europe, 30 532 cas ont été rapportés entre 2011 et 2015 (Beauté, 2017). Parmi l'ensemble des pays concernés, la France, l'Allemagne, l'Italie et l'Espagne comptent pour 70,3% des cas de légionellose en Europe. Aux États-Unis, 5000 cas sont reportés chaque année (Dooling *et al.* , 2015). Enfin, en Australie, le nombre de cas moyen de légionellose est de 500 cas par an (The department of Health Australian Government, 2006).

A travers le monde, l'espèce *L. pneumophila* est responsable de 91,5% des cas de légionellose parmi lesquels 84,2% concernent spécifiquement *L. pneumophila* Sg1 (Beauté, 2017; Fields *et al.* , 2002; Helbig *et al.* , 2002; Yu *et al.* , 2002). Dans les autres cas, les espèces de *Legionella* impliquées sont *L. longbeachae* (3,9% des cas), *L. bozemanii* (2,4% des cas), *L. micdadei, L. dumoffii, L. feeleii, L. wadsworthii*, et *L. anisa* (2,2% des cas au total) (Yu *et al.* , 2002). Cette distribution n'est toutefois pas retrouvée en Australie et en Nouvelle-Zélande, pays pour lesquels *L. pneumophila* est impliquée dans 54% des cas de légionellose alors que *L. longbeachae* est responsable de 45% des cas (Isenman *et al.* , 2016; Kenagy *et al.* , 2017).

1.3.4. Sources de contamination et facteurs de risque

Les bactéries du genre *Legionella* sont des bactéries naturellement présentes dans les écosystèmes d'eau douce (**Figure 6**) (Fliermans *et al.* , 1981; Fliermans, 1996; Qin *et al.* , 2013). Plusieurs espèces sont également retrouvées dans les composts et dans les sols terreux aux États-Unis, en Australie et en Thaïlande (Casati *et al.* , 2010; Currie *et al.* , 2014; Koide *et al.* , 2001; 1999; Pravinkumar *et al.* , 2010; Steele *et al.* , 1990; Travis *et al.* , 2012). La plupart du temps, ces sources ne sont pas impliquées dans la transmission directe du pathogène chez l'homme à l'exception des bains publics naturels retrouvés au Japon et à Taiwan (Furuhata *et al.* , 2004; Hsu *et al.* , 2006). *Legionella* est connue pour persister et coloniser les réseaux d'eaux potables même après l'application de traitements de l'eau (Farhat *et al.* , 2012) (**Figure 6**).

Plusieurs travaux ont alors montré que *Legionella* pouvait coloniser la plupart des environnements anthropisés : stations d'épuration, réseaux domestiques, hôpitaux, restaurants, bains publics, hôtels… (Al-Matawah *et al.* , 2012; Alary and Joly, 1992; Cowgill *et al.* , 2005; Kwon *et al.* , 2011; Lee *et al.* , 2010; O'Loughlin *et al.* , 2007). La présence de *Legionella* dans de tels environnements explique notamment son mode de contamination chez l'homme par l'inhalation d'aérosols contaminés générés par les douches, les robinets, les spas ou encore les TARs. Ces contaminations sont la plupart du temps associées à certains facteurs de risques chez l'homme (**Figure 6**).

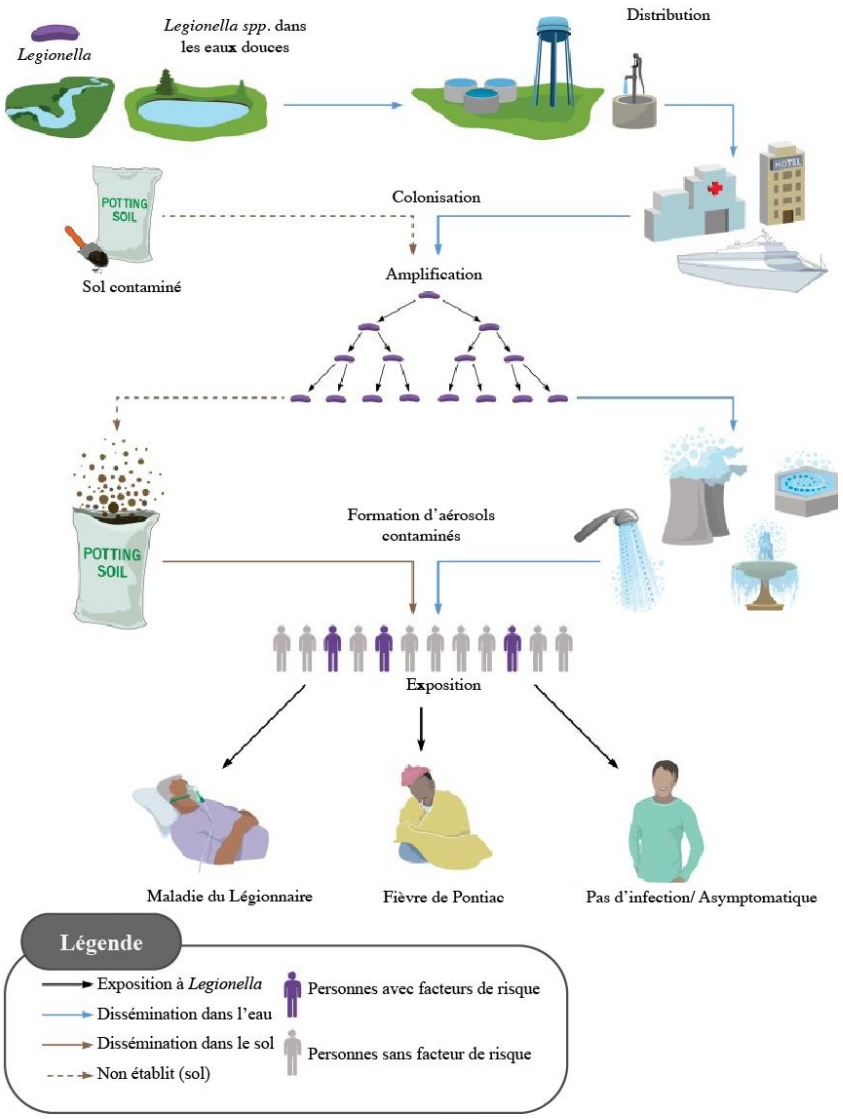


Figure 6. Dissémination de *Legionella* à partir de sources naturelles d'eau douce jusqu'à l'infection chez l'homme (adapté de (Mercante et Winchell, 2015)**).** Les légionelles provenant de sources d'eaux douces vont être retrouvées à faible concentration dans des points de distribution d'eau où elles vont pouvoir coloniser des réseaux d'eau (hôpitaux, réseaux domestiques). Des paramètres environnementaux favorables à leur croissance vont conduire à leur multiplication dans ces systèmes. La formation d'aérosols contaminés va être provoquée par l'intermédiaire de réfrigérants ou de douches personnelles, mais également à partir de sols contaminés. L'exposition de l'homme à ces aérosols pourra conduire au déclenchement de la maladie, notamment chez les individus qui présentent certains facteurs de risques (immunosuppression, cancer, SIDA, fragilité pulmonaire).

Les personnes hospitalisées ou immunodéprimées sont notamment sujettes à la légionellose à travers les équipements respiratoires hospitaliers (Blatt *et al.* , 1993). Les hommes de plus de 50 ans ayant une fragilité pulmonaire ou une immunosuppression sont également particulièrement touchés par la maladie (Marston *et al.* , 1994). Enfin, d'autres personnes présentent également plus de risques de contracter la maladie tels que les fumeurs, les personnes revenant d'un voyage à l'étranger, les diabétiques et les personnes atteintes par un cancer ou par le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) (Marston *et al.* , 1994; Sandkovsky *et al.* , 2008; Straus *et al.* , 1996).

Chapitre 2. Ecologie de *Legionella* dans les environnements d'eau douce

2.1. Généralités en écologie microbienne des eaux douces

Les environnements d'eau douce peuvent être naturels (rivières, mares, étangs) ou anthropisés (robinets, circuits d'eau, ballons d'eau chaude sanitaire) (**Figure 7**). Les écosystèmes naturels d'eau douce représentent plus de 3% de la surface terrestre (Downing *et al.* , 2006). Ces écosystèmes sont séparés en deux catégories distinctes qui tiennent compte de la dynamique des eaux présentes dans ces réservoirs : **(1)** les milieux lentiques qui regroupent l'ensemble des eaux calmes et **(2)** les milieux lotiques qui regroupent les eaux courantes. Les milieux aquatiques anthropisés résultent quant à eux de la transformation de milieux naturels par l'homme à des fins de consommation et de loisirs (agriculture, potabilisation de l'eau, réseaux, piscines, spas).

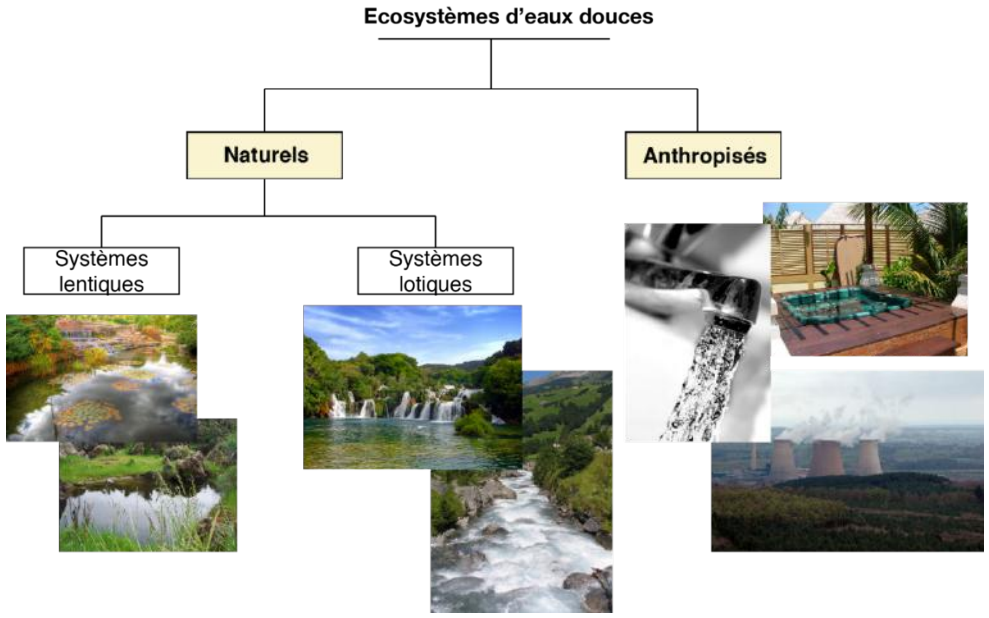


Figure 7. Description des écosystèmes d'eau douce naturels et anthropisés. Les systèmes naturels regroupent l'ensemble des réservoirs d'eau douce et intègrent les eaux calmes (écosystèmes lentiques) et les eaux courantes (écosystèmes lotiques). Les systèmes anthropisés décrivent les réseaux de distribution d'eau et les réservoirs artificiels.

La diversité taxonomique des microorganismes retrouvés au sein des environnements d'eau douce regroupe les domaines Bacteria, Eukarya et Archaea ainsi que les virus, et représentent en partie l'arbre phylogénétique du vivant (Woese *et al.* , 1990). La suite de ce chapitre apporte des connaissances générales sur les microorganismes qui composent les écosystèmes d'eau douce et qui appartiennent aux domaines Bacteria et Eukarya. Le domaine Eukarya comporte aussi bien des microorganismes simples (e.g. protistes) que des macroorganismes complexes (e.g. métazoaires, plantes). Toutefois, la description du domaine Eukarya dans ce chapitre ne concernera que les protistes. Le domaine Archaea étant majoritairement décrit au sein d'écosystèmes extrêmophiles (lacs hypersalins, eaux chaudes T°C >80°C et eaux acides), il ne sera pas abordé dans ce chapitre (Post, 1977).

2.1.1. Diversité microbienne des eaux douces

2.1.1.1. Le domaine Bacteria

Le domaine Bacteria représente l'embranchement de microorganismes le plus diversifié sur Terre. Sur la base des données de séquençage obtenues jusqu'à présent, ce domaine est composé de 92 phyla bactériens (Hug *et al.* , 2016). Les bactéries sont retrouvées dans de nombreux habitats et jouent un rôle essentiel dans la régulation des flux énergétiques et de nutriments dans les systèmes aquatiques (Veldkamp, 1975). La flore bactérienne des eaux naturelles et anthropisées peut être variable en fonction de nombreux critères physiques, chimiques et biologiques (Kaevska *et al.* , 2016). Ces critères incluent notamment la température de l'eau, le pH, la présence de produits chimiques, la force des courants, de même que la présence d'organismes aquatiques supérieurs (Jordaan et Bezuidenhout, 2012; Qin *et al.* , 2016). Toutefois, et malgré l'importance de ces différences écologiques, il existe une diversité bactérienne globalement retrouvée dans l'ensemble de ces écosystèmes d'eau douce (Newton et McLellan, 2015). Parmi les méthodes utilisées pour l'identification des bactéries, l'analyse de la séquence du gène codant l'ARNr 16S et son application en séquençage à haut débit ont grandement facilité la connaissance de la diversité bactérienne au sein de ces environnements (Kurilkina *et al.* , 2016; Wu *et al.* , 2007; Zwart *et al.* , 2002). Ce gène présente l'avantage de

comporter à la fois des régions hautement conservées et des régions variables entre les bactéries, ce qui le rend suffisamment informatif pour des études de diversité globale. De cette manière, il a été estimé que 54% des communautés bactériennes d'eau douce étaient identiques entre plusieurs rivières et lacs d'Europe, d'Amérique du Nord et d'Asie (Zwart *et al.* , 2002). Les principaux phyla bactériens identifiés à partir des écosystèmes d'eau douce sont les Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes et Cyanobacteria (Jin *et al.* , 2018; Li *et al.* , 2017; Lin *et al.* , 2017). Bien que ces phyla soient globalement retrouvés avec la même fréquence dans ces environnements, leur abondance reste variable entre les réservoirs d'eaux et dépend notamment des facteurs physico-chimiques et biologiques de l'échantillon d'eau étudié. À titre d'exemple, il a notamment été montré qu'un traitement de potabilisation de l'eau induisait une variation des proportions relatives des phyla bactériens les plus représentés dans l'eau douce (Pinto *et al.* , 2012).

2.1.1.2. Les Protistes

Les microorganismes eucaryotes, communément regroupés sous le terme de Protistes, représentent un groupe très divers d'organismes cellulaires simples (Whittaker et Margulis, 1978). Bien que ces microorganismes aient été jusqu'à présent moins étudiés que les bactéries, leur rôle en écologie microbienne commence à être bien compris (Caron *et al.* , 2008). Les protistes sont généralement divisés en deux groupes principaux qui les différencient en fonction de leur type trophique : les protistes photosynthétiques autotrophes et les phagoprotistes hétérotrophes (Caron *et al.* , 2008). Les protistes photosynthétiques incluent une grande variété d'algues unicellulaires, de diatomées et de dinoflagellés (Godhe *et al.* , 2008). Ces organismes contiennent de la chlorophylle, leur permettant d'absorber l'énergie lumineuse pour la synthèse de leur source de carbone par photosynthèse. Les protistes hétérotrophes nécessitent quant à eux d'obtenir leur ressources nutritionnelles à partir de matière organique et se nourrissent le plus généralement de bactéries ou de matière organique en décomposition (Arndt *et al.* ; Parry, 2004). Cette seconde catégorie de microorganismes comprend notamment les amibes, les flagellés et les ciliés. Les protistes sont reconnus comme des contributeurs majeurs de la régulation de la biomasse microbienne des écosystèmes d'eau douce (Arndt *et al.* ; Sherr et Sherr,

2002). Il existe une grande diversité de microorganismes eucaryotes au sein des environnements d'eau douce. Plusieurs travaux ont montré que les groupes Diplonemidae, Fungi, Cryptomycota, Aphelida et Perkinsozoa étaient fréquemment identifiés dans ces écosystèmes (Chen *et al.* , 2008; Lefèvre *et al.* , 2008; Lefranc *et al.* , 2005; Lepere *et al.* , 2010). Plus récemment, un travail a porté sur l'étude de la diversité de ces microorganismes au sein de plusieurs rivières en France et a montré que les groupes Viridiplantae, Alveolata et Fungi étaient les plus représentés en terme d'abondance. Toutefois, d'autres microorganismes associés aux groupes Stramenophiles, Rhizaria, Choanoflagellida, Amoebozoa, Ichthyosporea, Cryptophyta et Haptophyta ont également été identifiés à partir de ces échantillons (Debroas *et al.* , 2017).

2.1.2. Associations microbiennes dans l'eau

Dans la majorité des réservoirs d'eau douce, les microorganismes adhèrent aux surfaces pour y former des biofilms. Ces structures microbiennes sont retrouvées dans les environnements aquatiques tels que les fonds des rivières et dans les canalisations. Un biofilm est défini comme une communauté de microorganismes complexe, adhérée à une surface et enchâssée dans une matrice de substances polymériques extracellulaires (EPS) qui est produite par les organismes qui la composent (Costerton *et al.* , 1995; Nikolaev et Plakunov, 2007) (**Figure 8**). La matrice d'EPS n'est pas une structure précisément définie et sa composition dépend des espèces microbiennes se trouvant à l'intérieur du biofilm (Wingender *et al.* , 1999). En plus de polysaccharides, cette matrice est composée de protéines, d'acides nucléiques, de lipides et d'autres biopolymères telles que des substances humiques qui participent au maintien de la structure et de la morphologie du biofilm (Flemming et Wingender, 2001; 2010; Wingender *et al.* , 1999). Enfin, les EPS représentent une source de nutriment pour les microorganismes et par conséquent, jouent un rôle essentiel en écologie microbienne (Flemming et Wingender, 2010).

Les biofilms polymicrobiens peuvent être constitués d'une vaste communauté de microorganismes et incluent principalement des bactéries et des protistes

amoeboïdes (Arndt *et al.* , 2003; Tremblay *et al.* , 2014). Au niveau bactérien, les biofilms sont généralement dominés par les familles les ß-protéobactéries et les bactéries du groupe Cytophaga-Flavobacterium (Chao *et al.* , 2015; Chenier *et al.* , 2003; Manz *et al.* , 1999). Parmi ces groupes, certaines espèces bactériennes sont connues pour favoriser la formation de biofilm dans ces écosystèmes. Notamment, *Bacillus* spp. et *Pseudomonas* spp. sont décrits pour produire des biosurfactants qui participent à l'initiation de la formation de biofilm, de même qu'à la dispersion de ces structures (Pamp et Tolker-Nielsen, 2007; Schooling *et al.* , 1999; Vlamakis *et al.* , 2013).

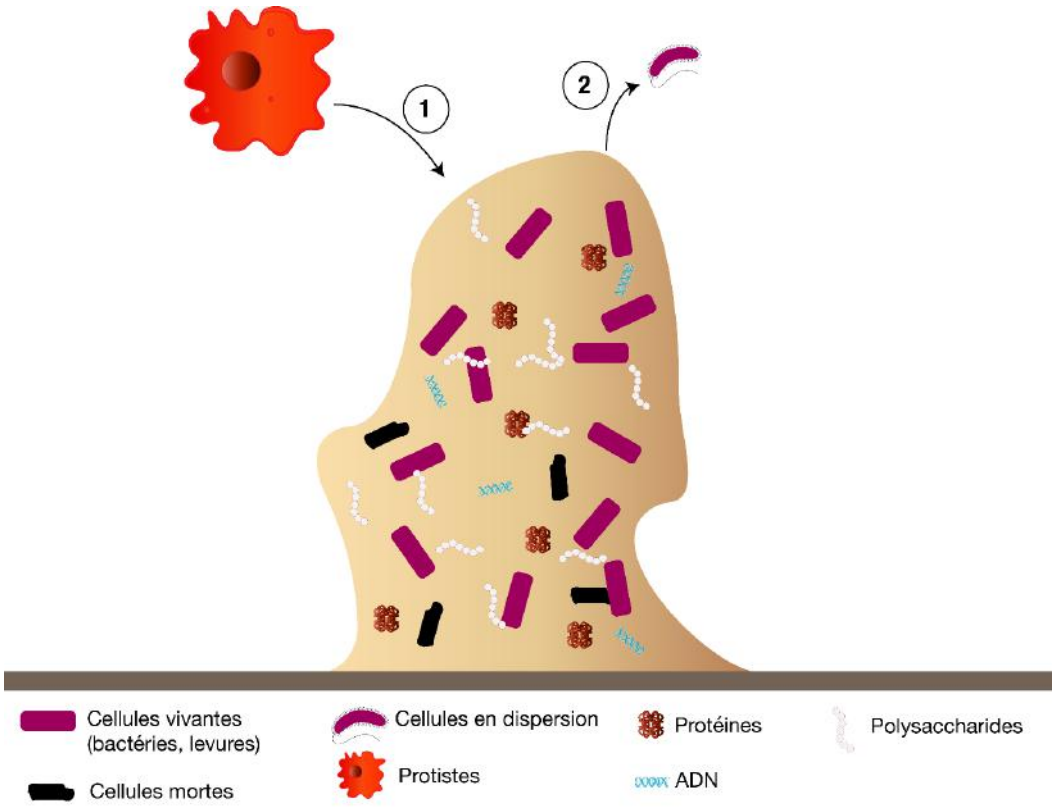


Figure 8. Structure générale d'un biofilm mature. Un biofilm est une structure complexe composée de microorganismes et de nutriments. **(1)** Les protistes amoeboïdes participent à la régulation de la biomasse bactérienne en se nourissant à la surface des biofilms. **(2)** Les bactéries présentent dans ces structures peuvent retourner à un état planctonique, ou se disséminer avant d'établir un nouveau biofilm.

Les protistes amoeboïdes sont connus pour participer à la régulation de la biomasse bactérienne en se nourrissant de bactéries à la surface des biofilms (Parry, 2004) (**Figure 8**). En 1999, une étude a estimé que 70 à 85% des nutriments ingérés par ces

organismes étaient directement redistribués à l'intérieur des biofilms microbiens (Zubkov et Sleigh, 1999) . De cette manière, ces protistes stimulent la croissance des bactéries à l'intérieur de biofilm en leur fournissant un apport de carbone et d'énergie (Sherr et Sherr, 2002).

2.1.3. Compétition bactérienne

Dans l'eau, la plupart des bactéries sont à la recherche de nutriments pour leur croissance. Pour cette raison, les microorganismes ont développé des mécanismes de compétition, qui leur permettent de répondre à leurs besoins nutritionnels. En outre, les organismes compétiteurs participent à la modulation des communautés microbiennes (Bauer *et al.* , 2018). Les deux principaux modes de compétition décrits chez les bactéries sont la compétition par exploitation et la compétition par interférence (Birch, 1957; Park, 1954). La compétition par exploitation correspond à une compétition passive dans laquelle un microorganisme utilise tous les nutriments présents dans son environnement et empêche de cette manière les autres microorganismes d'y avoir l'accès (Hibbing *et al.* , 2009). La compétition par interférence implique quant à elle **(1)** la production à distance de composés antagonistes par des microorganismes ou **(2)** l'injection de composés inhibiteurs par contact entre l'organisme compétiteur et l'organisme receveur (Hibbing *et al.* , 2009).

2.1.3.1. Compétition par exploitation

Dans certains cas, les bactéries produisent des métabolites spécialisés dans le but d'exploiter certaines ressources nutritionnelles présentes dans l'environnement (Hibbing *et al.* , 2009; Park, 1954). Le mécanisme de compétition par exploitation le plus largement décrit dans la littérature correspond à la sécrétion de sidérophores par les bactéries (Hider et Kong, 2010). Ces sidérophores ont pour rôle de piéger le fer libre présent dans l'environnement et de le rapporter à la bactérie productrice (Winkelmann, 2009). Chez les bactéries, le fer est un élément essentiel pour la

croissance et le fonctionnement des enzymes de la chaîne respiratoire (Cornelis *et al.* , 2011). En conséquence, la production de sidérophore augmente la biodisponibilité du fer pour l'organisme producteur et de manière simultanée, la diminue pour un autre microorganisme. Actuellement, il existe plus de 270 sidérophores caractérisés, ces derniers étant produits par une diversité de champignons, bactéries et cyanobactéries (Hider et Kong, 2010). Ce mécanisme a été mis en évidence par de nombreux exemples et inclut notamment la compétition entre *Staphylococcus aureus* et *P. aeruginosa* (Harrison *et al.* , 2007; Leinweber *et al.* , 2018). Dans certains cas, les sidérophores produits par une bactérie peuvent être utilisés par un autre microorganisme et portent le nom de xénosidérophores (Traxler *et al.* , 2012). Ce mécanisme est décrit chez *P. fluorescens*, qui, en plus de produire des pyoverdines et de l'enantiopyocheline, est capable d'utiliser la ferrioxamine et la ferricolicheline produites par *Streptomyces ambofaciens* (Galet *et al.* , 2015).

2.1.3.2. Compétition par interférence

Les mécanismes d'interférence bactériens établissent des relations entre deux bactéries, au détriment de l'une d'entre elles. Le plus généralement, ces mécanismes interviennent à travers la production de métabolites spécialisés dans cette fonction. Ces métabolites sont des composés produits par les bactéries qui ne sont pas impliqués dans le métabolisme primaire de l'organisme producteur et qui ne nécessitent pas de contact direct entre les deux bactéries (Davies, 2013). D'autres mécanismes d'interférence requièrent, en revanche, le contact physique entre une bactérie compétitrice et une bactérie cible pour pouvoir avoir lieu.

- **Mécanismes d'interférences par la sécrétion de métabolites secondaires**

Les bactéries produisent de nombreux métabolites secondaires, représentatifs d'une large diversité de composés chimiques et qui ont parfois des fonctions encore non identifiées (Davies et Ryan, 2011). Il a notamment été montré que *P. protegens* produit

un composé phénolique, le 2,4-diacetylphloroglucinol, capable d'inhiber la croissance de *B. subtilis* en coculture (Powers *et al.* , 2015).

Certaines bactéries sont également connues pour produire des biosurfactants qui participent dans la compétition entre les microorganismes. C'est le cas de la surfactine, un lipopeptide produit par *B. subtilis* qui a déjà montré son activité antagoniste envers diverses espèces microbiennes (Loiseau, 2015; Straight *et al.* , 2006). En réponse à ce composé, certains microorganismes ont également développé un mécanisme de résistance à travers la production d'une surfactine hydrolase, capable d'inactiver ce composé et sa fonction (Davies et Ryan, 2011; Hoefler *et al.* , 2012). Ce mécanisme de résistance a également été décrit chez de nombreuses souches pour faire face aux antibiotiques (Wright, 2005).

En plus de la production de certains métabolites secondaires à activité de compétition directe, les bactéries sont connues pour sécréter des enzymes qui participent à la régulation des systèmes de communication bactériens. Un grand nombre de bactéries utilisent un système de communication appelé Quorum Sensing (QS) pour synchroniser leur comportement en fonction de leur densité de population (Ng et Bassler, 2009). Pour cela, les bactéries sécrètent des composés de communication, appelés auto-inducteurs, qui leur permettent de réguler l'expression de certains de leurs gènes (Miller et Bassler, 2001). Certaines bactéries sont capables de dégrader ces molécules de signalisation, telles que les homosérines lactones acylées, à travers la production d'enzymes (Kang *et al.* , 2004; Sio *et al.* , 2006). Ce mécanisme d'interférence est appelé Quorum Quenching et n'induit pas la mort de la bactérie cible (Fetzner, 2014).

Enfin, la plupart des bactéries produisent des vésicules extracellulaires pendant leur croissance qui peuvent être des vecteurs de composés antagonistes (Berleman et Auer, 2012). Bien que ces vésicules jouent un rôle principal dans la formation de biofilm et en tant que réserve nutritive, elles peuvent également être utilisées comme moyen de défense contre certains compétiteurs (Biller *et al.* , 2014; Schooling et Beveridge, 2006). De cette manière, des hydrolases libérées de vésicules produites

par *P. aeruginosa* et appelées autolysines ont montré leur activité contre les espèces *E. coli* et *S. aureus* (Humann et Lenz, 2009; Kadurugamuwa et Beveridge, 1996).

- **Mécanismes d'interférences dépendant du contact entre deux bactéries**

Ce type de compétition peut être rencontré à l'intérieur de biofilms, dans lesquels la densité de population est importante alors que les ressources nutritives sont limitées (Stewart et Franklin, 2008). Ces conditions stressantes pour les bactéries favorisent l'exclusion de certaines espèces par compétition (Rendueles et Ghigo, 2015).

Le premier mécanisme de compétition par interférence qui nécessite un contact physique entre deux bactéries est appelé Inhibition Contact-Dépendante (CDI) (Hayes *et al.* , 2010; Willett *et al.* , 2015) (**Figure 9 A**). Le système CDI est composé d'un complexe protéique CdiAB situé sur la membrane externe de la bactérie donneuse (CDI+). Dans ce système, une toxine (CdiA) est exportée à travers une protéine membranaire (CdiB) de la bactérie donneuse et se retrouve ainsi au contact de la bactérie receveuse (Aoki, 2005). De cette manière, le domaine C-terminal de la toxine (CdiA-Ct), qui contient l'activité toxique, est délivré dans la cellule receveuse pour inhiber sa croissance (Willett *et al.* , 2015). Dans ce mode d'inhibition, seules les bactéries qui ne disposent pas du cluster de gène *cdiAB* seront inhibées (CDI-). Ce type de système a été mis en évidence chez un certain nombre de protéobactéries incluant les espèces *E. coli* et *P. aeruginosa* (Aoki, 2005; Mercy *et al.* , 2016).

Le deuxième mécanisme de compétition par contact entre deux bactéries correspond à l'injection d'effecteurs toxiques à travers l'utilisation du système de sécrétion de type VI (T6SS) (Ho *et al.* , 2013; Joshi *et al.* , 2016) (**Figure 9 B**). Lorsque deux bactéries sont physiquement en contact, le tube contractile du T6SS se déploie et perce la membrane de la bactérie cible pour y injecter des effecteurs toxiques tels que des phospholipases, des hydrolysases à peptidoglycane ou des nucléases (Chou *et al.* , 2012; Ma *et al.* , 2014; Russell *et al.* , 2011; 2013).

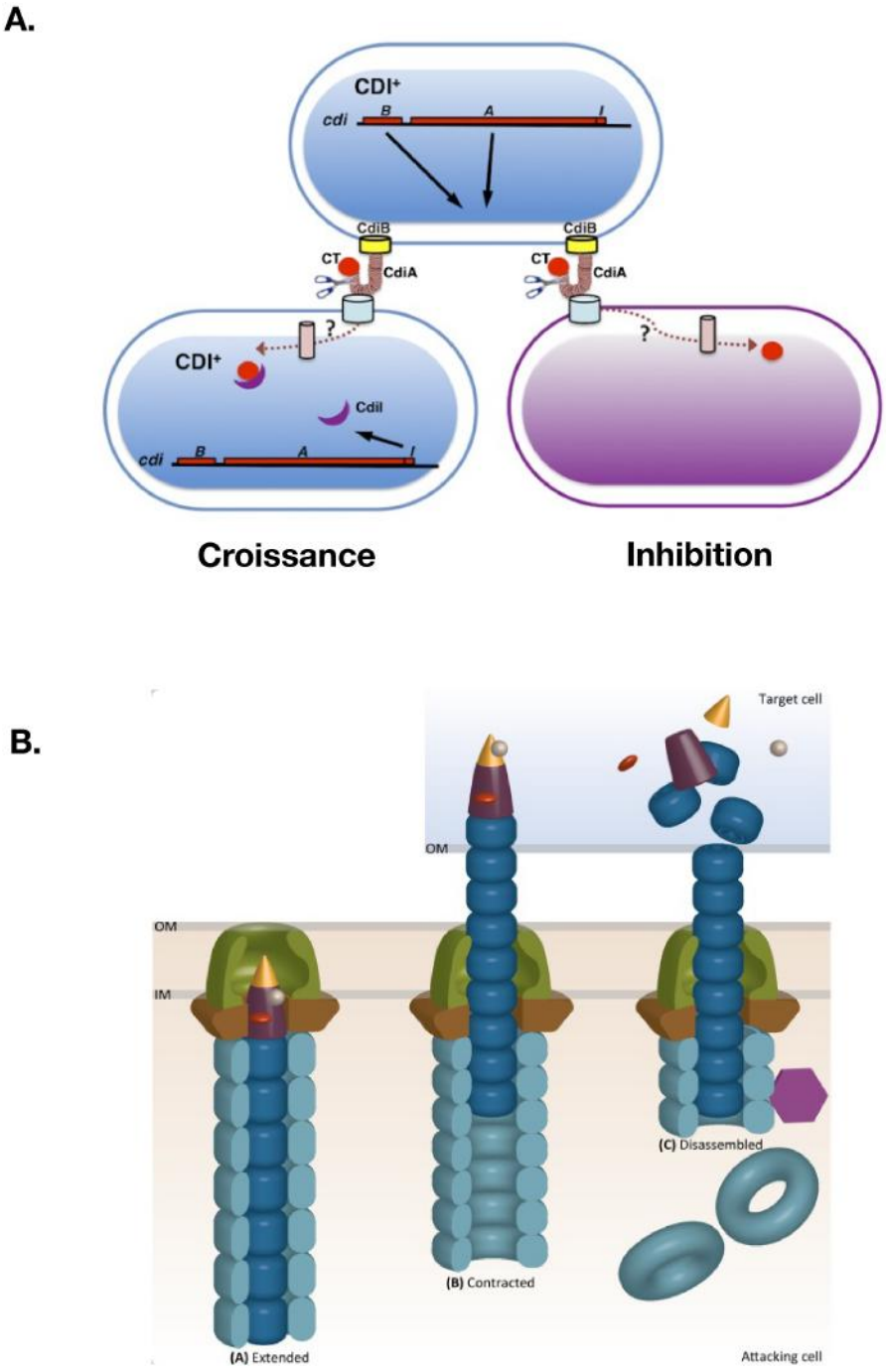


Figure 9. Mécanismes d'inhibition dépendant du contact entre deux bactéries. **A.** Inhibition Contact-Dépendante (CDI) (Morse *et al.* , 2012). Dans ce mode d'inhibition, une bactérie donneuse CDI+ entre en contact avec une bactérie cible à travers un complexe protéique CdiAB. Après injection de la partie C-terminale de la toxine CdiA, la bactérie cible sera inhibée si elle ne dispose pas du complexe CDI. **B.** Inhibition à travers un système de sécrétion de type VI (T6S) (Joshi *et al.* , 2016). Après assemblage du T6SS, la membrane de la cellule cible est percée à l'aide du tube interne de l'assemblage. Après translocation du système, des protéines effectrices sont libérées dans la cellule cible où elles pourront exercées leur activité toxique.

A l'origine, le T6SS a été identifié comme un facteur de virulence produit par *V. cholerae* contre l'amibe *Dictyostelium discoideum* (Pukatzki *et al.* , 2006). Depuis, des gènes codants des T6SS ont été identifiés chez de nombreuses protéobacteries incluant *A. baumannii* et *P. aeruginosa* (Bingle *et al.* , 2008; Carruthers *et al.* , 2013; Hood *et al.* , 2010).

2.2. Interactions de *Legionella* avec d'autres microorganismes

Dans les environnements d'eau douce, *L. pneumophila* peut être retrouvée sous forme planctonique ou au sein de biofilms (Declerck, 2010; Declerck *et al.* , 2009). La présence de *Legionella* dans les biofilms environnementaux peut également être affectée par d'autres microorganismes (Stewart *et al.* , 2012; Taylor *et al.* , 2009). Les légionelles peuvent persister, se multiplier ou se protéger par le biais d'interactions positives avec d'autres microorganismes (Franco *et al.* , 2009). En parallèle, des organismes participent également à l'élimination de *Legionella* au sein de ce microenvironnement par le biais d'interactions négatives (Toze *et al.* , 1990). Ces interactions font principalement appel à des notions de compétition et de parasitisme. Cette partie décrit les connaissances actuelles sur les interactions favorables à la croissance et la survie de *Legionella* dans l'eau, de même que les interactions favorisant son élimination.

2.2.1. Interactions favorisant la croissance ou la survie de *Legionella*

2.2.1.1. Interactions avec des bactéries chimiotrophes

Certaines espèces bactériennes naturellement retrouvées dans les biofilms environnementaux participent à la persistance de *Legionella* dans ces matrices. Des travaux ont montré que des bactéries favorisent l'adhérence de *L. pneumophila* par la synthèse de molécules utilisées dans la composition de la matrice extracellulaire des biofilms. C'est le cas de *Klebsiella pneumoniae*, *Microbacterium* sp., *Flavobacterium* sp., *Empedobacter breve*, *P. putida* et *P. fluorescens* (Mampel *et al.* , 2006; Stewart *et al.* , 2012; Vervaeren *et al.* , 2006).

La croissance de *Legionella* est également favorisée en laboratoire par syntrophie en présence de certaines souches bactériennes. Des études ont montré que la présence de *Flavobacterium breve* sur milieu BCYE dépourvu de L-cystéine était suffisante pour induire la croissance de plusieurs espèces de *Legionella*, incluant *L. pneumophila*, *L. bozemanii*, *L. micdadei* et *L. dumoffii* (Wadowsky et Yee, 1983). Il en résulte l'apparition de colonies satellites liées à la production de L-cystéine par *F. breve*. De même, une souche de *Brevundimonas vesicularis* a été décrite pour favoriser la croissance satellite de *L. pneumophila* en laboratoire (Koide *et al.* , 1989). La présence de colonies satellites de *L. pneumophila* dans ces conditions soulève l'hypothèse que d'autres bactéries de l'eau peuvent apporter des nutriments essentiels à la croissance de *Legionella*.

2.2.1.2. Interactions avec les cyanobactéries

Les cyanobactéries sont retrouvées dans tous les milieux aquatiques naturels. Ce sont des bactéries photosynthétiques qui produisent du dioxygène (O_2) à partir du dioxyde de carbone (CO_2) disponible dans l'eau. Jusqu'à aujourd'hui, quelques études ont montré l'importance des cyanobactéries dans la croissance et la survie de *L. pneumophila* sous forme planctonique en laboratoire. En 1980, une étude a démontré par des expériences de co-cultures que *Legionella* pouvait utiliser les produits extracellulaires d'une cyanobactérie du genre *Fischerella* comme substrats pour sa croissance (Tison *et al.* , 1980). D'autres travaux ont par la suite suggéré qu'un pigment peptidique liant le fer et produit par *Fischerella* participait à la croissance de *Legionella* par une voie d'acquisition du fer (Bohach et Snyder, 1983b). Un dernier travail a finalement mis en évidence par microscopie que *L. pneumophila*, de même que d'autres microorganismes, adhéraient à *Fischerella.*

L'importance de cette adhésion n'a jusqu'à présent pas été déterminée, mais ces auteurs suggèrent que ce mécanisme peut fournir un avantage nutritionnel à *Legionella*, favorisant ainsi sa croissance et sa survie (Bohach et Snyder, 1983a). Bien qu'aucune étude n'ait été conduite en milieu aquatique naturel, ce type d'association avec les cyanobactéries peut avoir une grande importance en écologie. En effet, les

cyanobactéries ont la capacité de proliférer en grande quantité dans les eaux naturelles, et fournissent par conséquent un avantage dans la survie des légionelles.

2.2.1.3. Interactions avec des protistes

Les bactéries du genre *Legionella* sont des parasites naturels de certains microorganismes phagotrophiques incluant les amibes libres et certains ciliés (Greub et Raoult, 2004). Dans les milieux aquatiques naturels, *L. pneumophila* est connue pour se répliquer de manière intracellulaire dans une variété d'amibes libres parmi lesquels sont principalement retrouvés les genres *Acanthamoeba*, *Vermamoeba*, *Naegleria*, *Echinamoeba* et *Vahlkampfia* (Greub et Raoult, 2004; Hilbi *et al.* , 2011; Hsu *et al.* , 2015; Swart *et al.* , 2018).

Au total, 17 espèces associées au phylum Amoebozoa et 7 espèces associées au phylum Percolozoa sont connues pour supporter la multiplication de *L. pneumophila* (**Figure 10**) (Best et Abu Kwaik, 2018). De même, *L. pneumophila* est également connu pour infecter certains organismes ciliés appartenant aux genres *Oxytricha*, *Tetrahymena* et *Paramecium* et *Stylonychia* (**Figure 10**) (Nishida *et al.* , 2018; Rasch *et al.* , 2016; Smith-Somerville *et al.* , 1991; Watanabe *et al.* , 2016).

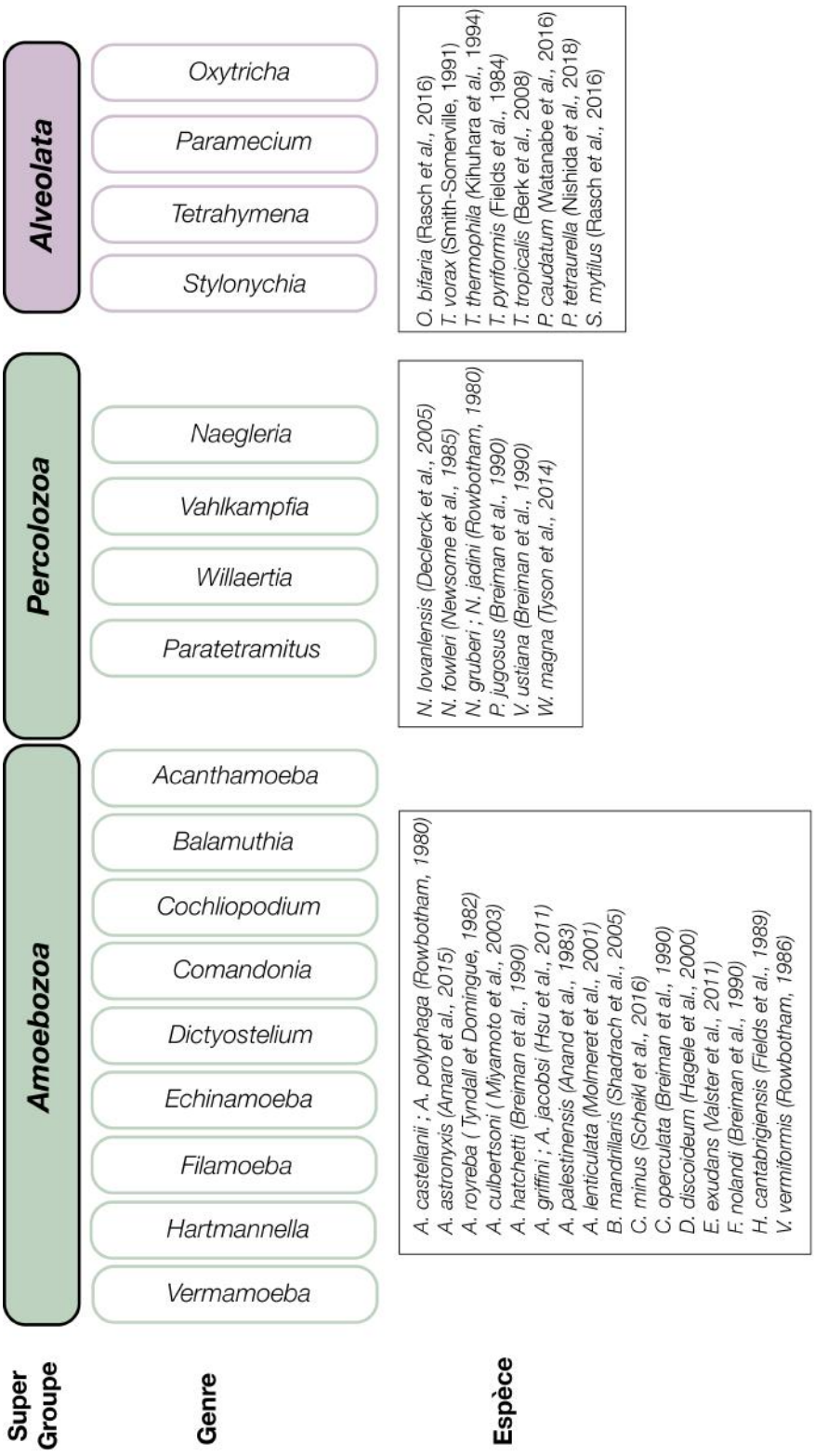


Figure 10. Diversité taxonomique des protistes décrits pour héberger des bactéries du genre *Legionella*

Bien que le cycle d'infection intracellulaire par *Legionella* n'ait pas été décrit chez l'ensemble de ces protistes, il a été largement étudié chez une variété d'amibes libres (**Figure 11**) (Franco *et al.* , 2009; Xu et Luo, 2013).

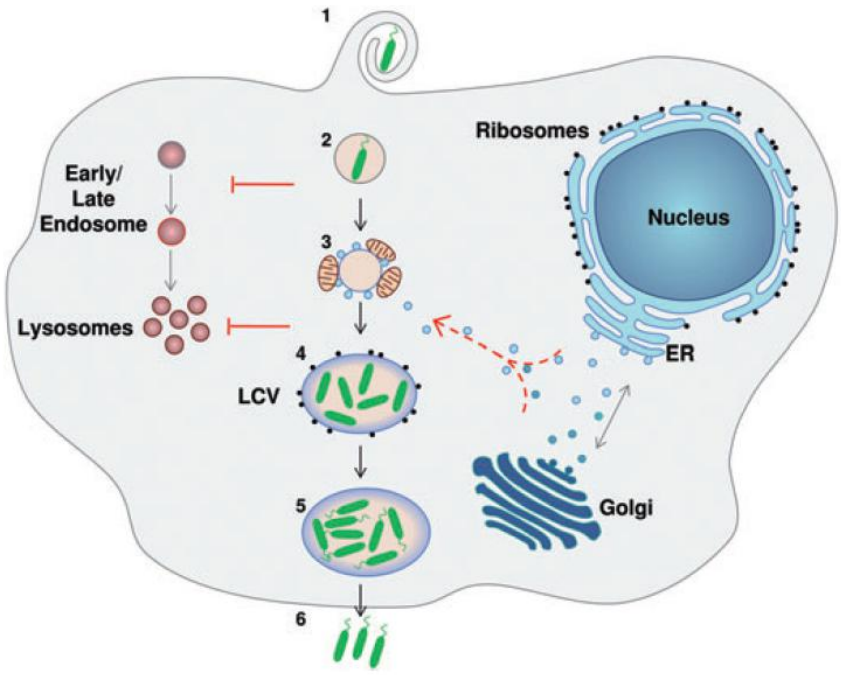


Figure 11. Cycle de vie intracellulaire de *Legionella*. (Franco *et al.* , 2009) **(1)** L'internalisation de *Legionella* par les amibes est réalisée par phagocytose enroulée **(2)** *Legionella* se retrouve dans une vacuole appelée LCV et échappe à la voie phagocytaire. **(3)** Arès interaction avec les mitochondries et le réticulum endoplasmique granuleux (REG), **(4)** *Legionella* se retrouve à l'intérieur d'une vacuole réplicative entourée de ribosomes. **(5)** Les légionelles se retrouvent en grand nombre de copies et **(6)** vont pouvoir s'échapper de la cellule hôte sous forme disséminée ou sous forme de vésicules remplies de légionelles.

Chez les amibes, le cycle d'infection débute par l'attachement de *L. pneumophila* à la surface de la cellule hôte. Parmi les molécules de surface impliquées dans l'attachement de cette bactérie, une lectine Gal/GalNAc de 170 kDa a été identifiée comme récepteur pour l'adhésion de *L. pneumophila* chez l'espèce *V. vermiformis*

(Venkataraman *et al.* , 1997). Toutefois, ce type de mécanisme n'est pas retrouvé dans l'attachement de *L. pneumophila* à *A. polyphaga*, suggérant des mécanismes spécifiques pour chaque espèce amibienne (Harb *et al.* , 1998). Après l'attachement de *L. pneumophila* à la cellule hôte, la bactérie est phagocytée par un mécanisme appelé « phagocytose enroulée » (Horwitz, 1984) (**Figure 11 voie (1)**). Ce mécanisme décrit l'enroulement unilatéral de la bactérie par un pseudopode et a déjà été observé chez *A. castellanii* (Bozue et Johnson, 1996; Rittig *et al.* , 1998).

En plus de ce mécanisme, il a été montré que l'endocytose de *L. pneumophila* était favorisée par la sécrétion d'effecteurs à travers son système de sécrétion de type IV Dot/Icm (Hilbi *et al.* , 2001). Après internalisation par l'amibe, *L. pneumophila* est capable d'échapper à la voie endolysosomale en empêchant la fusion entre le phagosome et les lysosomes (Derre et Isberg, 2004; Horwitz, 1983a; Horwitz et Maxfield, 1984) (**Figure 11, voies (2) et (3)**). La vacuole formée, appelée LCV (*Legionella Containing Vacuole*), est entourée de mitochondries et de vésicules dérivées du réticulum endoplasmique (Horwitz, 1983b; Tilney *et al.* , 2001) (**Figure 11, voie (4)**). Cette étape précède le recrutement des ribosomes à la LCV, ce qui conduit à la formation d'une vacuole réplicative (Tilney *et al.* , 2001) (**Figure 11 Voie (5)**). Lorsque le cycle d'infection est terminé, *Legionella* est expulsée de l'amibe sous forme libre ou sous la forme de vésicules remplies par la bactérie (Amaro *et al.* , 2015; Shaheen et Ashbolt, 2017) (**Figure 11, voie (6)**).

2.2.2. Interactions inhibant la croissance de *Legionella*

Les interactions négatives sur *Legionella* actuellement décrites concernent exclusivement l'implication de bactéries et font appel à des notions de parasitisme et de compétition.

2.2.2.1. Parasitisme de *Legionella* : cas de *Bdellovibrio bacteriovorus*

Bdellovibrio bacteriovorus est une protéobactérie de la classe des Oligoflexia qui a été décrite comme parasite d'un grand nombre de bactéries à Gram négatif, incluant

L. pneumophila (Fratamico et Cooke, 1996; Jackson et Whiting, 1992; Tomov *et al.* , 1982). *B. bacteriovorus* est retrouvé dans les eaux contaminées et dans les sols et a déjà été retrouvée en co-occurrence avec *Legionella* dans l'environnement (Feng *et al.* , 2016; Fry et Staples, 1976; Richardson, 1990). Le cycle de prédation de *B. bacteriovorus* chez les bactéries à gram négatif a été principalement étudié chez *E. coli* et présente plusieurs phases distinctes (**Figure 12**). La première phase du cycle décrit l'attaque de la bactérie cible par *B. bacteriovorus*. Dans cette étape, le parasite est mobile du fait de la présence d'un flagelle et attaque sa cible rapidement avec une vitesse moyenne de 160 µm.s-1 (Sockett et Lambert, 2004; Stolp et Starr, 1965). La deuxième phase du cycle concerne l'attachement sur la bactérie cible lors de laquelle *B. bacteriovorus* produit des endopeptidases qui favorisent la pénétration du parasite à l'intérieur de la cellule (Lerner *et al.* , 2012).

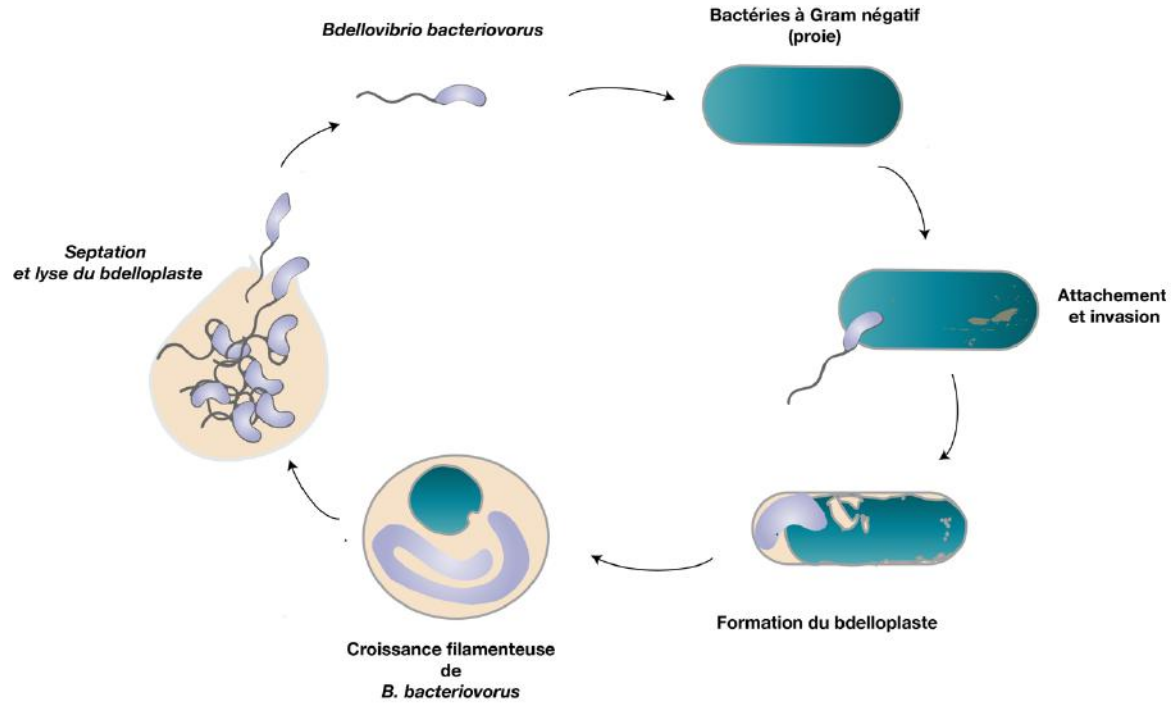


Figure 12. Cycle de prédation de *Bdellovibrio bacteriovorus* chez les bactéries à Gram négatif.

Après cette étape de pénétration, *B. bacteriovorus*, dégrade le contenu cellulaire de sa cible ce qui va conduire à la formation d'une membrane appelée bdelloplaste. Le

parasite, se retrouvant dans une structure appelée bdellokyste, va ainsi pouvoir se multiplier. Après multiplication, *B. bacteriovorus* élimine le bdelloplaste et se retrouve libéré dans l'environnement où il va pouvoir parasiter une nouvelle proie (Lerner *et al.* , 2012). L'activité lytique de ce parasite a été étudié sur plusieurs souches de *Legionella* incluant 5 souches de *L. pneumophila* appartenant aux sg 1, 2, 3 et 4, et 2 souches de *L. bozemanii* et *L. micdadei* (Tomov *et al.* , 1982). Pour l'ensemble des souches testées, *B. bacteriovorus* induit la formation de plages de lyse de la même manière que pour d'autres bactéries à Gram négatif dont *Salmonella thyphimurium* (Tomov *et al.* , 1982). Ces résultats suggèrent, par conséquent, que *B. bacteriovorus* est une bactérie capable de participer à l'élimination naturelle de *Legionella* dans l'environnement.

2.2.2.2. Inhibition de *Legionella* par compétition bactérienne

Plusieurs bactéries retrouvées naturellement dans les environnements d'eau douce ont également été décrites pour leur activité inhibitrice sur *L. pneumophila*. Par ailleurs, deux études ont montré que de 32 à 68 % des bactéries cultivables issues d'un réseau d'eau traité au chlore étaient capables d'inhiber la croissance de *Legionella* (Guerrieri *et al.* , 2008; Toze *et al.* , 1990). Ces phénotypes d'inhibition ont été décrits majoritairement chez les proteobactéries, de même que chez certaines souches affiliées aux phyla Firmicutes et Bacteroidetes (Al-Sulami *et al.* , 2013; Guerrieri *et al.* , 2008).

Le phylum Proteobacteria est le plus représenté dans ce type d'interactions et inclut les genres *Aeromonas*, *Brevundimonas*, *Burkholderia*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, *Vibrio*, *Klebsiella* et *Citrobacter* (Cotuk *et al.* , 2005; Guerrieri *et al.* , 2008). Les bactéries du genre *Aeromonas*, fréquemment isolées des environnements d'eau douce, ont été décrites par plusieurs auteurs pour leur capacité à inhiber la croissance de *L. pneumophila* (Al-Sulami *et al.* , 2013; Cotuk *et al.* , 2005). Ces travaux ont mis en évidence que les espèces *A. hydrophila*, *A. caviae* et *A. sobria*, *A. eucrenophila*, *A. schubertii*, *A. veronii* bv. veronii et *A. encheleia* étaient capables d'inhiber la croissance de *Legionella*. Toutefois, ces interactions antagonistes n'ont jusqu'à présent pas été élucidées au niveau moléculaire. En 2008,

une étude a également montré que l'activité anti-*Legionella* produit par une souche *d*' *A. hydrophila* était perdue après un traitement des surnageants de culture de la bactérie productrice avec des enzymes protéolytiques. Par conséquent, ces auteurs ont suggéré qu' *A. hydrophila* inhibait *Legionella* à travers la production d'une bactériocine (Kimiran Erdem et Yazici, 2008).

Les bactéries appartenant au genre *Pseudomonas* sont fréquemment retrouvées dans les environnements d'eau douce (Aoi *et al.* , 2000; Kodama *et al.* , 1974). Plusieurs études ont montré l'impact négatif de souches de *Pseudomonas* sur la croissance de *Legionella* (Cotuk *et al.* , 2005; Guerrieri *et al.* , 2008; Kimura *et al.* , 2009). En 2008, il a été mis en évidence que *P. fluorescens* était capable d'inhiber la formation et la stabilité de biofilms mono-espèce formés par *L. pneumophila* (Al-Sulami *et al.* , 2013; Guerrieri *et al.* , 2008). Une étude a également montré que l'auto-inducteur de QS (3-oxo-C12-HSL) de *P. aeruginosa* était capable d'inhiber la croissance et le développement de biofilms de *Legionella pneumophila* (Kimura *et al.* , 2009). Enfin, une étude de diversité bactérienne effectuée à partir de circuits d'units dentaires a mis en évidence une corrélation inverse entre la quantité de bactéries hétérotrophes (*P. aeruginosa* en majorité) et celle de *L. pneumophila*, suggérant que ces bactéries pourraient participer à son élimination naturelle dans ces réservoirs (Zanetti *et al.* , 2000).

Certaines bactéries appartenant aux genres *Flavobacterium* et *Chryseobacterium* ont également montré un impact négatif sur la croissance de *L. pneumophila* (Guerrieri *et al.* , 2008; Kimiran Erdem et Yazici, 2008). Toutefois, les mécanismes moléculaires associés à ces interactions négatives n'ont pas été déterminés. Enfin, le phylum Firmicutes est moins représenté au sein des écosystèmes anthropisés mais peut être retrouvé à partir d'environnements naturels (Brillard *et al.* , 2015). Deux études ont mis en évidence l'inhibition de *L. pneumophila* par des souches de *B. pumilus*, *B. subtilis* et *B. brevis* (Kimiran Erdem et Yazici, 2008; Loiseau *et al.* , 2015). Le composé inhibiteur produit par *B. subtilis* a par la suite été caractérisé et correspond à la surfactine, qui agit par lyse membranaire sur *L. pneumophila* (Loiseau *et al.* , 2015).

Chapitre 3. Traitements anti-*Legionella*

Dans le but d'éliminer les risques de contamination, des traitements sont appliqués dans les systèmes de potabilisation de l'eau. Ces traitements suivent les normes imposées par l'organisation mondiale de la santé en matière de lutte contre les microorganismes pathogènes de l'eau, parmi lesquels sont retrouvés les amibes libres et *L. pneumophila* (source OMS, 2011). Ce chapitre décrit les principaux modes de désinfection connus dans la lutte contre *Legionella* (traitements physiques et chimiques) et les principales informations disponibles sur le potentiel anti-*Legionella* de molécules naturelles.

3.1. Modes de désinfections actuels

3.1.1. Normes et législation françaises

Les plans d'entretien des réseaux d'eau et la surveillance des légionelles suivent la réglementation de l'arrêté ministériel du 14 Décembre 2013 (NOR : DEVP1305353A). Cet arrêté vise à limiter le risque de prolifération et de dispersion des légionelles à l'intérieur des TARs et des réseaux d'eau chaude sanitaire. Il a notamment pour objectif de maintenir ou réduire en permanence une concentration en légionelles à un niveau inférieur ou égal à 1000 UFC/L (Unités Formant des Colonies par Litre d'eau). Cette législation décrit également la fréquence des analyses d'eau à effectuer selon la norme AFNOR NFT-90431 (mise à jour en août 2017), de même que les stratégies préventives utilisées dans le traitement de l'eau. Elles sont fixées de manière à assurer un bon état écologique de l'eau et permettent de limiter l'utilisation de produits néfastes pour l'environnement. Finalement, cet arrêté ministériel impose l'arrêt en urgence des installations concernées pour un seuil de légionelles supérieur ou égal à 10^5 UFC/L. Dans ces conditions, la procédure suivie correspond à la vidange et à la désinfection de l'ensemble du système. Il existe à ce jour plusieurs procédés physiques ou chimiques utilisés pour la prévention et la désinfection des réseaux d'eau parmi lesquels les biocides oxydants et non oxydants sont les plus utilisés en France.

3.1.2. Traitements physiques

Les traitements physiques comprennent la désinfection par Ultra-Violets (UVs), la désinfection thermique et la filtration de l'eau**.** Les rayons UVs sont essentiellement utilisés dans le traitement des eaux usées et des eaux de consommation et permettent d'obtenir une haute qualité de désinfection de l'eau (Hijnen *et al.* , 2006). La désinfection thermique a été quant à elle, la première méthode utilisée pour contrôler les légionelles dans les réseaux de distribution des hôpitaux (Fisher-Hoch *et al.* , 1981). Elle consiste à augmenter la température de l'eau d'un système entre 60°C et 70°C pendant une période définie, puis à purger continuellement ou périodiquement le système en maintenant une température optimale de sortie à 60°C (Lin *et al.* , 1998). Enfin, des filtres peuvent être positionnés aux points de sortie de réseaux notamment au niveau des robinets ou des pommeaux de douche (Cervia *et al.* , 2010; Exner *et al.* , 2005; Holmes *et al.* , 2010; Sheffer *et al.* , 2005). Ces filtres ont pour objectif de traiter de petites quantités d'eau en limitant la sortie des légionelles. Ce type de procédure intervient principalement de manière préventive au niveau des hôpitaux ou dans les hôtels, et peut également être installé rapidement en cas d'urgence (Baron *et al.* , 2014; Sheffer *et al.* , 2005). Toutefois, les traitements physiques ne sont pas suffisamment efficaces pour être utilisés seuls dans le traitement de *Legionella* dans les réseaux d'eau (Costa *et al.* , 2010). Dans le cas d'un traitement par UVs, l'association de *Legionella* avec les amibes montre une diminution de l'efficacité de ce type de traitement, les amibes étant 100 fois plus résistantes aux rayons UVs que la bactérie seule (Cervero-Aragó *et al.* , 2014). De même, les bras morts, qui constituent des sites de formation de biofilms et de prolifération, ne sont pas facilement décontaminés par la désinfection thermique. Ces facteurs conduisent après l'application de ces traitements à la recolonisation du réseau à partir de ces sites (Ezzeddine *et al.* , 1989; Muraca *et al.* , 1990).

3.1.3. Traitements chimiques

3.1.3.1. Biocides oxydants

Les biocides oxydants ont la particularité de présenter un spectre large d'action dans les processus de désinfection et d'avoir deux fonctions : celle de détruire la matière organique (fonction oxydante) et celle de désinfecter l'eau (action biocide). Ces biocides peuvent être utilisés en traitement préventif (injection d'une faible dose en continu) et plus généralement en traitement curatif (injection d'une forte concentration sur une courte durée). Les trois principaux biocides oxydants utilisés dans le traitement de l'eau et efficaces contre *L. pneumophila* sont le chlore, le dioxyde de chlore (ClO_2) et la monochloramine (Kim *et al.* , 2002). Ces traitements peuvent être appliqués aux réseaux d'eau potable, de même qu'à d'autres systèmes d'eau, tels que les TARs et dans les piscines.

Le chlore peut être administré dans les réseaux sous la forme de sels hypochloreux (hypochlorite de sodium, hypochlorite de calcium). Ces composés agissent en dénaturant les protéines membranaires et intracellulaires, conduisant à la mort des cellules traitées (Camper *et* McFeters, 1979). Des concentrations de 2 à 6 mg/L de sels hypochloreux sont nécessaires en traitement préventif pour le contrôle de *L. pneumophila* (Lin *et al.* , 1998). Des traitements par hyperchloration peuvent également être utilisés pour désinfecter certains systèmes et nécessitent 20 à 50 mg/L de sels hypochloreux. Ces systèmes sont ensuite purgés et une concentration de traitement à 1 mg/L est maintenue en entretien (Lin *et al.* , 1998).

Le dioxyde de chlore est principalement utilisé en Europe comme agent oxydant dans la désinfection des systèmes anthropisés comme les hôpitaux, les spas, et les TARs notamment grâce à ses propriétés physiques et chimiques qui ressemblent au chlore (Kim *et al.* , 2002). Le ClO_2 agit sur la synthèse des protéines et a déjà été utilisé pour contrôler *Legionella* dans les réseaux d'eaux (Lin *et al.* , 2011; Srinivasan *et al.* , 2003; Zhang *et al.* , 2007). Ce biocide a également montré son efficacité à des concentrations de 50 à 80 mg/L en traitement curatif pendant 1 heure, avant de maintenir une concentration de 3 à 5 mg/L (Walker *et al.* , 1995).

En France, la monochloramine n'est pas autorisée pour la désinfection des eaux de distribution mais elle est néanmoins utilisée pour le traitement des eaux des circuits de refroidissement afin de lutter contre le développement des biofilms (LeChevallier *et al.* , 1988; Samrakandi *et al.* , 1997; Türetgen, 2004). Elle présente l'avantage d'être plus stable que le chlore libre et est donc de plus en plus utilisée. La concentration d'entretien en monochloramine recommetée par l'organisation mondiale de la santé est de 3 mg/L (Source OMS, 2011).

3.1.3.2. Biocides non oxydants

Les biocides non-oxydants sont des molécules de synthèse pouvant être utilisées dans le traitement de l'eau. En France, seules les utilisations des isothiazolones et du DBNPA (2,2-dibromo-3-nitro-propianomide) sont réglementées. Ce sont des agents électrophiles qui ont pour mécanisme d'action l'inhibition d'enzymes cellulaires et de voies métaboliques centrales chez les microorganismes (Williams, 2007). Les isothiazolones les plus utilisées dans le traitement de l'eau sont le 2-méthyl-4-isothiazolin-3-one (MIT) et le 5-chloro-2-méthyl-4-isothiazolin-3-one (CMIT) (Kim *et al.* , 2002). Ces composés présentent un large spectre d'activité et montrent leur efficacité dans la lutte contre *L. pneumophila*. En 1986, des travaux ont notamment montré que 2,6 à 17,4 mg/L d'un mélange de MIT et CMIT étaient suffisants pour abattre 4 Log de *L. pneumophila* en 6 heures (McCoy *et al.* , 1986). Concernant le DBNPA, plusieurs travaux ont montré son efficacité sur l'élimination de *Legionella* aussi bien sous sa forme sessile que planctonique. Il a été montré dans un pilote de refroidissement de laboratoire qu'une dose de 8 à 15 mg/L de DBNPA induisait un abattement de 4 log de *L. pneumophila* sous forme planctonique et sessile et que cette dose pouvait ensuite être réduite à 1 mg/L pour l'entretien de l'eau (Gao *et al.* , 2001; Thomas *et al.* , 1999).

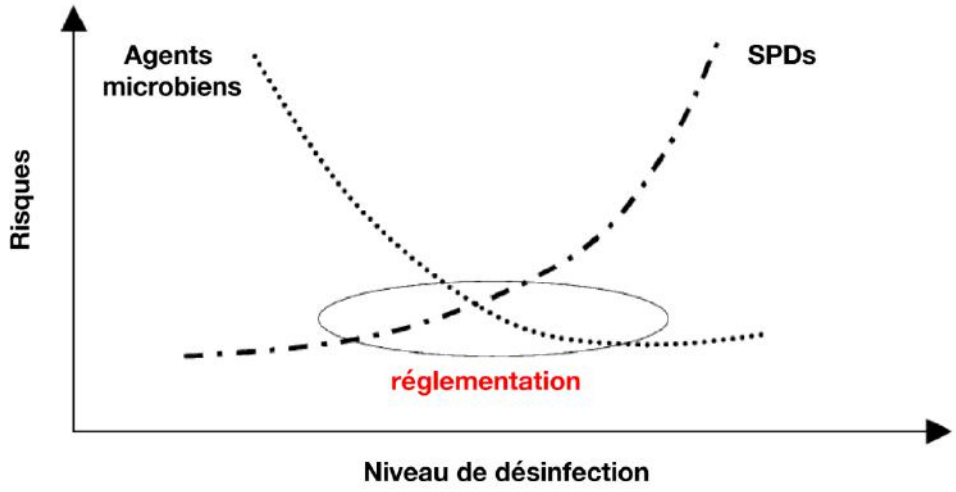


Figure 13. Analyse des risques en fonction du niveau de désinfection de l'eau. Afin de maintenir une eau saine pour la santé humaine et la vie aquatique, des réglementations en vigueur demandent de limiter l'utilisation de désinfectants pour restreindre la quantité de SPDs produits dans les réseaux. Graphique traduit de (Sadiq et Rodriguez, 2004).

3.1.4. Limites des traitements actuels et problématique écologique

Le traitement de l'eau avant sa distribution est essentiel pour la protection des hommes vis-à-vis des risques de contamination par *L. pneumophila*. Toutefois, ces traitements présentent des limites d'utilisation liées à leur efficacité et à leur impact écologique. Les trois principaux problèmes rencontrés après l'utilisation de tels traitements sont **(1)** la formation de sous-produits de désinfection (SPDs) toxiques dans les réseaux, **(2)** la corrosion des circuits traités et **(3)** la survie et la recolonisation de *Legionella* dans ces circuits.

3.1.4.1. Toxicité des sous-produits chlorés

Durant les processus de désinfection de l'eau, des réactions peuvent apparaître entre les désinfectants chimiques et la matière organique naturelle et ont pour conséquence la formation de SPDs (Chang *et al.* , 2013; Richardson, 2002). D'autres facteurs favorisent la formation de ces SPDs, incluant le pH du milieu et la température (Shah *et* Mitch, 2012). Les SPDs les plus communément retrouvés dans les eaux traitées sont les trihalométhanes (THMs), les acides haloacétiques (HAAs), les haloacétonitriles (HANs) et les halocétones (HKs) (Lou *et al.* , 2010). Ces composés sont souvent toxiques et leur présence dans l'eau potable représente une source dangereuse pour la santé humaine et pour les vies aquatiques (Watson *et al.* , 2012). Certains d'entre eux ont notamment fait l'objet d'études toxicologiques qui ont montré leur implication dans l'apparition de cancers chez l'homme (Villanueva *et al.* , 2004; 2017). Parmi les 600 SPDs identifiés à ce jour, les THMs et les HAAs représentent 20 à 30% des composés retrouvés dans les réseaux d'eau.

En Europe, ces substances chimiques sont réglementées par le système REACH (Registration, Evaluation and Autorisation of CHemicals) adopté en 2006 par le parlement européen (EUR-Lex - 32006R1907," 2006). Les objectifs de cette règlementation sont de protéger la santé humaine et l'environnement face aux risques potentiels des substances chimiques, dont les SPDs. Ces réglementations établissent notamment des niveaux acceptables de désinfectants utilisés dans le traitement de l'eau, permettant à la fois de limiter les risques microbiologiques et la formation de sous-produits chimiques (**Figure 13**).

3.1.4.2. Corrosion des réseaux d'eau

Certains matériaux utilisés dans les réseaux d'eau de distribution sont sujets à la corrosion pouvant être responsable de la détérioration de la qualité de l'eau potable à la suite de traitements chimiques (Husband *et* Boxall, 2011; McNeill *et* Edwards, 2002). Les matériaux autorisés dans la conception des réseaux d'eau potable sont l'acier, le cuivre, la fonte, le polyéthylène et le polychlorure de vinyle. Plusieurs travaux ont montré l'impact négatif de l'utilisation des biocides oxydants sur la qualité des matériaux constituant les réseaux d'eaux. Des travaux ont notamment montré que l'utilisation de pompes à chlore ou de systèmes électrochimiques à dioxyde de chlore conduisent à une forte attaque oxydante des tuyaux en polyéthylène (Chord *et al.* , 2011). Ces attaques oxydantes aboutissent à la formation de stries sur ce type de matériau, qui sont à l'origine de fuites observées dans les réseaux. Ces constatations ont également été faites après traitement curatif de réseaux d'eau en cuivre avec de l'hypochlorite de sodium (Montes *et al.* , 2014). Plusieurs travaux ont également évalué l'impact de ces désinfectants sur la corrosion de l'acier. Ainsi, le chlore libre, de même que la chloramine induisent une forte oxydation du fer contenu dans ce type de matériau (Eisnor *et* Gagnon, 2004; Masters *et al.* , 2015).

3.1.4.3. Survie des légionelles dans les réseaux

La survie des légionelles dans les réseaux d'eau est liée à plusieurs critères environnementaux qui incluent principalement leur capacité à se multiplier à l'intérieur des amibes et à survivre sur une longue durée dans un « état viable mais non cultivable » (VBNC). D'autres facteurs participent également à la persistance de *Legionella* dans les réseaux tels que la résistance des amibes et des biofilms aux traitements biocides (**Figure 14**).

Les amibes présentent majoritairement deux stades de vies distincts et réversibles dans l'environnement : un stade métaboliquement actif (trophozoïte) et un stade de dormance (kyste) (**Figure 14**, **voie 6**). L'occurrence de ces phagoprotistes au sein des

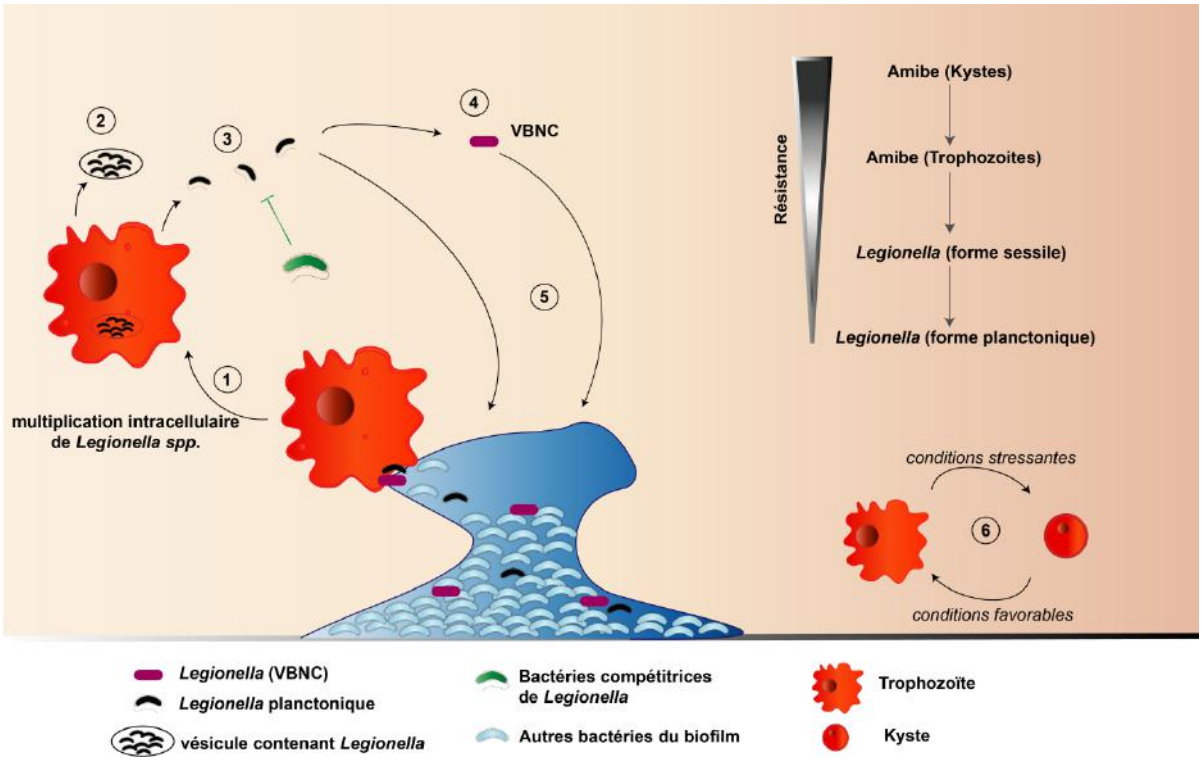


Figure 14. Résistance des amibes aux traitements biocides et survie des légionelles dans les réseaux. La plupart des amibes se nourrissent de microorganismes contenus à la surface de biofilms. **(1)** Après s'être multipliée à l'intérieur de amibes, *Legionella* peut être expulsée **(2)** dans une vésicule **(3)** ou sous forme planctonique dans l'environnement. **(4)** et **(6)** En condition de stress, *Legionella*, de même que les amibes peuvent adopter des formes viables présentant un faible niveau d'activité métabolique dans l'environnement (VBNC, kyste), **(5)** qui peuvent persister sur de très longues périodes dans les réseaux. Lorsque les conditions environnementales redeviennent favorables, les kystes amibiens peuvent retrouver une forme métaboliquement active (trophozoïte) et favoriser la « ressuscitation » des *Legionella* VBNC en forme planctonique.

réseaux d'eau est un facteur primordial dans la survie et la multiplication de *Legionella*. Lorsque les amibes sont métaboliquement actives (forme trophozoïte), *Legionella* peut interagir avec ces cellules et se multiplier activement de manière intracellulaire (**Figure 14**, **voie 1**) (Swart *et al.* , 2018). Après multiplication, *Legionella* est alors expulsée sous forme libre dans l'environnement ou sous forme de vésicules chargées en légionelles (Berk *et al.* , 1998; Shaheen *et* Ashbolt, 2017) (**Figure 14**, **voies 2, 3**). Bien que les traitements biocides semblent efficaces contre *L. pneumophila* sous forme planctonique, des travaux ont souligné leur manque d'efficacité lorsqu'elle se trouve associée aux amibes (Cervero-Aragó *et al.* , 2015). En 1988, une étude a démontré que la survie et la résistance d'un grand nombre de pathogènes après un traitement au chlore étaient liées à la présence d'*A. castellanii* sous forme trophozoïte dans le même milieu (King *et al.* , 1988). Il a également été suggéré que la croissance de *Legionella* dans son hôte amibien pouvait influencer l'efficacité des biocides sur *Legionella* en sortie d'amibe. En effet, une étude a montré que *L. pneumophila* était plus résistante à un traitement au chlore après réplication dans *Vermamoeba vermiformis* en comparaison avec sa réplication dans *A. castellanii* (Chang *et al.* , 2009).

Dans des conditions environnementales stressantes telles qu'à la suite d'un traitement biocide, les amibes peuvent se protéger sous forme de kyste. Il a été montré que des cellules d'*Acanthamoeba* sous forme de kystes étaient plus résistantes à une variété de désinfectants que les cellules trophozoïtes de cette même souche (Coulon *et al.* , 2010; Lloyd *et al.* , 2001; Turner *et al.* , 2000). Cette résistance est notamment expliquée par la présence d'une double paroi composée de cellulose chez les kystes amibiens, ce qui les rend très résistants aux traitements chimiques (Winiecka-Krusnell et Linder, 2001). Cette résistance semble également être dépendante de l'espèce amibienne. En effet, une étude a montré que des kystes *d'A. polyphaga* étaient capables de survivre après une exposition à 50 mg/L de chlore libre pendant 18 heures (Kilvington et Price, 1990, Dupuy *et al.,* 2014).

A l'inverse, d'autres travaux ont montré qu'une exposition à 4 mg/L de chlore libre était suffisante pour inactiver 99.9% des kystes de *Vermamoeba vermiformis* (Kuchta *et al.* , 1993). L'enkystement des amibes est également précédé par l'expulsion de

vésicules de nourriture. Ces vésicules peuvent contenir *Legionella* qui est de cette manière, en partie protégée des effets biocides (Berk *et al.* , 1998; Shaheen et Ashbolt, 2017).

L'expulsion des légionelles avant l'enkystement est toutefois controversée. Certaines études suggèrent que *Legionella* peut survivre à l'intérieur de kystes amibiens, bénéficiant ainsi d'une protection efficace (Fallon et Rowbotham, 1990; Kilvington et Price, 1990). Outre le fait que les amibes se nourrissent préférentiellement de bactéries contenues à la surface de biofilms, ces structures jouent également un rôle dans la persistance de *Legionella* au sein des réseaux d'eau. Plusieurs travaux ont souligné le manque d'efficacité des biocides à pénétrer les biofilms, qui est principalement lié à une diffusion lente et hétérogène des composés à l'intérieur de ces matrices (Królasik *et al.* , 2010; Pan *et al.* , 2006). En conséquence, l'exposition limitée de *Legionella* aux substances chimiques favorise sa persistance à l'intérieur de ces communautés (Abu Khweek et Amer, 2018) (**Figure 14**).

Les légionelles peuvent également résister à certaines conditions environnementales stressantes, telles qu'un traitement biocide, en entrant dans un état VBNC (**Figure 2**, voie 4) (Allegra *et al.* , 2011; Li *et al.* , 2014). Les formes VBNC présentent un faible niveau d'activité métabolique et sont incapables de se développer sur un milieu de culture. Toutefois, ces cellules conservent certaines caractéristiques de cellules viables telles que l'intégrité cellulaire et leur virulence (Alleron *et al.* , 2008; Dietersdorfer *et al.* , 2018; Kirschner, 2016). Lorsque *Legionella* sous forme VBNC se retrouve à l'intérieur de biofilms, elle peut restaurer sa cultivabilité et sa pathogénie en se multipliant à l'intérieur d'un nouvel hôte amibien (**Figure 14**, **voies 5 et 1**) (Alleron *et al.* , 2008; Ducret *et al.* , 2014; García *et al.* , 2007; Kirschner, 2016).

Enfin, l'utilisation de tels traitements induit des modifications des communautés microbiennes dans les réseaux d'eau. En conséquence, certains microorganismes capables de réguler de manière négative l'occurrence des légionelles peuvent être détruits par ces traitements (**Figure 14**).

3.2. Lutte biologique contre *Legionella*

En prenant en compte les limites d'utilisation des procédés physiques et chimiques pouvant être appliqués dans le traitement de l'eau, il devient nécessaire de trouver de nouvelles stratégies antimicrobiennes pour lutter contre *L. pneumophila*. Ces composés doivent pouvoir lutter contre les amibes, pénétrer les biofilms et avoir une activité contre le pathogène sous forme sessile. En plus de leur efficacité, ces molécules doivent être facilement dégradées dans l'environnement pour limiter leur impact écologique sur les communautés microbiennes, sur la vie aquatique et sur l'homme. Dans ce contexte, des composés d'origine naturelle sont recherchés pour la lutte anti-*Legionella*. L'ensemble des composés d'origine naturelle décrits à ce jour ont fait l'objet d'une revue en 2016 (Berjeaud *et al.* , 2016). Ces composés sont produits par différents organismes tels que les plantes, certains organismes eucaryotes et des bactéries et seront décrits dans ce sous-chapitre.

3.2.1. Huiles essentielles

Les huiles essentielles sont connues pour avoir un large spectre d'activité antagoniste contre les bactéries (Burt, 2004; Seow *et al.* , 2014; Silva *et al.* , 2013; Solórzano-Santos *et* Mire*t*a-Novales, 2012). Actuellement, 20 huiles essentielles (HE) obtenues à partir de végétaux appartenant à la classe des Trachéophytes ont montré leur potentiel dans la lutte anti-*Legionella* (**Figure 15**) (Chaftar *et al.* , 2016; 2015; Chang *et al.* , 2008; Laird *et al.* , 2014; Mondello *et al.* , 2009).

Parmi l'ensemble des HE étudiées à ce jour, celles obtenues à partir de feuilles de genévrier de Phénicie (*Juniperus phoenicea*), de feuilles de thym (*Thymus vulgaris*) et de la rue commune (*Ruta graveolens*) sont les plus efficaces pour inhiber *L. pneumophila* Sg1 et présentent des concentrations minimales inhibitrices (CMI) comprises entre 20 et 30 µg/mL (Chaftar *et al.* , 2016). Une étude a également regardé l'effet de l'HE d'arbre à thé (*Melaleuca alterniforlia*) sur 22 souches de *L. pneumophila* appartenant aux sérogroupes 1 et 6 (Mondello *et al.* , 2009). Pour toutes les souches de *Legionella* testées, l'HE de *M. alterniforlia* inhibe leur croissance avec des CMI allant de 125 µg/mL à 500 µg/mL.

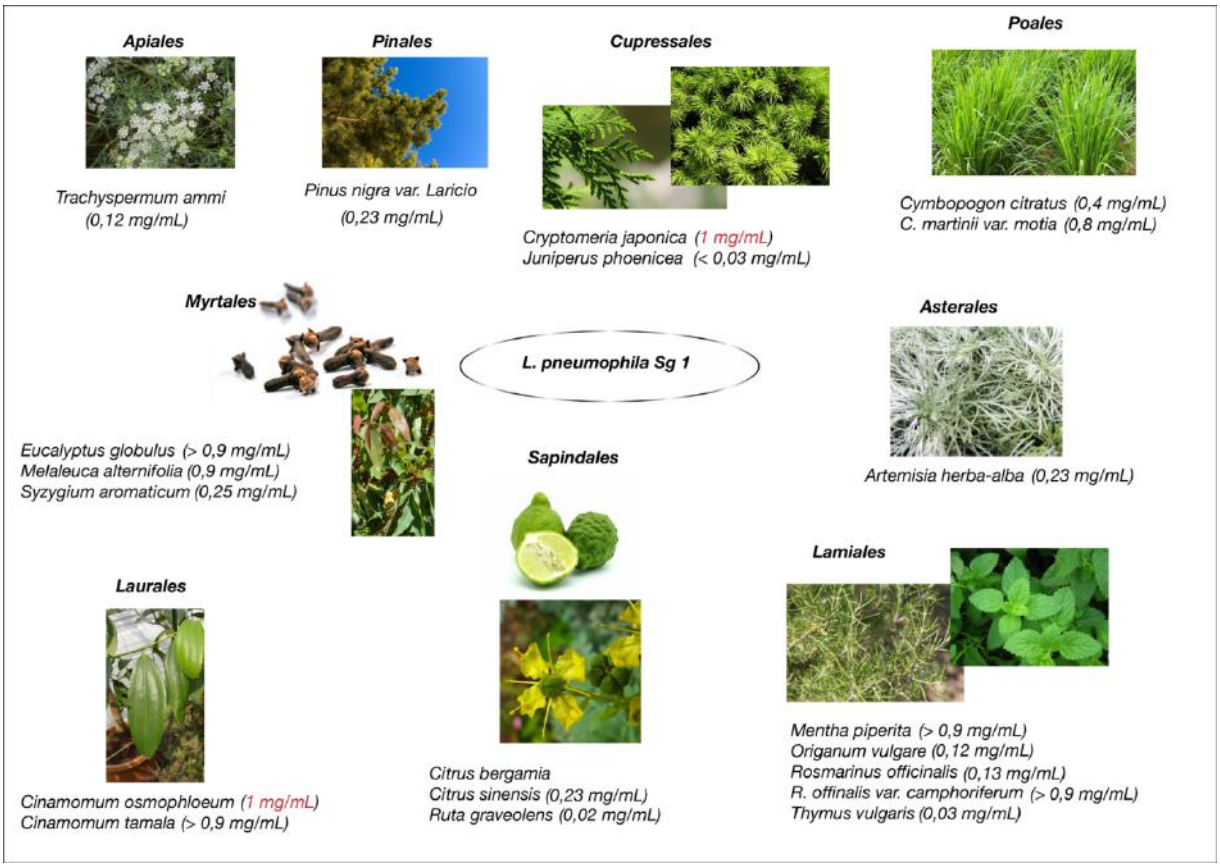


Figure 15. Huiles essentielles à activité anti-*Legionella*. Les 20 huiles essentielles connues pour leur propriété anti-*Legionella* sont issues de 9 ordres de végétaux distincts appartenant tous à la classe des Trachéophytes. Les concentrations notées après chaque nom botanique correspondent aux concentrations minimales inhibitrices (en noir) ou aux concentrations minimales bactéricides (en rouge) connues de la littérature (Chaftar *et al.* , 2015; 2016; Chang *et al.* , 2008; Laird *et al.* , 2014; Mondello *et al.* , 2009).

Les HE étant de composition variable et parfois complexe, il n'existe pas de mécanisme d'action spécifique décrit chez *Legionella*. D'une manière générale, les HE peuvent agir en dégradant l'enveloppe cellulaire, induire des dommages sur la membrane cytoplasmique et sur les protéines membranaires, induisant la fuite du contenu cellulaire ou la coagulation du cytoplasme (Gustafson *et al.* , 1998; Lambert

et al. , 2001; Ultee *et al.* , 1998). En 2015, une étude s'est concentrée sur l'action de l'HE *T. vulgaris* sur la membrane de *L. pneumophila* et a montré par microscopie électronique à transmission que les cellules étaient plus courtes et perdaient leur intégrité membranaire (Chaftar *et al.* , 2015). Le composé majoritaire retrouvé dans cette HE est le carvacrol (88.50%), un composé phénolique ayant déjà prouvé son activité antibactérienne à large spectre (Fadli *et al.* , 2012; Nostro *et al.* , 2007; Wijesundara *et* Rupasinghe, 2018).

3.2.2. Composés protéiques issus d'organismes eucaryotes

3.2.2.1. Protéines

A ce jour, seules deux protéines ont été montrées comme actives contre *Legionella* : l'apolipophorine III (ApoLp-III) de la fausse teigne (*Galleria mellonella)* et la lactoferrine humaine.

L'apoLp-III est une protéine contenue dans l'hémolymphe d'un grand nombre d'insectes parmi lesquels sont retrouvés les genres *Orthoptera*, *Leptidoptera*, *Coleoptera*, *et Hemiptera*. La purification de cette protéine en 2012 a par la suite permis d'évaluer son potentiel contre 3 espèces de *Legionella* : *L. dumoffii*, *L. pneumophila*, et *L. gormanii* (Chmiel *et al.* , 2014; Palusińska-Szysz *et al.* , 2012; Zdybicka-Barabas *et al.* , 2014). Dans le cas de *L. pneumophila*, il a été montré qu'une heure de traitement en présence de 100 µg/mL d'ApoLp-III était suffisant pour induire une réduction de 55% de la population bactérienne. Le mode d'action de cette protéine a également été étudié chez *L. dumoffii* et montre par microscopie électronique à transmission des altérations cellulaires et des dommages membranaires sur *Legionella* (Palusińska-Szysz *et al.* , 2012). Enfin, une étude a également montré que l'augmentation de la quantité de phosphatidylcholine membranaire chez *L. dumoffii* favorisait la liaison et la pénétration de l'apoLp-III dans la membrane de cette bactérie (Palusińska-Szysz *et al.* , 2016).

La lactoferrine est une glycoprotéine de la famille des transferrines capable de lier les ions ferriques avec une forte affinité. L'activité anti-*Legionella* de ce composé a été étudiée sous une forme saturée ou non en fer (Bortner *et al.* , 1989; 1986). Ces deux

études ont montré que 90 µg/mL de lactoferrine non ferritinisée sont suffisants pour tuer 99.99% d'une population de *Legionella* après deux heures de traitement. En revanche, la lactoferrine ferritinisée de cette glycoprotéine ne permet pas de réduire la viabilité de *Legionella* dans les mêmes conditions (Bortner *et al.* , 1986). Bien que le mode d'action de cette molécule sur *Legionella* n'ait pas été déterminé, une étude a montré que cette glycoprotéine induisait une perturbation de la paroi cellulaire chez les bactéries à Gram négatif. La lactoferrine se lie à des récepteurs à la surface cellulaire, ce qui conduit à la mort de la bactérie (Jenssen *et* Hancock, 2009).

3.2.2.2. Peptides dérivés de protéines

Deux fragments synthétiques protéiques ont montré une activité anti-*Legionella* : le peptide C18G, dérivé des 13 derniers résidus du facteur plaquettaire humain de type IV et le fragment NK-2, correspondant à une séquence partielle de la protéine lymphatique NK-lysine chez le porc (Darveau *et al.* , 1992; Leippe, 1995).

Concernant le peptide synthétique C18G (ALYKKLLKKLLKSAKKLG; 2043 Da), son activité a été évaluée contre *L. pneumophila* et présente une CMI comprise entre 32 et 128 µg/mL selon les concentrations en Mg^{2+} contenues dans l'expérience (Robey *et al.* , 2001).

Le fragment protéique NK-2 (KILRGVCKKIMRTFLRRISKDILTGKK; 3203 Da) a également été évalué pour son activité anti-*Legionella* (Schlusselhuber *et al.* , 2015). Cette étude révèle qu'une concentration de 1,6 µM de ce peptide est suffisante pour éliminer *Legionella*. Le mode d'action de ce composé a été étudié sur des liposomes composés de phosphatidyléthanolamine et de phosphatidylcholine, ces derniers représentant les phospholipides membranaires les plus abondants chez les bactéries (Sohlenkamp et Geiger, 2016). Ces travaux révèlent une interaction directe du peptide NK-2 avec ces lipides membranaires, induisant une augmentation de la rigidité membranaire. L'augmentation de cet effet induit une courbure intrinsèque de ces membranes, et à terme leur destruction (Willumeit *et al.* , 2005).

3.2.2.3. Peptides antimicrobiens

À ce jour, seuls trois peptides antimicrobiens produits par la cione (*Ciona intestinalis*) et par la fausse teigne (*Galleria mellonella*) ont été étudiés pour leur capacité à inhiber *L. pneumophila*.

Les peptides Ci-MAM-A24 et Ci-PAP-A22 sont des peptides synthétiques cationiques produits à partir de deux précurseurs peptidiques retrouvés naturellement chez *C. intestinalis* (Di Bella *et al.* , 2011; Fedders *et* Leippe, 2008; Fedders *et al.* , 2008). Ces deux composés ont été évalués pour leur capacité à inhiber *L. pneumophila* (Schlusselhuber *et al.* , 2015). Ces travaux ont permis de déterminer une CMI de 1.6 µM pour le peptide Ci-MAM-A24 et 25 µM pour le peptide Ci-PAP-A22. L'étude du mécanisme d'action de ces deux composés sur *L. pneumophila* a finalement montré une perméabilisation de la membrane de la bactérie.

Par ailleurs, ces peptides ont également été évalués pour leur capacité à induire une lyse d'*A.castelanii*, l'hôte naturel de *Legionella* (Schlusselhuber *et al.* , 2015). Les résultats de ce travail indiquent que le traitement d'*A.castellanii* avec 25 µM de peptide Ci-MAM-A24 est suffisant pour induire la perméabilisation de 85% des amibes traitées, tandis que le peptide Ci-PAP-A22 n'induit pas d'effet à cette concentration.

Une défensine (défensine Gm) purifiée à partir de l'hémolymphe de G. *mellonella* a également montré une activité contre *L. dumoffii* (Cytryńska *et al.* , 2007; Palusińska-Szysz *et al.* , 2012). Ce peptide présente une masse moléculaire de 4714,6 Da et est caractérisé par un motif peptidique contenant 6 cystéines, conservé chez l'ensemble des défensines d'insectes (Lee *et al.* , 2004; Shafee *et al.* , 2017). Une analyse par microscopie électronique à transmission a montré qu'un traitement avec 40 µg/mL de défensine Gm affectait la morphologie cellulaire de *L. dumoffii* et induisait la perte du contenu cellulaire de la bactérie. D'autre part, des dommages membranaires ont également été observés, suggérant une perméabilisation de la membrane de *L. dumoffi* par ce composé (Palusińska-Szysz *et al.* , 2012). Bien que le mécanisme d'action de ce peptide n'ait pas été étudié davantage sur *L. dumoffii*, l'ensemble des défensines d'insectes partagent les mêmes topologies structurales, ce qui suggère

une interaction similaire de ces peptides avec les membranes (Shafee *et al.* , 2017). En effet, toutes les structures tridimensionnelles des défensines d'insectes sont constituées d'un domaine en hélice-α et de deux feuillets-β antiparallèles stabilisés entre eux par trois ponts disulfures (SCαβ : motif αβ stabilisé par des cystéines) (Dias *et* Franco, 2015; Koehbach, 2017). Leur activité sur les membranes des bactéries à Gram négatif est expliquée par la présence de charges positives retrouvées dans leur structure, qui interagissent rapidement avec les charges négatives des membranes. Ces interactions conduisent à la formation de pores membranaires et à terme à la perméabilisation des cellules (Koehbach, 2017).

3.2.3. Composés produits par des bactéries

Deux genres bactériens sont décrits pour produire des composés à activité anti-*Legionella*. Ces deux genres sont *Bacillus* et *Staphylococcus*, tous deux phylogénétiquement éloignés de *Legionella* et appartenant au phylum des Firmicutes.

3.2.3.1. Peptides anti-*Legionella* produits par *Staphylococcus* spp.

Les bactéries du genre *Staphylococcus* sont connues pour produire un grand nombre de peptides hémolytiques qui ont été pour certains étudiés pour leur propriétés anti-*Legionella* (**Tableau 1**) (Marchand *et al.* , 2011; Verdon *et al.* , 2008). Les premiers peptides anti-*Legionella* caractérisés sont la warnericine RK et les δ-hemolysines I et II produits par l'espèce *S. warneri* (Verdon *et al.* , 2008). Ces petits peptides (22 acides aminés) présentent des caractéristiques biochimiques et un mode d'action similaires. Ce sont des composés cationiques pouvant être formylés, et leur activité antibactérienne est pratiquement restreinte au genre *Legionella*. Depuis, plusieurs autres peptides anti-*Legionella* ont été caractérisés chez le genre *Staphyloccocus* (**Tableau 1**) (Marchand *et al.* , 2011).

Tableau 1. Liste des peptides hémolytiques produits par des bactéries du genre *Staphylococcus* et ayant des propriétés anti-*Legionella* connues. ND: séquence non-déterminée ; f-peptide : peptides formylés.

Peptides	Séquence	Espèce productrice	CMI* (µM)	Références
f-δ-hemolysine	MAQDIISTIGDLVKWIIDTVNKFTKK	S. *aureus*	1,05	(Marchand et al., 2011; Wiseman, 1975)
Hemolysin-H2	MDFIIDIIKKIVGLFTGK	S. *cohnii*	3,04	(Mak et al., 2008; Marchand et al., 2011)
f-PSM!	MADVIAKIVEIVKGLIDQFTQK	S. *epidermidis*	0,63	
f-δ-hemolysine	MMAADIISTIGDLVKWIIDTVNKFKK	S. *epidermidis*	1,59	(Marchand et al., 2011; McKevitt et al., 1990; Mehlin et al., 1999)
PSM!	MADVIAKIVEIVKGLIDQFTQK	S. *epidermidis*	1,9	
f-PSMß	MSKLAEAIANTVKAAQDQDWTKLGTSIVDIVESGVSVLGKIFGF	S. *epidermidis*	2,69	
Haemo 3	ND	S. *haemolyticus*	1,38	
f-Ggi II	MEKIANAVKSAIEAGQNQDWTKLGTSILDIVSNGVTELSKIFGF	S. *haemolyticus*	13,23	(Marchand et al., 2011; Watson et al., 1988)
f-Ggi I	MQKLAEAIAAAVSAGQDKDWGKMGTSIVGIVENGITVLGKIFGF	S. *haemolyticus*	4,15	
f-SLUSH C	MDGIFEAISKAVQAGLDKDWATMGTSIAEALAKGVDFIIGLFH	S. *lugdunensis*	5,16	(Donvito et al., 1997; Marchand et al., 2011)
f-SLUSH A	MSGIVDAITKAVQAGLDKDWATMATSIADAIAKGVDFIAGFFN	S. *lugdunensis*	11,28	
δ-hemolysine I	MAADIISTIGDLVKLIINTVKKFQK	S. *warneri*	1,08	
f-warnericine RK	MQFITDLIKKAVDFFKGLFGNK	S. *warneri*	0,54	
warnericine RK		S. *warneri*	0,3	(Marchand et al., 2011; Verdon et al., 2008)
f-δ-hemolysine II	MTADIISTIGDFVKWILDTVKKFTK	S. *warneri*	1,17	
δ-hemolysine II		S. *warneri*	1,09	

* concentrations déterminées avec *L. pneumophila* Lens

En 2009, l'étude structurale de la warnericine RK a permis de mettre en évidence que ce peptide formait une hélice alpha amphiphile entre les résidus 4 et 16 lorsque qu'il entre en interaction avec une membrane (mimée par l'ajout de vésicules de dimyristoylphosphatidylcholine) (Verdon *et al.* , 2009). Il a également été montré que ce peptide formait des canaux membranaires sur les érythrocytes et sur des modèles de membranes lipidiques et que cette sensibilité est principalement liée à la composition lipidique de la membrane de *Legionella* (Verdon *et al.* , 2011). Cependant, du fait de leur pouvoir hémolytique et de leur coût de revient, l'utilisation de ces peptides n'est pas envisageable dans le traitement de l'eau.

3.2.3.2. Surfactines produites par *Bacillus subtilis*

Les surfactines appartiennent à la famille des lipopeptides cycliques et sont produites par l'espèce *Bacillus subtilis*. Leur structure amphiphile est composée d'un heptapeptide cyclique lié à un acide gras β-hydroxylé contenant de 13 à 15 atomes de carbones (Peypoux *et al.* , 1999; Zhao *et al.* , 2017) (**Figure 16**).

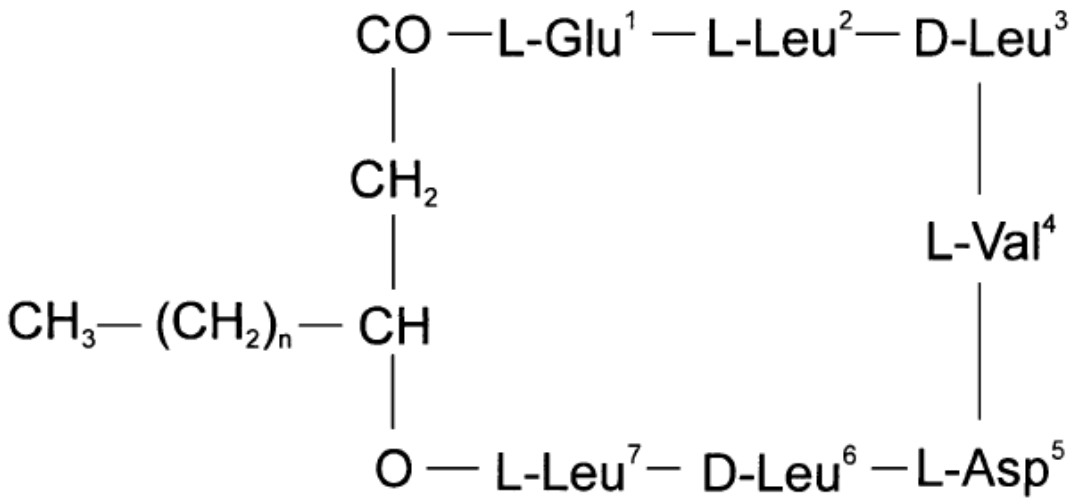


Figure 16. Structure générale des surfactines. (n = 9 à 11) (Carrillo *et al.* , 2003)

Les surfactines sont principalement connues pour leurs propriétés tensioactives et pour leur activités antibactériennes et anti-virales (Sabaté *et* Audisio, 2013; Yuan *et al.* , 2018). En 2015, un travail a montré que les surfactines présentaient également des propriétés anti-*Legionella* (Loiseau *et al.* , 2015). La souche productrice utilisée

dans ce travail, *B. subtilis* AM1, produit un mélange de deux isoformes de la surfactine actives contre *L. pneumophila*. Les deux chaînes d'acides gras de ces isoformes ont été identifiées et correspondent à des acides gras composés de 13 et 15 atomes de carbones (Loiseau *et al.* , 2015).

Dans ce même travail, l'activité antibactérienne des surfactines a été évaluée sur plusieurs espèces de *Legionella* appartenant à différents sérogroupes (*L. bozemanii*, *L. dumoffii*, *L. longbeachae*, *L. oakridgensis*, *L. feeleii*, *L. micdalei*, *L. pneumophila* Sg 1, 3, 5 et 6). Une concentration de surfactine comprise entre 1,5 à 4 µg/mL est suffisante pour inhiber la croissance de l'ensemble des souches testées (Loiseau *et al.* , 2015). Il a également été montré qu'une concentration de 66 µg/mL de surfactine permettait d'éliminer un biofilm préformé de *Legionella* en laboratoire (Loiseau *et al.* , 2015). Bien que le mécanisme d'action des surfactines n'ait pas été déterminé sur *Legionella*, des travaux ont étudié l'action de ce type de molécule sur les membranes (Buchoux *et al.* , 2008; Carrillo *et al.* , 2003). Ces études démontrent que la surfactine altère les structures membranaires par perméabilisation, conduisant à la perte du contenu cellulaire (Carrillo *et al.* , 2003). Cette observation est justifiée par une forte interaction entre la surfactine et la phosphatidylcholine membranaire, un des phospholipides les plus abondants de la membrane de *Legionella* (Hindahl *et* Iglewski, 1984; Palusińska-Szysz *et al.* , 2016; 2011). Cette déstabilisation membranaire est également accompagnée d'un mécanisme de répulsion entre les charges négatives des résidus acides de la surfactine (Glu, Asp) et les charges négatives des phopholipides (Phosphatidylglycérol et Phosphatidylsérine), favorisant la courbure membranaire et à terme la destruction de la membrane (Buchoux *et al.* , 2008). Récemment, la toxicité et la biodégradabilité des surfactants produits par *Bacillus subtilis* ont été évaluées (De Oliveira *et al.* , 2017). La toxicité de la surfactine a été évaluée sur le crustacé planctonique *Daphnia magnia* et indique une IC 50 de 170 µg/mL. Ces auteurs ont également évalué cette toxicité sur l'algue unicellulaire *Selenastrum capriconutum*, qui semble plus sensible à la surfactine (IC 50 = 49.3 µg/mL). Cette même étude a finalement évalué la biodégradabilité de la surfactine dans une communauté complexe microbienne et indique une dégradation de 61% du composé avec une solution à 25 µg/mL après 9 jours de traitement (De Oliveira *et al.* , 2017).

Par conséquent, la surfactine est le premier composé anti-*Legionella* produit par une bactérie qui présente une bonne biodégradabilité et une faible toxicité sur les organismes aquatiques. De fait, ce composé pourrait être qualifié comme biocide dans le traitement des réseaux d'eau

Objectifs de la thèse

L'ensemble des informations contenues dans la littérature permettent d'établir le bilan suivant :

- Les traitements utilisés pour contrôler la prolifération des légionelles dans les réseaux d'eau ne sont pas complètement efficaces et présentent un impact considérable sur l'environnement.

- Les différents états physiologiques de *L. pneumophila* de même que la présence de protozoaires et de biofilms sont des paramètres biologiques qui peuvent également influencer l'efficacité des traitements actuels.

- Actuellement, il n'existe pas de composés naturels efficaces pour le contrôle des légionelles dans les réseaux d'eau.

- Les bactéries présentes dans la même niche écologique que les légionelles apparaissent comme une source importante de composés anti-*Legionella*,

L'objectif principal de ce projet de thèse était de **caractériser de nouveaux composés anti-*Legionella* produits par des bactéries environnementales issues d'environnements d'eau douce**.

Plus précisément, le premier objectif de ce travail était de constituer une collection de souches bactériennes environnementales et de déterminer le profil d'activité de chaque isolat contre *L. pneumophila*. Après avoir identifié chaque souche environnementale, le deuxième objectif de cette thèse était de purifier et caractériser certains composés anti-*Legionella* produits par quatre souches de cette collection : *Flavobacterium* sp. PW 52, *Rahnella aquatilis* PoW 265, *Aeromonas bestiarum* PoW 257 et *Pseudomonas* sp. PW 329. Enfin, le dernier objectif de ce travail était de déterminer le mécanisme d'action de ces composés sur *L. pneumophila*.

Partie 2 : Matériel et méthodes

Chapitre 1. Techniques de microbiologie

1.1. Échantillonnage et isolement de bactéries environnementales

L'échantillonnage d'eaux environnementales a été mis en place entre les mois de Janvier et Février de l'année 2016. Un prélèvement unique a été effectué à partir de cinq réservoirs différents dans le département de la Vienne (France).

Les sites de prélèvements sont constitués de quatre réservoirs naturels d'eau douce et d'un point de prélèvement de fin de réseau de distribution d'eau potable.

Description des sites de prélèvements :

(1) Piscine, Sèvres-Anxaumont (46°34'14'' N, 0°C27'57'' E) : Ce point de prélèvement correspond à l'eau d'une piscine en hivernage, n'ayant pas reçu de traitement au chlore pendant 5 mois.
(2) Rivière, Bonneuil-Matours (46°40'57'' N, 0°34'17'' E) : Ce prélèvement a été effectué au niveau d'un parc de loisir, en prélevant l'eau de surface de la rivière (Vienne). Il s'agit d'un environnement lotique naturel.
(3) Puits, Châtellerault (46°49'04'' N, 0°32'46'' E) : Ce point de prélèvement a été fait dans un puits couvert par une dalle en béton.
(4) Etang, Châtellerault (46°49'04'' N, 0°32'46'' E) : Ce point de prélèvement correspond à l'eau d'un étang d'un jardin privé. Il contient des poissons et de nombreuses végétations.
(5) Robinet, Poitiers (46°34'55'' N, 0°20'10''E) : Ce site correspond à la fin d'un réseau de distribution d'eau potable.

Les échantillons d'eau ont été conditionnés en bouteille d'un litre. Les isolements des bactéries cultivables et revivifiables de l'eau ont été effectués sur un milieu gélosé R2A (*Reasoner's 2A Agar*), fréquemment utilisé en analyse de l'eau. Le milieu R2A est composé de 18,2 g de milieu commercial R2A Agar (Difco™) pour un litre et est autoclavé à 121°C pendant 15 minutes. Pour chaque échantillon, un volume de 1 mL

d'eau a été déposé sur trois géloses R2A, qui ont été incubées à 22°C, 30°C et 37°C respectivement. Les colonies obtenues après 72H d'incubation ont été de nouveau isolées sur gélose R2A pour assurer leur pureté. Enfin, chaque isolat a été conservé en cryotube à -80°C dans une solution de glycérol 20% (v/v).

Les isolats environnementaux ont tous été nommés par un acronyme composé du lieu de prélèvement et d'un numéro associé à la purification des souches sur milieu R2A. Les acronymes utilisés pour les sites de prélèvements sont PW (piscine), RW (rivière), WW (puits), PoW (étang) et TW (robinet).

1.2. Microorganismes et conditions de culture

1.2.1. Souches microbiennes de référence

1.2.1.1. *Legionella pneumophila* Lens

Deux souches de *L. pneumophila* Lens ont été utilisées dans ce travail : *L. pneumophila* Lens Sg1 (CIP 108 286) et *L. pneumophila* Lens Sg1 GFP. Elles ont été utilisées comme souches de références pour évaluer l'activité anti-*Legionella* des isolats environnementaux de cette étude. La souche CIP 108 286 a été isolée lors de l'épidémie de légionellose survenue en 2003 dans la région de Lens (France) et provient de la collection de l'Institut Pasteur de Paris. La souche Lens-GFP provient de la collection du laboratoire EBI.

L. pneumophila Lens a été cultivée à 37°C sur milieu BCYE gélosé (Buffered Charcoal Yeast Extract) ou en milieu liquide BYE (Buffered Yeast Extract) sous agitation (180 rpm). Le milieu BYE est composé pour un litre de 5 g d'ACES et de 10 g d'extrait de levure. Le pH est ajusté à 6,9 avec du KOH 10 N. Après stérilisation par filtration sur membrane de 0,22 µm, le milieu est complémenté en L-cystéine ([finale] : 0,4 g/L) et en pyrophosphate de fer ([finale] : 0,25 g/L). Le milieu BCYE est préparé à partir de BYE non stérilisé, en ajoutant 2 g/L de charbon actif et 15 g/L d'agar. Le milieu est ensuite autoclavé à 121°C pendant 15 minutes avant d'être complémenté en L-cystéine et pyrophosphate de fer. Pour la souche *L. pneumophila Lens* GFP, du

chloramphénicol est ajouté au milieu à une concentration finale de 10 µg/mL.

1.2.1.2. *Pseudomonas fluorescens* MFE01

La souche *Pseudomonas fluorescens* MFE01 a été utilisée comme souche de référence pour la production de composés organiques volatiles (COVs). Elle a été fournie par le laboratoire LMSM (Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement) de l'Université de Rouen. Cette souche a été cultivée en milieu LBmod (Lysogeny-Broth modifié) liquide ou gélosé contenant une concentration réduite en NaCl. Le milieu LBmod liquide est composé pour un litre de 10 g de tryptone, 5 g de NaCl et de 5 g d'extrait de levure. Lorsque le milieu LBmod est gélosé, 15 g d'agar ont été ajoutés. Le milieu a ensuite été autoclavé à 121°C pendant 15 minutes.

1.2.1.3. *Acanthamoeba castellanii*

Acanthamoeba castelanni est une espèce d'amibe libre retrouvée naturellement dans les eaux douces. La souche d'*A. castellanii* Neff ATCC 30010 a été cultivée à 30°C en flasque de 175 cm^3 avec 20 mL de PYG (Peptone Yeast Glucose). Le milieu PYG est composé pour un litre de 20 g de proteose peptone, d'1 g d'extrait de levure, de 18 g de glucose, d'1 g de citrate de sodium déshydraté, de 10 mL d'une solution de MgSO4 à 4 mM, de 10 mL d'une solution de Na_2HPO_4 à 2,5 mM, de 10 mL d'une solution de KH_2PO_4 à 2,5 mM, de 8 mL d'une solution de $CaCl_2$ à 0,4 M et de 2,5 mL d'une solution de $(NH_4)FeII(SO_4)_2$ $6H_2O$ à 0,05 mM.

Avant chaque expérience, les cellules d'amibes adhérentes ont été lavées avec 15 mL de tampon PAS (Page's Amoeba Saline). Le tampon PAS est composé pour un litre d'1 g de citrate de sodium, de 10 mL d'une solution de $MgSO_4$ à 4 mM, de 10 mL d'une solution de Na_2HPO_4 à 2,5 mM, de 10 mL d'une solution de KH_2PO_4 à 2,5 mM, de 8 mL d'une solution de $CaCl_2$ à 0,4 M et de 2,5 mL d'une solution de (NH_4) $FeII(SO_4)_2$ $6H_2O$ à 0,05 mM.

1.2.2. Souches bactériennes environnementales

Les souches bactériennes suivantes ont été isolées à partir d'eaux environnementales. Elles présentent une activité antagoniste sur *Legionella* et/ou sur *A. castelanii* et ont fait l'objet de travaux sur la caractérisation des composés impliqués dans ces activités.

1.2.2.1. *Aeromonas bestiarum* PoW 257

La souche environnementale *Aeromonas bestiarum* PoW257 a été cultivée en milieu LB liquide. Le milieu LB liquide est composé pour un litre de 10 g de tryptone, 10 g de NaCl et de 5 g d'extrait de levure. Le milieu est ensuite autoclavé à 121°C pendant 15 minutes.
A. bestiarum a été inoculé dans un volume de 100 mL de milieu LB dans un erlen de 500 mL à une DO_{600nm} = 0,01. La croissance de la souche a été réalisée à 30°C pendant 48 heures sous agitation (180 rpm). Le surnageant d'*A. bestiarum* a été obtenu par centrifugation à 9000 g pendant 15 minutes à 4°C et a été filtré sur une membrane de 0,22 µm.

1.2.2.2. *Flavobacterium sp*. PW 52

La souche environnementale *Flavobacterium sp.* PW 52 a été cultivée en milieu BYE. Un volume de 100 mL de milieu BYE a été inoculé dans un erlen de 500 mL avec une suspension de *Flavobacterium sp.* PW 52 ajustée à DO_{600nm}=0,01. La croissance de la souche a été réalisée à 22°C pendant 48 heures sous agitation (150 rpm). Le surnageant de *Flavobacterium* a été obtenu par centrifugation à 9000g pendant 20 minutes.

1.2.2.3. *Rahnella aquatilis* PoW 265

La souche *Rahnella aquatilis* PoW 265 a été cultivée en milieu BYE, additionné ou non de 0,25 g/L de pyrophosphate de fer. Un volume de 100 mL de milieu BYE a été

inoculé dans un erlen de 500 mL avec une suspension de *R. aquatilis* PoW265 ajustée à DO_{600nm} = 0,01. La croissance de la souche a été réalisée à 30°C pendant 48 heures sous agitation (180 rpm). Le surnageant de *R. aquatilis* a été obtenu par deux centrifugations successives de 20 minutes à 9000g et a été filtré à travers une membrane de 0,22 µm.

1.3. Mesures d'activité des bactéries environnementales sur *L. pneumophila*

1.3.1. Évaluation de l'activité par test de diffusion en gélose

Le spectre d'activité des isolats environnementaux contre *L. pneumophila* a été réalisé en milieu BCYE gélosé (**Figure 17**).

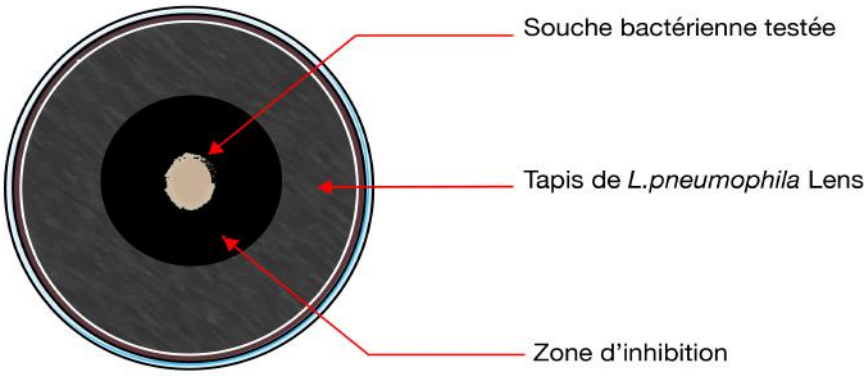


Figure 17. Test d'inhibition de *L. pneumophila* par diffusion en gélose.

Une suspension de *L. pneumophila* Lens a été ajustée à une concentration de 10^8 UFC/mL (DO_{600nm} = 0,1) et 100 µL ont été étalés sur une gélose BCYE. L'activité des isolats a été étudiée en déposant 10 µL d'une suspension de chaque souche bactérienne au centre de la gélose. Selon l'isolat, les boîtes ont été incubées pendant 48 heures à 22, 30 ou 37°C, avant d'être de nouveau incubées pendant 48 heures à 37°C. Après la période d'incubation, l'activité anti-*Legionella* a été déterminée par mesure des diamètres d'inhibition autour de chaque isolat.

1.3.2. Évaluation de l'activité par test d'inhibition à longue distance

Les isolats montrant une inhibition de croissance totale de *L. pneumophila* sur gélose BCYE ont été évalués pour leur capacité à produire des composés organiques volatiles (COVs). Un test d'inhibition à longue distance a été mis en place en microplaque 6 puits selon le schéma d'expérience présenté en **Figure 18**.

Chacun des puits de la microplaque a été rempli avec 5 mL de milieu BCYE. Un volume de 10 µL d'une suspension de *L. pneumophila* Lens ajustée à DO_{600nm} = 0,1 (~10^8 UFC/mL) a été déposé sur la gélose dans les puits A1 et A3. Un volume de 40 µL d'une suspension bactérienne à tester a été ajustée à DO_{600nm} = 1 au centre du puits A2. Les microplaques ont été incubées pendant 4 jours à 30°C. La production de VOCs par les souches environnementales testées est montrée par l'absence de croissance de *L. pneumophila* Lens.

Dans certains cas, *L. pneumophila* Lens GFP a été utilisée pour évaluer l'activité d'isolats environnementaux à longue distance. La croissance de *Legionella* a été quantifiée par fluorescence à l'aide d'un lecteur de plaque (Tristar2 LB942, Berthold).

Ce protocole a également été optimisé pour évaluer l'activité produite par les souches de *Pseudomonas* environnementales, en utilisant *Pseudomonas fluorescens* MFE01 comme contrôle positif de production de COVs. Dans ce cas, les puits B1 et B2 ont été remplis avec 5 mL de milieu LB contenant une concentration de NaCl réduite à 5 g/L.

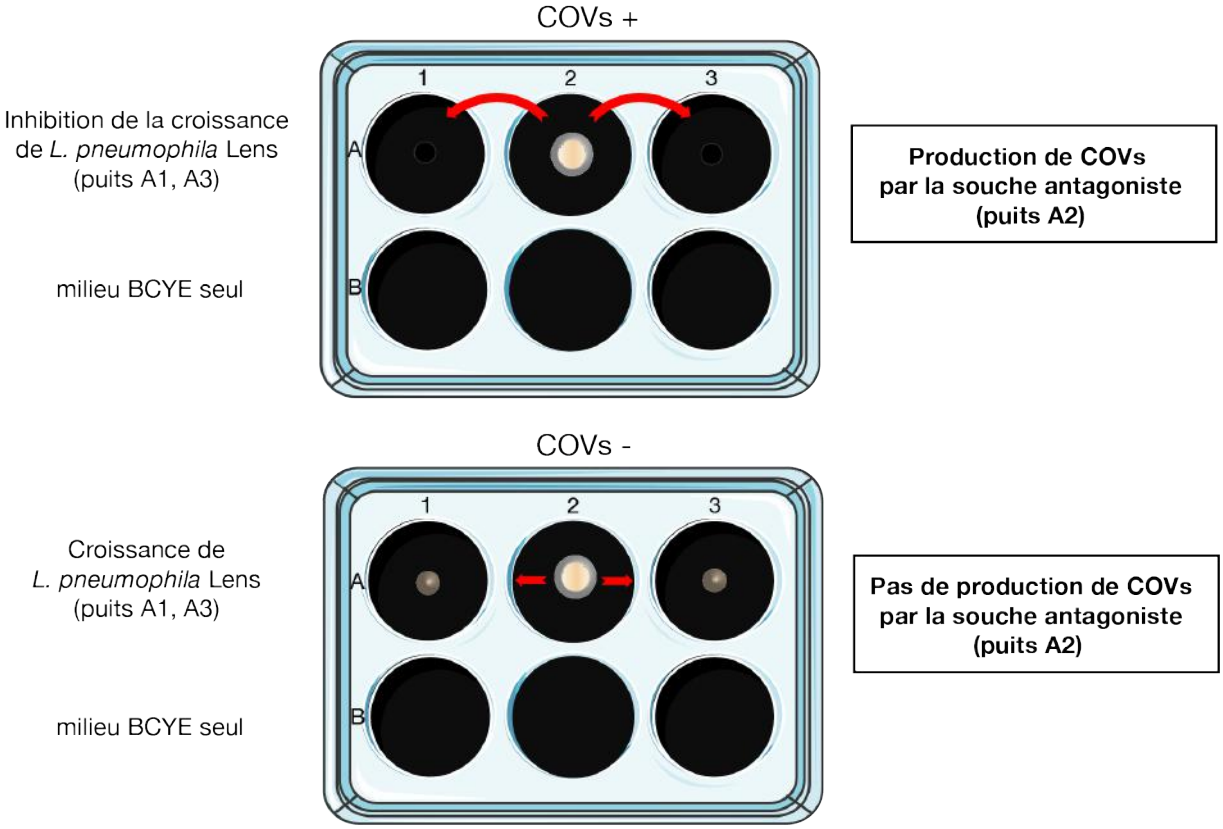


Figure 18. Test d'inhibition de *L. pneumophila* à longue distance. La mise en évidence de l'activité anti-*Legionella* entre deux souches physiquement séparées a été évaluée en plaque 6 puits. Les bactéries productrices de composés organiques volatiles (puits A2- schéma du haut) sont capables d'inhiber *Legionella* à longue distance (puits A1 et A3 – schéma du haut), tandis que les bactéries productrices de composés exclusivement diffusibles (puits A2- schéma du bas) ne sont pas capables d'inhiber *L. pneumophila* dans ces conditions (puits A1 et A3 – schéma du bas).

1.3.3. Activité des surnageants de culture bactériens et des composés purifiés

1.3.3.1. Test d'activité par diffusion en gélose

L'activité des surnageants bactériens et des composés purifiés à partir des souches *Aeromonas bestiarum* PoW 257, *Flavobacterium sp.* PW 52 et *Rahnella aquatilis* PoW 265 a été évaluée sur milieu BCYE contre *L. pneumophila*. Pour ce faire, une suspension de *L. pneumophila* Lens a été ajustée à une concentration de 10^8 UFC/mL (DO_{600nm} = 0,1) et 100 µL ont été étalés sur une gélose BCYE. A l'aide d'une pipette pasteur stérile, un puits a été formé à l'intérieur de la gélose et 100 µL de surnageant ou de composé purifié (concentré 10 à 50 fois par lyophilisation) ont été déposés. Après 72 heures d'incubation à 37°C, l'activité des surnageants et des composés purifiés a été observée par la présence d'un halo d'inhibition autour du puits.

1.3.3.2. Test d'activité par mesure de densité optique

Pour tester l'activité des surnageants en microplaque, une suspension de *L. pneumophila* a été ajustée à DO_{600nm} = 0,001 (~10^6 UFC/mL) en milieu BYE complémenté en pyrophosphate de fer et en L-cystéine.

Après avoir déposé 190 µL de suspension de *L. pneumophila* dans chacun des puits, 10 µL de surnageant concentré ou de composé purifié ont été ajoutés. Après 72 heures d'incubation à 37°C, la croissance de *L. pneumophila* a été évaluée par mesure d'absorbance à 595 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque (TECAN, sunrise).

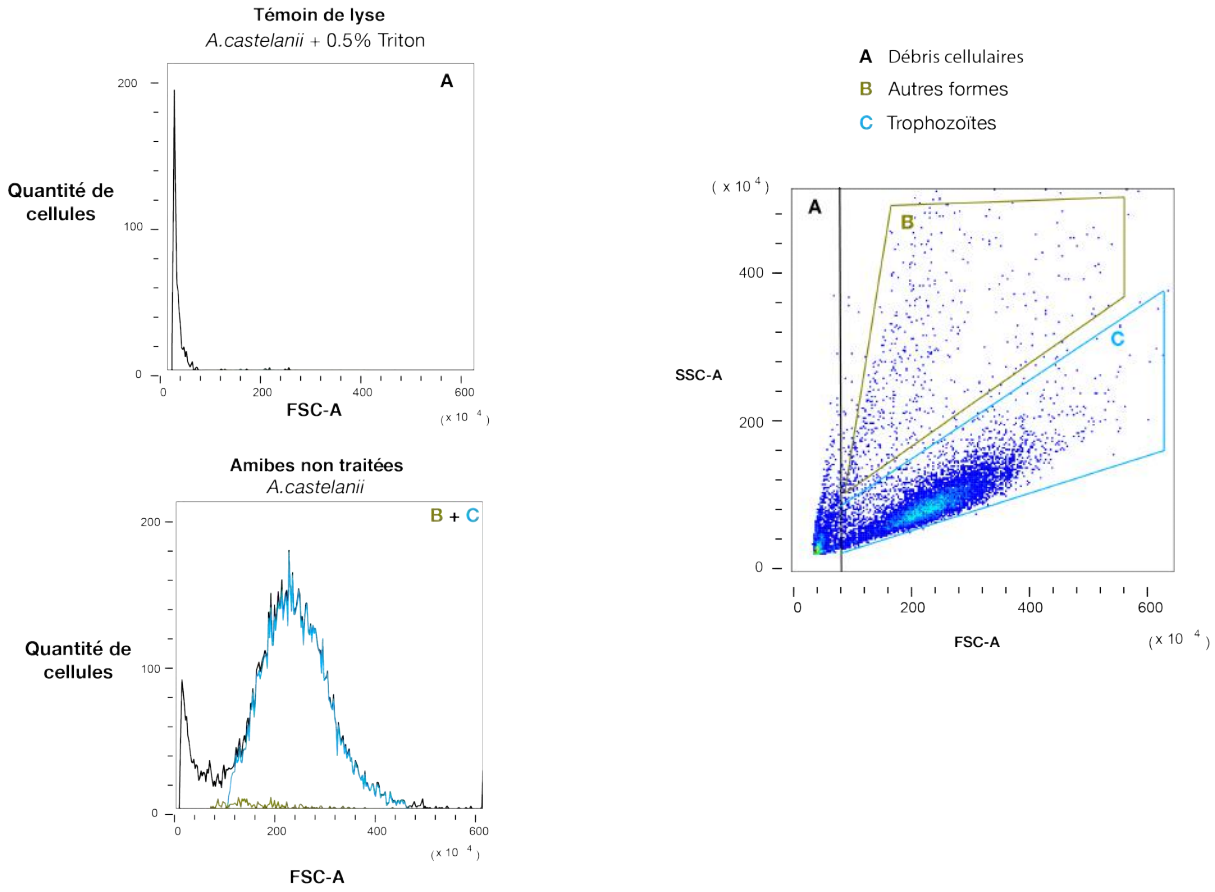


Figure 19. Caractéristiques des populations d'amibes observées par cytométrie de flux. L'analyse des cellules d'Acanthamoeba castellanii par cytométrie de flux permet de différencier plusieurs populations en fonction de la taille et de la structure interne des cellules. Après traitement avec un contrôle positif de lyse, les débris cellulaires seront observés dans la population A. En absence de traitement, les cellules sont séparées sur trois populations distinctes. La population C, majoritaire, représente les cellules sous forme trophozoïte, la population B représente des cellules ayant subi des modifications morphologiques (cellules arrondies, en cours d'enkystement). Enfin, quelques débris peuvent être observés et seront représentés par la population A.

1.4. Evaluation de l'activité anti-amibe de surnageants bactériens

Afin de déterminer l'effet des surnageants de culture de certaines bactéries environnementales sur *Acanthamoeba castellanii*, un test d'activité en microplaque 96 puits a été mis en place. Les surnageants bactériens utilisés ont été au préalable concentrés 10 fois par lyophilisation. La reprise des culots a été faite dans du milieu PYG.

Les amibes ont été préalablement cultivées en flasque de culture en milieu PYG jusqu'à confluence. Les amibes ont ensuite été décollées par tapotements de la flasque et la concentration de cellules a été estimée par comptage sur lame Fastread (Fast-read 102, Biosigma). Un volume de 180 µL d'une suspension d'amibes ajustée à 5.10^4 cellules/mL dans du PYG a été déposé dans chaque puits de plaque. La plaque a été incubée pendant 1 heure à 30°C afin de laisser adhérer les amibes, avant d'être traitée par 20 µL de chaque surnageant bactérien. La plaque a finalement été incubée pendant 24 heures à 30°C.

Les cellules sont ensuite décollées par pipetages successifs et grattage et analysées par cytométrie de flux à l'aide d'un CytoFLEX® (Beckman Coulter) équipé d'un laser bleu à 488 nm. L'analyse a été calibrée pour enregistrer 10 000 évènements avec un débit de 60 µL par minute par échantillon. Les résultats ont été traités avec le logiciel CytExpert.

En fonction de la taille des cellules et de leur structure interne, trois populations peuvent être différenciées lors de ces analyses (**Figure 19**) :

-les débris cellulaires (population A) qui indiquent une lyse des amibes.

-les formes cellulaires arrondies, stressées ou en cours d'enkystement (population B), qui indiquent un changement de la morphologie des cellules.

-les formes trophozoïtes (population C)

La concentration en trophozoïtes/mL après chaque traitement a été déterminée en quantifiant les cellules retrouvées dans la population C.

Chapitre 2. Techniques de biologie moléculaire et d'analyse bio-informatique

2.1. Extraction d'ADN

Chaque isolat environnemental à identifier a été cultivé sur une gélose R2A pendant 48H à 22°C, 30°C, ou 37°C. L'équivalent d'une anse de colonies a été resuspendu dans 200 µL d'eau stérile pour chaque isolat. Les tubes ont été chauffés au bain sec pendant 10 minutes à 96°C avant d'être centrifugés pendant 10 minutes à 12000 rpm à température ambiante. Les surnageants ont été conservés à -20°C et constituent la matrice d'ADN de départ de chaque isolat.

2.2. Identification bactérienne par séquençage du gène codant l'ARNr 16S.

Dans ce travail, les souches environnementales ont été identifiées par la méthode de séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S, en amplifiant les régions V1 à V4 de ce gène (759 pb). Ce gène présente l'avantage d'être universel au sein du monde bactérien et permet l'identification d'une souche au moins au niveau du genre.

2.2.1. Amplification du gène codant l'ARNr 16S par PCR

Le gène codant pour l'ARNr 16S des isolats bactériens a été amplifié en utilisant le couple d'amorces universelles 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') / 786R (5'-CTA CCA GGG TAT CTA ATC-3') (Frank *et al.,* 2008; Guettler *et al.,* 1999). Chaque tube réactionnel est composé de 5 µL de tampon 5X Green comprenant 7,5 mM de $MgCl_2$ (Promega®), de 0,9 µL d'un mélange de dNTPs à 5 mM, de 0,6 µL de chaque amorce à 10 µM, de 0,32 µL de GoTaq Flexi DNA polymérase (Proméga®) et de 0,8 µL de matrice d'ADN. Le volume réactionnel a ensuite été ajusté à 20 µL avec de l'eau milliQ.

L'amplification par PCR a été effectuée sur 30 cycles, comprenant une dénaturation à 94°C pendant 30 secondes suivie d'une hybridation à 50°C pendant 30 secondes

et d'une d'extension à 72°C pendant 1 minute. Elle est terminée par une élongation finale à 72°C pendant 5 minutes.

Après vérification de la qualité des amplicons (759 pb) sur gel d'agarose 1%, les amorces et les dNTPs résiduels ont été éliminés en utilisant de la phosphatase alcaline de crevette (M0371S, New England Biolabs) et de l'exonucléase I (M0293S, New England Biolabs). Pour ce faire, 1U/µL de phosphatase alcaline et 10 U/µL d'exonucléase ont été ajoutés à 6 µL de produit PCR. Les tubes ont été incubés pendant 15 minutes à 37°C et les enzymes ont ensuite été inactivées par incubation à 80°C pendant 15 minutes.

2.2.2. Séquençage

Les réactions de séquençage ont été effectuées avec le kit BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems ®) en utilisant les amorces universelles 27F/786R. Ce protocole a été adapté en plaque de séquençage 96 puits (Biolabs) afin d'identifier 48 souches bactériennes par analyse. Chaque réaction sens et anti-sens a été analysée dans le but d'améliorer la qualité des séquences obtenues. Pour ce faire, deux mélanges réactionnels ont été préparés. Le mélange "Sens" contient 96 µL de tampon de séquençage 5X (Applied Biosystems®), 48 µL de BigDye® Terminator, 153 µL d'amorce 27F à 1 µM et 110 µL d'eau milliQ. Le mélange "anti-sens" est composé de la même manière en remplaçant le volume d'amorce 27F par 153 µL d'amorce 786R à 1 µM.

Un volume de 8,5 µL de mélange réactionnel a été déposé dans chaque puits de la plaque en suivant le schéma présenté dans la **Figure 20**. Chaque puits de plaque a été complété par 1,5 µL de produit PCR correspondant. Chaque réaction de séquence comprend une étape de dénaturation initiale à 96°C pendant 1 minute, suivie sur 25 cycles composés d'une dénaturation à 96°C pendant 10 secondes, d'une hybridation à 50°C pendant 5 secondes et d'une élongation à 60°C pendant 4 minutes.

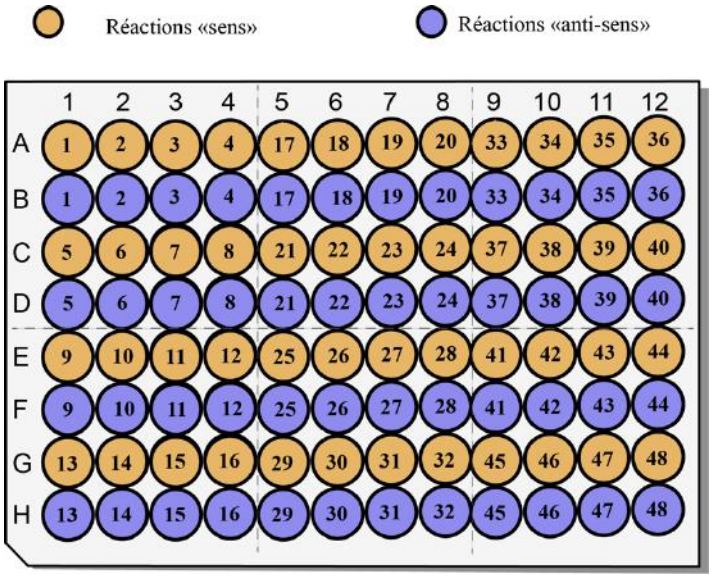


Figure 20. Schéma de plaque de séquençage utilisée pour l'identification bactérienne des isolats environnementaux. Chaque plaque permet d'identifier 48 souches. Les séquences destinées à l'identification sont obtenues par chevauchement de séquences entre les produits de réactions « sens » (orange) et « anti-sens » (violet).

Les produits de séquençage ont été précipités à température ambiante avec 75 µL d'une solution d'éthanol 70% contenant 0,5 mM de $MgCl_2$. La plaque a été centrifugée 30 minutes à 2000 g à température ambiante. Après élimination des surnageants par retournement de la plaque, les culots d'ADN ont été lavés avec 200 µL d'éthanol 70%. La plaque a de nouveau été centrifugée 30 minutes à 2000g. Le surnageant a été éliminé et les culots ont été séchés à 37°C pendant 10 minutes afin d'éliminer les traces résiduelles d'éthanol. Enfin, les échantillons ont été repris avec 20 µL de formamide et ont été conservés à -20°C jusqu'à leur analyse.

Les échantillons ont été analysés à l'aide d'un séquenceur ABI Prism 3100 (Applied Biosystems®).

2.2.3. Alignements des séquences et analyse phylogénétique

La qualité de chaque séquence obtenue a été analysée à l'aide du logiciel SequencingApplied 5.2 (Applied Biosystems ®) avant d'être nettoyée à l'aide du logiciel 4Peaks. Les séquences sens et antisens ont ensuite été assemblées en utilisant le logiciel SerialCloner 2-1. Chaque séquence consensus a ensuite été confrontée à la base de données de références nr/nt en utilisant BlastN (Altschul *et al.,* 1990).

Les séquences obtenues pour chaque isolat ont ensuite été alignées à l'aide de l'algorithme MUSCLE (Edgar, 2004a; 2004b). L'analyse phylogénétique a été réalisée à partir des séquences alignées sur 480 pb (région V2-V4, positions: 201-681) en utilisant le logiciel MEGA v7 (Kumar *et al.,* 2016). La phylogénie a été construite en utilisant la méthode de maximum de vraisemblance et la robustesse des nœuds a été calculée en appliquant 1000 itérations de bootstrap. L'arbre généré a été mis en forme en utilisant iTOL (Letunic and Bork, 2016).

2.3. Identification bactérienne par typage MLSA

La technique d'analyse par séquençage multilocus (MLSA) consiste à analyser une séquence nucléotidique obtenue par la concaténation de plusieurs séquences de gènes de ménage. Chez les bactéries, elle permet de réaliser des identifications au niveau de l'espèce. Dans ce travail, le séquençage MLSA a permis de confirmer l'espèce de la souche *Aeromonas* sp*.* PoW257.

2.3.1. Amplification des gènes de ménage par PCR

L'identification de l'espèce par MLSA chez *Aeromonas* sp. PoW 257 a été effectuée à l'aide des six gènes suivants : *atpD* (sous-unité β du domaine extramembranaire F1 de l'ATP synthase), *dnaX* (sous-unités τ et γ de l'ADN polymérase III), *gltA* (Citrate synthase), *groL* (protéine chaperonne GroEL), *gyrA* (sous-unité α de l'ADN gyrase) et

gyrB (Sous-unité β de l'ADN gyrase). Le principe du séquençage par MLSA chez la souche *Aeromonas* sp. PoW 257 est expliqué dans la **Figure 21**. Les amorces utilisées pour l'amplification de ces gènes sont données dans le **Tableau 2** (Martinez-Murcia *et al.,* 2011; Martino *et al.,* 2011).

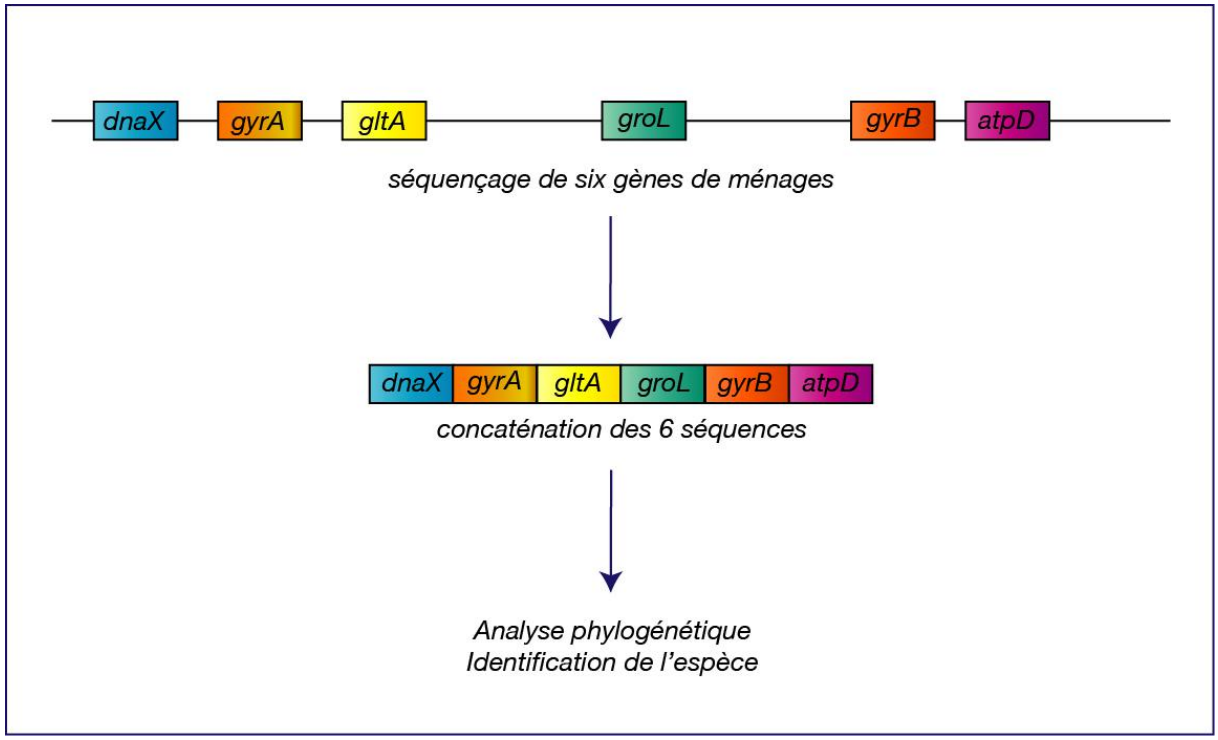


Figure 21. Principe de la technique d'analyse par séquençage multilocus (MLSA) appliquée à l'identification d'une espèce d'*Aeromonas* sp.. La technique MLSA consiste à analyser la séquence de 6 fragments de gènes de ménages (*dnaX*, *gyrA*, *gltA*, *groL*, *gyrB*, *atpD*) et de les assembler par concaténation. La séquence concaténée, suffisamment discriminante au niveau de l'espèce, est utilisée en analyse phylogénétique pour l'identification.

Tableau 2. Liste des gènes utilisés et caractéristiques des amorces associées pour l'identification de la souche d'*Aeromonas* sp. PoW 257 par analyse MLSA.

Gène	Produit du gène	Amorces	Séquences (5'-3')	Taille du gène (pb)	Taille de l'amplicon (pb)	Position sur le gène	Références
atpD	Sous-unité β du domaine extramembranaire F1 de l'ATP synthase	*atpD_0F*	CGG CAT CAA GGT TAT CGA CCT G	1389	660	393 - 1052	Martinez-murcia *et al.*, 2011
		atad_7R	ACC AGC GGA TCC AGC TGA CG				
dnaX	Sous-unités ! et " de l'ADN polymérase III	*dnaX_4F*	AAA ACC CTG GAR GAG CCG CC	2553	556	422 - 977	Martinez-murcia *et al.*, 2011
		dnaX_10R#	AGC TGC ACC TCT TCC GG				
gltA	Citrate synthase	*gltA_F*	TTC CGT CTG CTC TCC AAG AT	1287	626	487 - 1112	Martino *et al.*, 2011
		gltA_R	TTC ATG ATG ATG CCG GAG TA				
gyrA	Sous-unité ! de l'ADN gyrase	*gyrA_2F*	ATG AGC GAT CTG GCC AGA GA	2748	815	1 - 815	Martinez-murcia *et al.*, 2011
		gyrA_9R	CGC GCC TTG TTC ACC TGA TA				
gyrB	Sous-unité β de l'ADN gyrase	*gyrB_F*	GGG GTC TAC TGC TTC ACC AA	2412	669	793 - 1461	Martino *et al.*, 2011
		gyrB_R	CTT GTC CGG GTT GTA CTC GT				
groL	Protéine chaperonne GroEL	*groL_F*	CAA GGA AGT TGC TTC CAA GG	1635	782	222 - 1003	Martino *et al.*, 2011
		groL_R	CAT CGA TGA TGG TGG TGT TC				

!

Pour tous les gènes, le programme d'amplification par PCR commence par une dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, suivie d'une hybridation à 57°C pendant 30 secondes et d'une élongation à 72°C pendant 1 minute (30 cycles). Le programme est terminé par une étape d'élongation finale à 72°C pendant 5 minutes.

Après vérification de la qualité des amplicons pour chaque gène sur gel d'agarose 1,5%, les produits PCR ont été purifiés en utilisant le kit NuceloSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey Nagel), selon les recommandations du fournisseur.

2.3.2. Séquençage

Les réactions de séquençage des six loci ont été effectuées avec le kit BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems ®) en utilisant les mêmes couples d'amorces que pour l'étape de PCR en point final (**Tableau 2**). Chaque réaction sens et anti-sens a été analysée dans le but d'améliorer la qualité des séquences obtenues.

Chaque tube PCR comprend 1 µL de BigDye® Terminator, 2 µL de tampon de séquençage 5X, 1,5µL de matrice d'ADN (6 matrices au total), 3,2 µL d'amorce sens ou antisens à 1 µM et 2,3 µL d'eau milliQ. Chaque réaction de séquence comprend une étape de dénaturation initiale à 96°C pendant 1 minute, suivie sur 25 cycles d'une dénaturation à 96°C pendant 10 secondes, d'une hybridation à 57°C pendant 5 secondes et d'une élongation à 60°C pendant 4 minutes.

Les produits de séquence ont ensuite été purifiés en présence de 50 µL d'acétate de sodium (0,3 M, pH 5,2) et de 100 µL d'isopropanol. Les tubes ont été incubées pendant 20 minutes à température ambiante, puis centrifugés pendant 20 minutes à 13000g. Les surnageants ont été éliminés par retournement et les culots ont été lavés avec 1 mL d'éthanol 70% (v/v). Après centrifugation des tubes pendant 20 minutes à 13000g, les surnageants ont été éliminés par retournement, et les culots ont été

séchés à 37°C. Les culots ont été repris avec 20 µL de formamide et conservés à -20°C jusqu'à leur analyse. Les échantillons ont été analysés à l'aide d'un séquenceur ABI Prism 3100 (Applied Biosystems®).

2.3.3. Analyse de la qualité des séquences et assemblage

La qualité de chaque séquence obtenue a été vérifiée à l'aide du logiciel SequencingApplied 5.2 avant d'être nettoyée à l'aide du logiciel 4Peaks. Les séquences sens et antisens ont ensuite été assemblées en utilisant le logiciel SerialCloner 2-1. Pour chaque gène, les bases chevauchantes retrouvées entre les deux fichiers ont été utilisées pour construire une séquence consensus allant de 556 à 783 pb selon les gènes (**Tableau 3**). Chaque séquence consensus a ensuite été confrontée à la base de données de références nr/nt en utilisant BlastN (Altschul *et al.,* 1990).

Tableau 3. Tailles et positions des séquences utilisées dans l'alignement des six gènes de ménage pour l'analyse MLSA.

Gène	Taille de la séquence consensus (pb)	Taille de la séquence utilisée pour la concaténation (pb)	Positions sur le gène
atpD	571	498	485 - 983
dnaX	556	157	422 - 579
gltA	625	494	592 - 1086
gyrA	815	709	68 - 776
gyrB	783	783	669 - 1451
groL	782	510	361 - 870

2.3.4. Analyse phylogénétique

En vue d'une analyse phylogénétique, les séquences concaténées des six gènes de ménages ont été intégrées dans le logiciel MEGA v7 (Kumar *et al.,* 2016). Pour chaque locus, la position de début et de fin de séquence utilisée pour l'analyse par alignement est précisée dans le **tableau 2**. Les séquences orthologues provenant de 20 espèces représentatives du genre *Aeromonas* ont été alignées avec la séquence concaténée analysée à l'aide de l'algorithme MUSCLE (Edgar, 2004a; 2004b). La séquence orthologue utilisée pour ancrer l'arbre provient de la souche *E. coli* K12 MG1655. La phylogénie a été construite par la méthode de maximum de vraisemblance en utilisant pour le calcul 1000 itérations de bootstrap.

Chapitre 3. Techniques de biochimie

3.1. Détermination de la nature des composés anti-*Legionella*

Afin d'évaluer la nature de composés responsables de l'activité anti-*Legionella*, un criblage biochimique a été mis en place à partir des surnageants de culture de souches bactériennes d'intérêt. Le maintien de l'activité a été évalué après traitement de chaque surnageant aux protéases et après chauffage à 60°C et 121°C.

Le surnageant concentré 10 à 50 fois des souches *Flavobacterium sp.* PW 52, *A. bestiarum* PoW 257 et *R. aquatilis* PoW 265 ont été traités avec 100 µg/mL de trypsine ou de protéinase K pendant 1 heure à 37°C. Ces surnageants ont également été chauffés pendant 20 minutes à 121°C ou pendant 20 minutes à 70°C. Les effets de chaque traitement sur les composés impliqués dans l'activité anti-*Legionella* ont été déterminés par test de diffusion contre la bactérie *L. pneumophila* Lens.

3.2. Analyse et quantification de sidérophore chez *R. aquatilis PoW 265* par la méthode au ChromeAzurol.

Le test au ChromeAzurol permet de détecter la production de sidérophores en milieu gélosé et de les doser en milieu liquide. Le milieu CAS contient du ChromeAzurol S (CAS) et du bromure d'hexadecyltrimethylammonium (HDTMA) qui servent d'indicateurs de production de chélateurs de fer. En absence de sidérophore dans le milieu, le CAS et l'HDTMA forment un complexe de couleur bleue avec le fer (Fe^{3+}) disponible. Lorsqu'un ou plusieurs sidérophores sont produits, le complexe CAS/HDTMA-Fe^{3+} se dissocie et le milieu devient orange.

3.2.1. Détection de sidérophore en milieu CAS gélosé

Pour les expériences de détection de la production de sidérophore chez *R. aquatilis* PoW 265, le milieu CAS gélosé a été préparé selon la méthode décrite par B.C. Louden (Louden *et al.,* 2011) . La production de sidérophores a été mise en évidence après incubation de la souche à 30°C pendant 48 heures, par l'apparition d'un halo orange autour des colonies de *R. aquatilis* PoW265.

3.2.2. Dosage de sidérophore en milieu CAS liquide

Le milieu CAS liquide a été utilisé pour le dosage de sidérophores dans le surnageant de culture de *R. aquatilis* PoW 265 ainsi que dans les fractions obtenues après chaque étape de purification. Le milieu a été préparé selon le protocole décrit par S. Wilhelm en utilisant de l'eau déférisée (Wilhelm, 2017). L'eau déférisée a été obtenue en traitant de l'eau milliQ avec 10% (m/v) de résine Chelex-100 (Biorad®).

Pour le dosage, le surnageant ou la fraction à tester a été mélangé avec le milieu CAS dans un rapport 1 : 1 (v/v), en utilisant l'entérobactine (Sigma-Aldrich) comme standard. Après 30 minutes d'incubation à l'abri de la lumière, l'absorbance de chaque échantillon a été mesurée à 600 nm.

3.3. Mise en évidence de biosurfactants par test de diminution de la tension de surface

Les surfactants sont des composés amphiphiles qui possèdent la capacité de diminuer la tension de surface des molécules d'eau sur une surface hydrophobe (**Figure 22**). En absence de biosurfactant, les molécules d'eau adhèrent fortement les unes aux autres et la gouttelette d'eau conserve une apparence ronde avec un angle de contact (θ) d'environ 90° (**Figure 22. A.**). En présence de biosurfactants, les forces d'adhérences sont réduites causant un étalement de la goutte sur la surface hydrophobe et une diminution de l'angle de contact (**Figure 22. B.**).

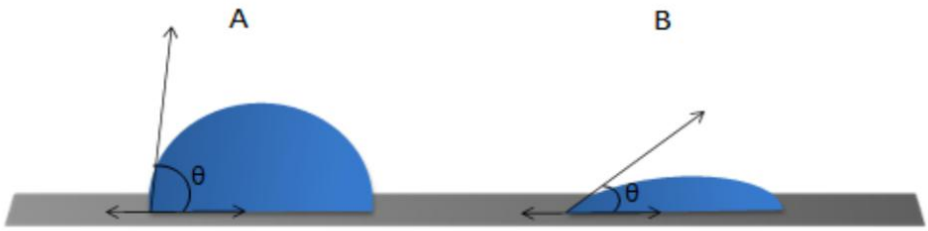


Figure 22. Test de diminution de la tension de surface. A. En absence de biosurfactant **B.** En présence de biosurfactant (Loiseau, 2015).

Afin de montrer la présence de surfactants dans le surnageant de *Flavobacterium sp*. PW52, un volume de 50 µL d'échantillon à tester a été mélangé à 2 µL de bleu de méthylène (20 mg. mL^{-1}) et a été déposé sur du parafilm. Le milieu de culture de la souche a été utilisé comme témoin négatif.

Chapitre 4. Techniques séparatives et analytiques

4.1. Étude d'un sidérophore anti-*Legionella* : l'aquabactine

4.1.1. Préparation du surnageant de culture de *R. aquatilis* PoW265

Un volume de 100 mL de surnageant de culture de la souche de *R. aquatilis* PoW265 a été concentré par lyophilisation. Après reprise du lyophilisat avec 2 mL d'eau, les protéines ont été précipitées en présence de 2 volumes de méthanol puis éliminées par centrifugation à 11000 g pendant 10 minutes à température ambiante. Le surnageant a été amené à sec à l'aide d'un speed-vac (miVac, Genevac).

4.1.2. Enrichissement de composés chélateurs de fer par chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés (IMAC)

Les composés chélateurs de fer contenus dans le surnageant ont ensuite été enrichis par chromatographie d'affinité sur ions ferriques immobilisés (IMAC-Fe^{3+}). Avant l'étape d'enrichissement, les ions métalliques résiduels présents sur la colonne (Propac IMAC BioLC™, 9 x 250 mm, 10 µm, Thermo Scientific) ont été éliminés en passant 200 mL d'une solution d'EDTA à 50 mM additionnée de 0,5 M de NaCl (pH = 4). La colonne a été rincée avec 250 mL d'eau acidifiée à pH 2 avec de l'acide formique (Cf = 20 mM). La colonne a ensuite été chargée en ions ferriques par passage de 100 mL d'une solution de chlorure du fer III à 25 mM contenant 100 mM d'acide acétique. Enfin, la colonne a été rincée avec 500 mL d'eau acidifiée à pH2. Ces étapes de lavage et de conditionnement ont été effectuées à l'aide d'une pompe Dionex Ultimate 3000 à un débit de 1 mL/min.

Avant l'injection, l'échantillon a été repris dans 20 mL d'eau milliQ et un volume de 1 mL a été injecté sur la colonne pour chaque analyse. L'élution a été réalisée à un débit de 1 mL/min en utilisant un gradient de pH allant de 2 (H_2O + 20 mM d'acide formique) à 10 (H_2O + 20 mM d'acide formique, ajusté à pH 10 avec de l'hydroxyde

d'ammonium). Le gradient utilisé est détaillé dans le **Tableau 4**. L'élution des composés chélateurs de fer ferrique a été suivie à 205 et 265 nm à l'aide d'un détecteur Ultimate 3000 (Dionex). Le spectre d'absorption UV des composés a été obtenu entre 200 et 300 nm à l'aide d'un détecteur à barrettes de diodes (Ultimate 3000, Diode array detector, Dionex).

Tableau 4. Gradient d'élution utilisé pour l'enrichissement en composés chélateurs de fer ferrique sur chromatographie d'affinité sur ions immobilisés (IMAC-Fe^{3+})

Temps (min)	% H_2O + 20 mM FA(1) (pH 2)	% H_2O + 20 mM FA(1) (pH 10 ajusté avec Hydroxyde d'ammonium)	pH
0	100	0	2
5	100	0	2
10	31,2	68,8	7,5
22	31,2	68,8	7,5
40	0	100	10
42	0	100	10
44	100	0	2

(1) FA : Acide formique

Entre chaque analyse, la colonne a été reconditionnée pendant 1 heure à un débit de 1 mL/min avec la solution d'eau acidifiée à pH 2. La fraction éluée, enrichie en composés chélateurs, a été lyophilisée avant d'être reprise dans 20 mL d'eau.

4.1.3. Purification de l'aquabactine par chromatographie liquide à haute performance en phase inverse (RP-HPLC)

La fraction active contenant un mélange de composés chélateurs de fer a été analysée par HPLC en phase inverse. Un volume de 1 mL de la fraction précédente a été diluée avec 19 mL d'eau milliQ avant l'injection. Lors de l'analyse, un volume de 1 mL d'échantillon a été injecté sur la colonne (Acclaim™ Polar Advantage II RSLC, 4,6 x 150 mm, 5 µm, Thermo Scientific) et l'élution a été réalisée à un débit de 0,8

mL/min à l'aide d'une pompe Ultimate 3000 (Dionex). L'élution est réalisée avec un gradient d'eau/acétonitrile/acide trifluoroacétique (TFA) 0,1% (v/v) présenté dans le **Tableau 5**.

L'élution du composé a été suivie à 205 et 265 nm à l'aide d'un détecteur UV Ultimate 3000 (Dionex).

Tableau 5. Gradient d'élution utilisé pour la purification de l'aquabactine par chromatographie en phase inverse

Temps (min)	% Solvant H_2O + 0,1 % TFA	% Solvant Acétonitrile + 0,1 % TFA
0	100	0
5	100	0
25	10	90
30	10	90
35	100	0
40	100	0

La fraction active contre *L. pneumophila* Lens a été amenée à sec à l'aide d'un speed-vac (miVac, Genevac).

4.2. Étude d'un peptide anti-*Legionella* : la bestiaricine

4.2.1. Précipitation de la bestiaricine produite par *A. bestiarum* PoW 257 au sulfate d'ammonium

Le composé de nature peptidique produit par la souche d'*A. bestiarum* PoW 257 a été concentré par précipitation au sulfate d'ammonium ($(NH_4)_2SO_4$). Pour ce faire, 36 g de sel de $(NH_4)_2SO_4$ ont été ajoutés à 100 mL de surnageant de culture filtré, correspondant à 60% de saturation en sulfate d'ammonium. La précipitation a été effectuée pendant 14 heures sous agitation douce à une température de 4°C. Le culot protéique contenant le composé actif a été récupéré par centrifugation à 10 000 g pendant 45 minutes à 4°C. Le culot protéique a été repris avec 10 mL d'eau milliQ.

4.2.2. Pré-purification de la bestiaricine par Extraction sur Phase Solide C18 (SPE-C18)

Après précipitation du composé peptidique au sulfate d'ammonium, l'extrait brut (EB) obtenu a été repris avec 10 mL d'eau milliQ avant d'être fractionné par extraction sur phase solide (Sep-pak C18, Waters®). La cartouche a été activée avec 10 mL d'éthanol puis équilibrée avec 10 mL d'eau milliQ. Un volume de 5 mL d'EB a ensuite été chargé sur la colonne. La cartouche a été lavée successivement avec 5 mL de solutions de pourcentage croissant en acétonitrile (0, 10, 20, 30, 40 ou 80%) et contenant chacune 20 mM d'acétate d'ammonium. Après reconditionnement et équilibration de la cartouche, le reste de l'EB a été fractionné de la même manière. Les fractions d'élution 40 et 80%, contenant la bestiaricine, ont été assemblées puis lyophilisées.

4.2.3. Purification de la bestiaricine par RP-HPLC

Après fractionnement de l'EB, la fraction lyophilisée contenant la bestiaricine a été reprise dans 5 mL d'un mélange eau : acétonitrile dans un rapport 5 : 1 (v/v). L'échantillon a été analysé par HPLC en phase inverse à l'aide d'une colonne C18 (Acclaim® 120 C18 4,6 x 250 mm, 5 µm). Lors de l'analyse, un volume d'1 mL d'échantillon a été injecté sur la colonne et l'élution a été réalisée à un débit de 0,8 mL/min avec un gradient eau/acétonitrile/TFA. Le gradient utilisé est détaillé dans le **Tableau 6**.

Tableau 6. Gradient d'élution utilisé pour la purification de la bestiaricine par chromatographie en phase inverse

Temps (min)	% Solvant H_2O + 0,1 % TFA	% Solvant Acétonitrile + 0,08 % TFA
0	80	20
5	80	20
15	40	60
30	0	100
32	0	100
35	80	20

L'élution de la bestiaricine a été suivie à 220 nm et 280 nm à l'aide d'un détecteur UV Ultimate 3000 (Dionex).

La fraction contenant de la bestiaricine a été lyophilisée et conservée à -20°C.

4.3. Etude de biosurfactants produits par *Flavobacterium* sp. PW52 : les flavolipides

4.3.1. Extraction des flavolipides à l'acétate d'éthyle

Un volume de 100 mL de surnageant bactérien de la souche de *Flavobacterium sp.* PW 52 a été extrait trois fois à l'acétate d'éthyle (1 : 1, v/v). Les fractions organiques obtenues ont été évaporées à l'aide d'un évaporateur rotatif. L'extrait obtenu a été dissout dans 2,5 mL d'un mélange H_2O/acétonitrile (2 : 3, v/v).

4.3.2. Analyse des flavolipides par RP-HPLC

L'extrait brut (EB) contenant les flavolipides obtenu par extraction à l'acétate d'éthyle a été analysé sur une colonne de phase inverse (Chromolith® SpeedROD RP-18e, 4.6×50 mm, Merck) à l'aide d'une chaîne HPLC (Ultimate 3000, Dionex). Un volume de 400 µL d'EB a été dilué avec 600 µL d'eau milliQ et l'ensemble a été injecté pour l'analyse avec un débit de 0,8 mL/min. Les flavolipides n'ayant pas de propriétés d'absorption connues, la collecte a été réalisée à l'aveugle. Pour les expériences d'activités, les fractions ont été collectées toutes les minutes pour l'activité anti-*Legionella* et toutes les 5 minutes pour l'activité anti-amibe. Le gradient utilisé pour l'élution est détaillé dans le **Tableau 7**.

Tableau 7. Gradient d'élution utilisé pour l'analyse des flavolipides par chromatographie en phase inverse.

Temps (min)	% Solvant H_2O + 0,1 % TFA	% Solvant Acétonitrile + 0,1 % TFA
0	80	20
5	80	20
20	0	100
22	0	100
23	80	20
24	80	20

Chaque fraction a finalement été amenée à sec à l'aide d'un speed-vac (miVac, Genevac).

4.4. Identification des composés par Chromatographie à Ultra Haute Performance couplée à la Spectrométrie de Masse (UPLC-MS)

Avant l'analyse, les composés purifiés (aquabactine, bestiaricine) ou en mélange (flavolipides) ont été repris dans un mélange 50 : 50 Acétonitrile : H2O (V/V) en présence de 0.2 % d'acide formique. L'identification de chaque composé a été effectuée par LC-MS à l'aide d'une chaîne UPLC Acquity UltraPerformance couplée à un spectromètre de masse XeVO Q-TOF muni d'une source Electrospray (Waters, US).

Les gradients d'élution utilisés pour chaque analyse sont détaillés dans le **Tableau 8**.

Toutes les analyses ont été effectuées en utilisant un mode d'ionisation positif (ESI+). Les acquisitions ont été conduites en appliquant une tension au capillaire de 2.5 KV, un voltage au cône de 30 V, une température de source de 120°C et une température de désolvatation de 220°C. Dépendamment du composé analysé, la détection a été effectuée par balayage de masses comprises entre 100 et 2000 m/z pour les analyses de la bestiaricine et de l'aquabactine ou entre 100 et 1500 m/z pour l'analyse des flavolipides.

Tableau 8. Gradients d'élution utilisés pour l'identification des composés par couplage LC-MS.

Analyse	Flavolipides	Bestiaricine	Aquabactine
Colonne	Chromolith® SpeedROD RP-18e 4.6 × 50 mm, Merck	Acquity UPLC BEH C18 1,7µm 2,1 x 100 mm, Waters	Acclaim RSLC PA2 2,2 µm 2,1 x 100 mm, ThermoFischer Sc.
Temps	25 min	12 min	12 min
Solvant A	H_2O + 0,2 % Ac. Formique		
Solvant B	ACN + 0,2 % Ac. Formique		
Débit	0,8 mL/min	0,5 mL/min	0,3 mL/min
Gradient (Temps ; %B)	0 min ; 20% B 5 min ; 20% B 20 min ; 100% B 22 min ; 100% B 23 min ; 20% B 25 min ; 20% B	0 min ; 10% B 1 min ; 10% B 4 min ; 40% B 7 min ; 90% B 9 min ; 90% B 12 min ; 10% B	0 min ; 20% B 2 min ; 20% B 8 min ; 80% B 11 min ; 80% B 12 min ; 20% B

4.5. Caractérisation de composés organiques volatiles (COVs) produits par *Pseudomonas* spp.

Les composés organiques volatiles (COVs) produits par la souche de référence *P. fluorescens* MFE01 et par la souche environnementale *Pseudomonas* sp. PW 329 ont été extraits par microextraction en phase solide (SPME) et identifiés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS).

4.5.1. Préparation des échantillons

Une pré-culture de chaque souche de *Pseudomonas* d'intérêt a été réalisée dans du milieu LBmod liquide sur la nuit à 28°C sous agitation (180 rpm). Des vials stériles de 20 mL adaptés à l'analyse « headspace » par GC-MS ont été préparés en ajoutant 4 mL de gélose LBmod horizontale et 6 mL de gélose inclinée (**Figure 23**). Un volume de 40 µL d'une suspension de *Pseudomonas* ajustée à DO_{600nm} = 1 (10^9 UFC/mL) a été déposé sur la gélose et les vials ont été incubés 0, 24, 48, 72 ou 96 heures à 28°C.

Un volume de 40 µL de LBmod a été utilisé comme contrôle négatif pour l'analyse.

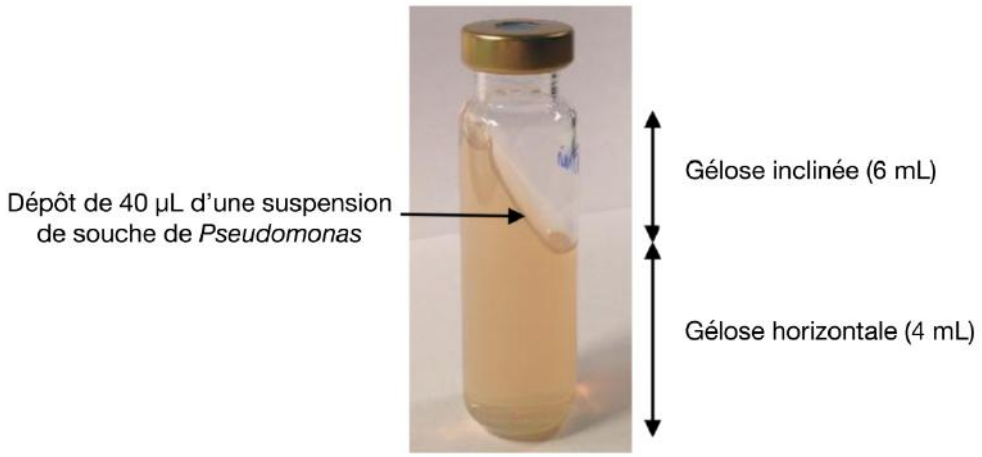


Figure 23. Photo d'un vial utilisé en GC-MS pour l'identification des COVs produits par des souches de *Pseudomonas* spp.

4.5.2. Extraction des COVs par MicroExtraction sur Phase Solide (SPME)

L'extraction des COVs produits par les souches de *Pseudomonas* sp. a été faite sur une fibre de 100 µm en polydiméthylsiloxane (PDMS) (Sigma-Aldrich). En amont de l'extraction, la fibre a été conditionnée pendant 30 minutes à 250 °C. L'extraction des composés a été réalisée par immersion de la fibre dans l'espace de tête pendant 30 minutes à 28°C sans agitation. Après extraction des COVs, la fibre a été désorbée pendant 5 minutes à 250°C.

4.5.3. Identification des COVs par Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (GC-MS)

L'analyse des COVs a été effectuée en utilisant un chromatographe en phase gazeuse 7890B couplé à un spectromètre de masse 7000C Triple Quadripôle (Agilent). L'hélium a été utilisé comme gaz vecteur a un débit constant de 1,2 mL/min. La séparation des COVs a été effectuée à l'aide d'une colonne Zebron ZB-5HT Inferno (30 m x 0.25 mm, 0.25 µm, Phenomenex, USA). Le gradient de température utilisé est constitué d'un palier à 40°C pendant 5 min, qui augmente de 5°C par minute jusqu'à

atteindre une température de 150°C. Après 2 minutes à 150°C, une augmentation de 4°C par minute est effectuée pour atteindre 230°C, et cette température est maintenue pendant 2 minutes.

L'ionisation des COVs a été réalisée par impact électronique (+EI) en utilisant une énergie électronique de 70 eV. Les températures de la source et de l'interface ont été fixées à 230°C et 300°C respectivement. La température des quadripôles a été fixée à 150°C. Enfin, la détection a été effectuée par balayage de masses comprises entre 35 et 400 m/z.

Les composés ont été identifiés en comparant les spectres obtenus avec ceux des composés contenus dans la base de données NIST 08. Les identifications du 1-Undecène, du 2-Undécanone et du 2-Tridécanone ont été confirmées en comparant leur temps de rétention à ceux de composés standards (Sigma-Aldrich).

Partie 3 : Résultats

Chapitre 1. Impact des bactéries environnementales dans la lutte biologique contre de *L. pneumophila*

De récents travaux menés au laboratoire EBI ont permis de mettre en évidence deux genres producteurs de composés anti-*Legionella* fréquemment retrouvés dans les communautés microbiennes d'eau douce : *Pseudomonas* sp. et *Bacillus* sp. (Loiseau, 2015; Loiseau *et al.,* 2015).

Afin de mieux caractériser le potentiel antagoniste des bactéries issues de la même niche écologique que *Legionella*, la première partie de ce travail a consisté à cribler l'activité anti-*Legionella* de bactéries isolées d'eaux douces. Cette partie à fait l'objet d'une première publication (**Publication 1**).

Publication 1: Exploiting the richness of environmental waterborne bacterial species to find natural anti-*Legionella* active biomolecules.

Ce travail décrit l'impact de bactéries environnementales sur la croissance de *Legionella pneumophila*. La flore cultivable et revivifiable bactérienne provenant de cinq réservoirs d'eau douce (273 isolats) a été criblée contre *L. pneumophila* Lens. La distribution taxonomique de ces isolats a également été estimée par analyse phylogénétique obtenue après séquençage du gène codant l'ARNr 16S pour chaque isolat. De cette manière, ce travail a pu mettre en évidence l'affiliation de ces isolats au sein de quatre phyla bactériens : Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes et Actinobacteria. Dans cette distribution, le phylum des *Firmicutes* et la classe des *Gammaproteobacteria* contiennent la plus forte proportion de producteurs anti-*Legionella*. Les genres actifs les plus représentés en termes de nombre et de distribution au sein des différents échantillons d'eau sont *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium* et *Bacillus* et représentent 56% de la communauté bactérienne isolée des échantillons

Publication 1

Exploiting the richness of environmental waterborne bacterial species to find natural anti-*Legionella* active biomolecules

Soumis dans ***Frontiers in Microbiology***

Septembre 2018

Exploiting the richness of environmental waterborne bacterial species to find natural anti-*Legionella* active biomolecules.

Running title (5 words): Waterborne bacteria as antimicrobial producers

7171 words, 5 figures, 1 table and 1 supplementary material

Marie-Hélène Corre, Vincent Delafont, Anasthasia Legrand, Jean-Marc Berjeaud, Julien Verdon*

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

* Corresponding author and mailing address:

E-mail: julien.verdon@univ-poitiers.fr

Phone: +33 5 49 45 36 93

Fax: +33 5 49 45 35 03

Abstract

Legionella pneumophila is one of the most tracked waterborne pathogens and remains an important threat to human health. Despite the use of biocides, *L. pneumophila* is able to persist in engineered water systems with the help of multispecies biofilms and phagotrophic protists. For few years now, high-throughput sequencing methods have enabled a better understanding of microbial communities in freshwater environments. Those unexplored and complex communities compete for nutrients using antagonistic molecules as war weapons. Up to now, few of these molecules were characterized in regards of *L. pneumophila* sensitivity. In this context, we established, from five freshwater environments, a vast collection of culturable bacteria and investigated their ability to inhibit the growth of *L. pneumophila*. All bacterial isolates were classified within 4 phyla, namely Proteobacteria (179/273), Bacteroidetes (48/273), Firmicutes (43/273) and Actinobacteria (3/273) according to 16S rRNA coding sequences. *Aeromonas*, *Bacillus*, *Flavobacterium* and *Pseudomonas* were the most abundant genera (154/273). Among the 273 isolates, 178 (65.2%) were shown to be active against *L. pneumophila* including 137 isolates of the four previously cited main genera. Additionally, other less represented genera depicted anti-*Legionella* activity such as *Acinetobacter*, *Kluyvera*, *Rahnella* or *Sphingobacterium*. Furthermore, various inhibition diameters were observed

among active isolates, ranging from 0.4 to 9 cm. Such variability suggests the presence of numerous and diverse natural compounds in the microenvironment of *L. pneumophila*. These molecules include both diffusible secreted compounds and volatile organic compounds, the latter being mainly produced by *Pseudomonas* strains. Altogether, this work sheds light on unexplored freshwater bacterial communities that could be relevant for the biological control of *L. pneumophila* in manmade water systems.

Keywords: *Legionella*, freshwater environments, *Pseudomonas*, bacterial community, inhibition profile, volatile organic compound, antimicrobials

Introduction

Water is essential to sustain life and granting free access to drinking-water is considered a basic human right. Therefore, water sources used for human consumption must be biologically safe, to avoid any risk for health. Indeed, the most common and widespread health risk associated with drinking water is represented by infectious diseases caused by pathogenic bacteria, viruses and parasites (World Health Organization, 2011). Most waterborne pathogens are introduced into drinking water supplies by the classic fecal-water-oral route of transmission (Ashbolt, 2015). However, other non fecal but potentially pathogenic microorganisms like *Legionella* sp., Nontuberculous mycobacteria, *Pseudomonas aeruginosa* or free-living amoebae, may colonize engineered water systems (Falkinham *et al.,* 2015b; Wang *et al.,* 2017). In hot water systems and cooling towers, bacteria of the genus *Legionella* represent a particular concern and remain one of the most tracked agents, being considered as opportunistic premise plumbing pathogens (Falkinham *et al.,* 2015a). They are part of the natural flora in many freshwater environments (i.e. rivers, streams) where they occur in relatively low numbers (Declerck, 2010; Declerck *et al.,* 2009). *L. pneumophila* is recognized as responsible for Legionnaires' disease (LD), a severe form of pneumonia, and Pontiac fever, a self-limited flu-like illness (Diederen, 2008). Furthermore, the serogroup 1 is responsible for 82.9% of the LD cases in Europe (Beauté, 2017; Hamilton *et al.,* 2018) and for over 80% of the cases worldwide (Newton *et al.,* 2010; Yu *et al.,* 2002). Non-*pneumophila* species account usually for less than 10% of human infections, and mostly involve *L. micdadei*, *L. bozmanii* and *L. longbeachae* (Beauté, 2017). Some water safety plans in distribution systems, recommended by the World Health Organization, were implemented (Parr *et al.,* 2015) like the one published by the ASHRAE (American Society of Heating, Refrigerating, and Air-Conditioning Engineers) in 2015. This plan focuses on hazards and hazardous events for implementing control measures which aim at avoiding *Legionella* transmission and limiting its proliferation (American Society of Heating Refrigerating and Air-Conditioning Engineers, 2015).

Persistence and colonization of *Legionella* sp. in engineered water systems is mediated by the presence of multispecies biofilms and phagotrophic protists like free-living amoebae (Abu Khweek and Amer, 2018). Moreover, protists serve as a natural playground for *L. pneumophila*, "training" bacteria to resist phagocytic destruction (Boamah *et al.,* 2017). The cozy intracellular environment of protist host cell also protects *L. pneumophila* from harsh environmental conditions while providing a nutrient rich replicative niche. Indeed, this intracellular lifestyle protects bacteria from being efficiently killed by water disinfection

procedures (Dupuy *et al.,* 2011). However, as mentioned by the French law n° 2009-967 (2009/08/03) adopted from discussions of the "Grenelle de l'environnement", more efforts are needed to control disinfection by-products and minimize people exposure to potentially hazardous chemicals (Trihalomethanes, Haloacetic acids…) while maintaining adequate disinfection to ensure good water quality. Thus, it is of primary importance to find natural antibacterial agents to control *L. pneumophila* growth and environmental spread.

For a few years, some studies have highlighted the anti-*Legionella* potency of various natural compounds (for recent review, see (Berjeaud *et al.,* 2016)). However, those compounds, mainly antimicrobial peptides and components of essential oils, don't originate from the microenvironment of *L. pneumophila*. The survival of *L. pneumophila* in water environments, aside from being sheltered within protists, is also driven by interactions with bacterial inhabitants found as planktonic cells or cells engulfed in mixed community biofilms (Abdel-Nour *et al.,* 2013). *L. pneumophila* can acquire nutrients by forming synergistic relationships with other members of a biofilm (Boamah *et al.,* 2017; Koide *et al.,* 2014; Stewart *et al.,* 2012; Stout *et al.,* 1985; Tison *et al.,* 1980; Wadowsky and Yee, 1983). Moreover, *L. pneumophila* is capable of surviving by necrotrophic growth on dead cell masses (Temmerman *et al.,* 2006). Although interactions with other bacteria promote *L. pneumophila* survival in oligotrophic environments, competition for nutrients is raging (Abu Khweek and Amer, 2018). Thus, it is reasonable to hypothesize that active molecules are locally produced by biological challengers. Surprisingly, very few papers have described such compounds. In 2008, a study tested 80 aquatic bacterial isolates and showed that 55 displayed antagonistic activity against *L. pneumophila* (Guerrieri *et al.,* 2008). Interestingly, 60 of all tested isolates (75%) were *Pseudomonas* and 43 of them were active against *L. pneumophila* as determined by spot-on-lawn assay. Other species were also described to antagonize the persistence of *L. pneumophila* within biofilms, e.g. *Acidovorax* sp., *Aeromonas hydrophila*, *Burkholderia cepacia*, or *Sphingomonas* sp. (Guerrieri *et al.,* 2008). However, to date, molecules of interest remain uncharacterized. Concomitantly, high-throughput sequencing technologies have enabled a fine characterization of environmental microbiomes such as those dwelling in drinking water distribution systems (Ji *et al.,* 2015; Proctor and Hammes, 2015), shedding light on unexplored and complex microbial communities, potentially hiding new potent antibacterial compounds.

Thus, the aim of the present study was to investigate the potential of those unexplored waterborne bacteria to inhibit the growth of *L. pneumophila*, in order to find new active compounds from natural origin. Environmental aquatic bacteria were thus sampled from five freshwater environments in order to establish a large culturable bacterial collection. Species

belonging to various genera and species were then screened for their antagonistic activity towards *L. pneumophila* and identified.

Material and Methods

Water sampling

Five different water sources were sampled: pond water (PoW), swimming pool water (PW), river water (RW), tap water (TW) and well water (WW). Each sample was collected in January 2016 in the Vienne department (Nouvelle-Aquitaine, France). Both water samples from a private pond and a private well were collected at Chatellerault (46°49'04'' N, 0°32'46'' E). The river water was sampled from the Vienne River in Bonneuil-Matours (46°40'57'' N, 0°34'17'' E). A sample of an untreated private swimming pool water was collected at Sèvres-Anxaumont (46°34'14'' N, 0°C27'57'' E). Finally, tap water was sampled from the drinking water network of Poitiers (46°34'55'' N, 0°20'10''E).

Environmental bacterial strains collection

A volume of 1 mL from each water sample was spread onto R2A agar plates within a maximum of 5 h after the original sampling. All plates were incubated for 72 h at 22°C, 30°C or 37°C. After 72 h, isolated colonies were collected and re-isolated on new R2A agar plates to assure the purity of aquatic isolates. In total, 273 purified isolates were obtained and kept frozen at -80°C until use.

16S rRNA gene sequencing

Aquatic bacterial isolates were identified by 16S rRNA gene sequencing. For DNA extraction, a colony was suspended in 200 µL of sterile water and the sample was boiled 10 min. Samples were then centrifuged (8000 x g, 15 min) and supernatants containing DNA were kept at -20°C. The 16S rRNA coding gene of bacterial isolates was amplified by PCR with the universal primer set 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') / 786R (5'-CTA CCA GGG TAT CTA ATC-3'), targeting the V1-V4 region of the gene. Amplification was carried out as follows: denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 50 °C for 30 s, and extension at 72 °C for 1 min, for a total of 30 cycles, followed by a final elongation at 72 °C for 5 min. Then, PCR products were subjected to 1 % agarose gel electrophoresis. For PCR-products clean-up, 1 U/µL of Shrimp Alkaline Phosphatase (M0371S, New England Biolabs) and 10 U/µL of Exonuclease I (M0293S, New England Biolabs) were added to 6 µL of PCR products. DNA sequencing was

completed with the ABI Prism BigDye terminator v3.1 sequencing kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) and then analyzed by an automatic ABI Prism 3730 genetic analyzer (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Sequences were assembled with SerialCloner software and confronted against the nr/nt sequence database using BLASTn (Altschup *et al.,* 1990). All sequences have been deposited in the GenBank database under accession numbers MH591484 to MH591754. Full list of accession numbers is given in Supplementary Table 1.

Phylogenetic analysis

Consensus from 16S rRNA gene coding sequences of the 273 isolates were aligned using MUSCLE algorithm (Edgar, 2004a, 2004b). The phylogenetic analysis of 480 bp aligned sequences from the V2-V4 16S gene regions (position: 201-681) was performed using MEGA V7 software (Kumar *et al.,* 2016). Phylogeny was inferred by maximum likelihood, with 1000 bootstrap iterations to test the robustness of the nodes. The resulting tree was uploaded and formatted using iTOL (Letunic and Bork, 2016).

Screening for anti-*Legionella* activity

Legionella pneumophila serogroup 1 Lens CIP 108286 (Cazalet *et al.,* 2008) was used as the reference strain for anti-*Legionella* experiments. All strains were screened for anti-*Legionella* activity by spot-on-lawn assay as described previously (Loiseau *et al.,* 2015). Briefly, *L. pneumophila* was cultured at 37 °C in buffered yeast extract (BYE) liquid medium for 72 h under shaking (150 rpm). The pre-culture was then diluted with fresh BYE to a concentration of 10^8 CFU/mL and a volume of 100 µL was spread onto a buffered charcoal yeast extract (BCYE) agar plate with a cotton swab. Then, 10 µL of suspension of each isolate (obtained from a fresh pre-culture on agar plates) were spotted onto the center of the agar plate. Each plate was then incubated for 48 h at 22°C, 30 °C, or 37°C. A second incubation step was done at 37°C for 48 h to allow *L. pneumophila* growth. Anti-*Legionella* compounds production was revealed by an inhibition zone around the producer strain. For each tested strain, the diameter of the inhibition area was measured.

L. pneumophila long-range inhibition assay

This assay was used for environmental bacterial isolates which totally inhibit the growth of *L. pneumophila* on agar plate. A 6-well plate assay was thus designed to physically separate environmental isolates from *L. pneumophila* Lens in order to determine whether emitted

volatiles organic compounds (VOCs) could inhibit or not the growth of *L. pneumophila*. Each well was filled with 5 mL of BCYE. Then, 10 µL of a suspension of GFP-expressing *L. pneumophila* Lens (Bigot *et al.,* 2013) (OD_{600nm} adjusted to 0.1) were spotted onto both upper sides of the plate. Finally, 40 µL of a suspension of selected isolate (OD_{600nm} adjusted to 1) were spotted onto the upper center of the plate. Depending of the tested isolate, plates were incubated for 48 h at 22°C, 30°C or 37°C. A second step of incubation was done for 48 h at 37°C. Anti-*Legionella* activity mediated by VOCs production was quantified by measuring the fluorescence of GFP with a TriStar^2 LB 942 Microplate Reader (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany).

Data analysis

For analyzing the distribution of diameters among the five water sub-collections, violin plots were constructed using R environment with the package "ggplot2" (Wickham, 2009). To assess the alpha-diversity within each water collection, the Shannon diversity index (H) was calculated based on relative abundance for assigned genera. To evaluate the evenness of each community, Pielou's index (J) was computed. Both indexes were calculated in R environment using the package "Vegan" (Oksanen *et al.,* 2018). Finally, a heatmap representing inhibition diameters distribution among bacterial genera was constructed using Plotly online software (https://plot.ly/).

Results

Waterborne bacteria exhibit a high proportion of anti-*Legionella* compounds producers

Firstly, a total of 273 bacterial isolates were recovered and purified from the five different freshwater sources (Pond, Pool, River, Tap and Well) used in this study. For each water sample, between 51 and 67 isolates were obtained per mL of a given water sample except for the tap water sample for which the cultivable bacterial biomass was lower (29 strains) (Fig. 1A). Secondly, the collection of aquatic bacterial isolates was screened for the ability to produce anti-*Legionella* compounds using an agar plate assay (repeated at least three times per isolate). Among the 273 isolates, 178 (65.2%) were shown to be active against *L. pneumophila* Lens CIP 108286 (Fig. 1A). Furthermore, those active isolates were not equally distributed among the five water sub-collections: 52/67 from the pond sub-collection (PoW; 77.7% of isolates), 40/51 from the pool sub-collection (PW; 78.4% of isolates), 61/66 from the river sub-collection (RW; 92.4% of isolates), 25/62 from the well sub-collection (WW; 39.7% of isolates) and 0/29

for the tap sub-collection (TW) (Fig. 1A). Interestingly, various inhibition diameters were observed among active isolates, ranging from 0.4 to 9 cm (Figure 1B). However, for each water sub-collection, most of inhibition diameters values were comprised between 0.4 and 2 cm. This inhibition profile was mainly observed for WW and RW sub-collections representing 68% and 60.6% of the total active isolates, respectively. Another point of interest is the full inhibition profile (diameter of 9 cm) displayed by several isolates from the collection (Fig. 1B). Surprisingly, those isolates were not evenly distributed but were mostly found in the PoW sub-collection (38.4% of total active isolates). In all other water sub-collections, the proportion of isolates displaying a total inhibition profile was lower (7.5%, 6.6% and 4% of total active isolates in PW, RW and WW sub-collections respectively).

Gammaproteobacteria and Firmicutes are the major clades of anti-*Legionella* bacteria

In order to explore taxonomic affiliations of bacterial isolates, a systematic sequencing of the 16S rRNA coding gene sequence was performed. Resulting sequences were used to reconstruct a phylogenetic tree presented in Fig. 2. All bacterial isolates were classified within 4 phyla, namely Proteobacteria (179/273), Bacteroidetes (48/273), Firmicutes (43/273) and Actinobacteria (3/273). In regards to the anti-*Legionella* activity, the Firmicutes phylum and the Gammaproteobacteria class stood out as clades containing the highest proportion of active isolates, as 89.8% of Gammaproteobacteria and 88.4% of Firmicutes showed inhibition of *Legionella* growth. Conversely, the Alphaproteobacteria class, for which most isolates originated from TW, harbored the lowest proportion of active isolates (9.1%) (Fig. 2). Genera such as *Bradyrhizobium* and *Novosphingobium*, which were exclusively isolated from TW, did not show any anti-*Legionella* activity. Overall, members of the Gammaproteobacteria class were the most frequently isolated bacteria, regardless of the environmental water source. Within this class, *Aeromonas* and *Pseudomonas* were the most represented genera, which were found in all samples except in the TW sub-collection. Together with *Flavobacterium* (Bacteroidetes) and *Bacillus (*Firmicutes), these four genera dominated the collected bacterial community as they represented 56.4 % (154/273) of all isolates of the collection (Fig. 2). Within those 154 isolates, 89% (137/154) were found active thus representing 100% of *Aeromonas* isolates, 94.7% of *Bacillus* isolates, 51.8% of *Flavobacterium* isolates and 97.1% of *Pseudomonas* isolates (Fig. 2).

WW sub-collection harbors the most diverse cultivable bacterial flora

With the aim to estimate the bacterial diversity and species evenness within water sub-collections, Shannon H diversity and Pielou's evenness indexes were calculated (Fig. 3A). Concerning the bacterial richness, the WW contains the most diverse community (H=2.52; 12 equally common species) while the TW is the lowest (H=1.09) which is not surprising because this sub-collection contains only 3 genera. PW and RW richness were similar (H ranging from 2.02 to 2.2) whereas PoW is poorly diverse with a H index=1.6 (Fig. 3A). Furthermore, the less even community identified corresponds to PoW (J=0.63), suggesting the dominance of few genera, in addition to a more distinct bacterial community assemblage when compared to others water samples. In TW, no dominant species could be identified as the community was very even (J=0.99), which is likely to be linked with the low richness of this sub-collection (Fig. 3A). WW and PW showed similar J index (0.84 and 0.83, respectively), suggesting the absence of highly dominant species. Those pieces of data indicate that both communities differ in bacterial diversity but do not contain much specific genera. To complete this analysis and further identify potential dominant taxa, relative abundances of the 4 main bacterial genera (*Aeromonas, Bacillus*, *Flavobacterium* and *Pseudomonas*) present in the water sub-collections were determined (Fig. 3B). Altogether, those genera represented up to 70% of the total bacterial community. Both their distribution and abundance show a high amount of *Pseudomonas* isolates in the PoW sub-collection (58% of all isolates), *Bacillus* isolates in the RW sub-collection (41% of all isolates) and *Flavobacterium* isolates in the WW sub-collection (31% of all isolates) (Fig. 3B). *Aeromonas* isolates were present in all sub-collections, although less abundantly than the 3 others genera.

Diffusible molecules and/or volatile compounds are the cause of the anti-*Legionella* activity

To decipher the underlying variety of anti-*Legionella* activity displayed by active strains, a heatmap was drawn, highlighting clusters according to the diameter of inhibition. Overall three clusters were identified, showing diameters of inhibition i) inferior to 2 cm, ii) between 2 and 6 cm, and iii) equal to 9 cm (total inhibition), in addition to strains devoid of anti-*Legionella* activity (Fig. 4). Among 25 active genera, 17 showed a specific inhibition profile with a constant diameter of inhibition (i.e. induced by more than 70% of all strains within the genus). A total absence of inhibition could be consistently observed for *Flectobacter*, *Pedobacter* (Bacteroidetes), *Exiguobacterium* (Firmicutes), *Sphingobium*, *Starkeya*, *Bradyrhizobium, Brevundimonas* (Alphaproteobacteria), *Deefgea* (Betaproteobacteria) and *Lysobacter*

(Gammaproteobacteria). Profiles corresponding to diameters of inhibition inferior to 2 cm were observed for *Arthrobacter* (Actinobacteria), *Chryseobacterium* (Bacteroidetes), *Brevibacillus* (Firmicutes), *Achromobacter*, *Acidovorax*, *Duganella* and *Rhodoferax* (Betaproteobacteria). Profiles resulting in diameter of inhibition between 2 and 6 cm were observed for a large variety of Gammaproteobacteria isolates, affiliated to *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Erwinia*, *Klebsiella* and *Rahnella* genera; other clades were less diversely represented with *Lysinibacter* (Actinobacteria), *Sphingobacterium* (Bacteroidetes) and *Bacillus* (Firmicutes). Other genera could not be classified in such clusters, as large intra genus variability could be observed (Fig. 4).

Unexpectedly, isolates belonging from two genera were found to totally inhibit the growth of *L. pneumophila* since no colony was detected on entire Petri-dishes when compared with *L. pneumophila* grown alone: *Kluyvera* and *Pseudomonas* (Fig. 4). Among the 70 isolates of *Pseudomonas*, only 26 (37.1%) were concerned while the two isolates of *Kluyvera* (100%) available in the collection exhibited this capacity. Those results suggest that at least one highly diffusible and/or a volatile antagonistic molecule could be produced. To further investigate this possibility, we designed a 6-well antagonistic assay enabling the quantification of long-range aerial interference between *Kluyvera*/*Pseudomonas* and physically separated GFP-expressing *L. pneumophila* Lens. Thus, the volatile activity could be visually estimated as a function of *L. pneumophila* growth (Fig. 5A). The use of a GFP-expressing *L. pneumophila* strain also allowed for a quantitative estimate of growth inhibition through fluorescence intensity measurements. This experimental design allowed us to verify simultaneously both hypotheses and an example is given in Fig 5B for the strain RW332. While no *Kluyvera* isolates were shown to produce volatile compounds capable of inhibiting *L. pneumophila* growth, 6 out of 26 *Pseudomonas* isolates displayed this capacity and may produce at least one anti-*L. pneumophila* volatile compound. In contrast, the 20 others *Pseudomonas* as well as the 2 *Kluyvera* isolates may have produced one or more highly active diffusible antagonistic molecules.

Discussion

Artificial water systems provide suitable conditions for growth and multiplication of waterborne pathogens including *L. pneumophila*, the causative agent of Legionnaires' disease (Van Heijnsbergen *et al.,* 2015). Characteristics shared by some waterborne pathogens include proliferation in biofilms, uptake, survival, and proliferation within an amoeba host and disinfectant resistance (e.g., chlorine, chloramine). More efforts are needed to control

disinfection by-products and minimize people exposure to potentially hazardous chemicals while maintaining adequate disinfection and control of targeted pathogens. However, to date, very few studies are available about the sensitivity of *Legionella* to antagonistic compounds (Berjeaud *et al.,* 2016). When available, those compounds were purified from organisms not found in the microenvironment of *L. pneumophila*. Thus, in this study, we established a vast freshwater bacterial collection in order to investigate the presence of *L. pneumophila*-inhibiting bacterial strains sharing the same ecological niches.

Five freshwater sources were sampled (bulk water) to increase the biodiversity of harvested bacteria and potentially active isolates. Among the 273 isolates, 178 (65.2%) were shown to be active against *L. pneumophila*. Those pieces of data are in agreement with those obtained by Guerrieri and coworkers who isolated 51 strains (51/75; 68%) active against *L. pneumophila* from different tap water samples (Guerrieri *et al.,* 2008). It is however important to stress that 75% of tested strains in the above-mentioned study belonged to the *Pseudomonas* genus and the biodiversity of their collection was somewhat restrained. Nonetheless, they showed that among their 20 non-*Pseudomonas* remaining strains (9 *Acinetobacter* spp., 2 *A. faecalis odorans*, 2 *A. hydrophila*, 2 *B. cepacia*, and 1 *Flavobacterium* spp.), 12 (60%) were active against *L. pneumophila*. In our study 70 strains (25.6%) belong to the *Pseudomonas* genus and, as expected, all but 2 displayed antagonistic activity. Among active genera in the collection, 20 are newly described as anti-*Legionella* in the present study, to the best of our knowledge. Only *Aeromonas* (Cotuk and Dogruoz, 2005; Guerrieri *et al.,* 2008)*, Bacillus* (Loiseau *et al.,* 2015), *Acinetobacter*, *Flavobacterium* and *Pseudomonas* (Guerrieri *et al.,* 2008) have been previously reported. Moreover, for many of them, such as *Chryseobacterium*, *Ralstonia* or *Rheinheimera*, we have collected more than one active isolate, hence reinforcing the conservation of such antagonistic aspect across isolates from the same genus. However, it has to be noted that because R2A was used to recovered water bacteria, other genera that cannot grow on this medium and that might produce anti-*Legionella* compounds could not be detected in this study.

The diversity of bacteria isolated in this study was shown to be modulated by the water source that was sampled. WW corresponded to the most diverse source, whereas TW showed the lowest diversity. Apart from PoW where *Pseudomonas* spp. accounted for more than half of the isolates, no highly dominant taxa were found in other samples. Indeed, the source-specific diversity contributed to gather a large and diversified collection of bacterial isolates, affiliated to four phyla, namely Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes and Proteobacteria. Most active isolates, 153/178 (86%) were recovered from PoW, PW and RW samples accounting for 77.4% to 92.4% of all strains. Surprisingly, no active strain was isolated from the TW sample, which

is also the less diverse bacterial sub-collection with only three genera (*Bradyrhizobium*, *Sphingobium* and *Sphingomonas*) maybe because it is the only one sample coming from a treated water system. The three most represented genera, i.e. *Bacillus*, *Pseudomonas* and *Flavobacterium*, all displayed anti-*Legionella* activity, at least for 50% of isolates. As suggested by the sequence comparisons and phylogeny, isolates affiliated to these three genera are highly likely to represent a various set of distinct species and strains. However, because of the underlying limitations of 16S rRNA-based bacterial identification, this diversity is surely underestimated. Other methods such as multi-locus sequence typing or whole genome sequencing would indubitably give more information in this regard.

The literature concerning the chemical nature of diffusible molecules responsible for anti-*Legionella* activity still remains scarce to this day. Recently, surfactin, the most known and well-studied biosurfactant from *Bacillus subtilis*, has been shown to exhibit a potent activity toward many *Legionella* species including the Lens strain (CIP 108286) (Loiseau *et al.,* 2015). Moreover, *Legionella* bacteria appeared highly sensitive to this lipopeptide (MICs of 1–4 µg/mL) in comparison with the few susceptible species reported so far (Berjeaud *et al.,* 2016). Biosurfactants which are commonly classified as low (including glycolipids, phospholipids, and lipopeptides) and high-molecular weight (polysaccharides, proteins, lipoproteins, and LPS) compounds, mostly depending on their chemical composition and their molecular weight, are also produced by many bacterial genera including *Acinetobacter*, *Bacillus* and *Pseudomonas* (Płociniczak *et al.,* 2011). As *L. pneumophila* was previously described to be sensitive to various membrane-active biomolecules (Berjeaud *et al.,* 2016), lipopeptides from *Bacillus* and rhamnolipids from *Pseudomonas* might be potent anti-*Legionella* weapons. Additionally, many antimicrobial peptides (AMPs) were found capable of killing *Legionella* sp. (Berjeaud *et al.,* 2016). Those AMPs were characterized from various organisms like warnericin RK and PSM from Staphylococci (Marchand *et al.,* 2011; Verdon *et al.,* 2008), Ci-PAP-A22 and Ci-MAM-A24 from marine *Ciona intestinalis* (Schlusselhuber *et al.,* 2015), Armadillidin H from the woodlouse *Armadillidium vulgare* (Verdon *et al.,* 2016) and a defensin from the greater wax moth *Galleria mellonella* (Palusińska-Szysz *et al.,* 2012). However, very few bacterial genera identified in our study were described to produce AMPs. To our knowledge, only *Aeromonas* (Tasiemski *et al.,* 2015), *Escherichia* (Rebuffat, 2012) and *Klebsiella* (de Lorenzo and Pugsley, 1985) were reported so far. As those AMPs have never been tested against *L. pneumophila*, we hypothesize that they might eventually be involved in the antagonism ability of such isolates. However, further biochemical investigations would be necessary to purify and characterize such AMPs and to explore their potential use as biocontrol agents against *L. pneumophila*.

Ultimately, *L. pneumophila* is sensitive to various biomolecules including molecules that are poorly active against others bacteria (e.g. warnericin RK or surfactin) (Berjeaud *et al.,* 2016). *L. pneumophila* might possess some particularities that could explain this sensitivity and part of the answer definitely lies in the composition of the cell envelope. For example, *L. pneumophila* possesses a high level of branched chain fatty acids, mainly in the stationary phase of growth(Verdon *et al.,* 2011). This level was shown to be involved in the sensitivity of this bacterium to warnericin RK. Another striking feature is the high sensitivity of *L. pneumophila* to detergents (Verdon *et al.,* 2009) highlighting the key role played by its membrane components. Indeed, as underlined by those studies, the lack of experimental data about mechanisms of action of active molecules is a bottleneck in the discussion (Berjeaud *et al.,* 2016).

The well antagonistic assay used to physically separate *Kluyvera*/*Pseudomonas* isolates from GFP-expressing *L. pneumophila* Lens, allowed us to detect the production of at least one anti-*Legionella* volatile organic compound (VOC) for 6 *Pseudomonas* strains since aerial exposure to volatile molecule(s) released from those strains inhibited the growth of *L. pneumophila*. It is the first report published so far of such a long-range aerial interference between *Pseudomonas* and *Legionella*. VOCs and volatilome have been studied primarily in a context of inter-kingdom responses and little is known about their potential roles in bacterium-to-bacterium interactions (Schulz and Dickschat, 2007). However, several studies suggested that VOCs emitted by bacteria could influence bacterial phenotypes such as colony morphogenesis, biofilm formation, pigment production or antibiotic resistance (Bernier *et al.,* 2011; Létoffé *et al.,* 2014). The reasons why microorganisms produce volatiles remain unclear even if several functions such as communication, quorum sensing mechanisms and defense have been suggested (Kai *et al.,* 2009). Nevertheless, these assumptions are difficult to demonstrate. Indeed, some bacterial volatiles have antifungal activity (Lo Cantore *et al.,* 2015; Popova *et al.,* 2014) while others can also serve as signals, attracting different animals, or repelling humans. Furthermore, they can also induce resistance mechanism towards bacterial pathogens in plants or promote their growth (Farag *et al.,* 2013). To date, none of these molecules was described as being anti-*Legionella*. Further investigations are needed to extract and analyze these molecules in order to decipher their mechanism of action. However, the role played by those volatiles compounds in an aquatic environment remains completely unknown.

In summary, the high proportion of anti-*Legionella* isolates recovered emphasizes that freshwater environments are not favorable to *L. pneumophila* in contrast to treated manmade

363 water settings and highlights the key role played by biofilms and protists that shelter this human
364 pathogen from competitors and harsh conditions (e.g. low temperature, presence of biocides).

Acknowledgements

We thank Daniel Guyonnet and Willy Aucher for their support around 16S rRNA coding gene sequencing experiment. We also thank Yoann Perrin, Cyril Noel and Didier Bouchon for their help on data analysis.

Author contributions

M-HC, JM-B and **JV** conceived and designed the study. **M-HC** performed experiments with the help of **AL** for antagonism experiments. **M-HC** and **VD** analyzed the data. **J-MB** and **JV** supervised the work. All authors edited the final manuscript.

Conflict of Interest Statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Funding

This work received financial support from the French National Research Program for Environmental and Occupational Health of ANSES, grant EST-2015/1/111.

References

Abdel-Nour, M., Duncan, C., Low, D. E., and Guyard, C. (2013). Biofilms: The stronghold of *Legionella pneumophila*. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 21660–21675. doi:10.3390/ijms141121660.

Abu Khweek, A., and Amer, A. O. (2018). Factors Mediating Environmental Biofilm Formation by *Legionella pneumophila*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8, 1–10. doi:10.3389/fcimb.2018.00038.

Altschup, S. F., Gish, W., Pennsylvania, T., and Park, U. (1990). Basic Local Alignment Search Tool 2Department of Computer Science. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410.

American Society of Heating Refrigerating and Air-Conditioning Engineers (2015). BSR/ASHRAE Standard 188P: Public Review Draft Prevention of Legionellosis Associated With Build- ing Water Systems. Available at: http://www.r2j.com/wp-content/uploads/2017/10/ASHRAE-188-2015.pdf.

Ashbolt, N. (2015). Environmental (Saprozoic) Pathogens of Engineered Water Systems: Understanding Their Ecology for Risk Assessment and Management. *Pathogens* 4, 390–405. doi:10.3390/pathogens4020390.

Beauté, J. (2017). Legionnaires' disease in Europe, 2011 to 2015. *Euro Surveill.* 22, :pii=30566. doi:10.2807/1560-7917.ES.2017.22.27.30566.

Berjeaud, J. M., Chevalier, S., Schlusselhuber, M., Portier, E., Loiseau, C., Aucher, W., Lesouhaitier, O., and Verdon, J. (2016). *Legionella pneumophila*: The paradox of a highly sensitive opportunistic waterborne pathogen able to persist in the environment. *Front. Microbiol.* 7, Article 486. doi:10.3389/fmicb.2016.00486.

Bernier, S. P., Létoffé, S., Delepierre, M., and Ghigo, J. M. (2011). Biogenic ammonia modifies antibiotic resistance at a distance in physically separated bacteria. *Mol. Microbiol.* 81, 705–716. doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07724.x.

Bigot, R., Bertaux, J., Frere, J., and Berjeaud, J. (2013). Intra-Amoeba Multiplication Induces Chemotaxis and Biofilm Colonization and Formation for *Legionella*. *PLoS One* 8, 1–10. doi:10.1371/journal.pone.0077875.

Boamah, D. K., Zhou, G., Ensminger, A. W., and O'Connor, T. J. (2017). From Many Hosts, One Accidental Pathogen: The Diverse Protozoan Hosts of *Legionella*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* doi:10.3389/fcimb.2017.00477.

Cazalet, C., Jarraud, S., Ghavi-Helm, Y., Kunst, F., Glaser, P., Etienne, J., and Buchrieser, C. (2008). Multigenome analysis identifies a worldwide distributed epidemic *Legionella pneumophila* clone that emerged within a highly diverse species. *Genome Res.* 18, 431–441. doi:10.1101/gr.7229808.

Cotuk, A., and Dogruoz, N. (2005). The effects of Pseudomonas and Aeromonas strains on *Legionella*

pneumophila growth. *Ann. Microbiol.* 55, 219–224. Available at: http://www.annmicro.unimi.it/full/55/cotuk_55_219-224.pdf.

de Lorenzo, V., and Pugsley, A. P. (1985). Microcin E492 , a Low-Molecular-Weight Peptide Antibiotic Which Causes Depolarization of the *Escherichia coli* Cytoplasmic Membrane. *Antimicrob. Agents Chemother.* 27, 666–669.

Declerck, P. (2010). Biofilms: The environmental playground of *Legionella pneumophila*. *Environ. Microbiol.* doi:10.1111/j.1462-2920.2009.02025.x.

Declerck, P., Behets, J., Margineanu, A., van Hoef, V., De Keersmaecker, B., and Ollevier, F. (2009). Replication of *Legionella pneumophila* in biofilms of water distribution pipes. *Microbiol. Res.* doi:10.1016/j.micres.2007.06.001.

Diederen, B. M. W. (2008). *Legionella* spp. and Legionnaires' disease. *J. Infect.* 56, 1–12. doi:10.1016/j.jinf.2007.09.010.

Dupuy, M., Mazoua, S., Berne, F., Bodet, C., Garrec, N., Herbelin, P., Ménard-Szczebara, F., Oberti, S., Rodier, M.H., Soreau, S., Wallet, F., and Héchard, Y. (2011). Efficiency of water disinfectants against *Legionella pneumophila* and *Acanthamoeba*. *Water Res.* doi:10.1016/j.watres.2010.10.025.

Edgar, R. C. (2004a). MUSCLE: A multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* 5, 1–19. doi:10.1186/1471-2105-5-113.

Edgar, R. C. (2004b). MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792–1797. doi:10.1093/nar/gkh340.

Falkinham, J. O., Hilborn, E. D., Arduino, M. J., Pruden, A., and Edwards, M. A. (2015a). Epidemiology and ecology of opportunistic premise plumbing pathogens: *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium avium*, and *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Health Perspect.* 123, 749–758. doi:10.1289/ehp.1408692.

Falkinham, J. O., Pruden, A., and Edwards, M. (2015b). Opportunistic Premise Plumbing Pathogens: Increasingly Important Pathogens in Drinking Water. *Pathogens* 4, 373–386. doi:10.3390/pathogens4020373.

Farag, M. A., Zhang, H., and Ryu, C. M. (2013). Dynamic Chemical Communication between Plants and Bacteria through Airborne Signals: Induced Resistance by Bacterial Volatiles. *J. Chem. Ecol.* 39, 1007–1018. doi:10.1007/s10886-013-0317-9.

Guerrieri, E., Bondi, M., Sabia, C., De Niederhäusern, S., Borella, P., and Messi, P. (2008). Effect of bacterial interference on biofilm development by *Legionella pneumophila*. *Curr. Microbiol.* 57, 532–536. doi:10.1007/s00284-008-9237-2.

Hamilton, K. A., Prussin, A. J., Ahmed, W., and Haas, C. N. (2018). Outbreaks of Legionnaires' Disease and Pontiac Fever 2006–2017. *Curr. Environ. Heal. Reports* 5, 263–271. doi:10.1007/s40572-018-0201-4.

Ji, P., Parks, J., Edwards, M. A., and Pruden, A. (2015). Impact of water chemistry, pipe material and stagnation on the building plumbing microbiome. *PLoS One* 10, 1–23. doi:10.1371/journal.pone.0141087.

Kai, M., Haustein, M., Molina, F., Petri, A., Scholz, B., and Piechulla, B. (2009). Bacterial volatiles and their action potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81, 1001–1012. doi:10.1007/s00253-008-1760-3.

Koide, M., Higa, F., Tateyama, M., Cash, H. L., Hokama, A., and Fujita, J. (2014). Role of *Brevundimonas vesicularis* in supporting the growth of *Legionella* in nutrient-poor environments. *New Microbiol.* 37, 33–39.

Kumar, S., Stecher, G., and Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870–1874. doi:10.1093/molbev/msw054.

Létoffé, S., Audrain, B., Bernier, S. P., Delepierre, M., and Ghigo, J. M. (2014). Aerial exposure to the bacterial volatile compound trimethylamine modifies antibiotic resistance of physically separated bacteria by raising culture medium pH. *MBio* 5, 1–12. doi:10.1128/mBio.00944-13.

Letunic, I., and Bork, P. (2016). Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Res.* 44, W242–W245. doi:10.1093/nar/gkw290.

Lo Cantore, P., Giorgio, A., and Iacobellis, N. S. (2015). Bioactivity of volatile organic compounds produced by *Pseudomonas tolaasii*. *Front. Microbiol.* 6, 1–14. doi:10.3389/fmicb.2015.01082.

Loiseau, C., Schlusselhuber, M., Bigot, R., Bertaux, J., Berjeaud, J. M., and Verdon, J. (2015). Surfactin from *Bacillus subtilis* displays an unexpected anti-*Legionella* activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 5083–5093. doi:10.1007/s00253-014-6317-z.

Marchand, A., Verdon, J., Lacombe, C., Crapart, S., Héchard, Y., and Berjeaud, J. M. (2011). Anti-*Legionella* activity of staphylococcal hemolytic peptides. *Peptides* 32, 845–851. doi:10.1016/j.peptides.2011.01.025.

Newton, H. J., Ang, D. K. Y., Van Driel, I. R., and Hartland, E. L. (2010). Molecular pathogenesis of infections

caused by *Legionella pneumophila*. *Clin. Microbiol. Rev.* 23, 274–298. doi:10.1128/CMR.00052-09.

Oksanen, J., Blanchet, F. G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., Minchin, P.R., O'Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H., Szoecs, E., and Wagner, H. (2018). Package "vegan": Community Ecology Package. Available at: https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/vegan.pdf.

Palusińska-Szysz, M., Zdybicka-Barabas, A., Pawlikowska-Pawlęga, B., Mak, P., and Cytryńska, M. (2012). Anti-*Legionella dumoffii* Activity of *Galleria mellonella* Defensin and Apolipophorin III. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 17048–17064. doi:10.3390/ijms131217048.

Parr, A., Whitney, E. A., and Berkelman, R. L. (2015). Legionellosis on the Rise : A Review of Guidelines for Prevention in the United States. 30322, 17–26. doi:10.1097/PHH.0000000000000123.

Płociniczak, M. P.-, Płaza, G. A., and Piotrowska-seget, Z. (2011). Environmental Applications of Biosurfactants : Recent Advances. *Int. J. Mol. Sci.* 12, 633–654. doi:10.3390/ijms12010633.

Popova, A. A., Koksharova, O. A., Lipasova, V. A., Zaitseva, J. V., Katkova-Zhukotskaya, O. A., Eremina, S. I., Mironov, A.S., Chernin, L.S., and Khmel, I.A. (2014). Inhibitory and toxic effects of volatiles emitted by strains of *Pseudomonas* and *Serratia* on growth and survival of selected microorganisms, *Caenorhabditis elegans*, and *Drosophila melanogaster*. *Biomed Res. Int.* 2014. doi:10.1155/2014/125704.

Proctor, C. R., and Hammes, F. (2015). Drinking water microbiology-from measurement to management. *Curr. Opin. Biotechnol.* 33, 87–94. doi:10.1016/j.copbio.2014.12.014.

Rebuffat, S. (2012). Microcins in action : amazing defence strategies of Enterobacteria. *Biochem. Soc. Trans.* 40, 1456–1462. doi:10.1042/BST20120183.

Schlusselhuber, M., Humblot, V., Casale, S., Méthivier, C., Verdon, J., Leippe, M., and Berjeaud, J.M. (2015). Potent antimicrobial peptides against *Legionella pneumophila* and its environmental host, *Acanthamoeba castellanii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 4879–4891. doi:10.1007/s00253-015-6381-z.

Schulz, S., and Dickschat, J. S. (2007). Bacterial volatiles: The smell of small organisms. *Nat. Prod. Rep.* 24, 814–842. doi:10.1039/b507392h.

Stewart, C. R., Muthye, V., and Cianciotto, N. P. (2012). *Legionella pneumophila* Persists within Biofilms Formed by *Klebsiella pneumoniae*, *Flavobacterium* sp., and *Pseudomonas fluorescens* under Dynamic Flow Conditions. *PLoS One* 7, 1–8. doi:10.1371/journal.pone.0050560.

Stout, J. E., Yu, V. L., and Best, M. G. (1985). Ecology of *Legionella pneumophila* within water distribution systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 221–228.

Tasiemski, A., Massol, F., Cuvillier-hot, V., Boidin-wichlacz, C., Roger, E., Rodet, F., Fournier, I., Thomas, F., and Salzet, M. (2015). Reciprocal immune benefit based on complementary production of antibiotics by the leech *Hirudo verbana* and its gut symbiont *Aeromonas veronii*. *Nat. Publ. Gr.* doi:10.1038/srep17498.

Temmerman, R., Vervaeren, H., Noseda, B., Boon, N., and Verstraete, W. (2006). Necrotrophic growth of *Legionella pneumophila*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 4323–4328. doi:10.1128/AEM.00070-06.

Tison, D. L., Pope, I. D. H., Cherry, W. B., and Fliermans, C. B. (1980). Growth of *Legionella* pneumophila in association with Growth of *Legionella pneumophila* in Association with Blue- Green Algae (Cyanobacteria). *Appl. Environ. Microbiol.* 39, 456–459.

Van Heijnsbergen, E., Schalk, J. A. C., Euser, S. M., Brandsema, P. S., Den Boer, J. W., and De Roda Husman, A. M. (2015). Confirmed and potential sources of *Legionella* reviewed. doi:10.1021/acs.est.5b00142.

Verdon, J., Berjeaud, J. M., Lacombe, C., and Héchard, Y. (2008). Characterization of anti-*Legionella* activity of warnericin RK and delta-lysin I from *Staphylococcus warneri*. *Peptides* 29, 978–984. doi:10.1016/j.peptides.2008.01.017.

Verdon, J., Coutos-Thevenot, P., Rodier, M. H., Landon, C., Depayras, S., Noel, C., La Camera, S., Moumen, B., Greve, P., Bouchon, D., Berjeaud, J.M., and Braquart-Varnier, C. (2016). Armadillidin H, a glycine-rich peptide from the terrestrial crustacean *Armadillidium vulgare*, displays an unexpected wide antimicrobial spectrum with membranolytic activity. *Front. Microbiol.* 7, 1484. doi:10.3389/fmicb.2016.01484.

Verdon, J., Falge, M., Maier, E., Bruhn, H., Steinert, M., Faber, C., Benz, R., and Héchard, Y. (2009). Detergent-like activity and a-helical structure of warnericin RK, an anti-*Legionella* peptide. *Biophys. J.* 97, 1933–1940. doi:10.1016/j.bpj.2009.06.053.

Verdon, J., Labanowski, J., Sahr, T., Ferreira, T., Lacombe, C., Buchrieser, C., Berjeaud, J.M., and Héchard, Y. (2011). Fatty acid composition modulates sensitivity of *Legionella pneumophila* to warnericin RK , an antimicrobial peptide. *BBA - Biomembr.* 1808, 1146–1153. doi:10.1016/j.bbamem.2010.12.011.

Wadowsky, R. M., and Yee, R. B. (1983). Satellite growth of *Legionella pneumophila* with an environmental

isolate of Flavobacterium breve. *Appl. Environ. Microbiol.* 46, 1447–1449.

Wang, H., Bedard, E., Prevost, M., Camper, A. K., Hill, V. R., and Pruden, A. (2017). Methodological approaches for monitoring opportunistic pathogens in premise plumbing: A review. *Water Res.* 117, 68–86. doi:10.1016/j.watres.2017.03.046.

Wickham, H. (2009). *ggplot2*. doi:10.1007/978-0-387-98141-3.

World Health Organization (2011). Guidelines for drinking-water quality - World Health Organization. doi:10.1016/S1462-0758(00)00006-6.

Yu, V. L., Plouffe, J. F., Pastoris, M. C., Stout, J. E., Schousboe, M., Widmer, A., Summersgill, J., File, T., Heath, C.M., Paterson, D.L., and Chereshsky, 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. doi:10.1086/341087.

Tables

Table 1. Inhibition diameters for genera with only one representing isolate in the collection

Genus	Diameter (cm)
Azospirillum	Ø = 0
Curtobacterium	Ø = 0
Novosphingobium	Ø = 0
Pseudacidovorax	Ø = 0
Pseudoxanthomonas	Ø = 0
Rhodococcus	Ø = 0
Shewanella	Ø = 0
Staphylococcus	Ø = 0
Achromobacter	Ø < 2
Acidovorax	Ø < 2
Arthrobacter	Ø < 2
Brevibacillus	Ø < 2
Rhodoferax	Ø < 2
Escherichia	2 < Ø < 6
Erwinia	2 < Ø < 6
Klebsiella	2 < Ø < 6
Lysinibacillus	2 < Ø < 6

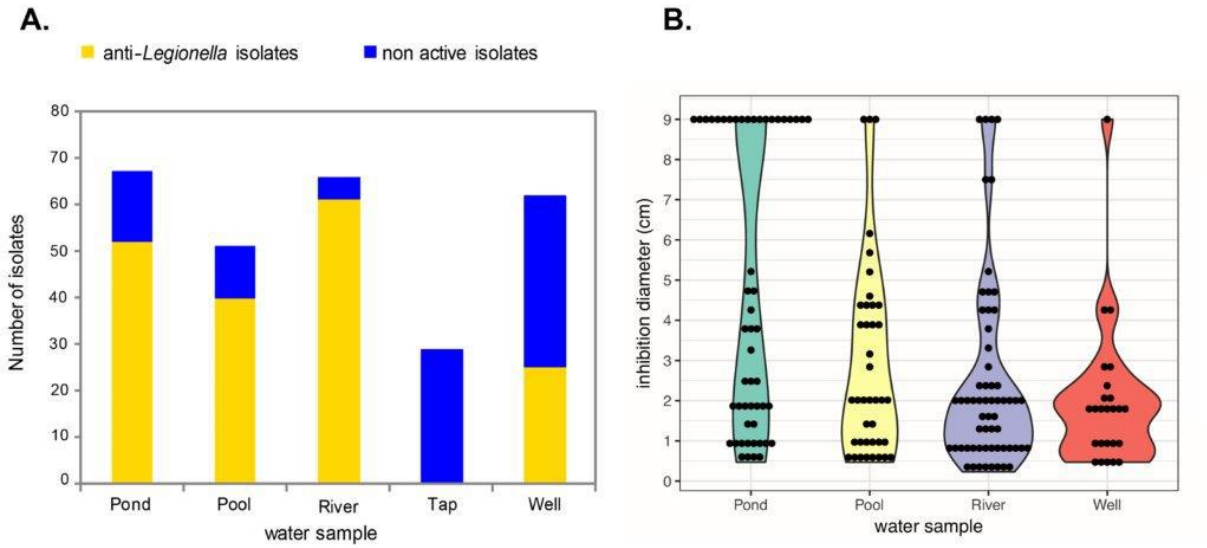


Figure 1. Abundance and distribution of active anti-*Legionella* bacterial isolates and their inhibition diameters among the five water sub-collections. *(A) Active isolates are colored in yellow while non active isolates are colored in blue. The screening was realized by using spot and lawn assay method. (B) Violin Plot distribution of inhibition diameters among anti Legionella isolates. Since there is no active isolate within TW, the corresponding sub-collection was not represented.*

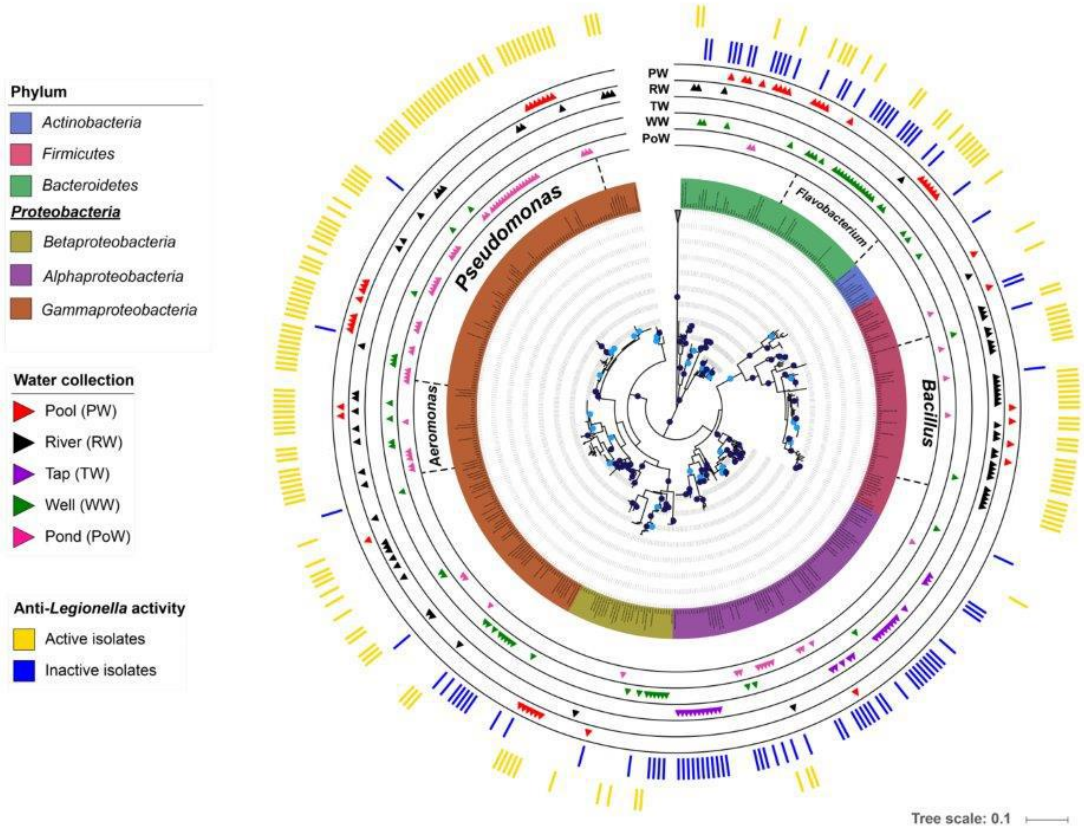


Figure 2. Phylogenetic tree of anti-*Legionella*-associated environmental bacteria. The phylogenetic analysis was performed using the maximum likelihood phylogenetic method on MEGA v7 and the tree was viewed with iTOL (Letunic and Bork, 2016)(Letunic and Bork, 2016). Branches with bootstrap values (1000 replicates) higher than 70% are marked with dark blue dots, and those between 60 and 70% with light blue dots (The tree did not have branches with bootstrap value less than 60%). Environmental bacterial strains are color-coded by phyla, except for the Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria and Gammaproteobacteria which are depicted at the class level. The outer colored bands show the anti-*Legionella* profile with active isolates in yellow and inactive isolates in blue. The five internal bands show the distribution of each isolate among the five environmental water sub-collections (PoW, PW, RW, TW and WW).

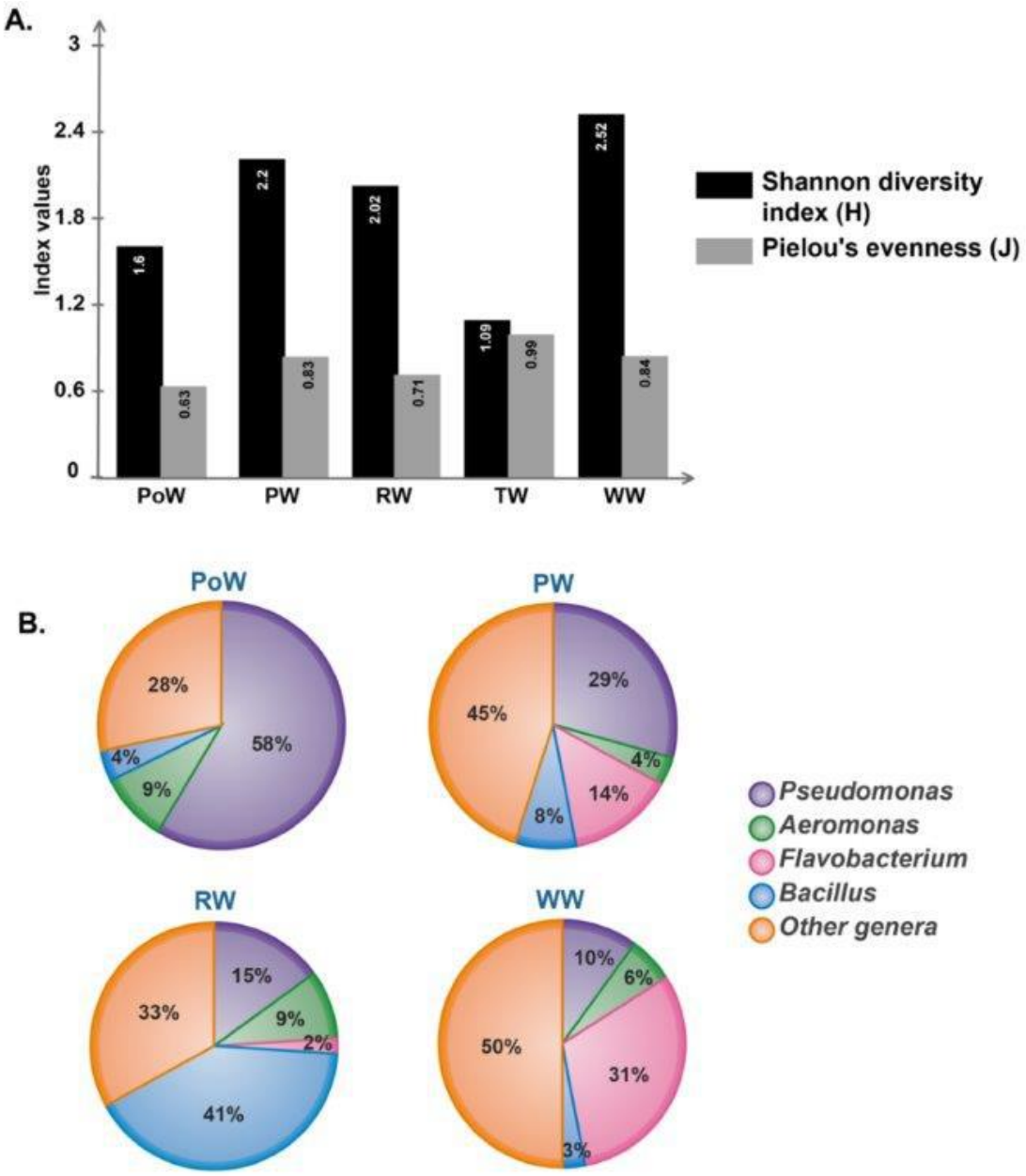


Figure 3. Microbial diversity of environmental water sub-collections. **(A)** Bacterial communities' richness and evenness from each water sub-collection, as estimated by Shannon and Pielou indexes, respectively. Calculation were performed using R package vegan (Oksanen *et al.,* 2018) **(B)** Relative abundances of the most represented (i.e. dominant) genera in each water sub-collection. TW sample is not represented by a circular diagram since this sample harbors only 3 bacterial genera, namely *Bradyrhizobium*, *Sphingobium* and *Sphingomonas.*

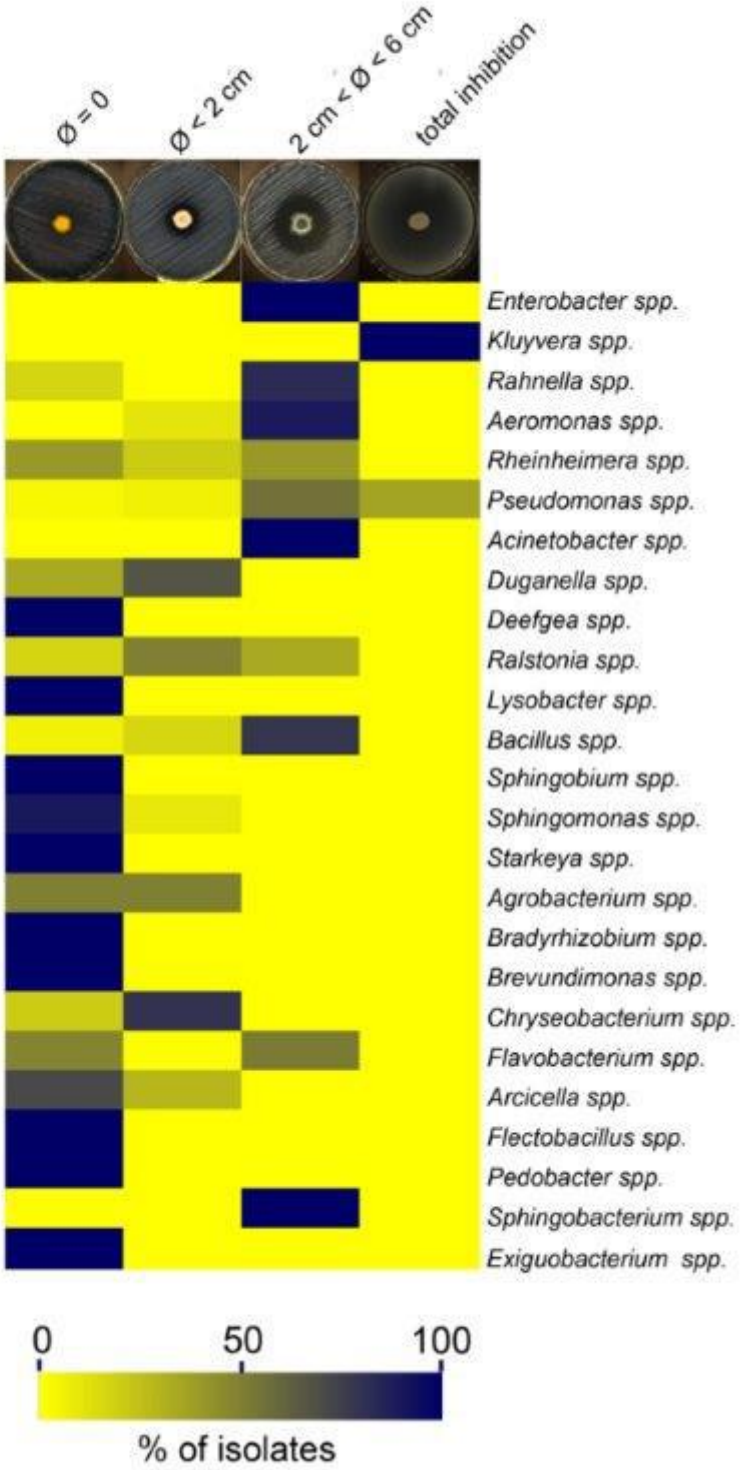


Figure 4. Distribution of inhibition diameters among bacterial genera. The heatmap was constructed using relative abundance of each inhibition profile among all genera. Genera represented by only one isolate are not included in this heatmap and are detailed in **Table 1**.

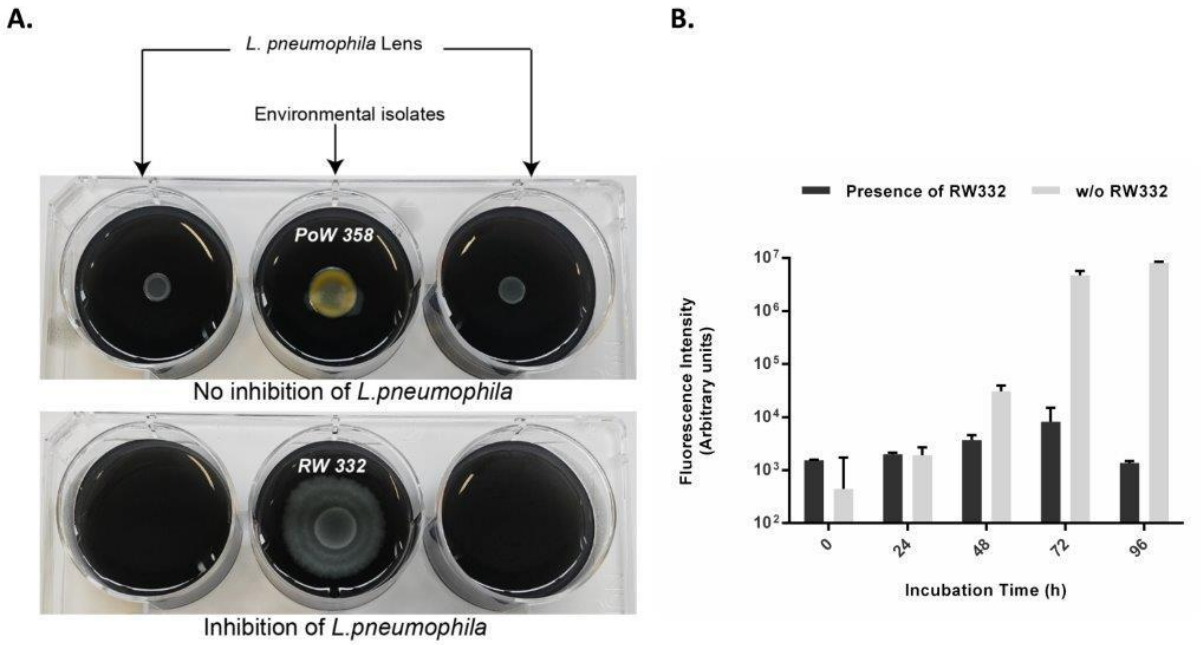


Figure 5. Long distance way inhibition of GFP-expressing *L. pneumophila* through the production of volatile compounds produced by several *Pseudomonas* isolates. *L. pneumophila* was spread on both upper sides of the 6 wells plate. Each isolate was spread on the center of 6-well plates. **(A)** On the left microtiter plate, *Pseudomonas* PoW358 does not exhibit any anti-*Legionella* activity while on the right microtiter plate, *Pseudomonas* RW332 exhibits a volatile compounds-mediated growth inhibition. **(B)** Fluorescence quantification emitted by GFP-expressing *L. pneumophila* Lens in presence and absence of the strain RW332 (n=3).

Supplementary Table 1: Full list of 16S rRNA coding sequences accession numbers

Isolate	Identification	Accession Number	Isolate	Identification	Accession Number
RW318	*Achromobacter sp.*	MH591537	RW137	*Bacillus sp.*	MH591692
PoW339	*Acidovorax sp.*	MH591608	RW150	*Bacillus sp.*	MH591668
RW136	*Acinetobacter sp.*	MH591485	RW151	*Bacillus sp.*	MH591671
RW138	*Acinetobacter sp.*	MH591486	RW167	*Bacillus sp.*	MH591684
RW172	*Acinetobacter sp.*	MH591484	RW68	*Bacillus sp.*	MH591673
PoW257	*Aeromonas sp.*	MH591495	RW75	*Bacillus sp.*	MH591662
PoW324	*Aeromonas sp.*	MH591494	RW77	*Bacillus sp.*	MH591693
PoW327	*Aeromonas sp.*	MH591508	RW79	*Bacillus sp.*	MH591694
PoW338	*Aeromonas sp.*	MH591501	RW80	*Bacillus sp.*	MH591695
PoW344	*Aeromonas sp.*	MH591509	RW81	*Bacillus sp.*	MH591696
PoW366	*Aeromonas sp.*	MH591507	RW86	*Bacillus sp.*	MH591697
PW24	*Aeromonas sp.*	MH591500	RW87	*Bacillus sp.*	MH591679
PW39	*Aeromonas sp.*	MH591498	RW88	*Bacillus sp.*	MH591680
RW153	*Aeromonas sp.*	MH591491	RW90	*Bacillus sp.*	MH591698
RW310	*Aeromonas sp.*	MH591506	RW91	*Bacillus sp.*	MH591681
RW312	*Aeromonas sp.*	MH591493	RW92	*Bacillus sp.*	MH591682
RW314	*Aeromonas sp.*	MH591504	RW93	*Bacillus sp.*	MH591699
RW317	*Aeromonas sp.*	MH591499	WW206	*Bacillus sp.*	MH591670
RW334	*Aeromonas sp.*	MH591505	WW285	*Bacillus sp.*	MH591672
RW78	*Aeromonas sp.*	MH591503	TW175	*Bradyrhizobium sp.*	MH591626
WW211	*Aeromonas sp.*	MH591496	TW176	*Bradyrhizobium sp.*	MH591625
WW239	*Aeromonas sp.*	MH591497	TW177	*Bradyrhizobium sp.*	MH591617
WW240	*Aeromonas sp.*	MH591492	TW178	*Bradyrhizobium sp.*	MH591627
WW290	*Aeromonas sp.*	MH591502	TW182	*Bradyrhizobium sp.*	MH591624
PoW213	*Arcicella sp.*	MH591743	TW184	*Bradyrhizobium sp.*	MH591618
PoW260	*Arcicella sp.*	MH591739	TW185	*Bradyrhizobium sp.*	MH591619
PW26	*Arcicella sp.*	MH591740	TW186	*Bradyrhizobium sp.*	MH591620
PW37	*Arcicella sp.*	MH591744	TW188	*Bradyrhizobium sp.*	MH591621
PW4	*Arcicella sp.*	MH591741	TW189	*Bradyrhizobium sp.*	MH591622
PW5	*Arcicella sp.*	MH591742	TW190	*Bradyrhizobium sp.*	MH591623
PW8	*Arcicella sp.*	MH591745	PW29	*Brevibacillus sp.*	MH591703
WW300	*Arthrobacter sp.*	MH591705	PoW262	*Brevundimonas sp.*	MH591628
PoW259	*Azospirillum sp.*	MH591640	PoW270	*Brevundimonas sp.*	MH591629
PoW274	*Bacillus sp.*	MH591669	WW229	*Brevundimonas sp.*	MH591631
PoW368	*Bacillus sp.*	MH591687	WW303	*Brevundimonas sp.*	MH591630
PoW379	*Bacillus sp.*	MH591676	PW15	*Chryseobacterium sp.*	MH591735
PW1	*Bacillus sp.*	MH591677	PW17	*Chryseobacterium sp.*	MH591736
PW2	*Bacillus sp.*	MH591678	PW27	*Chryseobacterium sp.*	MH591737
PW34	*Bacillus sp.*	MH591667	PW3	*Chryseobacterium sp.*	MH591734
PW35	*Bacillus sp.*	MH591688	WW282	*Chryseobacterium sp.*	MH591733
RW100	*Bacillus sp.*	MH591666	WW228	*Curtobacterium sp.*	MH591704
RW103	*Bacillus sp.*	MH591674	WW233	*Deefgea sp.*	MH591616
RW104	*Bacillus sp.*	MH591675	WW238	*Deefgea sp.*	MH591613
RW111	*Bacillus sp.*	MH591663	WW246	*Deefgea sp.*	MH591614
RW113	*Bacillus sp.*	MH591685	WW250	*Deefgea sp.*	MH591615
RW114	*Bacillus sp.*	MH591664	WW232	*Duganella sp.*	MH591611
RW117	*Bacillus sp.*	MH591686	WW298	*Duganella sp.*	MH591610
RW120	*Bacillus sp.*	MH591683	RW122	*Enterobacter sp.*	MH591510
RW129	*Bacillus sp.*	MH591665	RW84	*Enterobacter sp.*	MH591511
RW131	*Bacillus sp.*	MH591689	PW50	*Enterobacter sp.*	MH591512
RW133	*Bacillus sp.*	MH591690	RW132	*Erwinia sp.*	MH591513
RW135	*Bacillus sp.*	MH591691	RW116	*Escherichia sp.*	MH591488

Isolate	Identification	Accession Number	Isolate	Identification	Accession Number
PoW263	*Exiguobacterium sp.*	MH591702	PoW340	*Pseudomonas sp.*	MH591560
PW31	*Exiguobacterium sp.*	MH591701	PoW341	*Pseudomonas sp.*	MH591561
PW306	*Flavobacterium sp.*	MH591725	PoW342	*Pseudomonas sp.*	MH591562
PW53	*Flavobacterium sp.*	MH591718	PoW343	*Pseudomonas sp.*	MH591563
PW54	*Flavobacterium sp.*	MH591724	PoW345	*Pseudomonas sp.*	MH591564
PW55	*Flavobacterium sp.*	MH591716	PoW346	*Pseudomonas sp.*	MH591565
PW56	*Flavobacterium sp.*	MH591717	PoW347	*Pseudomonas sp.*	MH591566
PW61	*Flavobacterium sp.*	MH591726	PoW348	*Pseudomonas sp.*	MH591567
RW158	*Flavobacterium sp.*	MH591707	PoW349	*Pseudomonas sp.*	MH591568
WW212	*Flavobacterium sp.*	MH591727	PoW350	*Pseudomonas sp.*	MH591570
WW227	*Flavobacterium sp.*	MH591715	PoW351	*Pseudomonas sp.*	MH591571
WW230	*Flavobacterium sp.*	MH591714	PoW352	*Pseudomonas sp.*	MH591572
WW234	*Flavobacterium sp.*	MH591713	PoW353	*Pseudomonas sp.*	MH591573
WW241	*Flavobacterium sp.*	MH591711	PoW354	*Pseudomonas sp.*	MH591574
WW242	*Flavobacterium sp.*	MH591712	PoW355	*Pseudomonas sp.*	MH591575
WW245	*Flavobacterium sp.*	MH591709	PoW356	*Pseudomonas sp.*	MH591577
WW247	*Flavobacterium sp.*	MH591710	PoW357	*Pseudomonas sp.*	MH591578
WW251	*Flavobacterium sp.*	MH591708	PoW358	*Pseudomonas sp.*	MH591580
WW253	*Flavobacterium sp.*	MH591728	PoW360	*Pseudomonas sp.*	MH591583
WW283	*Flavobacterium sp.*	MH591730	PoW361	*Pseudomonas sp.*	MH591584
WW287	*Flavobacterium sp.*	MH591729	PoW362	*Pseudomonas sp.*	MH591586
WW288	*Flavobacterium sp.*	MH591731	PoW363	*Pseudomonas sp.*	MH591587
WW289	*Flavobacterium sp.*	MH591732	PoW365	*Pseudomonas sp.*	MH591590
WW293	*Flavobacterium sp.*	MH591722	PoW370	*Pseudomonas sp.*	MH591569
WW294	*Flavobacterium sp.*	MH591723	PoW371	*Pseudomonas sp.*	MH591576
WW299	*Flavobacterium sp.*	MH591721	PoW372	*Pseudomonas sp.*	MH591579
WW302	*Flavobacterium sp.*	MH591719	PoW373	*Pseudomonas sp.*	MH591581
WW304	*Flavobacterium sp.*	MH591720	PoW374	*Pseudomonas sp.*	MH591582
PW10	*Flectobacillus sp.*	MH591746	PoW375	*Pseudomonas sp.*	MH591585
PW22	*Flectobacillus sp.*	MH591747	PoW376	*Pseudomonas sp.*	MH591588
RW76	*Klebsiella sp.*	MH591514	PoW377	*Pseudomonas sp.*	MH591589
RW169	*Kluyvera sp.*	MH591489	PoW378	*Pseudomonas sp.*	MH591591
RW152	*Kluyvera sp.*	MH591490	PoW380	*Pseudomonas sp.*	MH591592
RW83	*Lysinibacillus sp.*	MH591700	PW307	*Pseudomonas sp.*	MH591547
WW219	*Lysobacter sp.*	MH591526	PW321	*Pseudomonas sp.*	MH591548
WW220	*Lysobacter sp.*	MH591527	PW328	*Pseudomonas sp.*	MH591549
WW221	*Lysobacter sp.*	MH591528	PW329	*Pseudomonas sp.*	MH591550
WW222	*Lysobacter sp.*	MH591529	PW330	*Pseudomonas sp.*	MH591551
WW223	*Lysobacter sp.*	MH591530	PW331	*Pseudomonas sp.*	MH591552
WW236	*Novosphingobium sp.*	MH591651	PW57	*Pseudomonas sp.*	MH591538
PW52	*Pedobacter sp.*	MH591748	PW58	*Pseudomonas sp.*	MH591539
RW101	*Pedobacter sp.*	MH591751	PW60	*Pseudomonas sp.*	MH591540
WW226	*Pedobacter sp.*	MH591752	PW62	*Pseudomonas sp.*	MH591541
WW295	*Pedobacter sp.*	MH591750	PW63	*Pseudomonas sp.*	MH591542
WW305	*Pedobacter sp.*	MH591749	PW64	*Pseudomonas sp.*	MH591543
WW252	*Pseudoduganella sp.*	MH591612	PW65	*Pseudomonas sp.*	MH591544
PoW322	*Pseudomonas sp.*	MH591554	PW66	*Pseudomonas sp.*	MH591545
PoW323	*Pseudomonas sp.*	MH591555	PW67	*Pseudomonas sp.*	MH591546
PoW325	*Pseudomonas sp.*	MH591556	RW102	*Pseudomonas sp.*	MH591553
PoW326	*Pseudomonas sp.*	MH591557	RW149	*Pseudomonas sp.*	MH591593
PoW336	*Pseudomonas sp.*	MH591558	RW162	*Pseudomonas sp.*	MH591594
PoW337	*Pseudomonas sp.*	MH591559	RW164	*Pseudomonas sp.*	MH591595

Isolate	Identification	Accession Number	Isolate	Identification	Accession Number
RW311	*Pseudomonas sp.*	MH591596	TW180	*Sphingomonas sp.*	MH591645
RW313	*Pseudomonas sp.*	MH591597	TW183	*Sphingomonas sp.*	MH591646
RW319	*Pseudomonas sp.*	MH591598	TW187	*Sphingomonas sp.*	MH591643
RW332	*Pseudomonas sp.*	MH591599	TW193	*Sphingomonas sp.*	MH591641
RW333	*Pseudomonas sp.*	MH591600	TW197	*Sphingomonas sp.*	MH591647
RW335	*Pseudomonas sp.*	MH591601	TW198	*Sphingomonas sp.*	MH591648
WW249	*Pseudomonas sp.*	MH591602	TW199	*Sphingomonas sp.*	MH591649
WW279	*Pseudomonas sp.*	MH591603	TW200	*Sphingomonas sp.*	MH591650
WW280	*Pseudomonas sp.*	MH591604	WW248	*Staphylococcus sp.*	MH591661
WW284	*Pseudomonas sp.*	MH591605	PoW272	*Starkeya sp.*	MH591638
WW286	*Pseudomonas sp.*	MH591606	PoW277	*Starkeya sp.*	MH591639
WW292	*Pseudomonas sp.*	MH591607			
WW225	*Pseudoxanthomonas sp.*	MH591531			
PoW261	*Rahnella sp.*	MH591517			
PoW265	*Rahnella sp.*	MH591518			
RW109	*Rahnella sp.*	MH591516			
RW99	*Rahnella sp.*	MH591515			
WW231	*Rahnella sp.*	MH591519			
WW237	*Rahnella sp.*	MH591520			
PW11	*Ralstonia sp.*	MH591738			
PW16	*Ralstonia sp.*	MH591534			
PW28	*Ralstonia sp.*	MH591535			
PW36	*Ralstonia sp.*	MH591536			
PW6	*Ralstonia sp.*	MH591532			
PW9	*Ralstonia sp.*	MH591533			
PoW276	*Rheinheimera sp.*	MH591525			
RW130	*Rheinheimera sp.*	MH591524			
WW244	*Rheinheimera sp.*	MH591523			
WW278	*Rheinheimera sp.*	MH591521			
WW291	*Rheinheimera sp.*	MH591522			
PoW255	*Rhizobium sp.*	MH591637			
PoW256	*Rhizobium sp.*	MH591636			
PoW266	*Rhizobium sp.*	MH591635			
PoW267	*Rhizobium sp.*	MH591634			
PoW271	*Rhizobium sp.*	MH591633			
RW316	*Rhizobium sp.*	MH591632			
WW210	*Rhodococcus sp.*	MH591706			
WW235	*Rhodoferax sp.*	MH591609			
WW243	*Shewanella sp.*	MH591487			
RW94	*Sphingobacterium sp.*	MH591753			
RW98	*Sphingobacterium sp.*	MH591754			
TW181	*Sphingobium sp.*	MH591653			
TW191	*Sphingobium sp.*	MH591657			
TW192	*Sphingobium sp.*	MH591658			
TW194	*Sphingobium sp.*	MH591660			
TW195	*Sphingobium sp.*	MH591659			
TW201	*Sphingobium sp.*	MH591654			
TW202	*Sphingobium sp.*	MH591656			
TW203	*Sphingobium sp.*	MH591655			
TW205	*Sphingobium sp.*	MH591652			
PoW269	*Sphingomonas sp.*	MH591642			
PW19	*Sphingomonas sp.*	MH591644			

Chapitre 2. Le genre *Pseudomonas* dans la lutte biologique contre *Legionella*

Ce chapitre décrit le potentiel des souches environnementales de *Pseudomonas* à inhiber la souche *L. pneumophila* Lens. Le genre *Pseudomonas* a déjà été décrit pour sa capacité antagoniste contre plusieurs espèces de *Legionella* (Guerrieri *et al.,* 2008; Toze *et al.,* 1990). Toutefois, les composés impliqués dans ces activités n'ont pas été caractérisés. Ce travail a permis la caractérisation de composés produits par des souches de *Pseudomonas* isolées à partir d'eaux douces.

2.1. Etude de la diversité taxonomique de *Pseudomonas* spp. isolés de communautés microbiennes d'eaux douces.

A partir d'échantillons d'eaux environnementales, 70 isolats ont été attribués au genre *Pseudomonas* par séquençage du gène codant pour l'ARN 16S. Ces isolats ont été retrouvés dans l'ensemble des échantillons d'eau, à l'exception de l'eau de réseau (TW) (**Figure 24**).

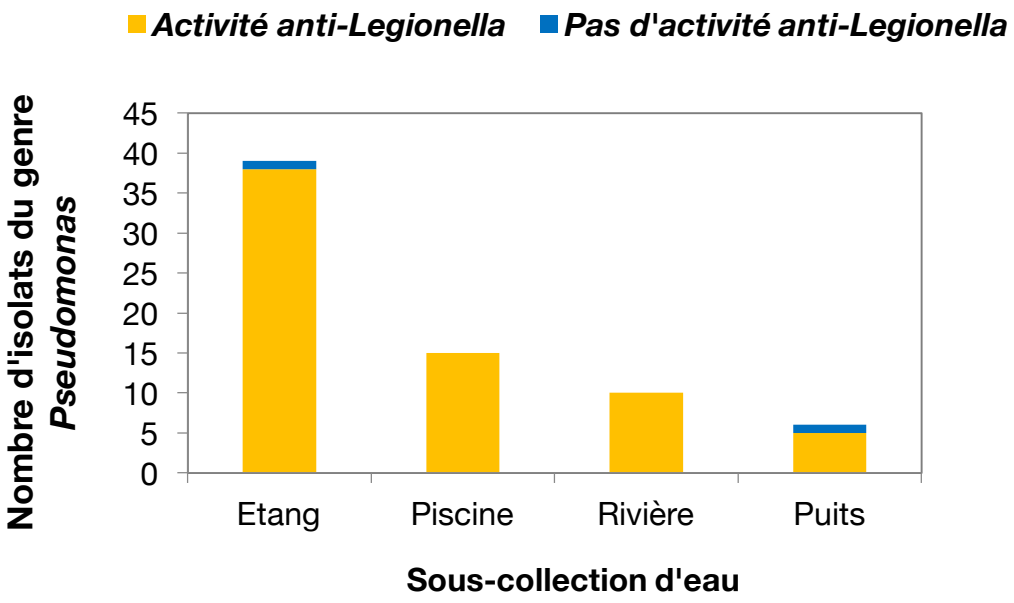


Figure 24. Distribution des souches environnementales de *Pseudomonas* par collection en fonction de leur activité anti-*Legionella*.

L'échantillon d'eau issu de l'étang (PoW) a permis d'isoler 39 souches de *Pseudomonas*, parmi lesquelles 38 (97%) ont une activité contre la souche *L.*

pneumophila Lens. Les autres échantillons d'eau provenant de la piscine, de la rivière et du puits (PW, RW, WW) ont également permis d'obtenir 15, 10 et 6 isolats de *Pseudomonas* respectivement. Parmi ces derniers, seul un isolat provenant de l'eau du puits (WW) ne montre pas d'activité contre *L. pneumophila*.

L'ensemble de ces isolats montre trois profils d'inhibition distincts par test d'antagonisme (**Figure 25**) :

- Profil A : Absence de halo d'inhibition autour de l'isolat de *Pseudomonas* testé (**Figure 25. A**)
- Profil B : Présence d'un halo d'inhibition autour de l'isolat de *Pseudomonas* testé indiquant l'activité d'une ou plusieurs molécules diffusibles (**Figure 25.B**)
- Profil C : Inhibition totale de la croissance de *L. pneumophila* par l'isolat environnemental testé, suggérant l'activité de composés organiques volatiles (COVs) (**Figure 25.C**).

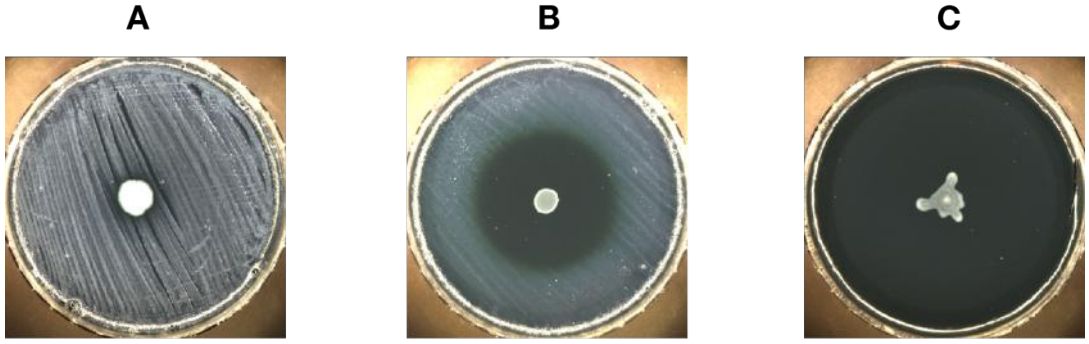


Figure 25. Profils d'inhibition des isolats de *Pseudomonas* environnementaux contre la souche *L. pneumophila* Lens. A. L'isolat WW 249 n'inhibe pas la croissance de *L. pneumophila*. **B.** L'isolat PoW 349 inhibe la croissance de *L. pneumophila*, montrée par la présence d'un halo d'inhibition. **C.** L'isolat PW 329 inhibe complètement la croissance de *L. pneumophila*.

Parmi l'ensemble des isolats de *Pseudomonas*, 2 souches issues de l'étang et du puits montrent le profil A (3%), signifiant qu'ils ne produisent pas de composés anti-*Legionella* dans les conditions expérimentales utilisées. Le profil B est majoritairement retrouvé dans les tests d'antagonisme, et représente 42 des 70 isolats de *Pseudomonas* testés (60%). Enfin, 26 isolats de *Pseudomonas* montrent le profil

d'inhibition C (37%), suggérant la production de COVs. Afin d'estimer la diversité des espèces de *Pseudomonas* productrices de composés anti-*Legionella* au sein de cette collection, une étude phylogénétique a été réalisée à partir des séquences du gène de l'ARNr 16S obtenues pour chaque isolat (**Figure 26**).

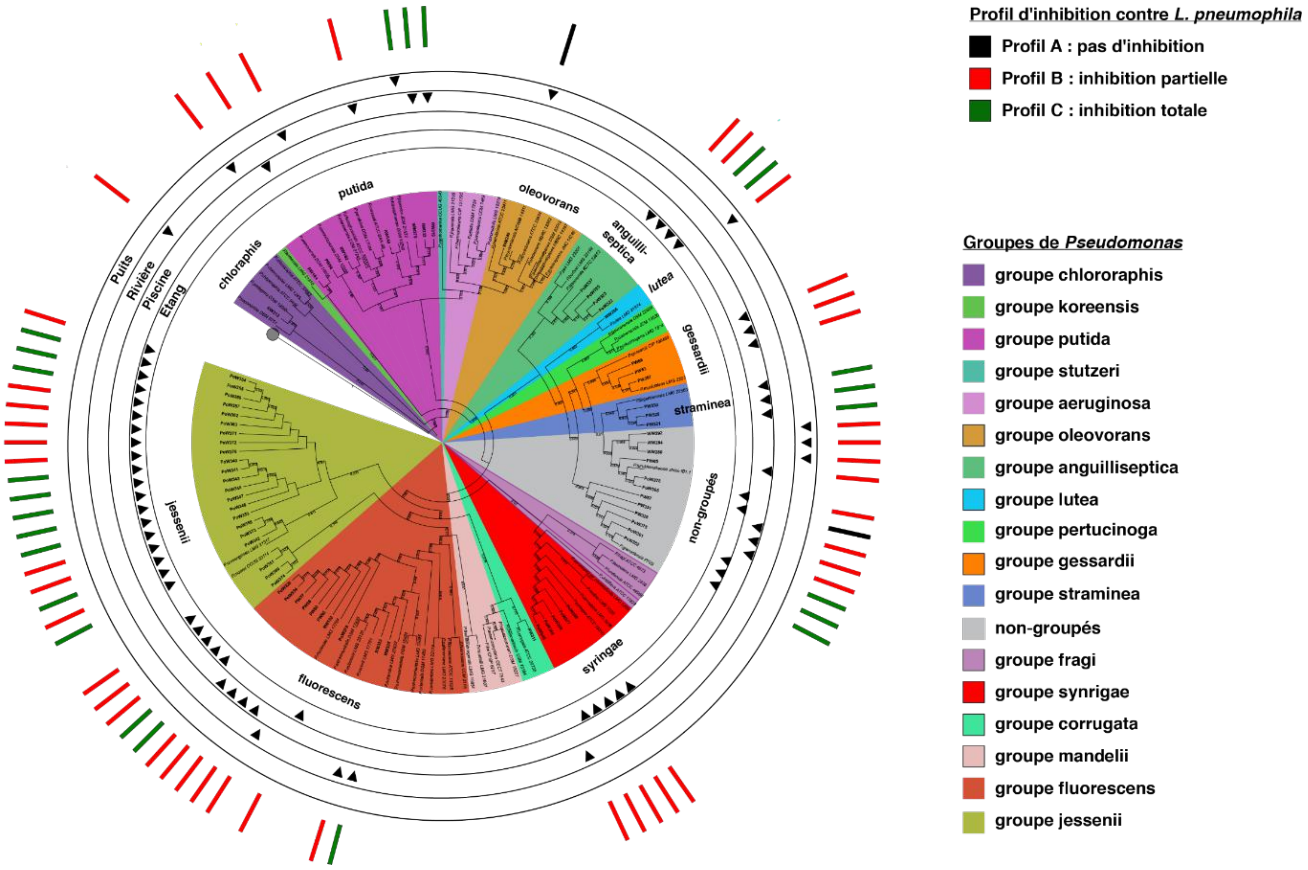


Figure 26. Distribution phylogénétique des isolats de *Pseudomonas* contenus dans les sous-collections d'eaux environnementales. Chaque isolat est assigné par un triangle de couleur noire à sa collection d'eau respective. Le profil d'inhibition observé contre *L. pneumophila* Lens pour chaque isolat est représenté à l'extérieur de l'arbre par des barres noires (profil A : pas d'inhibition), rouges (profil B : inhibition partielle) et vertes (profil C : inhibition totale).

Parmi les 18 groupes de *Pseudomonas* phylogénétiquement distincts et décrits à ce jour, 11 sont représentés au sein de cette collection (Gomila *et al.,* 2015). Les groupes *jessenii* et *fluorescens* sont les plus représentés en termes de nombre dans la collection (32/70). Par ailleurs, les isolats associés au groupe *jessenii* sont exclusivement retrouvés dans la sous-collection de l'étang (PoW). Certains isolats ne

sont pas assignés au sein de groupes de *Pseudomonas* (11/70) et sont proches phylogénétiquement des espèces *P. turukhanskensis* et *P. granadensis.* Cette analyse montre également qu'il ne semble pas y avoir de groupes de *Pseudomonas* spécifiquement associés à la production de COVs. Enfin, les deux isolats de *Pseudomonas* ne montrant pas d'activité contre la souche *L. pneumophila* Lens sont des souches proches des espèces *P. nitroreducens* (groupe *oleovorans*) et *P. turukhanskensis* (non-groupé).

2.2. Caractérisation des molécules diffusibles à activité anti-*Legionella* produites par le genre *Pseudomonas*

Dans le cadre de la caractérisation des composés anti-*Legionella* produits par le genre *Pseudomonas*, j'ai participé à un travail sur la caractérisation de molécules diffusibles impliquées dans ce type d'activité (**Figure 25.B**). Cette étude ne fait pas partie de ce travail de thèse mais a fait l'objet d'une publication qui est présentée en annexe (Loiseau *et al.,* 2015; 2018).

Annexe : Highlighting the potency of biosurfactants produced by *Pseudomonas* strains as anti-*Legionella* agents

Cet article décrit le criblage d'une collection de souches du genre *Pseudomonas* contre *L. pneumophila*. Les souches du genre *Pseudomonas* utilisées dans ces expériences proviennent d'échantillons cliniques et environnementaux. Parmi les souches testées, 13/21 (62%) ont montré une activité contre *L. pneumophila*. Les molécules impliquées dans l'activité observée ont également été caractérisées et correspondent à des biosurfactants de type rhamnolipides et lipopeptides. Enfin, ce travail montre la sensibilité spécifique des souches de *Legionella* à ces molécules.

2.3. Caractérisation des molécules volatiles à activité anti-*Legionella* produites par des souches du genre *Pseudomonas*

Les isolats de *Pseudomonas* qui induisent une inhibition totale de *Legionella pneumophila* Lens ont été évalués pour leur capacité à produire des composés organiques volatiles. Certaines productions ont été confirmées par test en plaque 6

puits en quantifiant la croissance de la souche de *L. pneumophila* Lens GFP par mesure de fluorescence (voir publication 1).

Dans ce cadre, une étude approfondie sur la caractérisation des COVs produits par la souche de référence *P. fluorescens* MFE01 a été mise en œuvre et fait l'objet d'un article en cours de rédaction (**Publication 2**).

2.3.1. Publication 2: Long-range aerial warfare: A volatile interference between *Pseudomonas* sp. and *Legionella pneumophila*

Ce travail décrit l'impact de la production de COVs par la souche *P. fluorescens* MFE01 sur la croissance de *L. pneumophila*. Au total, 18 COVs pouvant être impliqués dans cette activité ont été identifiés par GC-MS. Dans le but d'identifier les gènes impliqués dans la production de ces composés actifs contre *L. pneumophila*, des expériences de mutagénèse aléatoire par transposition ont été effectuées sur la souche MFE01. Parmi les mutants obtenus, les mutants 3H5 et 3H8 montraient une incapacité totale à inhiber *L. pneumophila*. L'analyse des séquences contenant le transposon *Tn5* chez ces deux mutants a conduit à identifier le gène *trpE* codant une anthranilate synthase. La comparaison des profils COVs émis par les souches 3H5 et MFE01 ont par la suite montré une réduction des quantités de 1-undécène, le 2-undécanone et le 2-tridécanone produites chez le mutant 3H5.

Publication 2

Long-range aerial warfare: A volatile interference between *Pseudomonas* sp. and *Legionella pneumophila*

En cours de rédaction

Long-range aerial warfare: A volatile interference between *Pseudomonas* sp. and *Legionella pneumophila*

Marie-Hélène Corre[1], Ségolène Depayras[2], Meg Rouxel[1], Alix Khalil[3], David Giron[3], Annabelle Merieau[2], Jean-Marc Berjeaud[1], Julien Verdon[1]✉

[1]Laboratoire Ecologie & Biologie des Interactions, UMR CNRS 7267, Université de Poitiers, 1 Rue Georges Bonnet, TSA 51106, 86073 POITIERS Cedex 9, France

[2]Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement, EA 4312, Université de Rouen, France

[3]Institut de Recherche sur la Biologie de l'Insecte (IRBI), UMR 7261 CNRS/Université de Tours, 37200 Tours, France

✉ Corresponding author and mailing address:

E-mail: julien.verdon@univ-poitiers.fr

Phone: +33 5 49 45 36 93

Fax: +33 5 49 45 35 03

Abstract

Legionella pneumophila, the causative agent of Legionnaires' disease, is a waterborne bacterium mainly found in man-made water systems in close association with free-living amoebae and multispecies biofilms. For years, several studies pointed out the ability of Gram-negative bacteria to kill *Legionella* sp. through the production of secondary metabolites or bacteriocin-like compounds. In this study, a strain of *Pseudomonas fluorescens* MFE01 displays a total inhibition profile on a 90 mm Petri dish against *L. pneumophila*. This long distance antibacterial activity was shown to be mediated through the production of volatile organic compounds (VOCs). The strain MFE01 exhibited a restricted spectrum of activity since only members of the Legionellaceae family were sensitive to its VOCs. Using headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) GC-MS strategy, we identified 18 VOCs produced by the strain MFE01 that could be responsible of this inhibition profile. To next figure out the mechanism of action of those compounds on *L. pneumophila*, a Tn*5* insertion mutants collection was generated from the wild type strain MFE01 and two of them were found to completely reverse the inhibition phenotype on *L. pneumophila*. Among those, both 3H5 and 3H8 mutants harbored Tn*5* in the anthranilate synthase coding gene (*trpE*) found in the tryptophan operon.

A comparison of emitted VOCs by the 3H5 mutant and the wild-type strain MFE01 shown that emission of 1-undecene, 2-undecanone and 2-tridecanone were reduced in the mutant strain. Therefore, we described VOCs as potent anti-*Legionella* agents to focus research on biofumigation strategies to fight legionellosis.

Keywords: volatile organic compounds; anti-*Legionella*; tryptophan biosynthesis regulation; anthranilate; *Pseudomonas*

INTRODUCTION

Legionella pneumophila is the main causative agent of Legionnaires' disease (LD), a severe form of pneumonia that can cause death. The serogroup 1 especially is responsible for 82.9% of the LD cases in Europe (1, 2) and for over 80% of the cases worldwide (3, 4). This bacterium originates from freshwaters environments and colonizes engineered water systems where it can persist within multispecies biofilms and phagotrophic protists like free-living amoebae (FLA) (5). Indeed, this opportunistic pathogen is able to resist phagocytic predation and replicate inside this nutrient-rich protective environment in a dedicated compartment called the *Legionella* containing vacuole (6). Although a probable person-to-person transmission was documented recently (7), people are exposed through the inhalation of contaminated water aerosols (8). In many water settings (i.e. drinking water supplies, hot water systems and cooling towers), *Legionella* spp. represent a particular concern and remain one of the most closely monitored microbial agent (9). Multiplication of *Legionella* spp. in those artificial water systems is highly facilitated by temperatures around 35°C and factors such as water stagnation, poor maintenance, no or reduced water disinfection and the presence of FLA grazing on biofilms (10). In these complex environments, interactions with microbial inhabitants like protists and bacteria play a key role in the survival of *L. pneumophila* (11, 12). Indeed, some bacteria were shown to promote *L. pneumophila* survival in oligotrophic environments while others were depicted to antagonize its persistence within biofilms (5, 13). Furthermore, we recently highlight than in freshwater environments, more than 60% of culturable bacterial isolates exhibit antagonistic activity against *L. pneumophila* (Corre *et al.,* 2018). Among those active isolates, 77% belong to one of those following genera: *Aeromonas*, *Bacillus*, *Flavobacterium* or *Pseudomonas*. In this previous work *Pseudomonas* isolates were of particular interest as we have shown that anti-*Legionella* molecules include both diffusible secreted compounds and volatile organic compounds (VOCs). A part of the secreted molecules has been characterized in a previous study and correspond to lipopeptides and rhamnolipids (Loiseau *et al.,* 2018). However, it is the only one report showing that VOCs could exert antagonist activity against *L. pneumophila*.

VOCs are a large group of secondary metabolites produced by many lifeforms on earth like humans, animals, plants, mushrooms protists and bacteria (14). Since human olfaction can sense thousands of volatiles molecules, those VOCs were exploited for a long time in many natural and artificial domains (i.e. production of fermented products, creation of perfumes). Although it is unclear how microorganisms can sense those compounds, microbial VOCs were shown to play key roles in microbial interactions between physically separated microorganisms

(15). To date, soil and rhizosphere environments remain the most studied systems in regards of microbial VOCs production and activities, particularly in plant-bacteria and bacteria-fungi interactions (15, 16). Relationships between bacteria were also explored and many positive and negative effects were characterized for those bacterial VOCs. Indeed, they can modulate the antibiotic tolerance pattern of bacterial cells (17–19), increase bacterial motility (17, 20), enhance bacterial capacity to form and to disperse biofilms (17, 21–23) and modulate bacterial virulence (24, 25). Conversely, bacterial VOCs can also inhibit the biofilm formation (17, 26, 27), impair cells motility (19) and exert direct antagonistic effects for microbial neighborhoods (26, 28–30). While volatile-mediated antifungal activity is well described in the literature, very few studies have reported data concerning volatile-mediated antibacterial activity (31).

The main objective of this study was to investigate the molecular and biochemical bases for VOCs production in *Pseudomona*s and their activity toward *Legionella* sp. In this context, we used *Pseudomonas fluorescens* MFE01 as a model since one freshwater isolate belonging to this species have been previously reported to aerially inhibit the growth of *L. pneumophila* (Corre *et al.,* 2018). A two-Petri dish assay was experimentally designed to screen numerous bacterial strains so as to determine the spectrum of activity of VOCs produced by *P. fluorescens* MFE01. The MFE01 volatilome was then characterized using headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) GC-MS. Mutants were generated to identify VOCs involved in the anti-*Legionella* activity and to unravel the metabolic pathways leading their production.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, growth conditions and chemicals

Bacterial strains used in this study are listed in Table 1. *P. fluorescens* MFE01 was cultured at 28°C for 24 h either on lysogeny broth (LB) agar plates or in liquid medium under shaking (180 rpm). LB was composed of 5 g/l Yeast extract, 10 g/l Tryptone and 5 g/l NaCl. When needed, 25 µg/ml gentamycin were added to the medium. For methyl anthranilate (MA) assays, a defined liquid medium MOPS was used. The composition of this medium is described elsewhere (32). *Legionella* strains were cultured at 37°C for 72 h either on buffered charcoal yeast extract (BCYE) agar plates or in buffered yeast extract (BYE) liquid medium under shaking (150 rpm). BYE was composed of 5 g/l N-(2-Acetamido)-2-aminoethanesulfonic acid, 10 g/l Yeast extract and the pH was adjusted at 6.9. BCYE was made from BYE by adding 2 g/l activated charcoal and 15 g/l agar. *Legionella pneumophila* serogroup 1 Lens CIP 108286 (33) was used as the reference strain for anti-*Legionella* experiments. Other bacteria were grown for 24 h either on LB agar plates or broth, at 30°C or 37°C, depending on the tested strain.

All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) unless otherwise stated.

Spot-on-lawn assay

The spot-on-lawn assay was performed as described previously (34). Briefly, a 72-h old pre-culture of *L. pneumophila* was diluted with fresh BYE to a concentration of 10^8 CFU/mL and a volume of 100 µL was spread onto a BCYE agar plate with a cotton swab. Then, 10 µl 24-h old pre-culture of *P. fluorescens* MFE01 (adjusted to a concentration of 10^9 CFU/ml with LB) were spotted onto the center of the agar plate and the plate was incubated at 30 °C for 72 h.

Two Petri-dish assay

The two-Petri-dish assay was adapted from Bernier and coworkers (18). An uncovered 3.5 cm Petri-dish was deposited in the center of a 9 cm classical Petri-dish (Figure 1). The resulting external ring was filled with 20 ml BCYE while the inner small Petri-dish was filled with 4 ml LB agar. A *P. fluorescens* MFE01 culture (diluted to a final OD_{600} of 0.1) or LB medium (control) was seeded in the central Petri-Dish as source of volatile compounds. Then, two 20 µL drops of a 48-h old culture of *L. pneumophila* (adjusted at a final OD_{600} of 1) were spotted on the external agar ring. The small Petri-dish was sealed with a lid or not, depending on the tested condition. The large Petri-dish was finally closed and incubated for 72 h at 28°C. Volatile activity was qualitatively estimated as a function of the growth of *L. pneumophila* (presence or absence of colonies).

***L. pneumophila* quantitative long-range inhibition assay**

The quantitative long-range inhibition assay was described elsewhere (Corre *et al.,* 2018) with some modifications. In brief, a 6-well plate was used to physically separate a GFP-expressing *L. pneumophila* Lens (35) and *P. fluorescens* MFE01 WT or mutants. Each external well was filled with 5 mL of BCYE and internal wells were filled with 5 mL of LB. Then, 10 µl of a 72-h old culture of GFP-expressing *L. pneumophila* Lens (adjusted to a final OD_{600} of 0.1) were spotted onto both upper sides of the plate. Finally, 40 µL of a 24-h old culture selected isolate (adjusted to a final OD_{600} of 1) were spotted onto the upper center of the plate. Plates were then incubated at 28°C for 96 h. Anti-*Legionella* activity mediated by volatile compound(s) production was quantified by measuring the fluorescence of GFP with a TriStar2 LB 942 Microplate Reader (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany).

Analyses of volatiles compounds by GC-MS

***Sample preparation*.** Sterile vials (20 ml) adapted to GC-MS were prepared by adding 4 ml of LB agar horizontally and 6 ml vertically. A 40 µl drop of a 24-h old culture of *P.*

fluorescens MFE01 or mutants (adjusted at a final OD_{600} of 1) was spotted on the agar, vials were then sealed and incubated at 28 °C for 0, 24, 48, 72 or 96 h before being analyzed by GC-MS. The injection vials were sealed with an aluminum crimp cap provided with a polytetrafluoroethylene/silicone septum (Agilent Technologies, Massy, France) and left in the incubator until analysis. For volatile compounds kinetic measurements, vials seeded with *P. fluorescens* MFE01 or mutants were incubated at 28°C for 0, 24, 48, 72 and 96 h.

SPME extraction. Prior to analysis, the 100 µm SPME polydimethylsiloxane (PDMS) fiber (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was preconditioned in the bakeout oven of the Gerstel injector as recommended by the manufacturer: 250°C during 30 min. Extraction duration profiles were carried out during 5 min at 28 °C. Desorption time was set at 5 min in the GC injection port set at 250°C.

GC-MS analyses. GC-MS analyses were performed in a 7890B Agilent gas chromatograph. Helium was used as the carrier gas at a constant flow rate of 1.2 ml/min. The injector operated in the splitless mode (50:1) and its temperature was set at 250°C. The separation of volatile compounds was performed on a Zebron ZB-5HT Inferno column (30 m x 0.25 mm, 0.25 µm, Phenomenex, USA). The oven temperature program started at 40°C (held for 5 min) and raised at a rate of 5°C/min to 150 °C (held for 2 min), and then raised at a rate of 4°C/min to 230 °C (held for 2 min). The detection was performed by an Agilent 7000C triple quadrupole mass set in positive electron impact mode (+EI) with 70 eV of electron energy. The electron multiplier was set by the auto tune procedure. MS data were collected in a full scan mode over the *m/z* range from 35 to 400. Transfer line temperature was set at 300°C, the first and second quadrupole (Q1, Q2) temperature at 150°C and the ion source temperature at 230 °C. All samples were analyzed in triplicate.

Generation of *P. fluorescens* MFE01 transposon mutants

The donor strain, *E. coli* S17-1 (36), contains a suicide plasmid pAG408 (5,7 Kpb) (37) with a mini-Tn*5* transposon. This plasmid was transferred into *P. fluorescens* MFE01 recipient cells by biparental mating. Bacterial cells were mixed and spotted onto sterile nitrocellulose filters, which were placed on LB agar plates and incubated overnight at 37°C. The mating mixture was suspended in 1 ml of sterile physiological water and 0.1 ml aliquots were spread on LB agar plates supplemented with kanamycin (50 µg/ml), to select for the presence of the integrated plasmid, and rifampicin (25 µg/ml), to kill the *E. coli* S17-1 donor bacteria and to ensure the selection of MFE01. The excision of the suicide plasmid, by a second recombination event, was triggered by plating on LB agar medium supplemented with 10% sucrose.

Determination of the transposon insertion sites by vectorette PCR

Genomic DNA of mutants was extracted using the NucleoSpin® Tissue kit (Macherey Nagel) as recommended by the manufacturer. Samples were then treated with 10 µg/ml RNase A (Sigma) for 30 min at 37°C before being digested for 2 h with the *Stu*I restriction enzyme (Promega). Newly generated DNA fragments were ligated to a DNA vectorette using the following mix (20 µl): 1.5 µl of genomic DNA at 50 ng/µl, 1 µl 10X buffer, 1 µl vectorette, 0.1 µl T4 DNA ligase (3u/µl) and 16.4 µl of water. The ligation reaction was performed overnight at 15°C. The DNA vectorette was built from an equimolar mixture of AV21 and AV22 primers (2 µM each) (see Table 2). The sample was incubated for 5 min at 65°C before addition of 1 mM $MgCl_2$. To detect the Tn*5* transpon, DNA samples were amplified by PCR using primers AV24/Iseq or AV24/Oseq with 5% DMSO in the final mix (see Table 2). Amplification was carried out as follows after a first step of denaturation at 95°C for 2 min: denaturation at 95 °C for 1 min, annealing at 58°C for 1 min and extension at 72 °C for 3 min, for a total of 30 cycles, followed by a final elongation at 72 °C for 10 min. Then, the PCR products were subjected to 1% agarose gel electrophoresis and further purified using a NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel, Bethlehem, PA, USA). DNA sequencing was completed with the ABI Prism BigDye terminator v3.1 sequencing kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) and then analyzed by an automatic DNA sequencer, ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (AppliedBiosystems, Carlsbad, CA, USA).

Disruption of the *trpE* gene in *P. fluorescens* MFE01

A marker-less *trpE* mutant was constructed by overlap PCR mutagenesis as described in Decoin et al 2014 with modifications (38). This *trpE* deletion was achieved by PCR with the Muta1-AnthrSyn-F and Muta2-AnthrSyn-XbaI-R primers (>700 bp product, amplicon A) and the Muta3-AnthrSyn-XbaI-F and Muta4-AnthrSyn-R primers (>750 bp product, amplicon B) (see Table 2). The polymerase used was the Phusion® High-Fidelity DNA polymerase (NEB). The PCR products (amplicon A and B) obtained correspond to the upstream and downstream parts, respectively, of the *trpE* gene of MFE01, each carrying an *XbaI* restriction enzyme site sequence at the end. PCR parameters were as follows: annealing temperature, 55°C, extension time, 1 min; 30 cycles. Then, both amplicons A and B were digested by *XbaI* (NEB, 37°C, 1 h 30 min and inactivated at 65°C) and ligated overnight at 25°C (T4 DNA Ligase, NEB). A third PCR was performed using ligature product purified (GeneJet PCR Purification Kit, ThermoFisher Scientific) allowing the *trpE* deletion (924 pb) after PCR with the Muta1-AnthrSyn-F and Muta4-AnthrSyn-R primers. The PCR parameters were as follows: annealing temperature, 55°C; extension time, 2 min and 35 cycles. This PCR fragment was introduced in the conjugative suicide vector pAKE604 (39). The resulting plasmid, pAKE604Δ*trpE*, was

verified by sequencing and was then transferred into MFE01 by biparental mating as described above. The mutant containing the *trpE* deletion was verified by DNA sequencing (using the Muta1-AnthrSyn-F and Muta4-AnthrSyn-R primers) and named MFE01Δ*trpE*.

RESULTS

Aerial exposure to *P. fluorescens* MFE01 volatiles inhibits the growth of *L. pneumophila*

Pseudomonas fluorescens MFE01 was found to inhibit the growth of *L. pneumophila* Lens using the spot-on-lawn method (Fig. 1A). Interestingly, the strain displayed a full inhibition profile since no *Legionella* colony was detected on the entire Petri-dish. This result suggests that at least one highly diffusible and/or volatile antagonistic molecule is produced by the MFE01 strain. In order to get an in-depth understanding, a two-Petri-dish assay (Fig. 1B-D) adapted from Bernier and coworkers was used (18). *P. fluorescens* MFE01 was physically separated from *L. pneumophila* by a small Petri dish sealed or not with a lid and the volatile activity was qualitatively estimated by the presence/absence of *L. pneumophila* colonies. When *P. fluorescens* MFE01 was cultivated inside the small sealed Petri dish, *L. pneumophila* was able to form colonies as expected (Fig. 1C) whereas an absence of lid during MFE01 development led to an inhibition of *L. pneumophila* visible growth (Fig. 1D). After the removal of the VOCs emitted by MFE01, the growth of *L. pneumophila* was not restored, indicating a bactericidal activity of these compounds (Data not shown). Therefore, the aerial exposure to volatile molecule(s) released at distance by the strain MFE01 is deleterious for *L. pneumophila* Lens.

Volatiles emitted by *P. fluorescens* aerially inhibit the growth of many *Legionella* species

To find out whether volatile molecule(s) produced by the strain *P. fluorescens* MFE01 could affect other bacteria including different species of *Legionella*, an extended spectrum of activity experiment was conducted. The results obtained are given in Table 1.

Almost all the *Legionella* strains tested, including, *L. pneumophila* serogroup 1, *L. pneumophila* non-serogroup 1 and non-*L. pneumophila* strains were sensitive to volatile compound(s) except the serogroup 7 (Table 1). However, some *Legionella* strains, while sensitive, were not totally inhibited in presence of MFE01 but their growth was reduced (Table 1). In contrast, the growth of all the other bacterial strains tested was not inhibited by the presence of *P. fluorescens* MFE01. Taken together, these results highlighted a specific sensitivity of *Legionella* and closely related bacteria to volatile compound(s) produced by the strain *P. fluorescens* MFE01.

Identification of the *P. fluorescens* MFE01 volatilome

To identify the volatiles compounds responsible for the antagonistic activity against *Legionella* sp., we first analyzed the volatilome of the strain MFE01 by SPME / GC-MS (Figure 2). This strain produces 18 volatile organic compounds (VOCs) when grown on LB agar medium including acids, alkanes, alkenes, ketones and one aldehyde (Table 3). The major VOCs produced by the strain MFE01 were methyl cis-2-butenoate, 4-hydroxybutanoic acid, cycloundecene, 1-undecene and 2-undecanone.

Identification of VOCs responsible for the anti-*Legionella* activity

Among the 18 VOCs identified by GC-MS, we then figured out those directly involved in the antagonistic activity against *Legionella* sp. In this way, 200 mutants of MFE01 were generated by transposon mutagenesis and screened using the two-Petri dish assay. This screening led to identify 6 mutants that were unable to aerially inhibit the growth of *L. pneumophila* Lens. The phenotype of these mutants was confirmed using a quantitative inhibition assay using a GFP-expressing *L. pneumophila* (Fig. 3). Unexpectedly, the final fluorescence intensity of aerially exposed *L. pneumophila* that represents the bacterial biomass was variable and dependent on the tested mutant. Indeed, *L. pneumophila* exhibited the same final biomass in presence of 3H5 and 3H8 mutants as in the absence of the MFE01strain. 3H2, 4G2 and 3G4 mutants induced the highest effect on *L. pneumophila* growth with a decrease in GFP fluorescence intensity of 1 log. Finally, the 3A3 mutant has a slightly effect on the growth of *L. pneumophila*. Taken together, these results highlight that *P. fluorescens* mutants were impaired in the capacity to totally inhibit the growth of physically separated *L. pneumophila* but some of them (3H2, 3G4, 3A3 and 4G2) still produced VOCs with activity against *L. pneumophila*.

Using a vectorette PCR method, the insertion site of the mini-transposon Tn*5* was identified for each MFE01 mutant (Table 4). Two couples of mutants harbored the same insertion site, *P. fluorescens* MFE01 3H2/3G4 in a GNAT family acetyltransferase encoding gene and *P. fluorescens* MFE01 3H5/3H8 in the *trpE* gene. In *Pseudomonas* species, the enzyme TrpE is known to transform chorismic acid into anthranilic acid, a precursor of tryptophan (43). However, to date, no information was available in the literature concerning the function of the three other genes in *Pseudomonas*. Therefore, we focused our attention on the 3H5 MFE01 mutant.

The 3H5 mutant is impaired in the production of 1-undecene

VOCs involved in the anti-*Legionella* activity were identified by comparing the volatilome of the wild type strain MFE01 to those of two mutants: the transposon mutant 3H5 and a deletion mutant of *trpE* named MFE01Δ*trpE* by SPME/GC-MS. Before starting the experiment, the capacity of the MFE01Δ*trpE* to aerially inhibit the growth of *L. pneumophila* was assayed. Surprisingly, MFE01Δ*trpE* mutant was still able to inhibit the growth of *L. pneumophila* as the wild type strain. These results indicated that the deletion of the *trpE* gene was not sufficient to abolish the volatile-dependent inhibitory phenotype of the strain MFE01. However, to monitored the VOCs production ability of the two mutants, 3H5 and MFE01Δ*trpE*, their volatilomes were deciphered. Chromatograms obtained for MFE01 and MFE01Δ*trpE* were identical but the intensity of 3 compounds was reduced in the chromatogram of 3H5: 1-undecene, 2-undecanone and 2-tridecanone (Fig. 4). The MFE01Δ*trpE* mutant is still able to exert an aerial inhibition because the *trpE* deletion did not alter its capacity to quantitatively produce the same VOCs as the wild-type strain. However, the 3H5 mutant produced less amounts of 1-undecene, 2-undecanone and 2-tridecanone during its growth. Moreover, each compound was individually found to inhibit at distance the growth of *L. pneumophila* in a millimolar range and the highest effect was shown with 1-undecene (data not shown).

The 3H5 mutant is auxotroph for tryptophan

In order to confirm the role of TrpE in the synthesis of VOCs, we first used an inhibitor of this enzyme, methyl anthranilate (MA) (Fig. 5). When grown on LB agar supplemented with 1 mM MA in presence of MFE01, no growth was detected for *L. pneumophila*. However, in presence of 5- or 10-mM MA, *L. pneumophila* was able to grow and to form biomass similarly when grown in absence of MFE01 (Fig. 5). When adding to the medium, MA was thus able to suppress the long-distance aerial inhibition done by MFE01. To verify if anthranilate is involved in the tryptophan biosynthesis pathway, growth kinetics were conducted in a defined medium supplemented or not with 200 µM tryptophan and 10 µM MA. Results are given in the Figure 6.

In presence of MA, the growth of the wild-type strain MFE01 was inhibited (Fig. 6A). The addition of tryptophan in presence of MA was not sufficient to restore the growth. This result indicated that MA interfered with an essential pathway in MFE01 and that pathway was not involved in the use of tryptophan. Interestingly, the mutant 3H5 was not able to grow in the defined medium unless tryptophan was added indicating that this mutant is auxotroph for

tryptophan (Fig. 6B). When the medium was supplemented in MA, the growth of 3H5 was suppressed similarly to the wild-type strain. Taken together, those results indicated that the insertion of the mini transposon Tn*5* in MFE01 induces an incapacity for the strain to synthetize tryptophan. The TrpE enzyme is thus effectively linked to the biosynthesis of tryptophan. However, another pathway seemed to be perturbed by the use of MA as the addition of tryptophan was not sufficient to restore the grow of *P. fluorescens* MFE01.

DISCUSSION

P. fluorescens MFE01 is an environmental bacterium with an optimal growth temperature of 30°C, able to grow at 37°C and previously studied for its functional type VI secretion system (38, 45, 46). Environmental and clinical *Pseudomonas* strains were recently reported to display antagonistic activity toward *Legionella* sp. (Loiseau *et al.,* 2018; Corre *et al.,* 2018). Those strains produced biosurfactants, (e.g. lipopeptides and rhamnolipids) that are highly active against *Legionella* bacteria in comparison with several other bacteria (Loiseau *et al.,* 2018). In addition, an aerially inhibition was demonstrated *Pseudomonas* isolates from freshwater environments but no volatiles were characterized (Corre *et al.,* 2018). Remarkably, these data highlight that the long-distance inhibition capacity of *Pseudomonas* toward *Legionella* is quite widespread among this genus. In this study, the VOCs emitted by the strain *P. fluorescens* MFE01 grown on agar medium were characterized and the underlying mechanisms of their production were studied in depth.

The *L. pneumophila* colonies did not resume their normal growth after the removal of VOCs of MFE01, which showed that the effect of VOCs was bactericidal. Since it has been demonstrated that VOCs can influence microbial growth, the influence of VOCs produced by soil-associated bacteria on other bacteria was widely studied (30). Many papers have reported a bacteriostatic effect of VOCs (26, 47, 48) but, to date, few have shown a bactericidal effect of VOCs. For example, Xie and coworkers have recently reported the bactericidal effect of decyl alcohol and 3,5,5-trimethylhexanol emitted from *Bacillus* sp. D13 toward *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, the causative agent of bacterial leaf blight (49). Our data suggest that VOCs emitted by *P. fluorescens* MFE01 can inhibit the growth of many *Legionella* species underlying a high sensitivity of this bacterial genus. However, the reason why some isolates like *L. feelei* or *L. pneumophila* Paris are less sensitive or completely tolerant remains unclear. As shown in previous studies, VOCs could induce ultrastructural changes in target cells like alterations in the cell wall and membranes that could lead to changes in cell permeability (29, 49). The cell

envelope of *Legionella* has many particular structural characteristics that could explain, in part, the high sensitivity of this genus to a panel of biomolecules (50, 51). These specificities include a unique structure of the lipopolysaccharide with large proportion of O- and N-acetyl groups, a high level of phosphatidylcholine and branched chain fatty acids. However, how those features could modulate the activity of active molecules is still unclear (52, 53). The growth of all non-*Legionellaceae* bacteria tested in this study was no affected by the VOCs of MFE01 in our conditions reinforcing the hypothesis of the key role played by components of the *Legionella* cell envelope.

All of the active VOCs that have been reported so far in the literature can be grouped into 9 chemical families: alcohols, aldehydes, alkenes, alkanes, alkynes, esters, ketones, terpenoids and sulfur-containing compounds (49). The volatilome of the strain MFE01 was deciphered and the 18 compounds that have been identified belong to these families. The major VOC emitted by MFE01 was found to be 1-undecene. This compound was previously identified in the volatilome of many *Pseudomonas* species (54–60). Some authors have proposed to use this VOC in combination with five others as biomarkers for clinical investigation on *P. aeruginosa* (57). 1-undecene has also been previously reported to exert antifungal activity (61), stimulation of plant growth (56), killing of *Caenorhabditis elegans* (62) but never as an antibacterial compound. In our study, 1-undecene, together with 2-undecanone and 2-tridecanone, were mainly responsible for the anti-*Legionella* activity of MFE01. However, the active concentrations remained to be determined as we actually failed to mimic the continuous exposition of *L. pneumophila* to those VOCs.

During this study, four different transposon mutants were selected for their incapacity to inhibit the growth of *L. pneumophila* as the wild-type strain. Among them, the 3H5 mutant was promising because of the total loss of the at-distance inhibiting phenotype. The interrupted gene is *trpE* which encodes an enzyme responsible for the production of anthranilate, a precursor in the biosynthesis pathway of tryptophan (43). MA has been shown to inhibit the anthranilate synthase in *E. coli* by being converted into 7-methyltryptophan (63). In our conditions, the MA totally represses the capacity of MFE01 to inhibit the growth of *L. pneumophila* at distance underlying the key role played by anthranilate in this phenotype. However, the addition of tryptophan in presence of MA is not sufficient to counterbalance the effect of MA indicating that another pathway is probably involved. To go further, a deletion mutant was constructed but surprisingly, it was still capable of inhibiting the growth of *L. pneumophila*. Indeed, this deletion did not changed the number of VOCs emitted and weakly

affected their amount. These data reinforce the idea that another pathway is implicated as this strain possesses only one *trpE* copy and that MA is not a specific inhibitor of the anthranilate synthase. Furthermore, the insertion of the mini-transposon Tn*5* has probably deregulated the expression of others genes like *trpGCD* that have led to a diminution of the amount of the inhibiting VOCs that were emitted. This genetical regulation together with the characterization of the tryptophan operon which is not characterize in *P. fluorescens* (64) have to be studied in depth to unravel the complete mechanism of VOCs production in MFE01.

Conflict of Interest Statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Funding

This work received financial support from the French National Research Program for Environmental and Occupational Health of ANSES, grant EST-2015/1/111.

References

1. Beauté J. 2017. Legionnaires' disease in Europe, 2011 to 2015. Euro Surveill 22:pii=30566.

2. Hamilton KA, Prussin AJ, Ahmed W, Haas CN. 2018. Outbreaks of Legionnaires' Disease and Pontiac Fever 2006–2017. Curr Environ Heal Reports 5:263–271.

3. Yu VL, Plouffe JF, Pastoris MC, Stout JE, Schousboe M, Widmer A, Summersgill J, File T, Heath CM, Paterson DL, Chereshsky 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.

4. Newton HJ, Ang DKY, Van Driel IR, Hartland EL. 2010. Molecular pathogenesis of infections caused by *Legionella pneumophila*. Clin Microbiol Rev 23:274–298.

5. Abu Khweek A, Amer AO. 2018. Factors Mediating Environmental Biofilm Formation by *Legionella pneumophila*. Front Cell Infect Microbiol 8:1–10.

6. Oliva G, Sahr T, Buchrieser C. 2018. The Life Cycle of *L. pneumophila*: Cellular Differentiation Is Linked to Virulence and Metabolism. Front Cell Infect Microbiol 8:1–12.

7. 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.

8. Hilbi H, Jarraud S, Hartland E, Buchrieser C. 2010. Update on Legionnaires' disease: Pathogenesis, epidemiology, detection and control: MicroMeeting. Mol Microbiol 76:1–11.

9. Falkinham JO, Hilborn ED, Arduino MJ, Pruden A, Edwards MA. 2015. Epidemiology and ecology of opportunistic premise plumbing pathogens: *Legionella pneumophila*, Mycobacterium avium, and Pseudomonas aeruginosa. Environ Health Perspect 123:749–758.

10. Ashbolt N. 2015. Environmental (Saprozoic) Pathogens of Engineered Water Systems: Understanding Their Ecology for Risk Assessment and Management. Pathogens 4:390–405.

11. Abdel-Nour M, Duncan C, Low DE, Guyard C. 2013. Biofilms: The stronghold of *Legionella pneumophila*. Int J Mol Sci 14:21660–21675.

12. 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.

13. Guerrieri E, Bondi M, Sabia C, De Niederhäusern S, Borella P, Messi P. 2008. Effect of bacterial interference on biofilm development by *Legionella pneumophila*. Curr Microbiol 57:532–536.

14. Schulz S, Dickschat JS. 2007. Bacterial volatiles: The smell of small organisms. Nat Prod Rep 24:814–842.

15. Schulz-Bohm K, Martín-Sánchez L, Garbeva P. 2017. Microbial volatiles: Small molecules with an important role in intra- and inter-kingdom interactions. Front Microbiol 8:1–10.

16. Audrain B, Farag MA, Ryu CM, Ghigo JM. 2015. Role of bacterial volatile compounds in bacterial biology. FEMS Microbiol Rev 39:222–233.

17. Létoffé S, Audrain B, Bernier SP, Delepierre M, Ghigo JM. 2014. Aerial exposure to the bacterial volatile compound trimethylamine modifies antibiotic resistance of physically separated bacteria by raising culture medium pH. MBio 5:1–12.

18. Bernier SP, Létoffé S, Delepierre M, Ghigo JM. 2011. Biogenic ammonia modifies antibiotic resistance at a distance in physically separated bacteria. Mol Microbiol 81:705–716.

19. Kim KS, Lee S, Ryu CM. 2013. Interspecific bacterial sensing through airborne signals modulates locomotion and drug resistance. Nat Commun 4:1809–1812.

20. Jones SE, Ho L, Rees CA, Hill JE, Nodwell JR, Elliot MA. 2017. *Streptomyces* exploration is triggered by

fungal interactions and volatile signals. Elife 6:e211738.

21. Barraud N, Kelso M, Rice S, Kjelleberg S. 2014. Nitric Oxide: A Key Mediator of Biofilm Dispersal with Applications in Infectious Diseases. Curr Pharm Des 21:31–42.

22. Kim J, Park W. 2015. Indole: a signaling molecule or a mere metabolic byproduct that alters bacterial physiology at a high concentration? J Microbiol 53:421–428.

23. Marvasi M, Chen C, Carrazana M, Durie IA, Teplitski M. 2014. Systematic analysis of the ability of Nitric Oxide donors to dislodge biofilms formed by *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7. AMB Express 4:1–11.

24. Kesarwani M, Hazan R, He J, Que YA, Apidianakis Y, Lesic B, Xiao G, Dekimpe V, Milot S, Deziel E, Lépine F, Rahme LG. 2011. A quorum sensing regulated small volatile molecule reduces acute virulence and promotes chronic infection phenotypes. PLoS Pathog 7.

25. Venkataraman A, Rosenbaum MA, Werner JJ, Winans SC, Angenent LT. 2014. Metabolite transfer with the fermentation product 2,3-butanediol enhances virulence by *Pseudomonas aeruginosa*. ISME J 8:1210–1220.

26. Raza W, Wang J, Wu Y, Ling N, Wei Z, Huang Q, Shen Q. 2016. Effects of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens* on the growth and virulence traits of tomato bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. Appl Microbiol Biotechnol 100:7639–7650.

27. Kim SK, Park HY, Lee JH. 2015. Anthranilate deteriorates the structure of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms and antagonizes the biofilm-enhancing indole effect. Appl Environ Microbiol 81:2328–2338.

28. Ossowicki A, Jafra S, Garbeva P. 2017. The antimicrobial volatile power of the rhizospheric isolate *Pseudomonas donghuensis* P482. PLoS One 12:1–13.

29. Tahir HAS, Gu Q, Wu H, Niu Y, Huo R, Gao X. 2017. Bacillus volatiles adversely affect the physiology and ultra-structure of *Ralstonia solanacearum* and induce systemic resistance in tobacco against bacterial wilt. Sci Rep 7:1–15.

30. Kai M, Haustein M, Molina F, Petri A, Scholz B, Piechulla B. 2009. Bacterial volatiles and their action potential. Appl Microbiol Biotechnol 81:1001–1012.

31. Schmidt R, Cordovez V, De Boer W, Raaijmakers J, Garbeva P. 2015. Volatile affairs in microbial interactions. ISME J 9:2329–2335.

32. Palmer CJ, Tsai Y-L, Paszko-Kolva C, Mayer C, Sangermano LR. 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.

33. Cazalet C, Jarraud S, Ghavi-Helm Y, Kunst F, Glaser P, Etienne J, Buchrieser C. 2008. Multigenome analysis identifies a worldwide distributed epidemic *Legionella pneumophila* clone that emerged within a highly diverse species. Genome Res 18:431–441.

34. Loiseau C, Schlusselhuber M, Bigot R, Bertaux J, Berjeaud J-M, Verdon J. 2015. Surfactin from *Bacillus subtilis* displays an unexpected anti-*Legionella* activity. Appl Microbiol Biotechnol 99.

35. Bigot R, Bertaux J, Frere J, Berjeaud J. 2013. Intra-Amoeba Multiplication Induces Chemotaxis and Biofilm Colonization and Formation for *Legionella*. PLoS One 8:1–10.

36. Simon R, Priefer U, Pühler A. 1983. A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. Nat Biotechnol 784–791.

37. Suarez A, Güttler A, Strätz M, Staendner LH, Timmis KN, Guzmán CA. 1997. Green fluorescent protein-based reporter systems for genetic analysis of bacteria including monocopy applications. Gene 196:69–74.

38. Decoin V, Barbey C, Bergeau D, Latour X, Feuilloley MGJ, Orange N, Merieau A. 2014. A type VI secretion system is involved in *Pseudomonas fluorescens* bacterial competition. PLoS One 9:e89411.

39. El-Sayed AK, Hothersall J, Thomas CM. 2001. Quorum-sensing-dependent regulation of biosynthesis of the polyketide antiobiotic mupirocin in *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 10586. Microbiology 147:2127–2139.

40. Verdon J, Coutos-Thevenot P, Rodier MH, Landon C, Depayras S, Noel C, La Camera S, Moumen B, Greve P, Bouchon D, Berjeaud JM, Braquart-Varnier C. 2016. Armadillidin H, a glycine-rich peptide from the terrestrial crustacean *Armadillidium vulgare*, displays an unexpected wide antimicrobial spectrum with membranolytic activity. Front Microbiol 7:1484.

41. Loiseau C, Schlusselhuber M, Bigot R, Bertaux J, Berjeaud JM, Verdon J. 2015. Surfactin from *Bacillus subtilis* displays an unexpected anti-*Legionella* activity. Appl Microbiol Biotechnol 99:5083–5093.

42. Delafont V, Samba-Louaka A, Cambau E, Bouchon D, Moulin L, Héchard Y. 2017. *Mycobacterium llatzerense*, a waterborne Mycobacterium, that resists phagocytosis by *Acanthamoeba castellanii*. Sci Rep

7:46270.

43. Heeb S, Fletcher MP, Chhabra SR, Diggle SP, Williams P, Cámara M. 2011. Quinolones: From antibiotics to autoinducers. FEMS Microbiol Rev 35:247–274.

44. Tatusov RL, Galperin MY, Natale DA, Koonin E V. 2000. The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. Nucleic Acids Res 28:33–36.

45. Decoin V, Gallique M, Barbey C, Le Mauff F, Poc CD, Feuilloley MGJ, Orange N, Merieau A. 2015. A *Pseudomonas fluorescens* type 6 secretion system is related to mucoidy, motility and bacterial competition Microbe-host interactions and microbial pathogenicity. BMC Microbiol 15:72.

46. Gallique M, Decoin V, Barbey C, Rosay T, Feuilloley MGJ, Orange N, Merieau A. 2017. Contribution of the *Pseudomonas fluorescens* MFE01 type VI secretion system to biofilm formation. PLoS One 12:e0170770.

47. Dandurishvili N, Toklikishvili N, Ovadis M, Eliashvili P, Giorgobiani N, Keshelava R, Tediashvili M, Vainstein A, Khmel I, Szegedi E, Chernin L. 2011. Broad-range antagonistic rhizobacteria *Pseudomonas fluorescens* and *Serratia plymuthica* suppress Agrobacterium crown gall tumours on tomato plants. J Appl Microbiol 110:341–352.

48. Rajer FU, Wu H, Xie Y, Xie S, Raza W, Tahir HAS, Gao X. 2017. Volatile organic compounds produced by a soil-isolate, *Bacillus subtilis* FA26 induce adverse ultra-structural changes to the cells of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, the causal agent of bacterial ring rot of potato. Microbiology 163:523–530.

49. Xie S, Zang H, Jun Wu H, Uddin Rajer F, Gao X. 2018. Antibacterial effects of volatiles produced by *Bacillus* strain D13 against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Mol Plant Pathol 19:49–58.

50. Berjeaud J-M, Chevalier S, Schlusselhuber M, Portier E, Loiseau C, Aucher W, Lesouhaitier O, Verdon J. 2016. *Legionella pneumophila*: The paradox of a highly sensitive opportunistic waterborne pathogen able to persist in the environment. Front Microbiol 7.

51. Shevchuk O, Jäger J, Steinert M. 2011. Virulence properties of the *Legionella pneumophila* cell envelope. Front Microbiol 2:Article 74.

52. Verdon J, Labanowski J, Sahr T, Ferreira T, Lacombe C, Buchrieser C, Berjeaud J-M, Héchard Y. 2011. Fatty acid composition modulates sensitivity of *Legionella pneumophila* to warnericin RK, an antimicrobial peptide. Biochim Biophys Acta - Biomembr 1808:1146–1153.

53. Geiger O, López-Lara IM, Sohlenkamp C. 2013. Phosphatidylcholine biosynthesis and function in bacteria. Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids 1831:503–513.

54. Fernando WGD, Ramarathnam R, Krishnamoorthy AS, Savchuk SC. 2005. Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. Soil Biol Biochem 37:955–964.

55. Zhai Y, Shao Z, Cai M, Zheng L, Li G, Huang D, Cheng W, Thomashow LS, Weller DM, Yu Z, Zhang J. 2018. Multiple modes of nematode control by volatiles of *Pseudomonas putida* 1A00316 from Antarctic soil against *Meloidogyne incognita*. Front Microbiol 9:Article 253.

56. Lo Cantore P, Giorgio A, Iacobellis NS. 2015. Bioactivity of volatile organic compounds produced by *Pseudomonas tolaasii*. Front Microbiol 6:Article 1082.

57. Bos LDJ, Sterk PJ, Schultz MJ. 2013. Volatile Metabolites of Pathogens: A Systematic Review. PLoS Pathog 9:e1003311.

58. Cheng X, Cordovez V, Etalo DW, van der Voort M, Raaijmakers JM. 2016. Role of the GacS Sensor Kinase in the Regulation of Volatile Production by Plant Growth-Promoting *Pseudomonas fluorescens* SBW25. Front Plant Sci 7:Article 1706.

59. Stanborough T, Fegan N, Powell SM, Singh T, Tamplin M, Chandry PS. 2018. Genomic and metabolic characterization of spoilage-associated *Pseudomonas* species. Int J Food Microbiol 268:61–72.

60. Lawal O, Knobel H, Weda H, Nijsen TME, Goodacre R, Fowler SJ, Ahmed WM, Artigas A, Bannard-Smith J, Bos LDJ, Camprubi M, Coelho L, Dark P, Davie A, Diaz E, Goma G, Felton T, Fowler SJ, Leopold JH, van Oort PMP, Povoa P, Portsmouth C, Rattray NJW, Rijnders G, Schultz MJ, Steenwelle R, Sterk PJ, Valles J, Verhoeckx F, Vink A, White IR, Winters T, Zakharkina T. 2018. TD/GC–MS analysis of volatile markers emitted from mono- and co-cultures of *Enterobacter cloacae* and *Pseudomonas aeruginosa* in artificial sputum. Metabolomics 14:66.

61. Hunziker L, Bönisch D, Groenhagen U, Bailly A, Schulz S, Weisskopf L. 2015. *Pseudomonas* strains naturally associated with potato plants produce volatiles with high potential for inhibition of *Phytophthora infestans*. Appl Environ Microbiol 81:821–830.

62. Popova AA, Koksharova OA, Lipasova VA, Zaitseva J V., Katkova-Zhukotskaya OA, Eremina SI, Mironov

AS, Chernin LS, Khmel IA. 2014. Inhibitory and toxic effects of volatiles emitted by strains of *Pseudomonas* and *Serratia* on growth and survival of selected microorganisms, *Caenorhabditis elegans*, and *Drosophila melanogaster*. Biomed Res Int 2014.

63. Held WA, Smith OH. 1970. Mechanism of 3-methylanthranilic acid derepression of the tryptophan operon in *Escherichia coli*. J Bacteriol 101:209–217.

TABLE 1 Antibacterial spectrum of volatile compound(s) produced by *P. fluorescens* MFE01

Target strain	Visible Growth	Source/Reference
L. pneumophila Lens (Sg 1) CIP 108286	-	CIP
L. pneumophila Lorraine (Sg 1) CIP 108729	-	CIP
L. pneumophila Paris (Sg 1) CIP 107629T	Δ*	CIP
L. pneumophila (Sg 2) ATCC 33154	-	ATCC
L. pneumophila Bloomington-2 (Sg 3) ATCC 33155	-	ATCC
L. pneumophila Los Angeles-1 (Sg 4) ATCC 33156	-	ATCC
L. pneumophila Dallas 1E (Sg 5) ATCC 33216	Δ	ATCC
L. pneumophila Chicago 2 (Sg 6) ATCC 33215	-	ATCC
L. pneumophila Chicago 8 (Sg 7) ATCC 33823	+	ATCC
L. pneumophila Concord 3 (Sg 8) ATCC 35096	-	ATCC
L. pneumophila IN-23-G1-C2 (Sg 9) ATCC 35289	Δ	ATCC
L. pneumophila Leiden 1 (Sg 10) ATCC 43283	-	ATCC
L. pneumophila 797-PA-H (Sg 11) ATCC 43130	-	ATCC
L. pneumophila 570-CO-H (Sg 12) ATCC 43290	-	ATCC
L. pneumophila 82A3105 (Sg 13) ATCC 43736	Δ	ATCC
L. pneumophila 1169-MN-H (Sg 14) ATCC 43703	-	ATCC
L. pneumophila Lansing 3 (Sg 15) ATCC 35251	-	ATCC
L. dumofii NY 23 ATCC 33279	Δ	ATCC
L. feeleii WO-44C ATCC 35072	+	ATCC
L. longbeachae Tucker 1 ATCC 33484	-	ATCC
L. micdadei TATLOCK ATCC 33218	-	ATCC
L. oakridgensis Oak Ridge 10 ATCC 33761	-	ATCC
Bacillus megaterium F04	+	(40)
Bacillus subtilis AM1 LMG 28342	+	LMG
Enterobacter cloacae D03	+	(40)
Enterococcus faecalis V583	+	(41)
Escherichia coli LMG 2092	+	LMG
L. bozemanae WIGA ATCC 33217	-	ATCC
Klebsiella pneumoniae 0502083	+	(40)
Listeria ivanovii Li4pVS2	+	(41)
Micrococcus luteus ATCC 4698	+	ATCC
Mycobacterium llatzerense EDP_4	+	(42)
Proteus mirabilis LRA 08 01 73 ATCC 35659	+	ATCC
Salmonella enterica J18	+	(40)
Staphylococcus aureus Wichita ATCC 29213	+	ATCC
Staphylococcus warneri RK	+	(40)

Δ: Visible growth detected but with less bacterial mass compared with the growth control

Bacterial strains were obtained from various culture collections: ATCC (American Type Culture Collection), CIP (Collection Institut Pasteur, France) and LMG (Library of 693 Microbiology Universiteit Gent, Belgium). Other strains were from the laboratory culture collection. Sg: Serogroup

TABLE 2 Oligonucleotides used in this study

Primer name	***Primer sequence (5'-3')***
Muta1-AnthrSyn-F	ATCCAGGGCAAGTACAAC
Muta2-AnthrSyn-XbaI-R	TAATAATCTAGAATGGAAATCATCGACGAACT
Muta3-AnthrSyn-XbaI-F	TAATAATCTAGAGAAGGTTTCAACGAAGGC
Muta4-AnthrSyn-R	GCTACTTCAAGTGGATCATC
AnthrSyn-SacI-F	TAATAAGAGCTCTATGAATCGCGAAGAATTCC
AnthrSyn-XbaI-R	TAATAATCTAGAGAAATTGCGTGGATCAGG
Seq-pPSV35-F	TTTACACTTTATGCTTCCGG
Seq-pPSV35-R	AAGGCGATTAAGTTGGGTAA
AV21	GACTCTCCCTTCTCGAATCGTAACCGTTCGTACGAGAATCGCTGTCCTCTCCTTC
AV22	GAAGGAGAGGACGCTGTCTGTCGAAGGTAAGGAACGGACGAGAGAAGGGAGAG
AV24	CGAATCGTAACCGTTCGTACGAGAATCGCT
Iseq	TACGTGCAAGCAGATTACGG
Oseq	TTGTGCCCATTAACATCACC

TABLE 3 Volatiles organic compounds identified from the volatilome of *P. fluorescens* MFE01 by headspace SPME/GC-MS

No.	Retention time (min)	VOC	Pic area (AU)
1	**5.086**	Methyl cis-2-butenoate	2.36×10^7
2	**11.239**	1-Nonene	4.70×10^6
3	**11.979**	4-Hydroxybutanoic acid	2.46×10^7
4	**14.749**	Cyclodecene	3.26×10^6
5	**17.904**	Cycloundecene	2.49×10^7
6	**18.061**	1-Undecene	2.28×10^9
7	**18.482**	5-Undecene	5.69×10^6
8	**18.758**	2-Undecene	3.56×10^6
9	**21.098**	1-Dodecene	3.19×10^6
10	**21.35**	Dodecane	2.99×10^6
11	**21.519**	Decanal	1.03×10^6
12	**23.538**	Cyclotridecene	8.48×10^6
13	**23.943**	Undecanal	2.75×10^6
14	**23.986**	2-Undecanone	2.05×10^7
15	**26.807**	Tetradecane	2.58×10^6
16	**29.577**	2-Tridecanone	7.19×10^6
17	**32.763**	Hexadecane	1.23×10^6
18	**35.683**	Heptadecane	4.40×10^6

TABLE 4 List of the *P. fluorescens* MFE01 mutants obtained in this study

***P. fluorescens* MFE01 mutant lacking volatile activity**	**Interrupted gene**	**COG Protein function***
P. fluorescens MFE01 3H2/3G4	Similar to *PSPTO_5507*	GNAT family acetyltransferase
P. fluorescens MFE01 3A3	*hlyD*	HlyD family type I secretion periplasmic adaptor subunit
P. fluorescens MFE01 4G2	*yqiB*	Uncharacterized protein yqiB
P. fluorescens MFE01 3H5/3H8	*trpE*	Anthranilate synthase component 1

*The database of Clusters of Orthologous Groups of proteins (COG) (44)

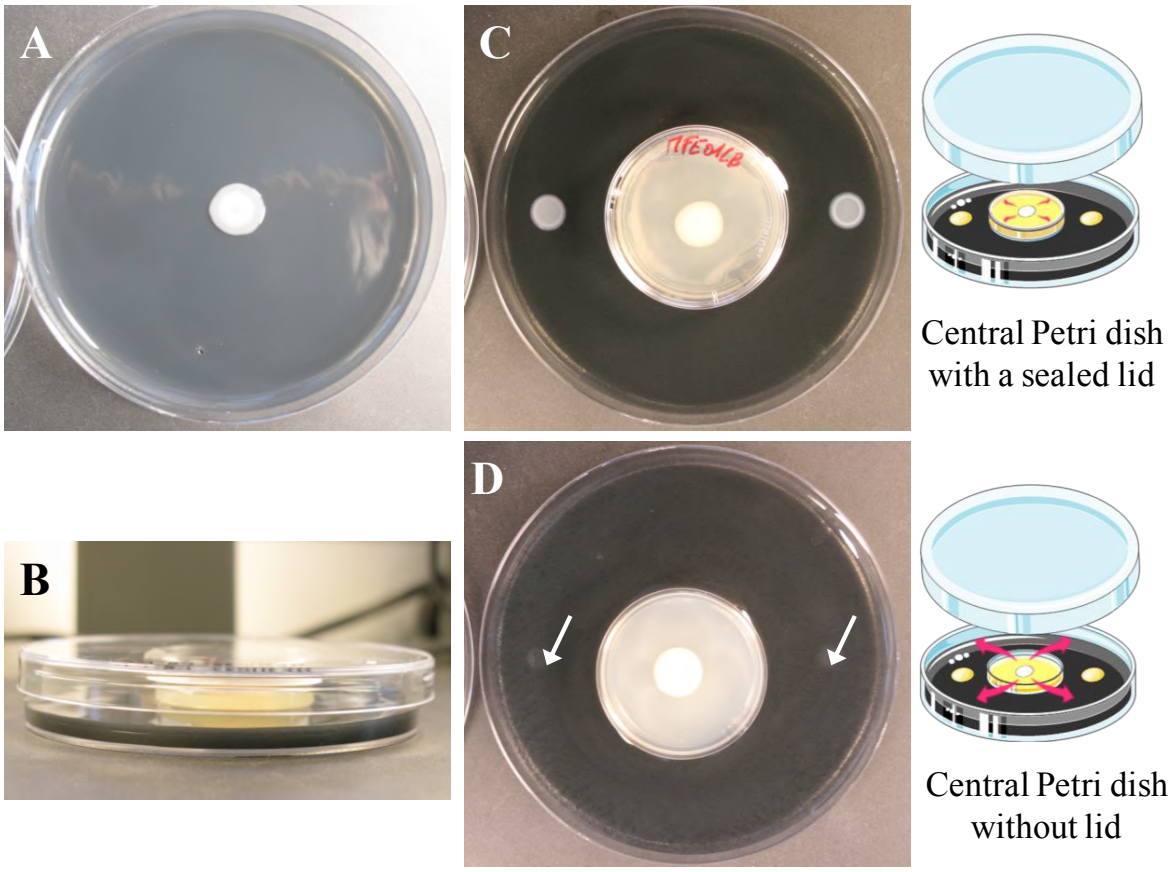


FIG 1 Antagonistic activity of *Pseudomonas fluorescens* MFE01 towards *L. pneumophila* Lens. (A) Spot on lawn assay with *Pseudomonas fluorescens* MFE01 (central colony). (B) Side view of the experimental two-Petri-dish assay. (C) *P. fluorescens* MFE01 grown in a central small Petri-dish with a lid sealed with parafilm. (D) *P. fluorescens* MFE01 grown in a central small Petri-dish without lid. Growth of *L. pneumophila* Lens was monitored at 28°C after 96 h of incubation. Arrows show an absence of *L. pneumophila* colonies, indicative of a volatile-dependent inhibitory phenotype.

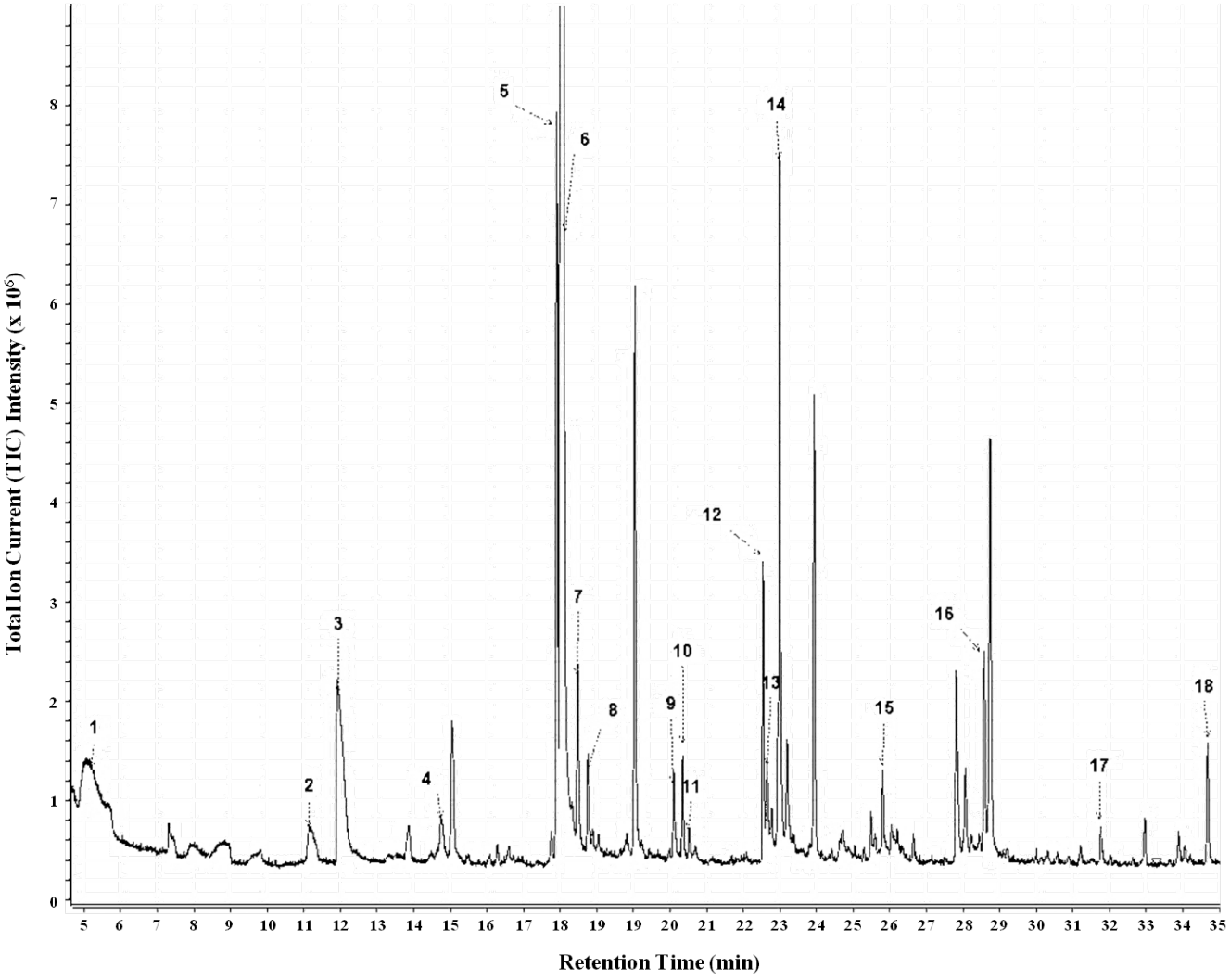


FIG 2 Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) total ion chromatogram (TIC) of volatile organic compounds emitted by *P. fluorescens* MFE01 grown on LB agar

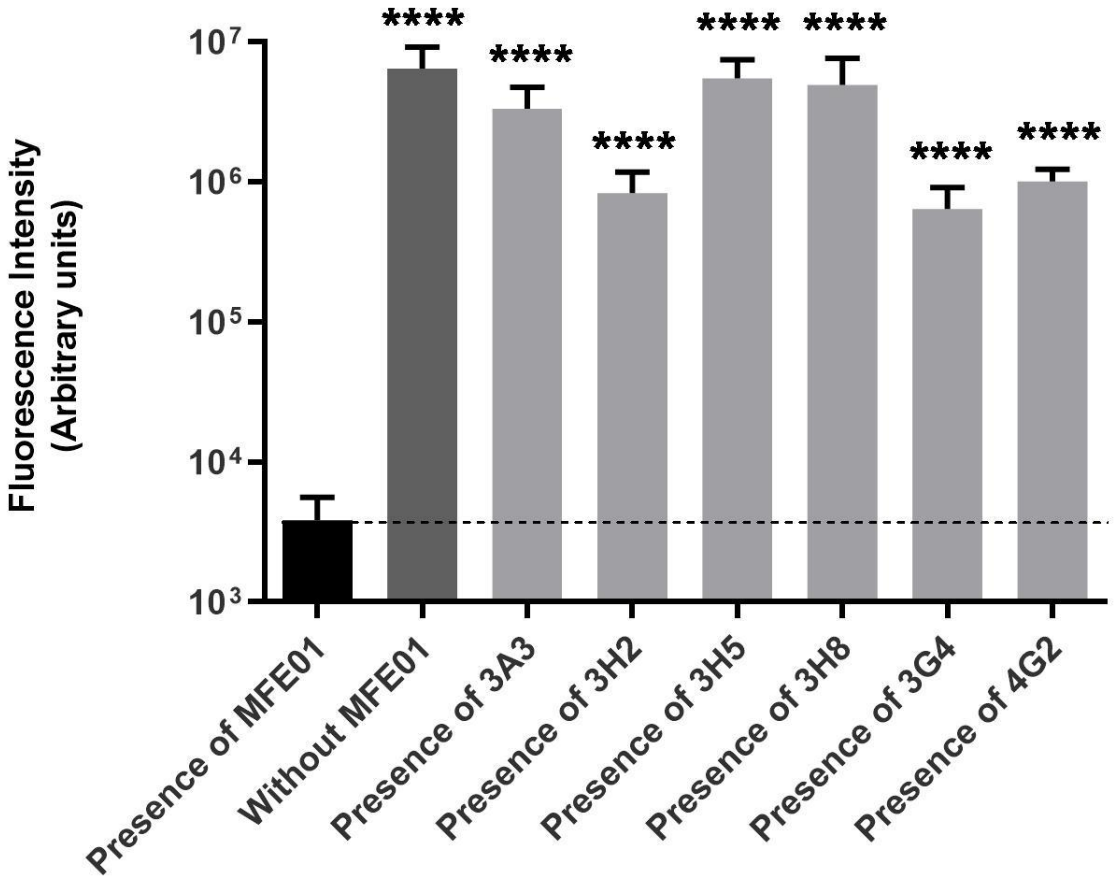


FIG 3 Long distance inhibition of GFP-expressing *L. pneumophila* through the production of volatile compound(s) produced by *P. fluorescens* MFE01 transposition mutants. *L. pneumophila* was spread on both upper sides of the 6 wells plate. Each isolate was spread on the center of a 6-well plate. Fluorescence was quantified using a GFP-expressing *L. pneumophila* Lens in presence and absence of mutants of MFE01 (n=3). The dash line represents the fluorescence intensity quantified for the positive control. **** $p < 0.0001$; *** $p < 0.001$; Student test.

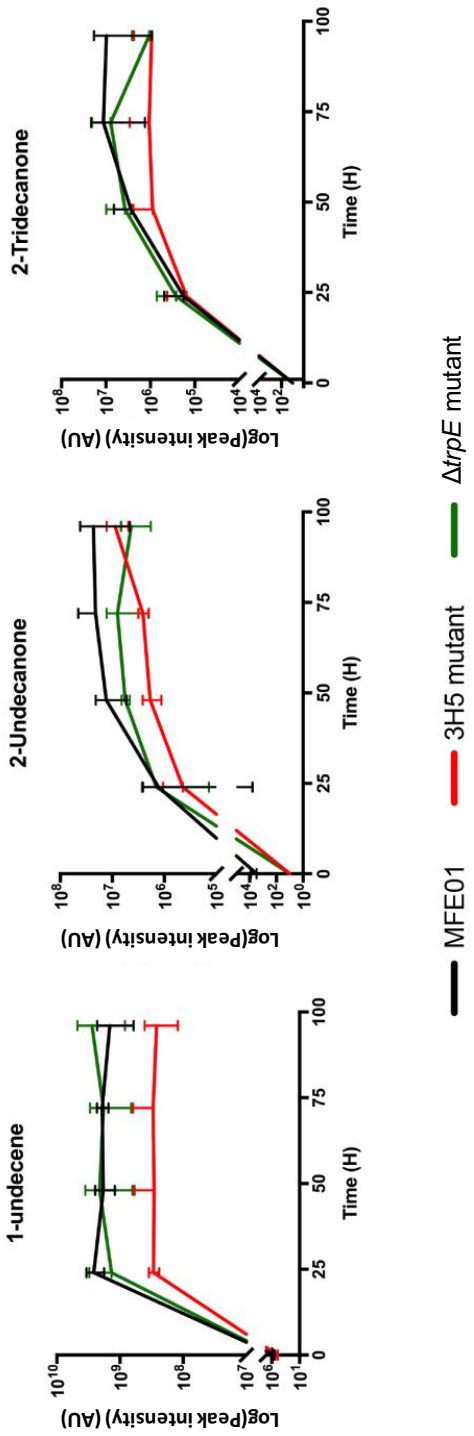


FIG 4 SPME/GC-MS kinetics of 1-undecene, 2-undecanone and 2-tridecanone production by *P. fluorescens* MFE01 and mutants. Each strain was cultured in LB medium for 24 h and a suspension diluted at OD_{600} = 1 was deposited on a sterile vial filled with LB agar. Vials were then incubated at 28°C and analyzed at different time points by SPME/GC-MS (n=3).

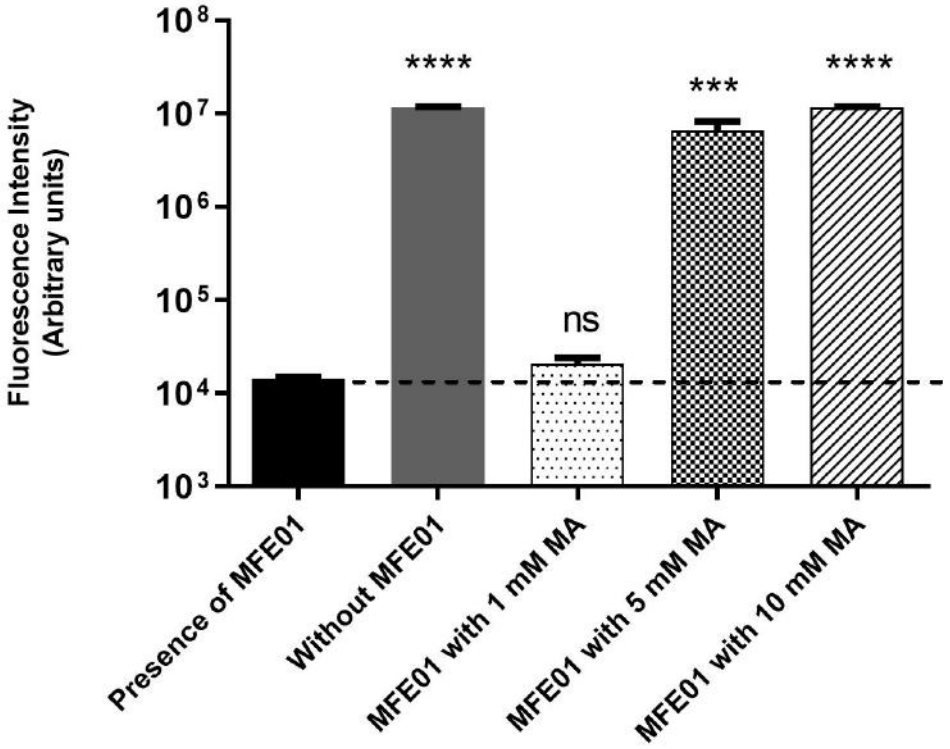


FIG 5 Long distance inhibition of GFP-expressing *L. pneumophila* through the production of volatile compound(s) produced by *P. fluorescens* MFE01 in presence of methyl anthranilate (MA). *L. pneumophila* was spread on both upper sides of the 6 wells plate. Each isolate was spread on the center of a 6-well plate. Fluorescence was quantified using a GFP-expressing *L. pneumophila* Lens in presence and absence of MA (n=3). The dash line represents the fluorescence intensity quantified for the positive control. **** $p < 0.0001$; *** $p < 0.001$; Student test.

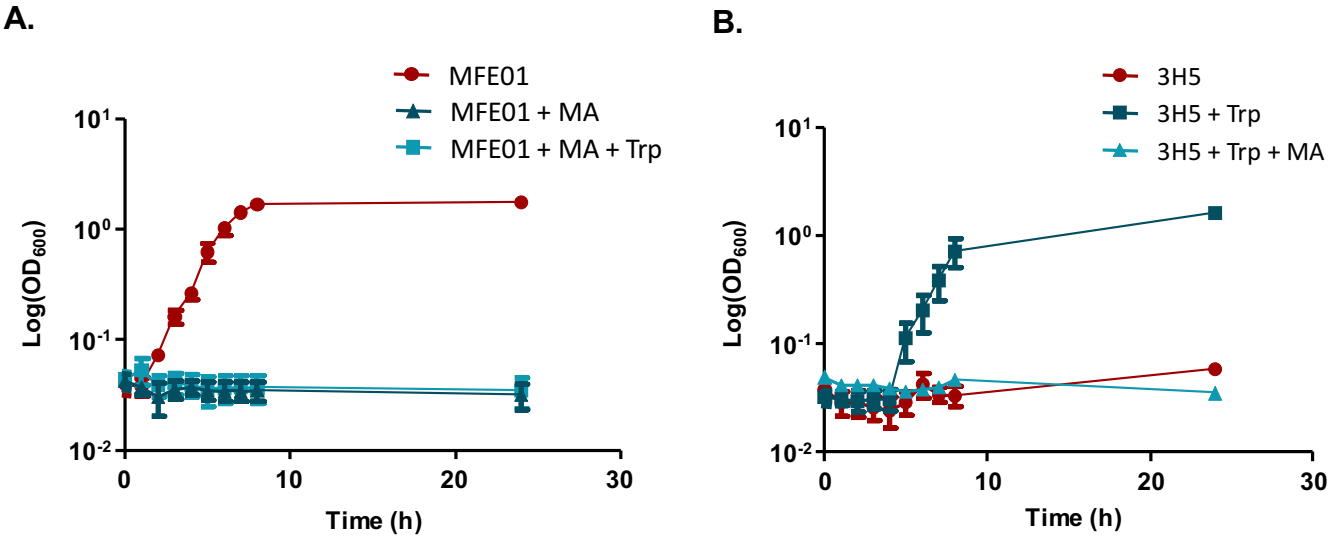


FIG 6 Growth curves of *P. fluorescens* MFE01 and its mutant 3H5 in a defined medium. When used, 10 µM MA were added to the medium at T = 0. When needed, 200 µM tryptophan were added to the medium at T = 3 h. A. Growth of *P. fluorescens* MFE01; B. Growth of 3H5. Three experiments were carried out in triplicate and the results are expressed as means. Bar scales indicate standard deviation.

2.3.2. Résultats complémentaires

Une souche de *Pseudomonas* sp. (PW 329) provenant de la collection environnementale a également été étudiée pour sa capacité à produire des COVs. Afin de confirmer son phénotype d'inhibition, un test en plaque 6 puits a été utilisé pour quantifier la croissance de *L. pneumophila* Lens GFP en présence de cette souche (**Figure 27**).

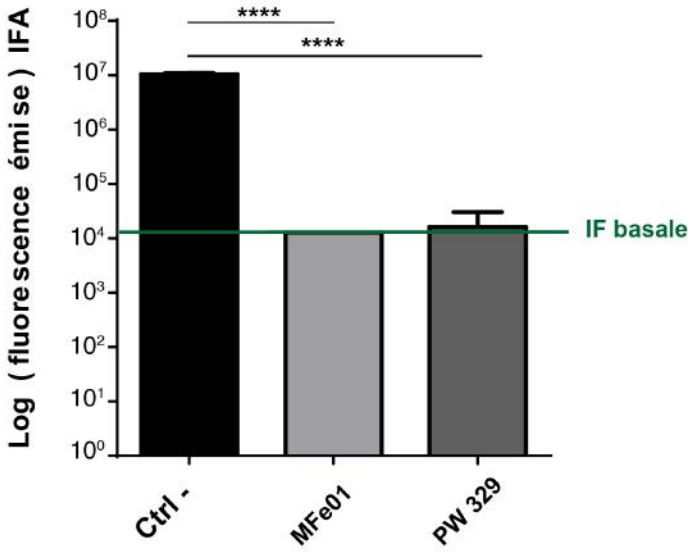


Figure 27. Quantification par fluorescence de la croissance de *L. pneumophila* Lens en présence de la souche *Pseudomonas* sp. PW 329. La souche MFE01 a été utilisée comme témoin positif d'expérience. (n = 3; Pvalue < 0,0001)

Les résultats obtenus montrent en présence de *Pseudomonas* sp. PW 329 une diminution significative de la fluorescence émise par la souche Lens GFP (10^4 IFA), en comparaison avec la condition non exposée (10^7 IFA).

Afin d'identifier les COVs émis par cette souche, le profil de production de ces molécules a été déterminé par GC-MS. Le chromatogramme obtenu est présenté en **Figure 28**.

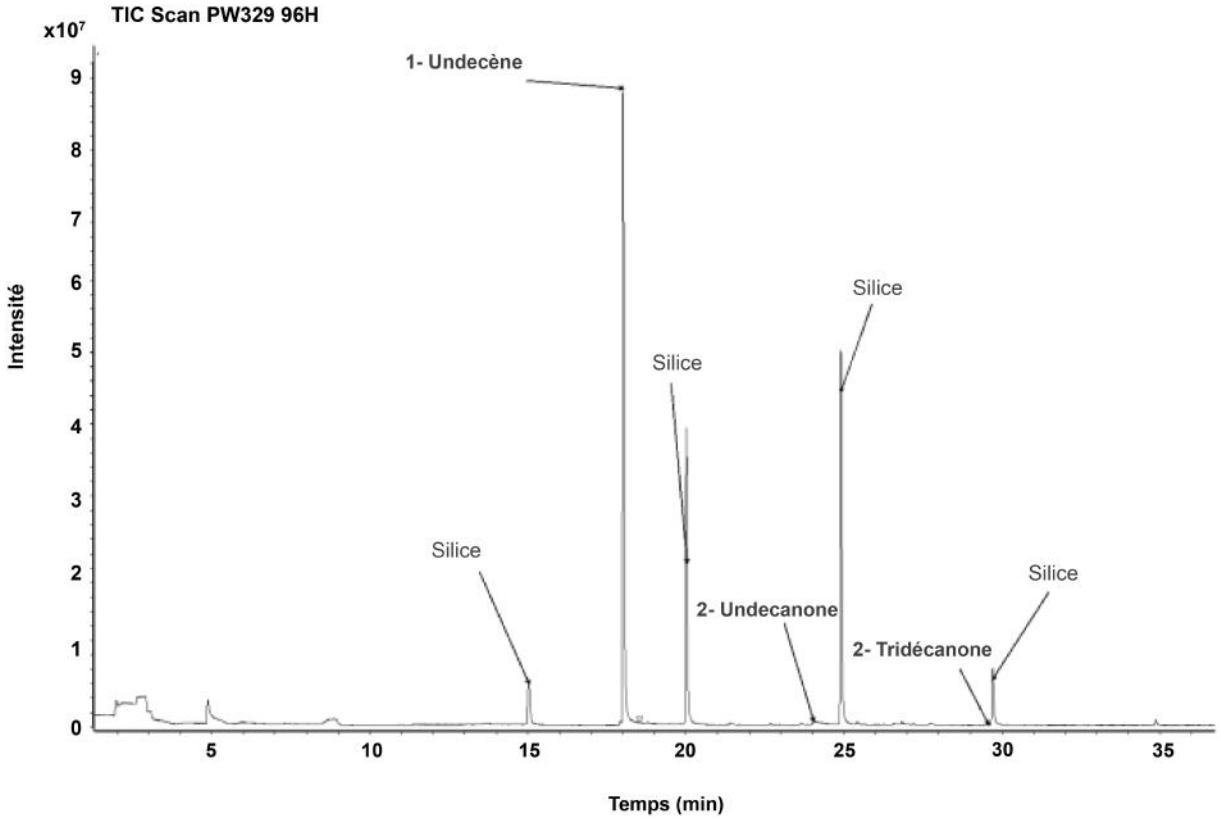


Figure 28. Profil de production des COVs émis par la souche *Pseudomonas* sp. PW329. Le chromatogramme présenté a été obtenu après 96H de culture de la souche PW329 à 28°C en milieu LBmod. Les composés ont été identifiés à l'aide de la base de données NIST 08 et ces identifications ont été confirmées par passage de composés standards.

L'analyse du chromatogramme obtenu a permis d'identifier la présence majoritaire de 1-undecène (9.10^7 ua) après 18 minutes d'analyse. Deux autres composés ont également été identifiés après 24 et 29 minutes et correspondent au 2-undécanone (2.10^6 ua) et au 2-Tridécanone (2.10^5 ua), respectivement.

Chapitre 3. Le genre *Aeromonas* comme producteur de peptides anti-*Legionella*

3.1. Diversité des isolats d'*Aeromonas* issus de communautés d'eaux douces

Dans ce travail, 19 isolats appartenant au genre *Aeromonas* ont été isolés à partir des sous-collections PW (piscine), PoW (étang), WW (puits) et RW (rivière). Ces isolats présentent tous la capacité d'inhiber *Legionella* par test d'antagonisme et montrent des halos d'inhibitions compris entre 1,8 et 2,2 cm (**Figure 29**).

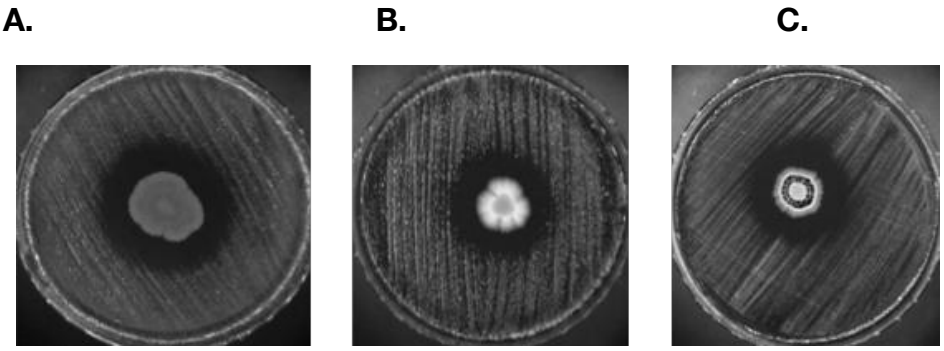


Figure 29. Profils d'inhibitions de trois isolats d'*Aeromonas* sp. provenant de trois réservoirs d'eau douce différents. (A) RW 153 (rivière), **(B)** PW 24 (piscine), **(C)** PoW 257 (étang).

Afin d'estimer la diversité des souches d'*Aeromonas* productrices de composés anti-*Legionella* au sein de chaque sous-collection d'eau, une analyse phylogénétique a été réalisée à partir des séquences du gène codant pour l'ARN 16S obtenues pour chaque isolat. Pour cela, une analyse par maximum de vraisemblance a été utilisée et a permis de montrer que les isolats d'*Aeromonas*, issus de cette collection environnementale, sont taxonomiquement proches des espèces *caviae*, *bestiarum*, *rivuli*, *hydrophila*, *diversa*, *popoffii*, *allosaccharophila* ou *encheleia* (**Figure 30**). Les espèces d'*Aeromonas* affiliées lors de cette analyse semblent être spécifiques de l'échantillon d'eau étudié. Plus précisément, les espèces *rivuli* et *hydrophila* sont exclusivement retrouvées dans l'eau de rivière (RW), tandis que les espèces *diversa*, *popoffii* et *allosaccharophila* sont uniquement retrouvées dans l'eau du puits (WW).

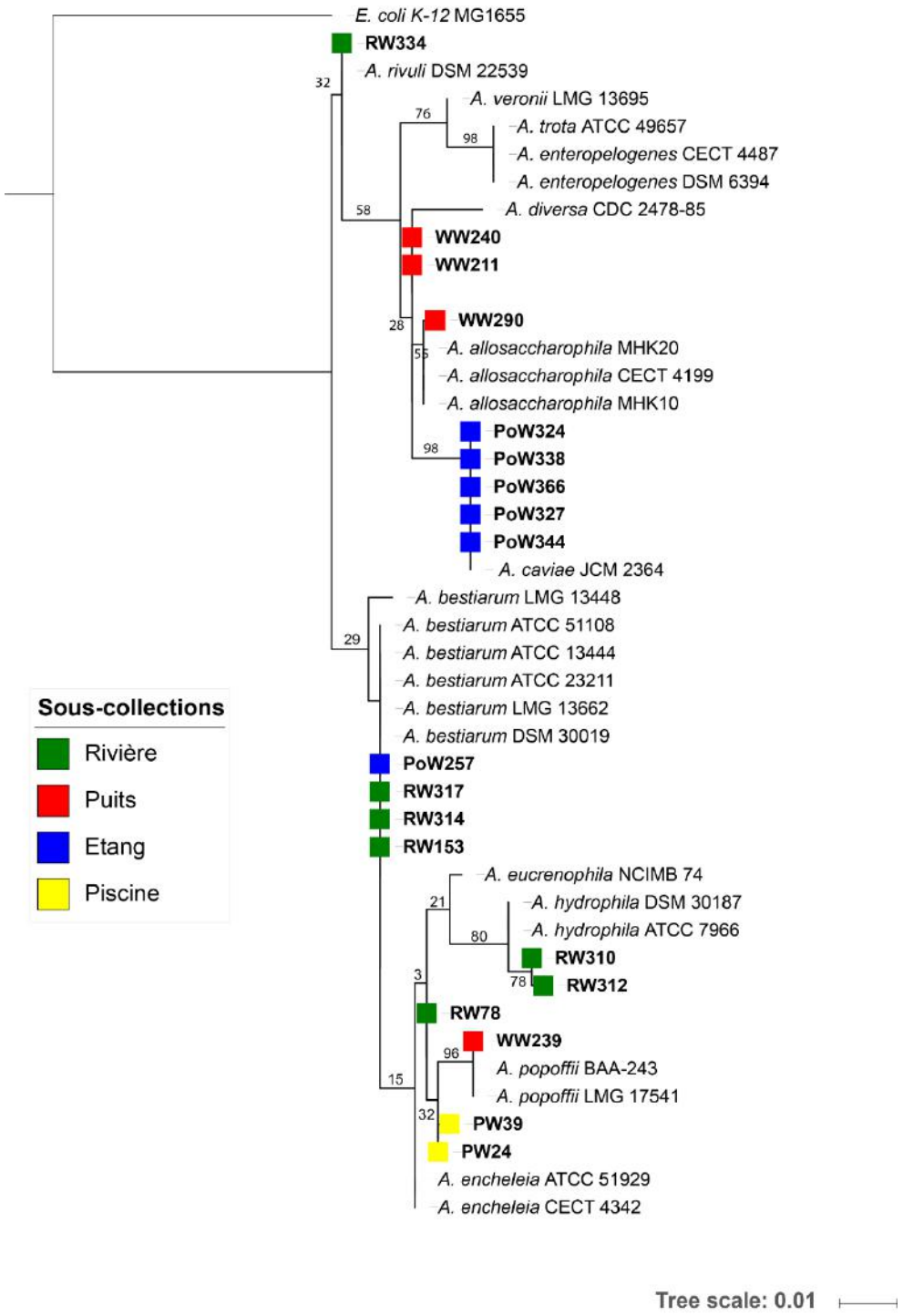


Figure 30. Distribution taxonomique des isolats d'*Aeromonas* sp. issus de quatre sous-collections d'eau environnementale. Une analyse phylogénétique par maximum de vraisemblance a été faite à partir des séquences 16S obtenues pour chaque isolat (500 pb). *E. coli* K-12 MG1655 a été utilisée pour ancrer l'arbre. La robustesse des nœuds a été évaluée sur 1000 itérations et est indiquée par les valeurs sur les branches.

L'espèce *caviae* semble présente exclusivement dans l'eau de l'étang (PoW) et les deux isolats d'*Aeromonas* présents dans l'eau de la piscine (PW) sont proches de l'espèce *encheleia*. Enfin, les 4 isolats affiliés à l'espèce *bestiarum* sont retrouvés dans deux échantillons d'eau différents avec 1 isolat dans l'échantillon PoW et 3 isolats dans l'échantillon RW.

3.2. Caractérisation de la bestiaricine, un peptide anti-*Legionella*

3.2.1. Identification d'*Aeromonas bestiarum* PoW 257

L'isolat PoW 257, affilié sur la base d'identification 16S à l'espèce *A. bestiarum*, a été par la suite sélectionné pour caractériser le composé impliqué dans l'activité anti-*Legionella* observée. Afin de confirmer cette identification, une analyse MLSA basée sur l'alignement de six gènes de ménages (*dnaX*, *gyrA*, *gltA*, *groL*, *gyrB*, *atpD*) a été effectuée sur l'isolat PoW 257 (**Figure 31**).

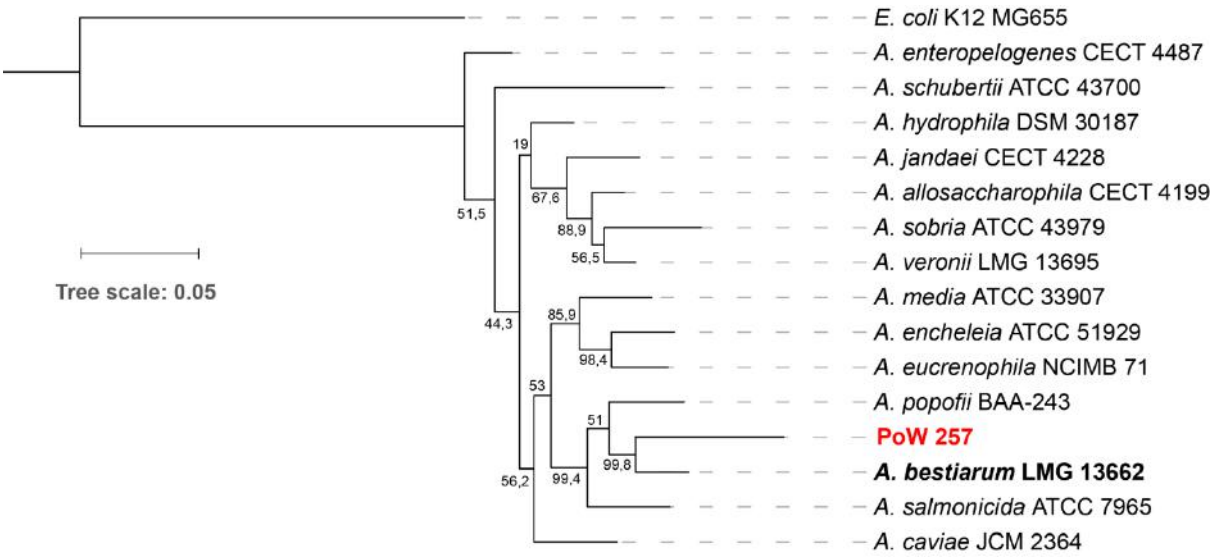


Figure 31. Identification de la souche *A. bestiarum* PoW 257 par analyse MLSA. Une analyse par maximum de vraisemblance a été utilisée pour reconstruire la phylogénie. 1000 itérations ont été utilisées pour tester la robustesse des nœuds et les valeurs correspondantes sont affichées au niveau de chaque nœud. Le nombre de positions utilisées dans l'alignement est de 3151 pb. La souche *E. coli* K12 MG655 a été utilisée pour ancrer l'arbre.

L'arbre phylogénétique obtenu après concaténation de chaque séquence a permis de confirmer que l'isolat *Aeromonas* PoW257 est bien affilié à l'espèce *bestiarum*.

3.2.2. Détermination de la nature du composé impliqué dans l'activité anti-*Legionella*

Afin d'estimer la stabilité du composé aux protéases et à la température, le surnageant d'*A. bestiarum* PoW 257 a été traité avec 100 µg/mL de protéinase K ou de trypsine et a été chauffé à 70 ou 121 °C pendant 20 minutes. La stabilité du composé a ensuite été évaluée en testant l'activité du surnageant traité sur *Legionella* (**Figure 32**).

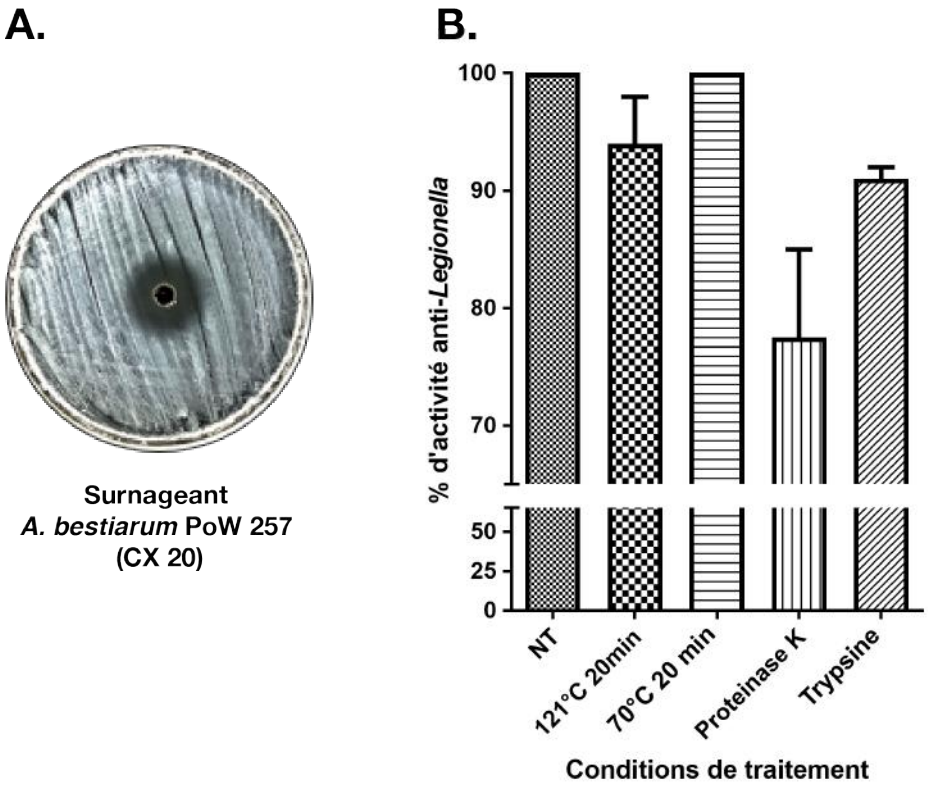


Figure 32. Activité anti-*Legionella* du surnageant de culture d'*A. bestiarum* PoW 257. Le surnageant concentré 20 fois par lyophilisation a été traité en présente de 100 µg/ mL de protéinase K ou de trypsine ou chauffé à 70 et 121 °C. L'activité anti-*Legionella* après chaque traitement a été mesurée par diffusion en milieu BCYE.

Les résultats obtenus montrent que l'activité anti-*Legionella* est maintenue après chauffage du surnageant actif à 70 °C ou à 121 °C. Toutefois, le composé produit par *A. bestiarum* PoW 257 est sensible aux protéases, montré par une perte d'activité de

25% et de 10% en présence de protéinase K et de trypsine, respectivement. Ces résultats suggèrent qu'un composé de nature peptidique est responsable de l'activité anti-*Legionella* observée.

3.2.3. Purification et identification du peptide anti-*Legionella*

Ce composé a ensuite été précipité au sulfate d'ammonium et le culot protéique actif (CSAx20) a été fractionné par extraction sur phase solide C18 (SPE). L'activité des fractions obtenues après chaque étape a été évaluée contre *L. pneumophila* Lens (**Figure 33 B**).

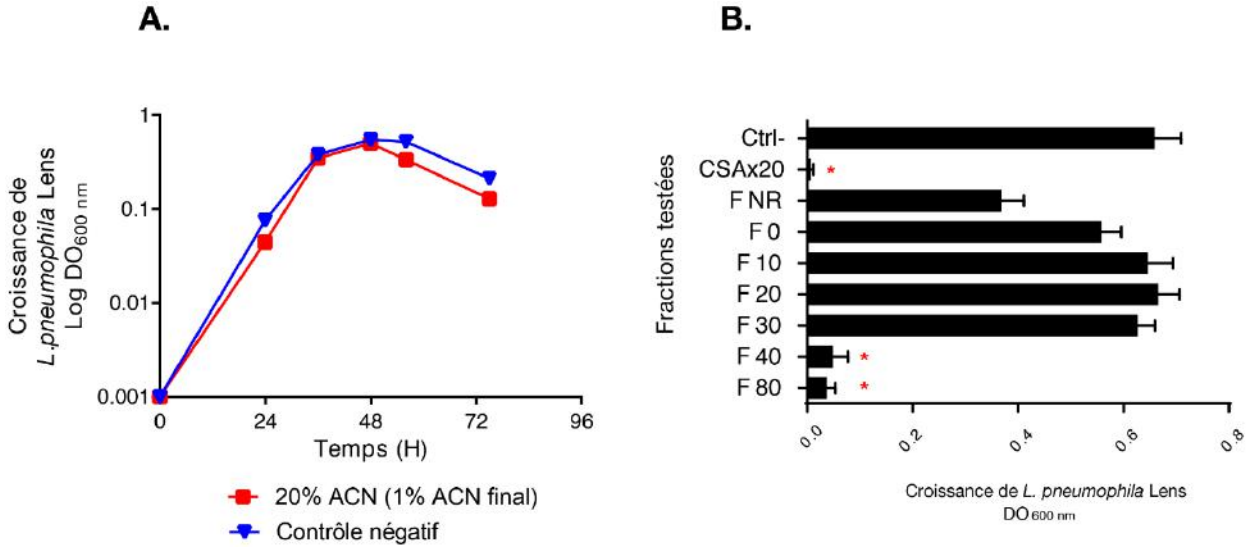


Figure 33. Evaluation de l'activité anti-*Legionella* du composé produit par *A. bestiarum* PoW 257 après précipitation au sulfate d'ammonium et pré-purification par SPE C18. (A) Suivi de croissance de *L. pneumophila* Lens en présence d'1% final d'acétonitrile (ACN). **(B)** Croissance de *L. pneumophila* Lens en présence de l'extrait protéique obtenu par précipitation au sulfate d'ammonium (CSAx20) ou de chaque fraction éluée par SPE. Chaque fraction (NR, 0, 10, 20, 30, 40, 80) a été évaporée et a été reprise dans 20% d'acétonitrile avant de tester l'activité. NR : non retenu sur la cartouche, F0 : 0% ACN, F10 : 10% ACN, F20 : 20% ACN, F30 : 30% ACN, F40 : 40% ACN, F80 : 80% ACN. La croissance de *L. pneumophila* Lens a été évaluée par mesure de densité optique à 600 nm.

Les résultats montrent que l'activité anti-*Legionella* est maintenue après précipitation au sulfate d'ammonium, indiquée par l'absence de croissance pour la condition CSAx20 (**Figure 33 B**). Après pré-purification du composé sur cartouche de SPE-18, l'activité anti-*Legionella* est retrouvée dans les fractions notées F40 et F80,

correspondant aux étapes d'élutions avec 40 et 80% d'acétonitrile respectivement (**Figure 33 B**). Ces fractions ayant été reprises avec une solution d'acétonitrile 20%, cette solution a été utilisée comme contrôle négatif d'expérience (**Figure 33 A, 33 B**). Les deux fractions actives ont ensuite été rassemblées et correspondent à une fraction pré-purifiée du peptide recherché appelée F40-80. Cette fraction a par la suite été analysée par HPLC en phase inverse et l'élution du composé a été suivie à 220 et 280 nm. Le chromatogramme obtenu est présenté dans la **Figure 34**.

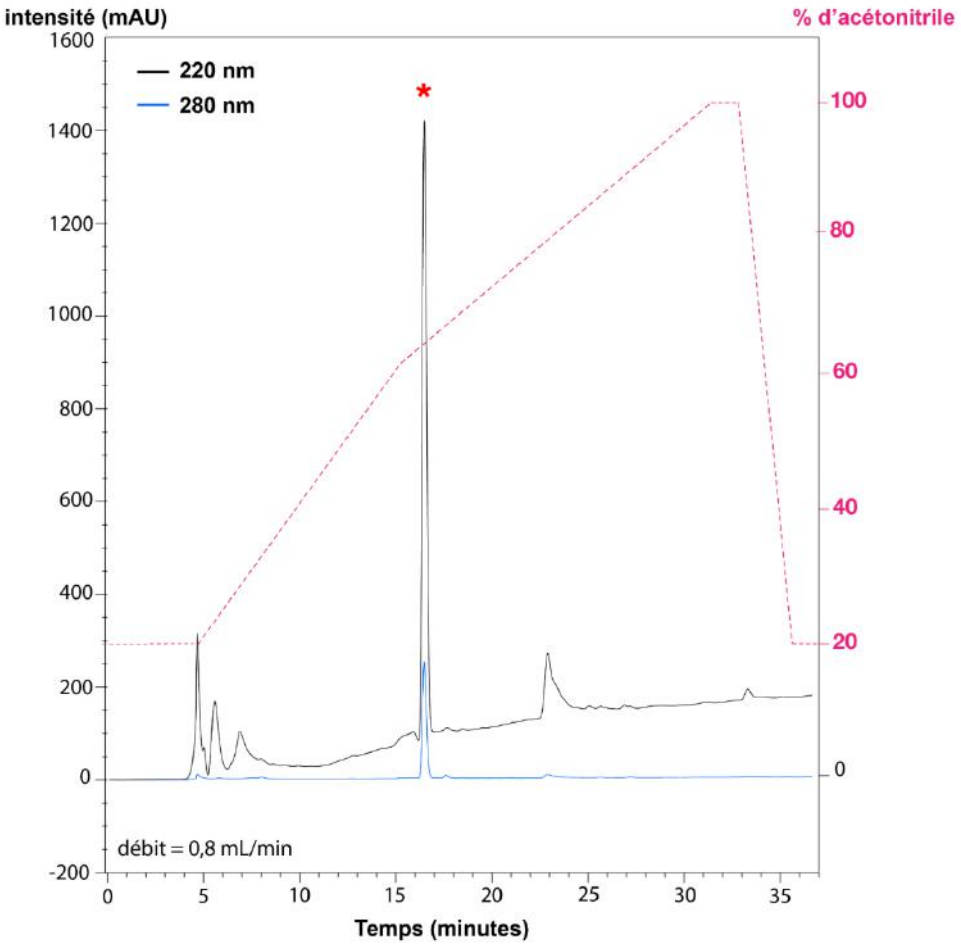


Figure 34. Purification de la bestiaricine produite par A. bestiarum PoW 257 par HPLC en phase inverse. L'analyse a été suivie à 220 nm et 280 nm. La seule fraction active sur *L. pneumophila* est représentée par une étoile rouge.

Durant cette analyse, un pic majeur est détecté après 17 minutes (60% acétonitrile). D'après le test d'activité anti-*Legionella* associé à cette étape de purification, seule la fraction identifiée sur le chromatogramme conserve l'activité. Afin d'identifier le

peptide responsable de cette activité, cette fraction a été analysée par ESI-MS en utilisant un mode d'ionisation positif (**Figure 35**).

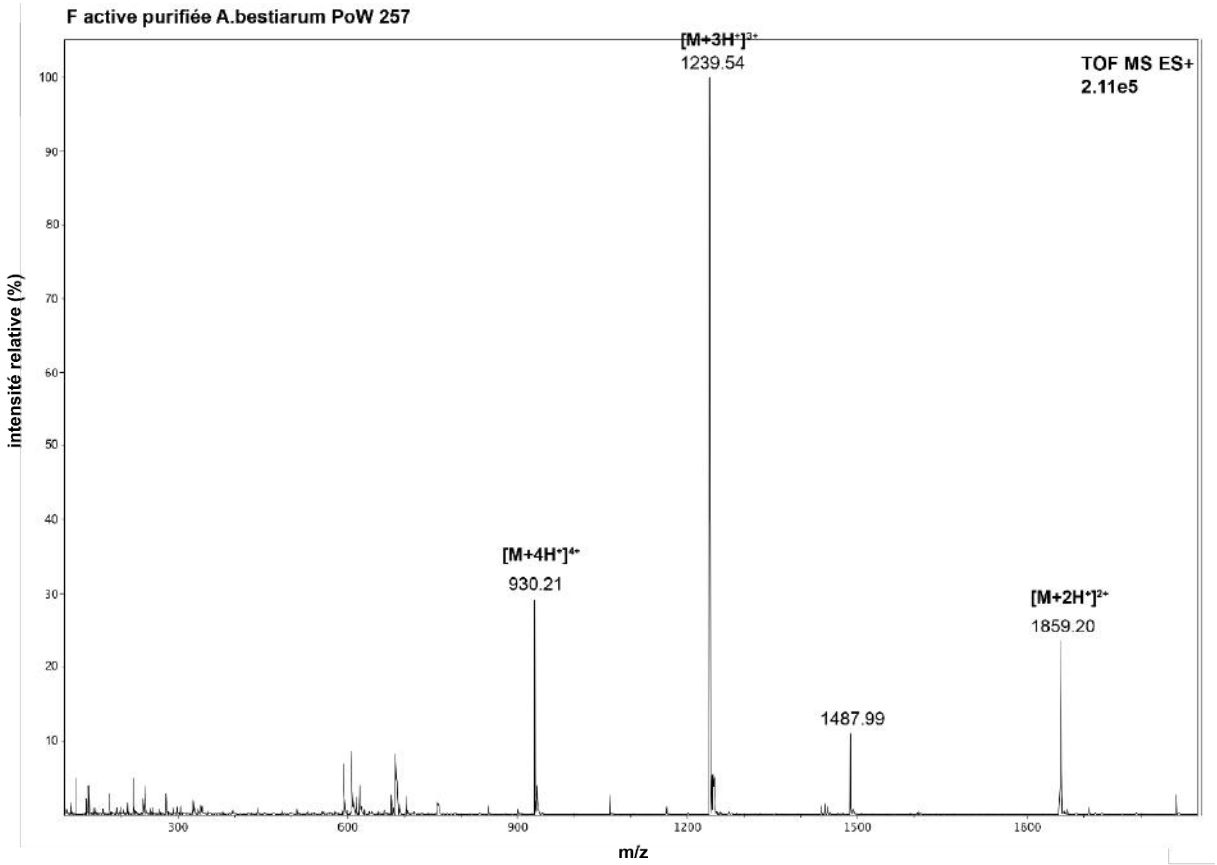


Figure 35. Spectre de masse de la bestiaricine obtenu par analyse ESI-MS en mode positif.

La masse moléculaire de ce composé peptidique déterminée à partir de ce résultat est 3714,42 Da (**Figure 35**) et est indiquée par les ions 930,2128 $[M+4H^+]^{4+}$, 1239,54 $[M+3H^+]^{3+}$ et 1859,2097 $[M+2H^+]^{2+}$. Ce peptide n'ayant jamais été décrit dans la littérature, le nom de bestiaricine lui a été attribué en lien avec le nom de l'espèce qui le produit.

Chapitre 4. L'aquabactine, un sidérophore de type catécholate, agit comme composé anti-*Legionella*

4.1. Production d'un composé anti-*Legionella* par la souche *Rahnella aquatilis* PoW 265

Une souche de *R. aquatilis* a été isolée à partir de l'eau d'un étang à poissons (PoW) et montre une activité anti-*Legionella* par test de diffusion en gélose (**Figure 36 A**). *R. aquatilis* est une entérobactérie principalement retrouvée dans les eaux douces et dans les sols (El-Hendawy *et al.,* 2003; Izard *et al.,* 1979; Martinez *et al.,* 2012). Cette espèce bactérienne a également été décrite pour sa capacité à produire un sidérophore, qui est indiquée par la présence d'un halo de couleur orange en milieu ChromeAzurol (CAS) (**Figure 36 B**) (El-Hendawy *et al.,* 2003).

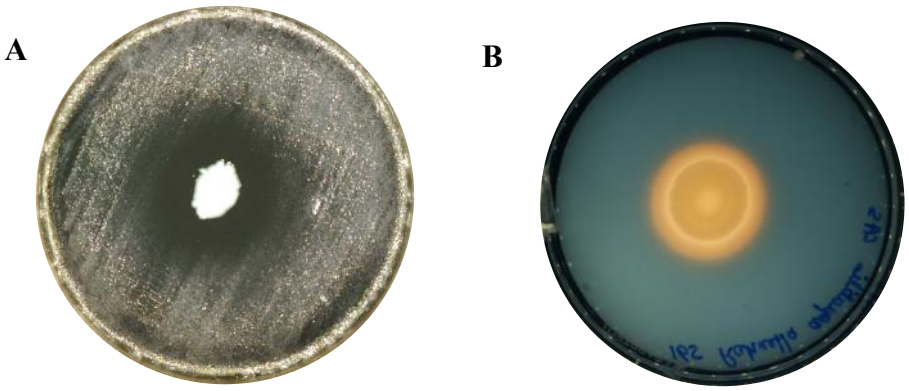


Figure 36. *R. aquatilis* PoW 265 produit un composé anti-*Legionella* et un sidérophore. (A) Profil d'inhibition de *R. aquatilis* PoW 265 sur *L. pneumophila* Lens en milieu BCYE **(B)** Production d'un sidérophore par *R. aquatilis* PoW 265 en milieu CAS.

Les sidérophores bactériens ont pour fonction de piéger les ions ferriques (Fe(III)) contenus dans l'environnement du microorganisme qui le produit. En tenant compte de l'importance du fer dans la croissance et la virulence de *Legionella*, nous avons fait l'hypothèse que ce sidérophore pouvait être responsable de l'inhibition de croissance observée chez *L. pneumophila*.

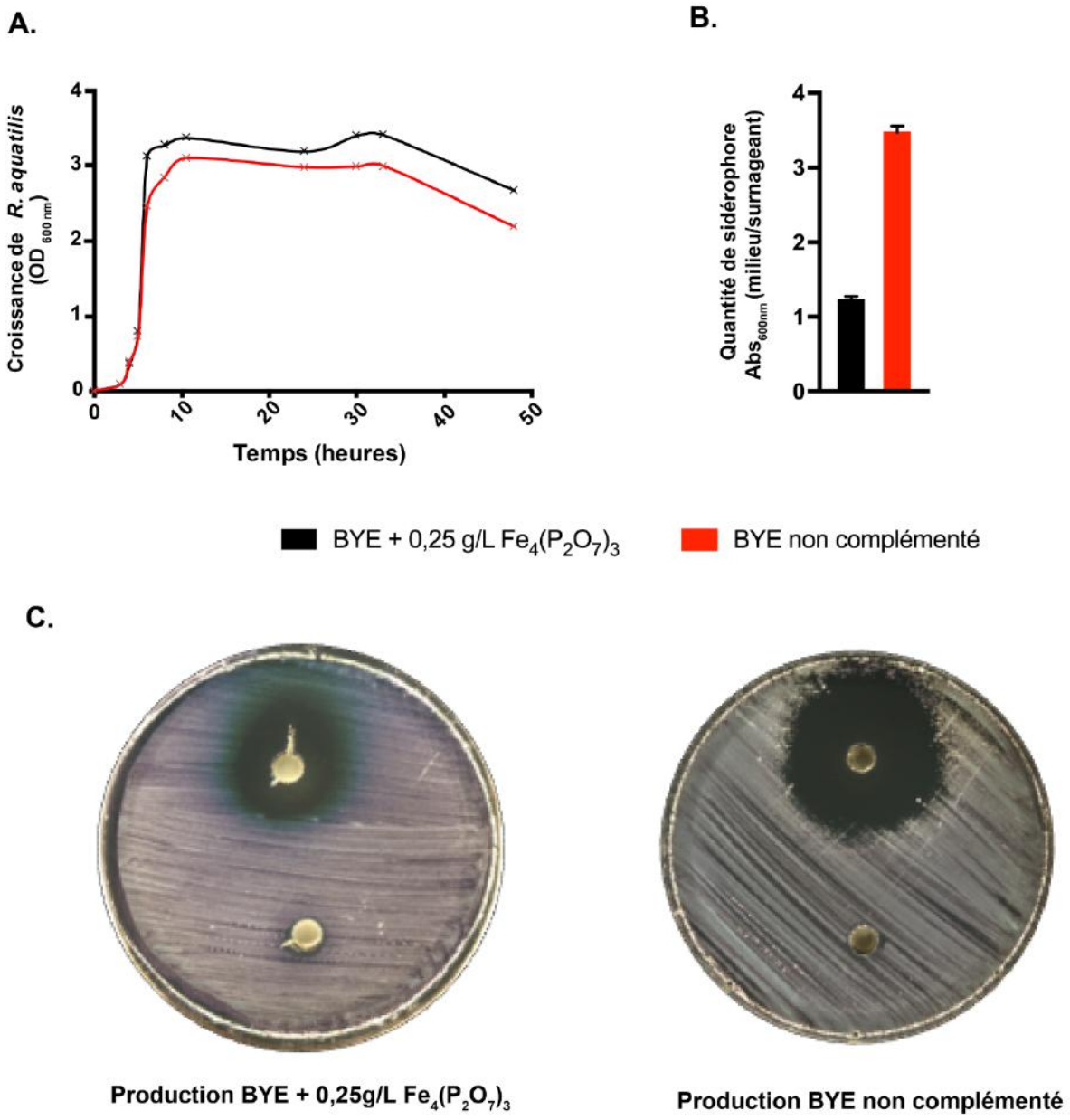


Figure 37. Production d'un composé actif contre *L. pneumophila* régulée par la disponibilité en fer dans le milieu. (A) Croissance de la souche productrice *R. aquatilis* PoW 265 en milieu BYE complémenté ou non par 0,25 g/L de pyrophosphate de fer **(III)** ($Fe_4(P_2O_7)_3$. **(B)** Cinétique de production de sidérophore par *R. aquatilis* en milieu BYE complémenté ou non par 0,25 g/L de $Fe_4(P_2O_7)_3$. **(C)** Profils d'inhibition des surnageants obtenus après 48H de croissance dans ces deux conditions. Les protéines contenues dans chaque surnageant concentré 50 fois par lyophilisation ont été précipitées au méthanol et l'extrait obtenu a été mis à sec. Les contrôles négatifs d'expériences (puits du bas) correspondent au milieu BYE concentré 50 fois après précipitation au méthanol.

Afin de déterminer si ce sidérophore pouvait être impliqué dans cette activité, la croissance de *R. aquatilis* en milieu BYE non complémenté en pyrophosphate de fer (III) a été comparée avec celle en milieu complémenté (**Figure 37**). Les résultats obtenus montrent que *R. aquatilis* est capable de se développer dans ces deux conditions et de la même manière (**Figure 37 A**). En parallèle, la production de sidérophore a été quantifiée par test CAS pour ces deux conditions (**Figure 37 B**). Les rapports d'absorbance mesurés dans le milieu non complémenté en fer indiquent une augmentation de la production de sidérophore après 48H de croissance en comparaison avec la mesure faite à partir du milieu complémenté. Après 48H de croissance, les protéines contenues dans le surnageant de culture pour ces deux conditions ont été précipitées au méthanol et l'activité anti-*Legionella* a été estimée par test de diffusion (**Figure 37 C**). D'après les résultats obtenus, les extraits obtenus dans chaque condition sont actifs (puits du haut), en comparaison avec le milieu de culture seul utilisé pour ces expériences (puits du bas). De plus, l'activité mesurée après culture en milieu BYE non complémenté en pyrophosphate de fer est plus importante, suggérant une régulation de la production du composé actif par la disponibilité en fer. Ces premiers éléments indiquent donc que le sidérophore produit par *R. aquatilis* PoW 265 est responsable de l'activité anti-*Legionella* observée.

4.2. Purification et identification de l'aquabactine

En suivant l'hypothèse qu'un sidérophore pouvait être responsable de l'activité, une méthode d'enrichissement de composés chélateurs de fer ferrique a été développée. Pour cela, le surnageant de culture de *R. aquatilis* a été injecté sur une colonne d'IMAC-Fe^{3+} et le chromatogramme obtenu au cours de cette analyse est présenté en **Figure 38 A**. L'activité de la fraction contenant les composés chélateurs de fer (III) (éluée à pH 8) a par la suite été évaluée par test de diffusion contre *L. pneumophila* et indique une activité positive (**Figure 38 A** et **38 B**). D'après le spectre d'absorption UVs obtenu à partir de cet échantillon, les composés contenus dans cette fraction montrent un pic d'absorption caractéristique à 265 nm (**Figure 38 C**). Cette propriété d'absorption est notamment observée pour les noyaux dihydroxybenzène contenus dans les structures de sidérophores de type catécholate.

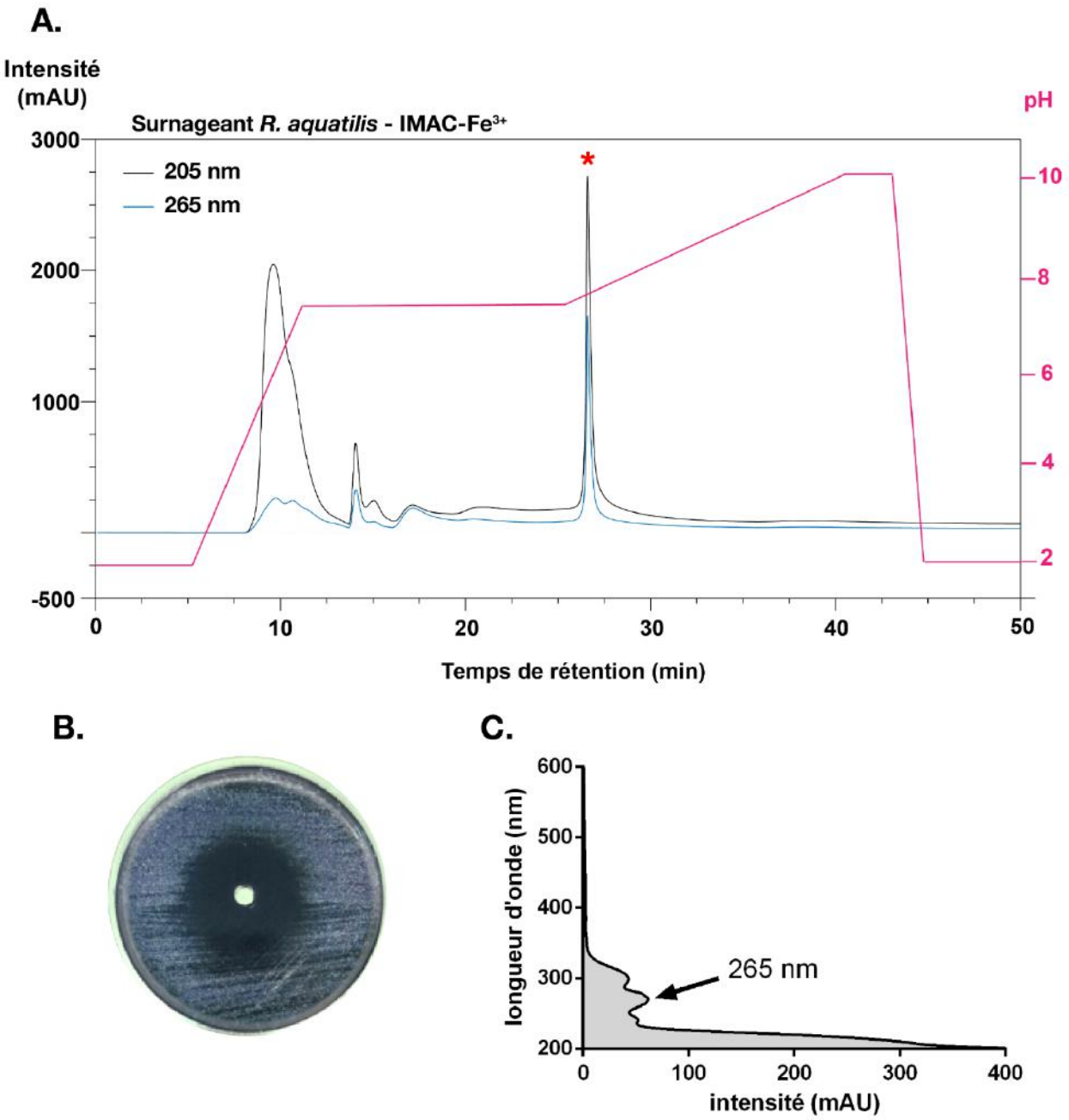


Figure 38. Activité anti-*Legionella* de composés chélateurs de fer (III) produits par *R. aquatilis* PoW265. (A) Enrichissement de composés chélateurs de fer III par chromatographie d'affinité sur ions ferriques immobilisés (IMAC-Fe^{3+}). **(B)** Activité anti-*Legionella* de la fraction enrichie en chélateurs d'ions ferrique par test de diffusion. **(C)** Spectre d'absorption des composés contenus dans la fraction enrichie.

Afin de purifier ce sidérophore, une analyse par HPLC en phase inverse a été réalisée et le chromatogramme obtenu lors de cette analyse est présenté en **Figure 39**. Ce chromatogramme montre un composé majoritaire élué avec 65% d'acétonitrile après 20 minutes d'analyse. Ce composé, présentant également la propriété d'absorber à 265 nm a finalement été évalué pour sa capacité à inhiber *L. pneumophila* par test de diffusion. Le résultat obtenu montre une inhibition de la croissance de *L. pneumophila* Lens. En parallèle, ce composé a été déposé en milieu CAS et l'apparition d'un halo orange autour du puits de dépôt montre la présence d'un sidérophore.

Par conséquent, l'ensemble de ces résultats indiquent qu'un sidérophore, sans doute de type catécholate, est responsable de l'activité anti-*Legionella* observée.

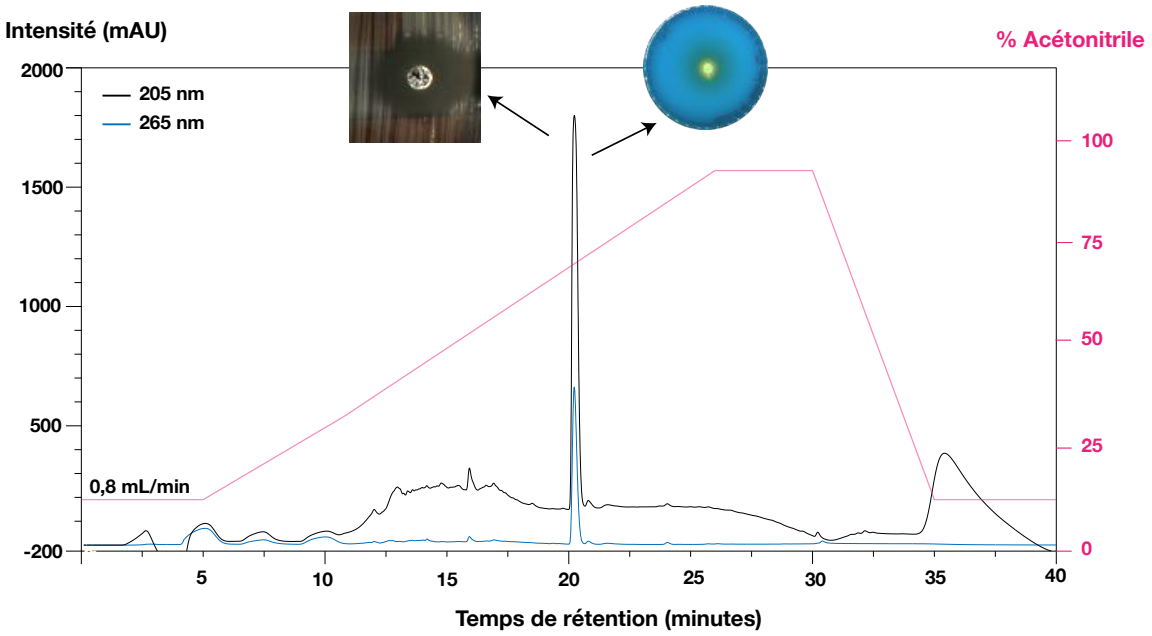


Figure 39. Purification de l'aquabactine par RP-HPLC. La fraction enrichie en chélateurs de fer ferrique a été injectée sur colonne RSLC (phase inverse avec avantage polaire). Le seul composé actif est élué après 20 minutes (70% acétonitrile) et montre un résultat positif en milieu CAS.

Dans le but d'identifier ce sidérophore, une analyse par ESI-MS a été effectuée en mode positif. Le spectre obtenu indique la présence de 5 ions majoritaires dont les masses sont comprises entre 668 et 957 Da (**Figure 40**). Ces ions sont tous séparés

entre eux par des écarts de masse non identifiés de 72 Da. L'ion 668 m/z ($[M+H]^+$) présente une masse proche de l'entérobactine produite par *E.* coli (670 m/z $[M+H]^+$) (Henderson *et al.,* 2009). Ce sidérophore est formé par la cyclisation de 3 unités de 2, 3-dihydroxybenzène (DHB), chacune liées à une L-sérine par liaison amide. Les ions 650 et 690 m/z correspondent respectivement aux formes déshydratée $[M-H_2O]^+$ et adduite $[M+Na^+]^+$ de ce même composé. Ces formes déshydratée et adduite sont également observées pour les quatre autres ions majeurs présents sur ce spectre (740, 812, 884, 957 m/z $[M+H]^+$) (**Figure 40**).

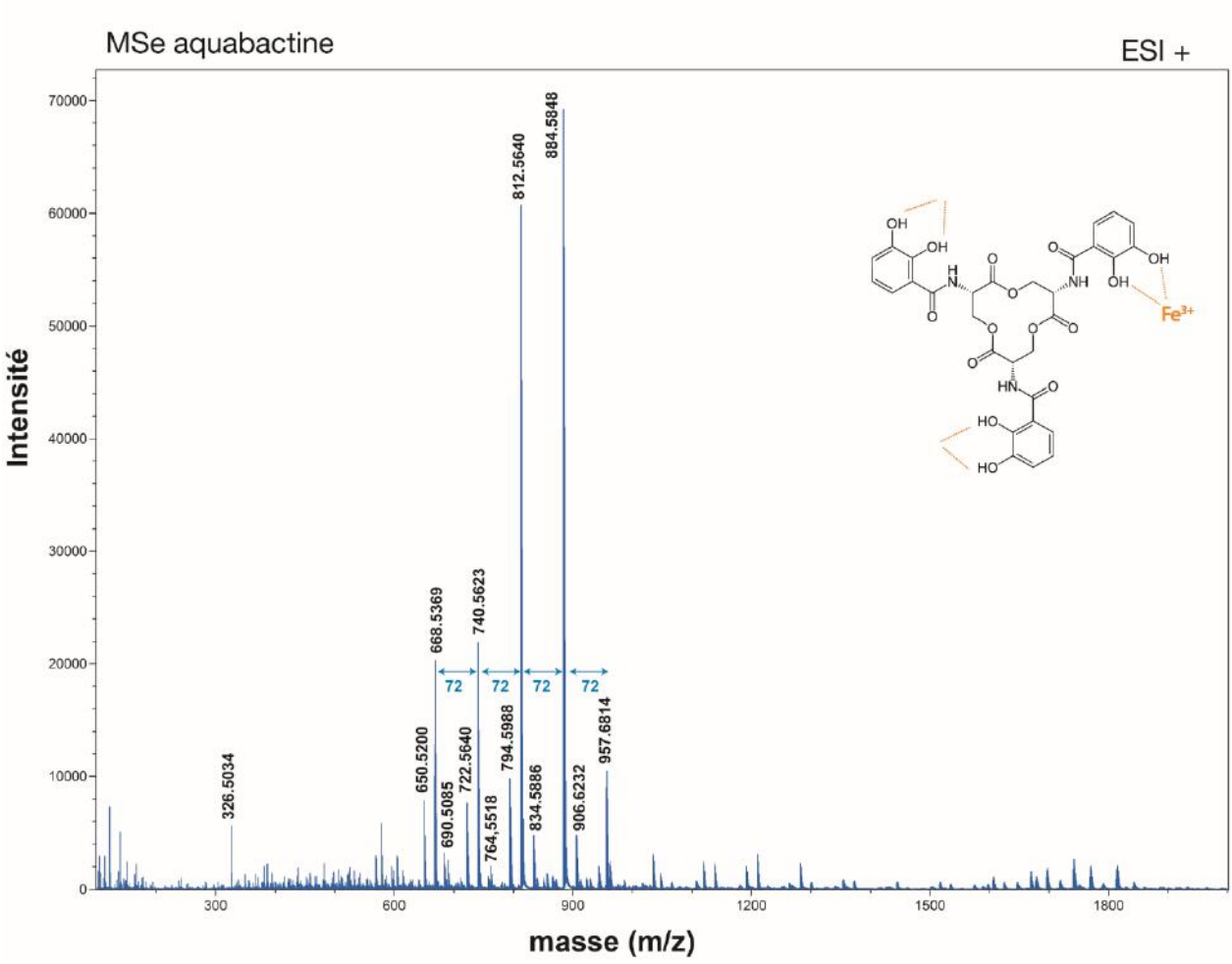


Figure 40. Spectre de masse de l'aquabactine et structure potentielle du sidérophore anti-*Legionella*. L'analyse a été effectuée en mode positif**.**

Le sidérophore produit par *R. aquatilis* n'ayant pas été décrit dans la littérature, le nom d'aquabactine a été proposé.

4.3. Expériences complémentaires

D'après l'identification obtenue par spectrométrie de masse, l'aquabactine semble présenter une structure de type catécholate, également retrouvée dans la structure de l'entérobactine produite par certaines entérobactéries dont *E. coli*. De manière à estimer si l'entérobactine pouvait induire une inhibition de la croissance de *Legionella*, des tests d'activité par diffusion ont été effectués en présence de 150 µM à 1,5 mM d'entérobactine purifiée (résultats non montrés). Pour toutes les concentrations testées, la croissance de *Legionella* n'est pas influencée par la présence d'entérobactine, suggérant une spécificité structurale de l'aquabactine. Afin d'estimer si l'activité anti-*Legionella* était plus généralement retrouvée au sein de la famille des entérobactéries, des tests d'antagonisme ont été effectués en utilisant la souche *E. coli* DH5α, *R. aquatilis* PoW 265 et *L. pneumophila* Lens à la fois comme cible et comme bactérie productrice. Les résultats obtenus pour chaque cible testée sont présentés en **Figure 41**.

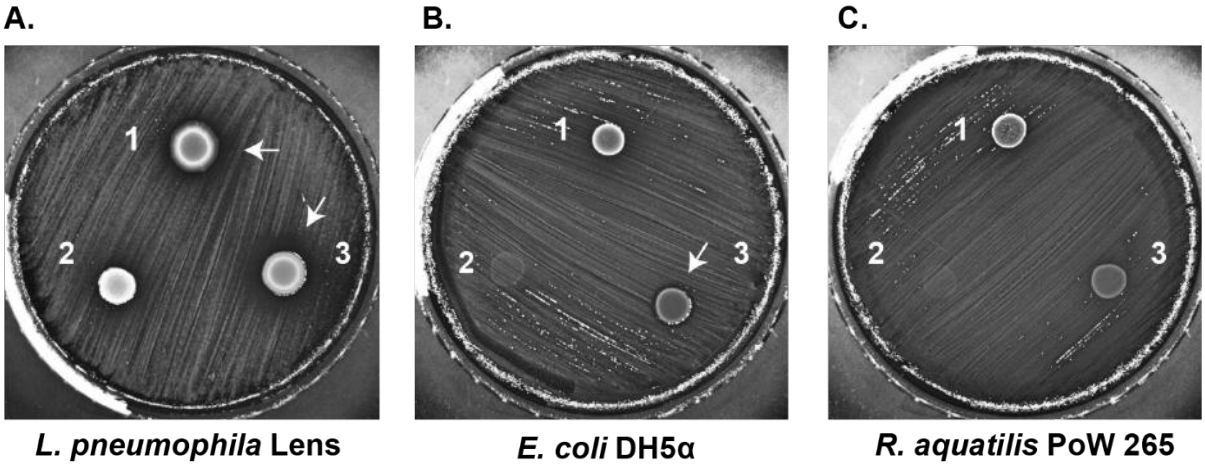


Figure 41. Profils d'activité des souches *E. coli* DH5α (1), *L. pneumophila* Lens (2) et *R. aquatilis* PoW 265 (3) contre ces mêmes bactéries. Les résultats positifs d'antagonisme sont montrés par des flèches blanches.

Ces résultats montrent que les souches *E. coli* DH5α et *R. aquatilis* PoW 265 ont la capacité d'inhiber *L. pneumophila* Lens par test de diffusion (**Figure 41 A**). Toutefois, le halo d'inhibition formé autour de la colonie de *R. aquatilis* (12 mm) est plus important que celui autour d'*E. coli* (6 mm), suggérant une plus grande sensibilité de

Legionella au composé produit par *R. aquatilis* PoW 265. En utilisant les souches *E. coli* DH5α et *R. aquatilis* PoW 265 comme bactéries cibles, *L. pneumophila* n'a pas pu se développer dans ces conditions, du fait de son temps de génération beaucoup plus long que celui des entérobactéries (**Figures 41 B** et **41 C**). Enfin, une inhibition de la croissance d'*E. coli* est observée autour de la colonie de *R. aquatilis* PoW 265 (**Figure 41 B**). L'ensemble de ces résultats confortent l'idée que l'aquabactine présente une propriété spécifique d'activité contre *L. pneumophila*.

Chapitre 5. Les flavolipides, une classe de biosurfactant encore non explorée pour son activité antimicrobienne

Les bactéries du genre *Flavobacterium* sont connues pour produire des flavolipides, une classe de biosurfactants encore non explorée pour leur potentiel antimicrobien (Bodour *et al.,* 2004). Les objectifs de cette partie de l'étude ont été d'estimer la capacité des isolats appartenant au genre *Flavobacterium* d'inhiber *L. pneumophila* et d'évaluer l'activité des flavolipides contre *L. pneumophila* et une souche amibienne *Acanthamoeba castellanii*.

5.1. Distribution des isolats de *Flavobacterium* sp. au sein des communautés d'eau douce

Dans la collection constituée dans ce travail, 27 isolats appartenant au genre *Flavobacterium* ont été isolés à partir des échantillons PW (7/27, 25,9%), RW (1/27, 3,7%) et WW (19/27, 70,4%). Parmi l'ensemble de ces isolats, 13 (48,1%) ont la capacité d'inhiber *L. pneumophila* Lens par test d'antagonisme et montrent des halos d'inhibitions allant de 20 à 45 mm (**Figure 42**).

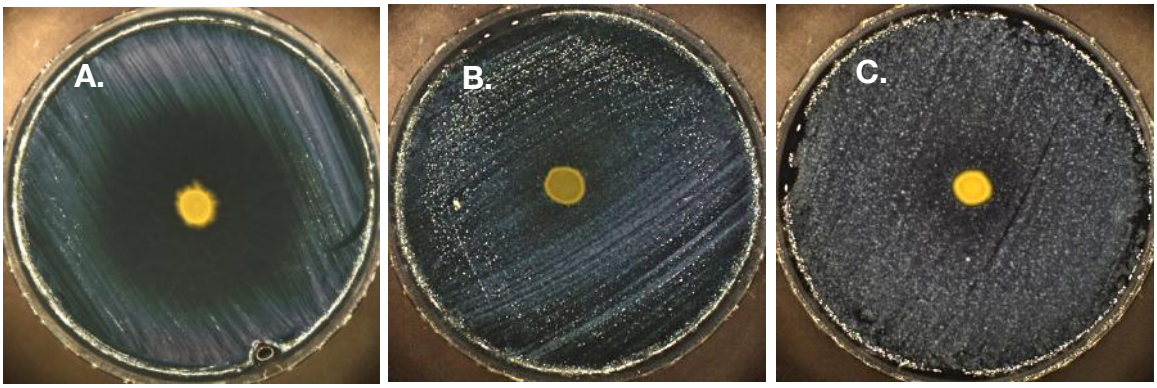


Figure 42. Profils d'inhibition de trois isolats de *Flavobacterium* sp. provenant des 3 sous-collections PW, RW et WW. A. Inhibition de *L. pneumophila* par l'isolat PW 52. **B.** et **C.** Absence d'inhibition de *L. pneumophila* par les isolats RW 158 et WW 299 respectivement.

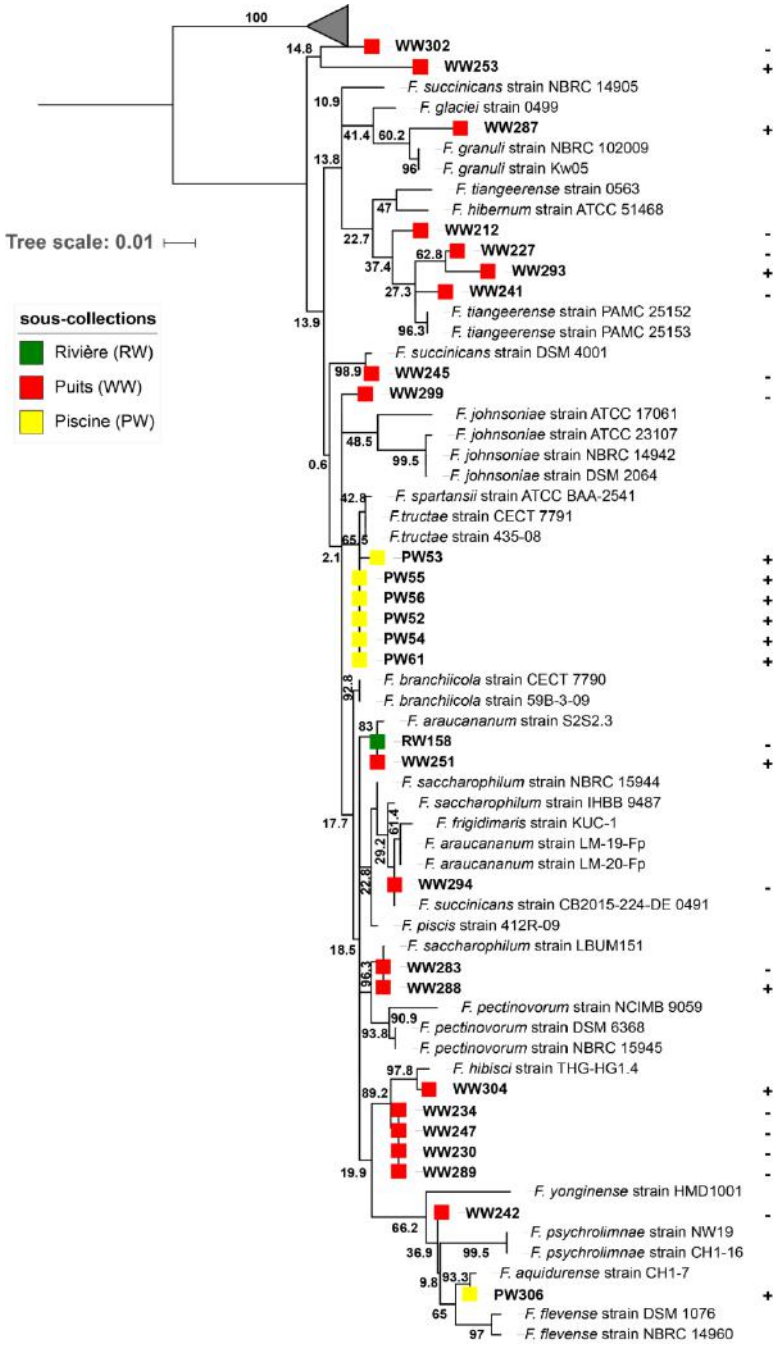


Figure 43. Distribution taxonomique des isolats de *Flavobacterium* sp. associée à leur profils d'activité anti-*Legionella*. L'analyse phylogénétique a été effectuée avec la méthode de maximum de vraisemblance sur MEGA v7 et l'arbre a été mis en forme sur iTOL. La robustesse des nœuds a été évaluée en appliquant 1000 itérations et est indiquée par les valeurs sur les branches. Un signe + ou – est associé à chaque isolat et indique l'activité anti-*Legionella*. Les séquences 16S des souches *C. xylanolytica* DSM 6779, *C. daecheongense* NBRC 102008 et *C. gleum* NBRC 15054 ont été utilisées pour ancrer l'arbre.

Afin d'estimer la diversité taxonomique des isolats actifs associés au genre *Flavobacterium*, une analyse par maximum de vraisemblance a été réalisée en utilisant les séquences du gène codant pour l'ARN 16S de chaque isolat. L'arbre phylogénétique obtenu est présenté dans la **Figure 43**. L'ensemble des isolats affiliés à ce genre bactérien et issus de la sous-collection PW (n=7) présentent une activité contre *L. pneumophila* Lens. Sur la base de leur séquence codant l'ARNr 16S, ces isolats sont phylogénétiquement proches des espèces *tructae* (n=6) et *aquidurense* (n=1). La sous-collection WW, qui contient le plus grand nombre d'isolat associés au genre *Flavobacterium* (n= 19) semble également contenir une plus grande diversité d'espèces au sein de ce genre. Ces isolats sont proches des espèces *succinicans*, *granuli*, *araucananum*, *saccharophilum*, *pectinovorum*, *hibisci* et *psychrolimnae*. Toutefois, seuls 6 de ces isolats (31,5%) montrent une activité anti-*Legionella*. Enfin, le seul isolat provenant de l'eau de rivière (RW) ne montre pas d'activité contre *L. pneumophila* et semble être phylogénétiquement proche de *F. araucananum* (**Figure 42 C**, **Figure 43**).

5.2. Etude de l'activité anti-*Legionella* des flavolipides produits par *Flavobacterium* sp. PW 52

5.2.1. Détermination de la nature du composé impliqué dans l'activité anti-*Legionella*

Afin d'identifier le type de composé impliqué dans l'activité anti-*Legionella* observée chez *Flavobacterium spp.*, l'isolat PW 52 a été sélectionné pour la suite du travail. Dans le but d'évaluer la nature du composé impliqué dans l'activité anti-*Legionella*, le surnageant de culture de *Flavobacterium sp*. PW 52 a été traité avec 100 µg/mL de protéases (trypsine, protéinase K) ou chauffé à 70 °C et 121 °C pendant 20 minutes. La stabilité du composé a ensuite été évaluée en testant l'activité du surnageant traité contre *L. pneumophila* (**Figure 44 A et 44 B**).

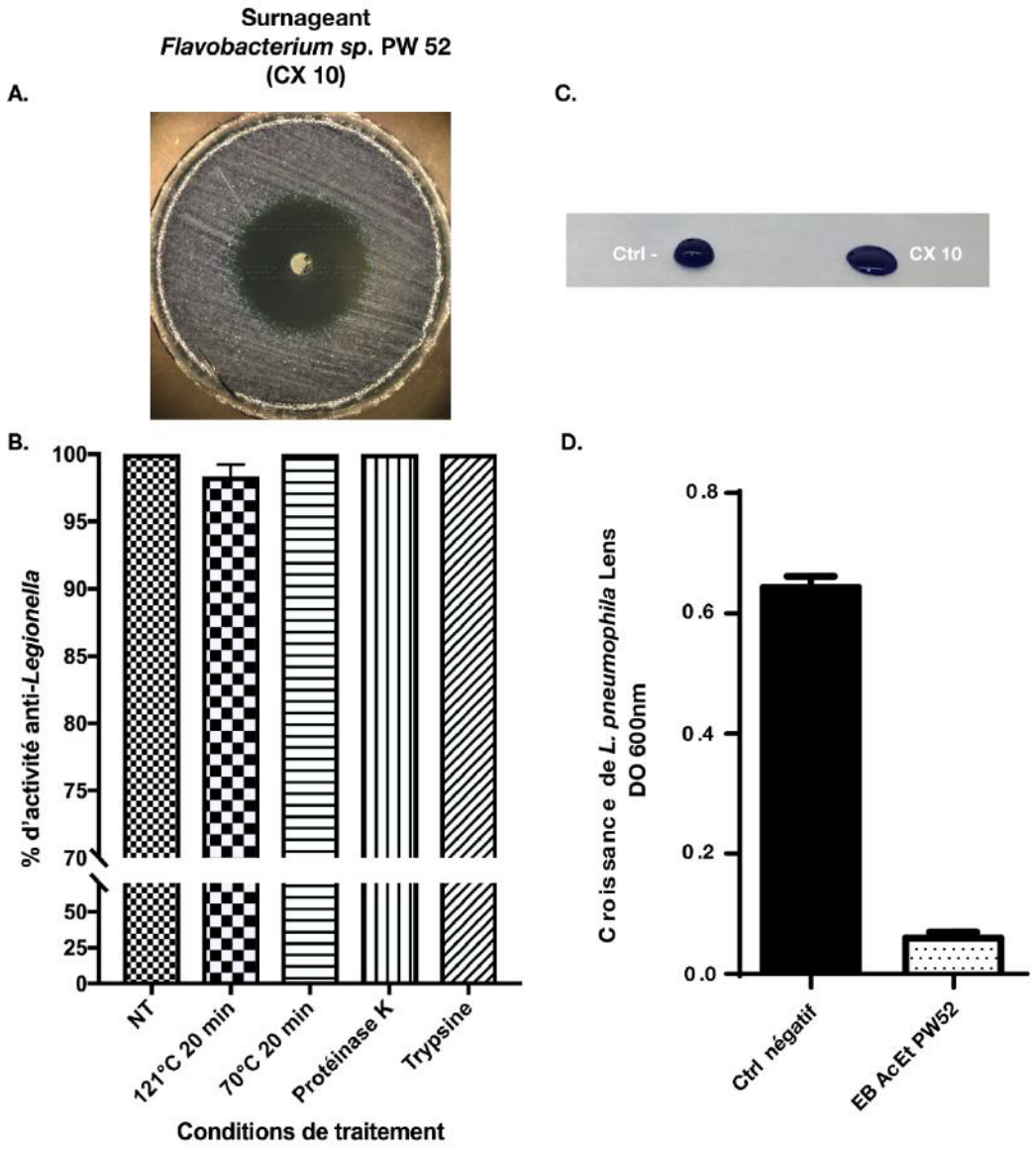


Figure 44. Production de biosurfactants par la souche *Flavobacterium* sp. PW 52. (A) Activité du surnageant de culture de PW 52. **(B)** Orientation de la nature du composé impliqué dans l'activité anti-*Legionella*. L'activité anti-*Legionella* a été évaluée par test de diffusion en gélose. **(C)** Test de diminution de la tension de surface à partir du surnageant de culture de PW 52. Le contrôle négatif utilisé est le milieu de culture (BYE) concentré 10 fois. **(D)** Activité de l'extrait brut (EB) de biosurfactants obtenu par extraction à l'acétate d'éthyle. L'activité anti-*Legionella* a été évaluée en milieu liquide par mesure d'absorbance après 96 heures de croissance à 37 °C. Le contrôle négatif a été obtenu en traitant *L. pneumophila* (190 µL ; OD = 0,001) avec 10 µL d'acétonitrile 50%. (n = 3)

Les résultats obtenus montrent que l'activité anti-*Legionella* est maintenue après traitements aux protéases et chauffage du surnageant, indiquant que le ou les composés impliqués dans l'activité ne sont pas de nature protéique et sont thermorésistants (**Figure 44 B**). Le genre *Flavobacterium* est connu pour produire des biosurfactants du type flavolipides (Bodour *et al.,* 2004). Afin de déterminer si ces composés pouvaient être présents dans le surnageant de culture de *Flavobacterium sp.* PW 52, un test de diminution de la tension de surface a été effectué, mettant en évidence la présence de composés tensioactifs (**Figure 44 C**). Le résultat obtenu montre que le surnageant de *Flavobacterium sp*. PW 52 induit un étalement de la goutte, ce qui indique la présence de biosurfactants. Afin de confirmer l'implication de ces composés dans l'activité anti-*Legionella*, une extraction de biosurfactants à l'acétate d'éthyle a été effectuée, et l'activité anti-*Legionella* de l'extrait brut (EB) obtenu a par la suite été évaluée. Après 96 heures de croissance en présence de l'EB, la croissance de *L. pneumophila* est inhibée de 80% en comparaison avec le témoin négatif, confirmant l'implication de biosurfactants dans l'activité observée (**Figure 44 D**).

5.2.2. Caractérisation des flavolipides produits par *Flavobacterium* sp. PW 52

Afin de caractériser le ou les flavolipides produits par la souche *Flavobacterium* sp. PW 52, une analyse par HPLC en phase inverse de l'EB a été effectuée (**Figure 45**). D'après le chromatogramme obtenu, les composés présents dans l'EB analysé ne semblent pas avoir la capacité d'absorber aux longueurs d'ondes sélectionnées (205 nm, 280 nm) (**Figure 45 A**). De ce fait, des fractions ont été collectées toutes les minutes lors de l'analyse avant d'être testées contre *L. pneumophila* (**Figure 45 B**). Les résultats obtenus montrent une inhibition de la croissance de *L. pneumophila* après traitement avec les fractions 8 à 21, suggérant la présence d'un mélange de flavolipides actifs.

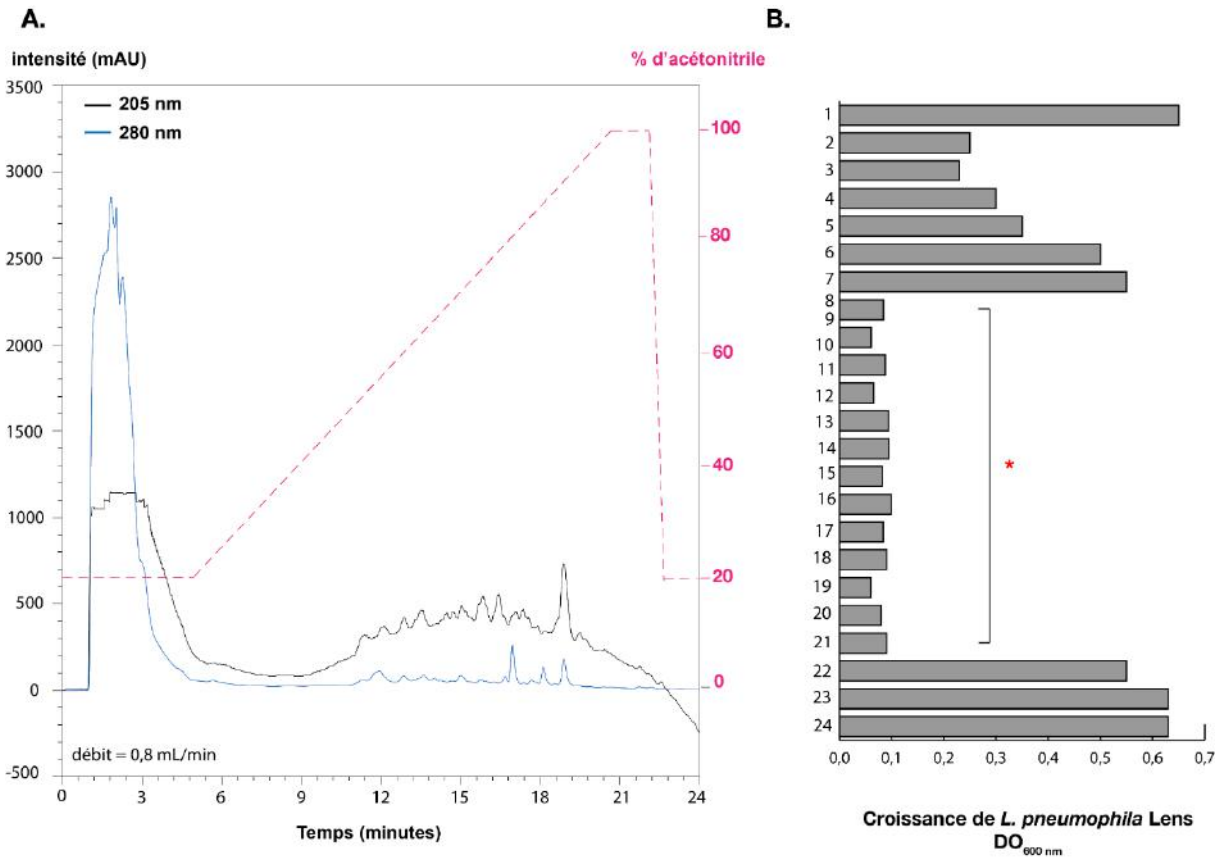


Figure 45. Analyse du mélange de composés présents dans l'EB de *Flavobacterium* sp. PW 52. (A) Chromatogramme obtenu par analyse en HPLC en phase inverse. Les composés impliqués dans l'activité n'ayant pas de propriété d'absorption connue, des fractions ont été collectées toutes les minutes pendant toute la durée de l'analyse (1-24). **(B)** Analyse de l'activité anti-*Legionella* de chaque fraction collectée par HPLC. Les nombres à gauche de chaque barre correspondent aux numéros des fractions HPLC. L'étoile rouge indique une activité positive contre *L. pneumophila.*

Afin d'identifier ces composés, une analyse par LC-MS de l'EB a été effectuée dans les mêmes conditions chromatographiques que lors de l'analyse par HPLC (**Figure 45 A**). Le chromatogramme obtenu indique la présence d'un mélange complexe de composés élués tout au long de l'analyse (**Figure 46**).

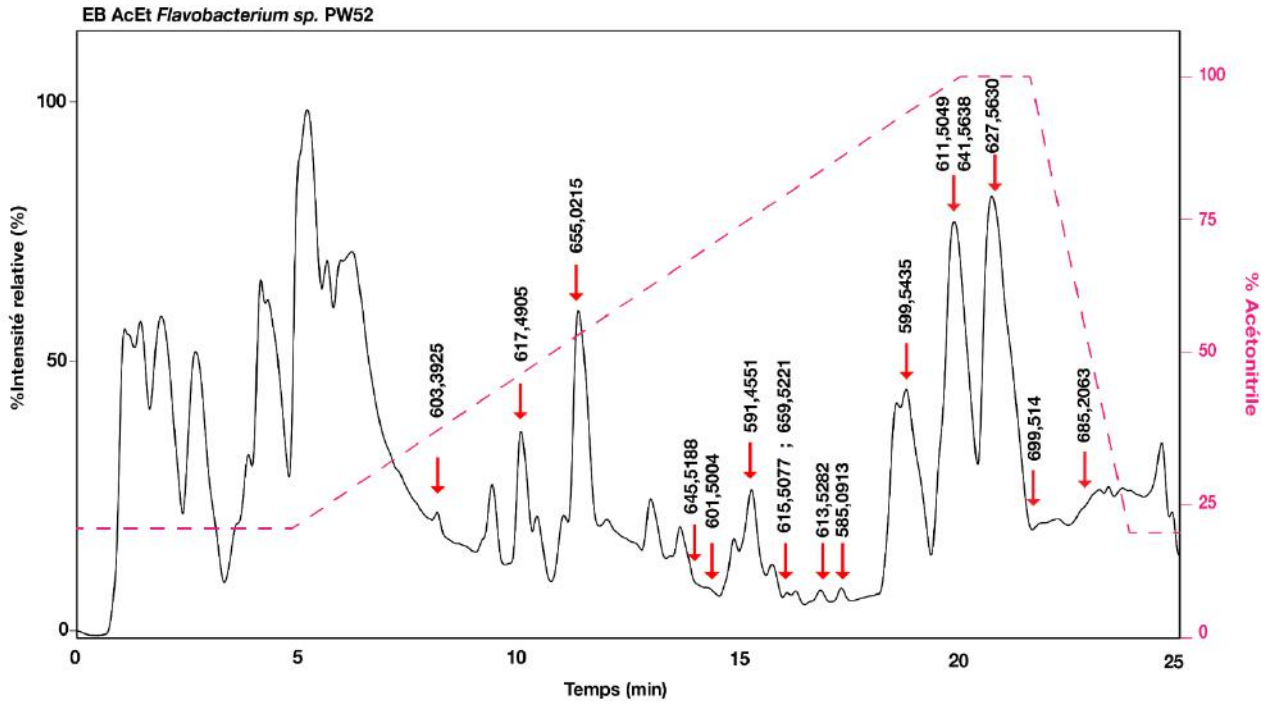
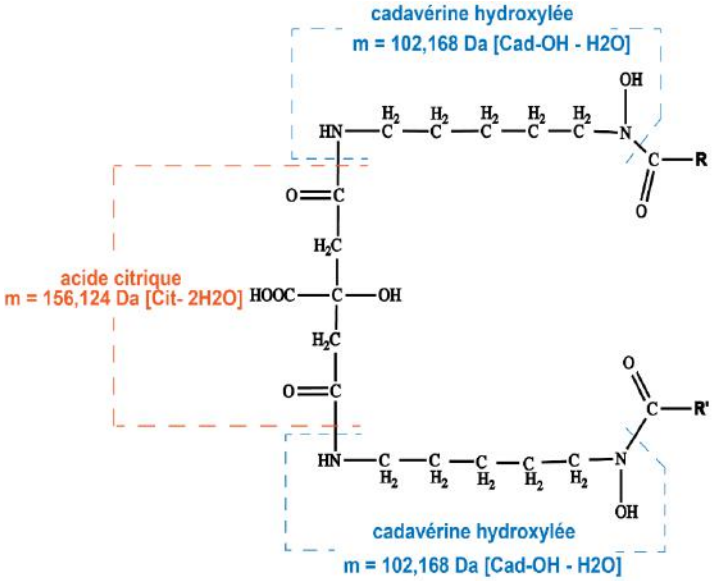


Figure 46. Chromatogramme obtenu après analyse LC-MS de l'EB de flavolipides produits par *Flavobacterium* sp. PW 52. Le gradient utilisé est identique à celui utilisé en HPLC. L'ionisation ESI a été effectuée en mode positif. Les flèches rouges indiquent la présence d'ions moléculaires pouvant correspondre à des flavolipides. Ces masses ont été sélectionnées sur la base de données contenues dans la littérature (Bodour et al., 2004).

Sur la base des structures des flavolipides décrites dans la littérature, cette analyse a permis d'identifier 16 ions moléculaires pouvant correspondre à des flavolipides et ces composés sont élués entre 8 et 21 minutes dans cette analyse (**Figure 47**).



Structure de flavolipide proposée	Masse calculée (Da)	Ion pseudo-moléculaire [M+H+]	Temps de rétention (min)	Abondance relative (%)
2[Cad-OH]-Cit- 2(C7: 1)	584,7032	585,0913	17,82	0,02
2[Cad-OH]-Cit- 2(C7: 0)	588,7350	591,4551	15,12	3,05
2[Cad-OH]-Cit-(C7: 1)-(C8: 1)	598,7140	599,5435	18,83	6,41
2[Cad-OH]-Cit-(C7: 1)-(C8: 0) 2[Cad-OH]-Cit-(C7: 0)-(C8: 1)	600,7457	601,5004	14,22	0,62
2[Cad-OH]-Cit-(C7: 0)-(C8: 0)	602,7616	603,3925	8,46	0,04
2[Cad-OH]-Cit-(C7: 1)-(C9: 2)	610,7406	611,5049	19,87	**57,05**
2[Cad-OH]-Cit-(C7: 1)-(C9: 1) 2[Cad-OH]-Cit- 2(C8: 1)	612,7565	613,5282	17,29	3,40
2[Cad-OH]-Cit-(C7: 1)-(C9: 0) 2[Cad-OH]-Cit-(C8: 1)-(C8: 0)	614,7724	615,5077	16,28	0,44
2[Cad-OH]-Cit-(C7: 0)-(C9: 0) 2[Cad-OH]-Cit- 2(C8: 0)	616,7882	617,4905	10,13	0,15
2[Cad-OH]-Cit-(C7: 1)-(C10: 1) 2[Cad-OH]-Cit-(C8: 1)-(C9: 1)	626,7831	627,5630	20,40	**15,21**
2[Cad-OH]-Cit-(C8: 1)-(C10: 1) 2[Cad-OH]-Cit- 2(C9: 1)	640,8097	641,5638	19,87	5,71
2[Cad-OH]-Cit-(C8: 0)-(C10: 0)	644,8415	645,5188	14,18	0,55
2[Cad-OH]-Cit-(C9: 1)-(C10: 1)	654,8363	655,0215	11,43	0,77
2[Cad-OH]-Cit-(C9: 0)-(C10: 0)	658,8681	659,5221	16,28	0,27
2[Cad-OH]-Cit-(C11: 1)-(C10: 1)	682,8896	685,2063	22,98	5,08
2[Cad-OH]-Cit-(C12: 0)-(C10: 1)	698,9321	699,5140	21,47	1,22

Figure 47. Identification des flavolipides produits par l'isolat *Flavobacterium* PW 52 par LC-MS. Les structures suivies d'un (1) ont été décrites par (Bodour *et al.*, 2004). L'abondance relative de chaque flavolipide a été déterminée grâce à la mesure de l'aire sous chaque pic correspondant

Le corps hydrophile des flavolipides est composé de deux unités de cadavérine hydroxylée (Cad-OH) liées par liaison amide à une unité d'acide citrique (Cit). Chaque unité de Cad-OH est également liée à un acide gras ramifié de série iso- dont certains portent une insaturation en position Δ2 (**Figure 47**) (Bodour *et al.,* 2004). Parmi les 16 ions identifiés dans cette analyse, 14 semblent correspondre à des flavolipides déjà décrits dans cette précédente étude et ont des masses comprises entre 584 et 682 Da. L'ion 611,5049 m/z [M+H$^+$], qui présente la plus forte abondance (57,05%), ne correspond à aucune structure décrite à ce jour et est élué après 19,87 minutes (**Figure 47**). L'ion 613,5282 m/z [M+H$^+$] présente la masse la plus proche de l'ion à 611,5049 m/z ([M+H$^+$] (2[Cad-OH]-Cit-C7:1-C9:1)) et est élué après 17,29 minutes. Sur la base de leur différence de masse (2 Da), la présence d'une insaturation supplémentaire sur le flavolipide de masse égale à 611,5049 m/z est proposée (2[Cad-OH]-Cit- C7:1-C9:2). La structure correspondant à l'ion 699,5140 m/z n'a également pas été décrite et pourrait correspondre au flavolipide 2[Cad-OH]-Cit-C12:0-C10:1. D'après les abondances relatives observées pour chaque ion d'intérêt, la souche *Flavobacterium* sp. PW 52 semble également produire plus de forme 2[Cad-OH]-Cit-C7:1-C10:1 et/ou 2[Cad-OH]-Cit-C8:1-C9:1 (627,5630 m/z ; 15,21%).

5.2.3. Etude de l'activité anti-amibe des flavolipides produits par *Flavobacterium* sp. PW 52

Les amibes libres jouent un rôle primordial dans la multiplication et la dissémination de *Legionella* dans l'environnement. De fait, ces protozoaires représentent une cible intéressante en traitement de l'eau. Afin d'estimer la capacité de *Flavobacterium* sp. PW 52 à induire un effet sur les amibes, son surnageant de culture a été testé sur la souche *A. castellanii* ATCC 30010. L'effet des composés contenus dans le surnageant sur *A. castellanii* a été évalué par cytométrie de flux en quantifiant le nombre de cellules sous formes trophozoïtes après traitement (**Figure 48 A**). Le surnageant de *Flavobacterium* sp. PW 52 induit une diminution du nombre de trophozoïtes de 30 à 45% (condition NT) en comparaison avec la condition traitée avec du milieu BYE (Ctrl négatif) (**Figure 48 A**).

Afin de déterminer si les flavolipides sont responsables de l'activité observée, le surnageant de *Flavobacterium* sp. PW 52 a été traité aux protéases (100 µg/mL) et a été chauffé à 70 °C et 121 °C pendant 21 minutes (**Figure 48 A**). Les résultats obtenus ne montrent pas de variation significative du pourcentage de trophozoïtes après ces traitements en comparaison avec le surnageant non traité (condition NT). Afin de confirmer l'activité des flavolipides sur *A. castellanii*, l'activité de l'EB obtenu après extraction à l'acétate d'éthyle des composés présents dans le surnageant de culture de *Flavobacterium* sp. PW 52 a été évaluée (**Figure 48 B**).

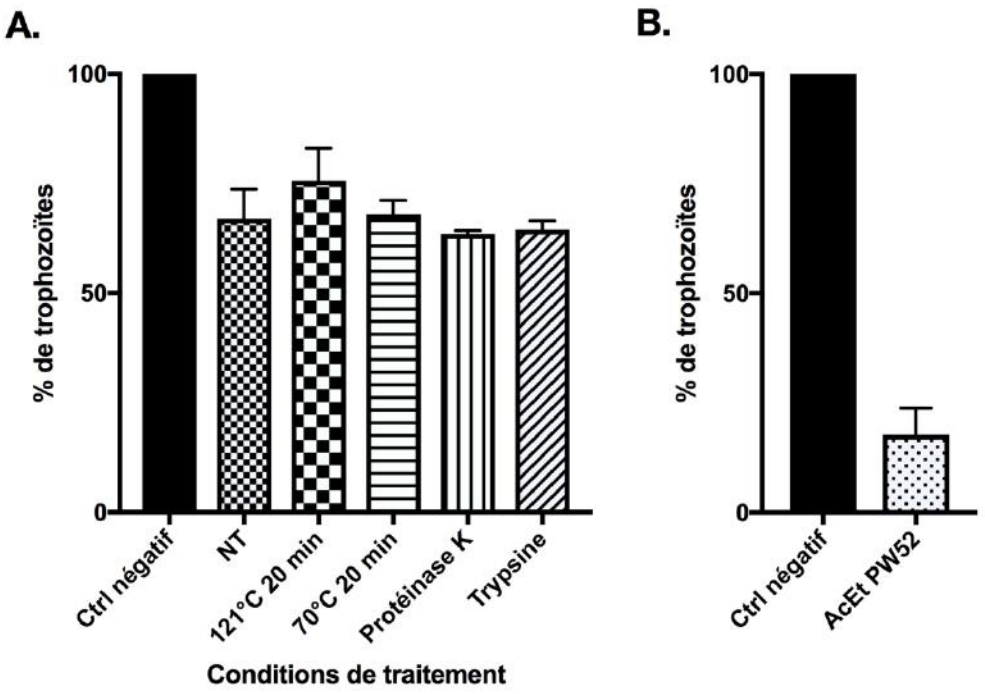


Figure 48. Evaluation de l'effet du surnageant de culture de *Flavobacterium* sp. PW 52 sur *A. castellanii.* (A) Activité anti-amibe du surnageant de culture de *Flavobacterium* sp PW 52. La condition Ctrl négatif a été effectuée en traitant les amibes avec du BYE concentré 10 fois et **(B)** de l'extrait acétate d'éthyle. La condition Ctrl négatif a été réalisée en traitant les amibes avec de l'acétonitrile 50% (v/v).(n = 2)

Les résultats obtenus montrent une diminution de 75% du nombre de trophozoïtes dans la condition traitée avec l'EB (AcEt PW 52) en comparaison avec la condition traitée avec le solvant utilisé pour reprendre l'extrait (Ctrl négatif) (**Figure 48 B**).

L'extrait brut obtenu a par la suite été analysé en HPLC en utilisant le même gradient que précédemment (**Figure 45 A**). L'activité des fractions collectées toutes les 5

minutes au cours de l'analyse a été évaluée contre *A. castellanii* (**Figure 49**). D'après les résultats obtenus, les composés présents dans chaque fraction (notée de 1 à 5) sont capables d'induire une diminution du nombre de trophozoïtes de 60 à 85 % en comparaison avec la condition non traitée (Ctrl négatif) de l'expérience. La fraction F1 correspond au pic d'injection et semble indiquer que certains flavolipides ne sont pas retenus sur la colonne HPLC, suggérant une agrégation de ces composés.

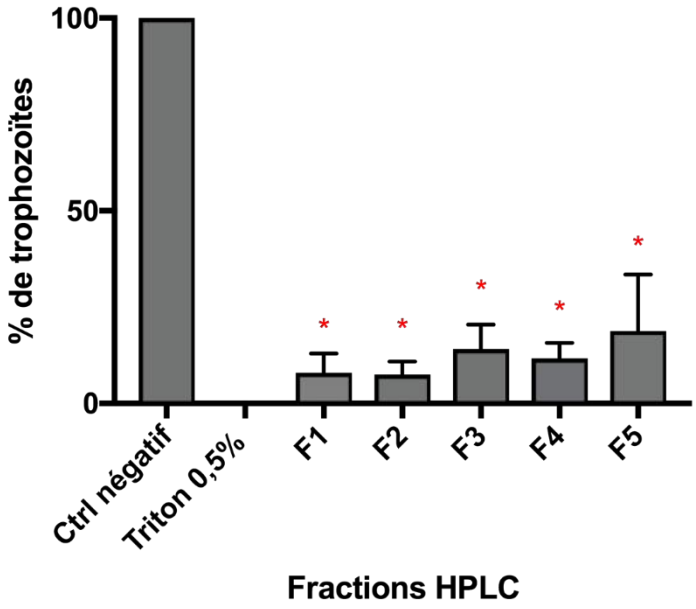


Figure 49. Activité anti-amibe des fractions HPLC collectées après analyse de l'EB de flavolipides produits par *Flavobacterium* sp. PW 52. Le contrôle négatif correspond aux cellules traitées avec 10 µL d'acétonitrile 50%. La condition traitée au triton correspond au contrôle positif de lyse amibienne. Les fractions F1 à F5 ont été obtenues par HPLC en phase inverse en collectant des fractions à l'aveugle toutes les 5 minutes Le chromatogramme obtenu est identique à celui montré en figure 5. Les fractions montrant une activité anti-amibe sont indiquées par une étoile rouge (n = 2)

L'ensemble des résultats indiquent que les flavolipides, une classe de biosurfactants produits par la souche *Flavobacterium* sp. PW 52, ont des propriétés anti-*Legionella* et anti-amibe

Partie 4 : Discussion

Les réseaux d'eaux artificiels fournissent des conditions favorables à la croissance et à la multiplication de nombreux pathogènes opportunistes tels que *L. pneumophila*, l'agent responsable de la légionellose (van Heijnsbergen *et al.,*2015). Ces microorganismes partagent des modes de vies similaires, incluant leur persistance dans les biofilms et leur prolifération dans les amibes (Falkinham, 2015; Lau et Ashbolt, 2009; Ozanic *et al.,*2016). Dans une démarche de santé publique, les réseaux d'eau sont régulièrement nettoyés avec des désinfectants chimiques (ex/ chlore, monochloramine). Toutefois, ces biocides ne sont pas complètement efficaces contre ces pathogènes de l'eau, en particulier lorsqu'ils se trouvent associés à des biofilms et à l'intérieur des amibes (Cervero-Aragó *et al.,*2015; Chiao *et al.,*2014). De plus, l'usage de ces biocides conduit à la formation de sous-produits de dégradation (SPDs) dans les réseaux d'eau, dont certains peuvent avoir des effets toxiques sur l'homme et sur les organismes supérieurs aquatiques (Lin *et al.,*2016; Villanueva *et al.,*2004; 2017; Yu *et al.,*2015). En 2008, l'agence européenne des produits chimiques (ECHA) a mis en place la réglementation REACH qui a pour but d'estimer la quantité de substances chimiques utilisées en Europe et d'évaluer les risques associés à ces produits. Cette réglementation encourage également à trouver des méthodes alternatives pour assurer une bonne qualité de l'eau, en limitant le rejet de produits toxiques.

Actuellement, il n'existe pas d'alternative efficace pour traiter les réseaux d'eau potable vis-à-vis des microorganismes néfastes et particulièrement pour le contrôle des légionelles. Récemment, une étude a mis en évidence la capacité d'une souche environnementale de *Bacillus subtilis* à inhiber *L. pneumophila* à travers la production d'un lipopeptide, la surfactine (Loiseau *et al.,*2015). Sa structure amphiphile lui confère des propriétés détergentes au niveau des membranes biologiques et sur les surfaces, faisant de ce composé un outil potentiel dans la lutte biologique contre *L. pneumophila* (Heerklotz et Seelig, 2007; Seydlová et Svobodová, 2008). Dans ce contexte, la surfactine est le premier composé à activité anti-*Legionella* produit par une bactérie pouvant être retrouvée dans l'eau douce.

Les bactéries de l'eau douce dans la lutte biologique contre *L. pneumophila*

Cette thèse avait pour objectif d'explorer le potentiel de souches bactériennes de l'eau douce à inhiber *L. pneumophila* au sein de son microenvironnement, y compris avec son hôte naturel *A. castellanii*. Dans ce contexte, une collection composée de 273 isolats environnementaux provenant de cinq réservoirs d'eaux douces (puits : WW ; piscine : PW ; étang : PoW ; robinet : TW ; rivière : RW) a été constituée. Parmi ces isolats, 178 (65,2%) ont montré une activité contre *L. pneumophila* par test de diffusion en gélose. Ce résultat est en accord avec ceux obtenus par une étude publiée en 2008, décrivant la capacité de bactéries isolées à partir de différents échantillons d'eau de réseaux à inhiber *L. pneumophila* (Guerrieri *et al.,*2008). Dans ce travail, 51 des 75 isolats testés (68%), distribués au sein des phyla Proteobacteria (74/75) et Bacteroidetes (1/75), ont montré une activité contre *L. pneumophila.* Toutefois, la collection décrite dans cette même étude est composée en majorité d'isolats affiliés au genre *Pseudomonas* (75% de leur collection), du phylum Proteobacteria majoritairement obtenu. Les 18 autres isolats de ce travail sont associés aux genres *Stenotrophomonas* (n = 4), *Aeromonas* (n = 2), *Acinetobacter* (n = 8), *Alcaligenes* (n = 2) et *Burkholderia* (n = 1), parmi lesquels 61% ont également montré une activité anti-*Legionella* (Guerrieri *et al.,*2008). Ces résultats ne permettent donc pas d'évaluer le potentiel global des communautés bactériennes d'eau douce, qui sont également constituées de bactéries associées aux phyla Actinobacteria, Bacteroidetes et Firmicutes (Aizenberg-Gershtein *et al.,*2012; Holinger *et al.,*2014; Wu *et al.,*2015).

Au cours du travail décrit dans ce manuscrit, 70/273 isolats (25,6%) ont été affiliés au genre *Pseudomonas*, parmi lesquels 68 (97%) ont montré une activité contre *L. pneumophila*. Les trois autres genres les plus représentés au sein de cette collection sont *Bacillus*, *Flavobacterium* et *Aeromonas* et ont également été trouvés actifs contre *L. pneumophila* dans 95, 52 et 100% des cas, respectivement. En accord avec nos résultats, des bactéries appartenant à ces quatre genres ont déjà été décrites pour leur capacité à inhiber *Legionella* par test de diffusion (Cotuk *et al.,*2005; Guerrieri *et al.,*2008; Loiseau *et al.,*2015). Parmi les autres isolats de cette collection, 20 genres ont été décrits pour la première fois pour leur activité anti-*Legionella* : *Ralstonia*,

Arcicella, *Chryseobacterium*, *Enterobacter*, *Sphingomonas*, *Brevibacillus*, *Kluyvera*, *Sphingobacterium*, *Rahnella*, *Rheiheimera*, *Lysinibacillus*, *Escherichia*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Achromobacter*, *Rhizobium*, *Acidovorax*, *Duganella*, *Arthrobacter*, *Rhodoferax*. Une diversité importante de producteurs anti-*Legionella* a donc été mise en évidence en comparant les résultats d'activité biologique et la phylogénie obtenue à partir des séquences codant l'ARNr 16S. Toutefois, les limites de l'identification bactérienne par séquençage du gène codant l'ARNr 16S conduisent à penser que la diversité des souches de l'eau douce identifiées dans ce travail pourrait être sous-estimée. Des méthodes complémentaires, telles que l'analyse par MLSA, pourraient être grandement informatives sur l'affiliation phylogénétique de chaque espèce au sein d'un même genre bactérien en corrélation avec son activité antimicrobienne. La diversité et l'abondance des bactéries retrouvées dépendent également de la source d'eau à partir de laquelle elles ont été isolées. L'échantillon WW montre la plus grande diversité bactérienne, tandis que l'échantillon TW n'est constitué que de 3 genres bactériens inactifs contre *Legionella* (*Bradyrhizobium*, *Sphingobium*, *Sphingomonas*). Cette faible diversité au sein de l'eau du robinet (TW) est en accord avec l'effet des traitements mis en œuvre dans le processus de potabilisation de l'eau. Enfin, c'est à partir des réservoirs PoW, PW et RW que la très grande majorité (86%) des isolats actifs (156/178 isolats) a été obtenue, bien que la diversité du réservoir WW soit plus importante.

À partir de cette collection, quatre souches bactériennes ont été étudiées plus en détails pour leur capacité à inhiber la croissance de *L. pneumophila*. Une souche de *Pseudomonas* isolée de l'eau de l'étang a été étudiée pour sa capacité à produire des COVs, le genre *Pseudomonas* étant le plus représenté au sein de la collection constituée dans ce travail. Les isolats d'*Aeromonas* spp. étant tous actifs contre *L. pneumophila*, une souche d'*A. bestiarum* a été étudiée pour sa capacité à produire un peptide anti-*Legionella*. Le genre *Flavobacterium* étant connu pour produire des flavolipides, une souche de *Flavobacterium* sp. isolée de l'eau de piscine a été étudiée pour la caractérisation de ces composés et leur implication dans l'activité observée. Enfin, *R. aquatilis* a déjà été décrit pour son activité contre certains phytopathogènes. Toutefois le composé impliqué dans ces activités n'a pas été décrit. Cette souche a donc fait l'objet d'un travail de caractérisation pour son activité anti-*Legionella*.

Les espèces de *Pseudomonas* produisent des composés organiques volatiles et des biosurfactants

La distribution phylogénétique des 70 isolats de *Pseudomonas* déterminée à partir du gène codant pour l'ARNr 16S a permis d'assimiler 58 isolats à 11 groupes de *Pseudomonas* phylogénétiquement distincts : groupe *P. chlororaphis* (1/70), groupe *P. putida* (7/70), groupe *P. oleovorans* (1/70), groupe *P. anguilliseptica* (4/70), groupe *P. lutea* (1/70), groupe *P. gessardii* (3/70), groupe *P. straminea* (3/70), groupe *P. syringae* (5/70), groupe *P. corrugata* (1/70), groupe *P. fluorescens* (10/70) et groupe *P. jessenii* (22/70). Les 12 isolats restants ont été assignés aux espèces *P. turukahnsensis* et *P. granadensis*, deux espèces récemment rapportées dans la littérature (Korshunova *et al.,*2016; Pascual *et al.,*2015). Toutefois, le genre *Pseudomonas* est un des genres bactériens les plus complexes compte tenu des 253 espèces décrites à ce jour (Parte, 2018). Des analyses de MLSA sont donc nécessaires pour confirmer la distribution de ces isolats au sein des groupes décrits et pour les identifier au niveau de l'espèce (Gomila *et al.,*2015).

Ces isolats environnementaux de *Pseudomonas* ont été étudiés pour leur capacité à produire deux types de composés actifs contre le genre *Legionella* : des composés organiques volatiles (COVs) et des biosurfactants. Dans ce contexte, ce travail a permis de montrer que les phénotypes de production de COVs ou de biosurfactants n'étaient pas restreints à un groupe phylogénétique de *Pseudomonas*. En effet, un grand nombre de microorganismes provenant de divers écosystèmes sont capables de produire des COVs. Toutefois, la composition de chacun de ces volatilomes et la quantité de chaque composé émis dépendent d'un grand nombre de facteurs incluant l'espèce bactérienne étudiée et ses conditions de culture (Garbeva *et al.,*2014a; 2014b). Concernant la production de biosurfactants, les bactéries du genre *Pseudomonas* sont connues pour produire des rhamnolipides et des lipopeptides, qui ont déjà été étudiés dans un contexte de lutte anti-*Legionella* (Loiseau, 2015; Müller *et al.,*2012; Raaijmakers *et al.,*2010).

- **Le 1-undécène, le 2-tricanone et le 2-undécanone inhibent L. pneumophila par voie aérienne**

Parmi les 70 isolats de *Pseudomonas* contenus dans la collection environnementale, 24 isolats (34%) ont montré une inhibition totale de *Legionella* par test d'antagonisme, suggérant une inhibition corrélée à la production de COVs. Ces isolats sont distribués dans l'ensemble des groupes précédemment décrits, à l'exception du groupe *P. oleovorans,* qui ne comprend qu'un seul isolat inactif. Ces souches ont été retrouvées à 71% dans l'échantillon PoW, à 12,5% dans les échantillons RW et PW et à 4% dans l'échantillon WW. Bien que l'eau de l'étang contienne le plus grand nombre d'isolats présentant ce phénotype d'inhibition, la diversité au sein de cet échantillon semble limitée aux groupes *P. jessenii* et fluorescens. D'après ces résultats, il ne semble pas y avoir de lien entre la distribution phylogénétique des *Pseudomonas* et leur capacité à produire des COVs.

Afin de caractériser les COVs produits par les bactéries du genre *Pseudomonas*, la souche de référence de *P. fluorescens* MFE01 a été utilisée. En séparant physiquement les souches MFE01 et *L. pneumophila* Lens-GFP, l'inhibition par voie aérienne a pu être confirmée et quantifiée par mesure de la fluorescence émise par la bactérie cible. Une analyse en GC-MS des composés produits par cette souche a ensuite permis d'identifier un mélange de trois composés volatiles, le 1-undécène, le 2-tridécanone, 2-undécanone, qui ont déjà été décrits pour être produits par les bactéries du genre *Pseudomonas* (Labows *et al.,*1980). En utilisant la même démarche, nous avons pu confirmer que la souche environnementale *Pseudomonas* sp. PW 329, affiliée au groupe *P. straminae*, produisait également ces composés avec des abondances similaires à celles obtenues pour MFE01. De plus des tests réalisés avec des standards ont montré que ces molécules avaient individuellement une activité anti-*Legionella* même si la quantification de cette activité est difficile à réaliser.

Dans le but d'identifier les gènes impliqués dans la production de ces composés actifs contre *L. pneumophila*, des expériences de mutagénèse aléatoire par transposition ont été effectuées sur la souche MFE01. De cette manière, 6 mutants ayant perdu la capacité d'inhiber à longue distance la souche *L. pneumophila* Lens-GFP ont été

identifiés. Parmi ces souches, les mutants 3H5 et 3H8 montraient une perte totale d'activité. L'analyse des séquences contenant le transposon à par la suite indiquée que le gène cible chez ces deux mutants présentait une identité de 93% avec la séquence du gène *trpE* codant une sous-unité de l'anthranilate synthase chez *P. fluorescens* Pf0-1. Actuellement, il n'existe aucune donnée sur le rôle de l'anthranilate synthase chez *P. fluorescens*. En revanche, des travaux réalisés chez *P. aeruginosa* ont montré que le gène *trpE* était impliqué dans la synthèse du tryptophane chez cette espèce (Essar *et al.,*1990). Afin de vérifier le rôle du gène *trpE* dans la production des COVs anti-*Legionella*, une délétion de ce gène chez la souche MFE01 a été réalisée (ΔTrpE). Toutefois, l'analyse du phénotype de ce mutant a montré qu'il possédait toujours la capacité d'inhiber *L. pneumophila* Lens par la production de COVs.

L'ensemble de ces résultats peuvent suggérer **(1)** une régulation métabolique de la souche ΔTrpE en absence du gène codant pour l'anthranilate synthase, permettant ainsi de restaurer le phénotype d'inhibition et/ou **(2)** la formation d'un décalage du cadre de lecture de l'opéron *trp* par le transposon chez la souche 3H5, conduisant à une diminution de l'abondance de COVs produits chez MFE01. Afin de confirmer ces hypothèses, une cinétique de la production des COVs chez la souche MFE01 et ses mutants 3H5 et ΔTrpE a été réalisée par GC-MS. L'analyse des COVs pour le mutant 3H5 indique une diminution de l'abondance des 3 composés principaux identifiés chez la souche MFE01 (1-undécène, 2-Tridécanone, 2-Undecanone), suggérant que ces composés ne sont pas produits suffisamment pour inhiber *L. pneumophila*. De plus, l'analyse de la production de ces composés chez la souche ΔTrpE indique une production de COVs similaire à celle observée pour MFE01.

Chez *Pseudomonas* spp., la production d'un grand nombre de métabolites secondaires et d'exoenzymes dépend du système à deux composants Gac. Ce système est composé d'une histidine kinase membranaire GacS et d'un régulateur de réponse cytoplasmique GacA (Cheng *et al.,*2013). Plusieurs études ont montré que la production de métabolites secondaires était réprimée en utilisant des mutants des gènes *gacS* ou *gacA* (Zuber *et al.,*2003). Chez *P. fluorescens*, il a récemment été montré que la production de 1-undécène était également régulée par ce système (Cheng et al, 2016). Ces observations ont également été faites pour plusieurs autres

COVs produits par *Pseudomonas* spp. (Aarons *et al.,*2000 ; Duffy et Defago, 2000; Hassan et al, 2010; Han et al; 2006, Ossowicki et et., 2017). En 2009, il a été proposé que la mutation du gène *gacA* chez *P. aeruginosa* induisait une surexpression des gènes *trpG*, *trpD* et *trpC.* Ces trois gènes sont organisés en opéron chez *Pseudomonas* et sont impliqués dans la biosynthèse du tryptophane (Brencic *et al.,*2009). La régulation de cet opéron est contrôlée par une séquence d'atténuation située en position 5' en amont des gènes *trpGDC* (Merino *et al.* 2008). Chez *P. aeruginosa*, le gène *trpE* se situe juste en amont de l'opéron *trpGDC* (Merino *et al.,*2008). En tenant compte du fait que la production de 1-undecène chez *P. fluorescens* semble régulée par le système Gac et qu'une mutation du gène *gacA* induit la transcription de l'opéron *trpGDC* chez *P. aeruginosa*, il est probable que l'insertion du transposon dans le gène *trpE* ait induit un décalage du cadre de lecture suffisant pour modifier la séquence d'atténuation de l'opéron *trpGDC*. Afin de confirmer si la perte du phénotype anti-*Legionella* est liée à un décalage du cadre de lecture de l'opéron *trp* chez la souche 3H5, le séquençage du génome des mutants 3H5 et ΔTrpE sera prochainement réalisé.

Bien que l'inhibition de *Legionella* par certains COVs ait pu être confirmée, d'autres travaux sont nécessaires pour comprendre leur mécanisme d'action sur *Legionella*. Il existe à ce jour peu de données sur le rôle des COVs dans les interactions bactérie-bactérie (Schulz et Dickschat, 2007). Certaines études suggèrent que les COVs émis par les bactéries peuvent influencer certains phénotypes bactériens tels que la morphogenèse des colonies, la formation de biofilm et la production de pigment (Bernier *et al.,*2011; Kaddes *et al.,*2016; Létoffé *et al.,*2014). Plusieurs espèces de *Pseudomonas* et de *Bacillus* sont connues pour produire des COVs dont l'activité biologique a été mesurée contre certains phytopathogènes (Raza *et al.,*2016 a; Raza *et al.,*2016 b; Xle *et al.,*2018; Rajer *et al.,*2017). Une étude récente a notamment mis en évidence que deux souches de *B. amyloliquefaciens* et *B. artrophaeus* montraient une forte activité contre *R. solanacearum* à travers la production de benzaldéhyde, de 1,2-benzisotiazol-3(2H)-one et de 1,3-butadiène (Tahir *et al.,*2017). L'étude du mode d'action de ces composés sur *R. solanacearum* a permis de mettre en évidence que ces COVs induisaient des modifications importantes de la morphologie cellulaire chez cette bactérie. Afin de montrer *si P. fluorescens* MFE01 induit également ce type de

modification chez *L. pneumophila*, des observations de cette bactérie par microscopie électronique après une exposition de la souche MFE01 seront prochainement réalisées.

- **Sensibilité spécifique de *L. pneumophila* aux biosurfactants produits par des souches de *Pseudomonas* sp.**

Parmi les isolats de *Pseudomonas*, 43 ont montré la présence d'un halo d'inhibition sur *L. pneumophila*, suggérant la production de composés diffusibles actifs.

La caractérisation de ces composés n'a pas été menée au cours de cette thèse, mais un travail réalisé précédemment au laboratoire en a fait l'objet à partir de souches de *Pseudomonas* environnementales et cliniques (Loiseau, 2015). Les 20 souches environnementales et cliniques utilisées dans cette précédente étude sont distribuées au sein de 4 groupes de *Pseudomonas* phylogénétiquement distincts à l'exception de la souche DSS73 dont l'espèce n'est pas connue : groupe *P. aeruginosa* (3 *P. aeruginosa*, 1 *P. otidis*), groupe *P. fluorescens* (5 *P. fluorescens*, 1 *P. libaniensis*), groupe *P. putida* (4 *P. putida*, 3 *P. fulva*), groupe *P. syringae* (2 *P. syringae*). Dans cette collection, 13 souches de *Pseudomonas* (65%) assignées aux espèces *P. aeruginosa*, *P. otidis*, *P. fluorescens*, *P. putida* et *P. syringae* ont montré une activité anti-*Legionella* à travers la production de biosurfactants (Müller *et al.,*2012; Raaijmakers *et al.,*2010). D'après les résultats obtenus pour chaque souche étudiée, *P. aeruginosa* et *P. otidis* produisent des mélanges de rhamnolipides tandis que *P. fluorescens*, *P. putida* et *P. syringae* produisent des lipopeptides.

Valorisation d'*Aeromonas* spp. comme source de peptides anti-*Legionella*

Le genre *Aeromonas* est largement distribué au sein des communautés microbiennes d'eaux douces tels que les rivières, les lacs, les étangs ou les réseaux d'eau (Figueira *et al.,*2011; Khor *et al.,*2015). Dans la collection constituée lors de ce travail de thèse, 19 isolats ont été affiliés au sein du genre *Aeromonas* et semblent, d'après la phylogénie obtenue à partir des séquences 16S, affiliés à plusieurs espèces. De façon intéressante, tous ces isolats ont montré une activité contre *L. pneumophila* Lens par test de diffusion. Ce résultat est en accord avec ceux d'une étude décrivant l'activité

de 33 isolats d'*Aeromonas* sp. appartenant aux espèces *A. caviae*, *A. hydrophila* et *A. sobria*, sur la croissance de *Legionella* (Toze *et al.,*1994). Dans leur travail, 97% des isolats testés ont été trouvés actifs contre la souche *L. pneumophila* Philadelphia et 76% ont montré également une activité contre *L. longbeachae.* De plus, l'ensemble des isolats d'*Aeromonas* a montré une activité contre les autres espèces de *Legionella* testées dans cette étude. D'autre part, S. Toze a montré que des souches *A. caviae*, *A. hydrophila* et *A. sobria*, ne présentaient pas d'activité contre les souches *P. aeruginosa*, *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus*, et *K. pneumoniae*, suggérant une activité spécifique sur le genre *Legionella* (Toze *et al.,*1994).

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à la caractérisation du composé inhibiteur produit par l'isolat d'*A. bestiarum* (PoW 257), identifié par analyse MLSA et provenant de l'eau d'un étang à poissons. Cette espèce n'a été jusqu'à présent que peu étudiée dans un contexte de diversité au sein des environnements aquatiques et sa distribution au sein de ces écosystèmes reste, par conséquent, mal connue. Toutefois, une étude a récemment mis en évidence qu'*A. bestiarum* est une espèce fréquemment retrouvée dans les eaux douces naturelles (Baron *et al.,*2017).

Afin d'identifier la nature chimique du composé impliqué dans l'activité, le surnageant de culture *d'A. bestiarum* PoW 257 a été traité en présence de protéinase K et de trypsine, deux endoprotéases capables de couper les liaisons peptidiques au niveau du groupement carboxyle de certains acides aminés. L'activité du composé est apparue diminuée après traitement aux protéases, mais n'a pas été affectée lors du chauffage du surnageant de culture à 121 °C. Ces résultats suggèrent que ce composé actif contre *Legionella* est un peptide. Afin de confirmer cette hypothèse, le composé a été précipité au sulfate d'ammonium, selon une procédure habituellement utilisée dans la purification de bactériocines produites par le genre *Lactobacillus* (Song *et al.,*2014). Après analyse de la fraction précipitée par HPLC en phase inverse, la fraction éluée retenant l'activité anti-*Legionella* a été analysée par spectrométrie de masse. Le composé impliqué dans l'activité présente une masse de 3714 Da et a été nommé bestiaricine, en lien avec l'espèce *A. bestiarum* qui le produit. Toutefois, des analyses supplémentaires par spectrométrie de masse et par séquençage N-terminal

d'Edman sont nécessaires pour déterminer la séquence peptidique de la bestiaricine. Enfin, la structure secondaire de ce peptide sera évaluée par dichroïsme circulaire.

Par la suite, des expériences devront être menées pour déterminer son mécanisme d'action sur *L. pneumophila*. Afin de confirmer la sensibilité spécifique des bactéries du genre *Legionella* à ce composé, un spectre d'activité sera également réalisé sur des souches non-*Legionella* fréquemment retrouvées dans les écosystèmes d'eaux douces.

L'aquabactine, un sidérophore de type catécholate, agit comme composé anti-*Legionella*

Dans ce travail, une souche de *R. aquatilis* isolée d'un étang à poissons (PoW) a été étudiée pour sa capacité à inhiber *L. pneumophila* à travers la production d'un sidérophore, l'aquabactine.

R. aquatilis est une bactérie à Gram négatif de la famille des *Enterobacteriaceae* retrouvée principalement dans les eaux douces et dans les sols (El-Hendawy *et al.,*2003; Izard *et al.,*1979; Martinez *et al.,*2012). Ce genre bactérien a jusqu'alors été étudié pour son implication dans de rares cas cliniques chez des sujets immunodéprimés (Alballaa *et al.,*1992; Harrell *et al.,*1989; Kuzdan *et al.,*2015). Plus récemment, des travaux ont également montré le potentiel de *R. aquatilis* à favoriser la croissance de certaines plantes et à lutter contre certains phytopathogènes bactériens tels que *Xanthomonas campestris* et *Agrobacterium tumefaciens* (El-Hendawy *et al.,*2005; Li *et al.,*2014). Toutefois, les composés impliqués dans ces activités n'ont pas été caractérisés.

Dans les conditions de notre étude, *R. aquatilis* PoW 265 produit un composé anti-*Legionella* thermorésistant. Cette souche a également la capacité de produire un sidérophore montré par une réaction positive au test universel au ChromeAzurol (CAS), dont la fonction première est de piéger les ions ferriques (Fe (III)) contenus dans le microenvironnement du microorganisme qui le produit (El-Hendawy *et al.,*2003).

Les résultats obtenus dans ce travail montrent que l'activité anti-*Legionella* du surnageant de culture de *R. aquatilis* PoW265 est plus importante après une croissance en milieu BYE non complémenté en fer. Ce résultat est en corrélation avec la quantité de sidérophore produite au cours de la croissance de *R. aquatilis* en milieu carencé en comparaison avec celle d'un milieu complémenté en pyrophosphate de fer III. L'ensemble de ces résultats suggère une régulation de l'activité anti-*Legionella* par le fer ou une action directe de la molécule sur *L. pneumophila*. En tenant compte de l'importance de cet élément dans la croissance et le processus d'infection de *Legionella*, et de sa capacité à produire son propre sidérophore, la légiobactine, ces résultats laissent à penser que l'aquabactine pourrait jouer un rôle dans la compétition pour l'acquisition du fer. Ce questionnement suggère **(1)** que l'aquabactine possèderait une plus forte affinité pour le Fer III que la légiobactine, expliquant alors une lutte nutritionnelle pour cet élément, et/ou **(2)** que l'aquabactine utiliserait un récepteur membranaire de la membrane externe de *L. pneumophila*, avant d'être libéré à l'intérieur de la cellule comme composé inhibiteur ou régulateur du métabolisme du fer ou finalement **(3)** que l'aquabactine induirait une lyse membranaire chez *L. pneumophila*.

Afin de mieux comprendre le mécanisme d'action de l'aquabactine sur l'inhibition de croissance de *L. pneumophila*, un protocole de purification de ce sidérophore, basé sur la chromatographie d'affinité sur ions ferriques immobilisés (IMAC-Fe^{3+}), a été développé au cours de ce travail. Cette méthode a permis d'enrichir les composés chélateurs de fer (III) contenus dans le surnageant de *R. aquatilis* PoW265 et a très récemment montré son intérêt dans la purification des sidérophores de type catécholate (Li *et al.,*2018). Cet enrichissement a permis de confirmer que l'extrait enrichi en chélateurs de fer ferrique conservait l'activité anti-*Legionella*. Par la suite la purification de ce composé par chromatographie en phase inverse a permis de montrer que l'activité anti-*Legionella* n'est pas liée à un mélange de composés chélateurs de fer (III) mais bien à l'action de l'aquabactine purifiée.

Son analyse par spectrométrie de masse a mis en évidence une structure proche de l'entérobactine, un sidérophore initialement décrit chez *E. coli* et produit par un grande nombre d'entérobactéries (Bister *et al.,*2004; O'Brien et Gibson, 1970). Ces

données n'ont toutefois pas permis de conclure sur la structure de l'aquabactine mais indiquent, grâce aux connaissances sur la fragmentation de l'entérobactine, qu'il s'agit d'un sidérophore de type catécholate (Berner *et al.,*1991). Cette constatation est également complétée par le fait que les genres *Rahnella* et *Escherichia* sont proches d'un point de vue taxonomique (*Enterobacteriaceae*) et partagent des similarités dans leurs mécanismes d'acquisition du fer (Carpenter et Payne, 2014).

Des résultats complémentaires obtenus dans ce travail ont également montré que 1 mg/mL d'entérobactine sous forme purifiée n'avaient pas d'activité contre *Legionella* par test de diffusion. *A contrario*, nous avons montré que *R. aquatilis* PoW 265 était capable d'inhiber la souche *E. coli* DH5α, laissant penser que l'aquabactine présente une spécificité structurale responsable de l'activité observée contre *E. coli* et contre *L. pneumophila*. Les entérobactéries sont notamment décrites pour produire des peptides-sidérophores appelés microcines (Rebuffat, 2012; Vassiliadis *et al.,*2010). Ces composés hybrides sont connus pour cibler les bactéries à Gram négatif dans l'environnement par un mécanisme de type « Cheval de Troie » et sont composés d'un sidérophore de type salmocheline (entérobactine glycosylée) conjugué à un court peptide antimicrobien (Bilitewski *et al.,*2017; Thomas *et al.,*2004). D'après nos premiers résultats obtenus par spectrométrie de masse, l'aquabactine ne semble pas partager cette spécificité structurale. De plus, les microcines sont reconnues à la surface des bactéries à Gram négatif par des récepteurs TonB dépendants, qui vont permettre l'entrée du composé dans l'espace périplasmique de la bactérie cible (Mathavan et Beis, 2012). Toutefois, il n'existe pas de gène codant pour ce type de transporteur chez *L. pneumophila*. En effet, l'import du fer ferrique à travers la membrane externe de *L. pneumophila* est gouverné par les protéines transmembranaires LbtU et LbtP , deux récepteurs TonB-indépendants récemment décrits dans la littérature (Chatfield *et al.,*2011; O'Connor *et al.,*2016). Des analyses supplémentaires par spectrométrie de masse et par résonance magnétique nucléaire (RMN) devront être mises en œuvre pour confirmer la structure de l'aquabactine, de même que pour mieux comprendre son mécanisme d'action. Afin de déterminer si l'aquabactine induit la perméabilisation de *L. pneumophila*, une analyse par cytométrie en flux après marquage à l'iodure de propidium pourra également être réalisée.

Bien qu'une inhibition de croissance de *L. pneumophila* ait déjà été observée en présence de 30 µM de deferoxamine mesylate (sidérophore de type hydroxamate produit par *Streptomyces pilosus*) , ce travail montre pour la première fois l'activité d'un sidérophore de type catécholate sur *Legionella* (Goldoni *et al.,*1991).

Les flavolipides, un groupe de biosurfactants peu exploré pour son potentiel antimicrobien

Le genre *Flavobacterium* est facilement retrouvé dans les réseaux d'eau potable et fait partie des genres les plus souvent retrouvés en corrélation avec la présence de *Legionella* dans ces environnements (Stojek et Dutkiewicz, 2011). Au sein de la collection constituée dans ce travail, 27 isolats ont été assignés à ce genre par séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S. Parmi ces isolats, seuls 51% d'entre eux sont capables d'inhiber *L. pneumophila* par test de diffusion. Ce pourcentage est en accord avec certaines données de la littérature décrivant à la fois l'impact positif et négatif de la présence de *Flavobacterium* sur la croissance de *L. pneumophila*. Des travaux ont montré l'impact positif de *F. breve* sur la croissance satellite de *L. pneumophila* en conditions de laboratoire. Ces auteurs ont notamment suggéré que *F. breve* apportait des nutriments essentiels à la croissance de *Legionella* (Wadowsky et Yee, 1983). Une autre étude a montré la persistance de *Legionella* au sein de monobiofilms formés par *Flavobacterium* sp*.* et à l'intérieur de biofilms mixtes (Murga *et al.,*2001; Stewart *et al.,*2012). La présence de *Flavobacterium* au sein du microenvironnement de *Legionella* et de son hôte naturel, *A. castellanii*, stimulerait également la réplication de *Legionella* à l'intérieur de ces cellules (Declerck *et al.,*2005). A l'inverse, une étude a montré l'impact négatif d'un isolat de *Flavobacterium* sp. sur la croissance de *Legionella* par test de diffusion (Guerrieri *et al.,*2008). Enfin des travaux ont montré des variations dans la capacité de *Flavobacterium* à former des biofilms, en fonction de la souche de *Flavobacterium* étudiée (Basson *et al.,*2008).

D'après l'analyse phylogénétique associée à ce travail, nos isolats, parmi lesquels 70% proviennent de l'eau du puits (WW), sont taxonomiquement proches des espèces *F. psychrolimnae* (6/27), *F. pectinovorum* (11/27), *F. araucananum* (1/27), *F.*

granuli (6/27). Toutefois, deux isolats de *Flavobacterium* n'ont pas pu être affiliés à une espèce proche. Les isolats phylogénétiquement proches des espèces *F. psychrolimnae*, *F. araucananum* et *F. granuli* ont été isolés exclusivement à partir de l'échantillon WW et représentent au total 26% des isolats de *Flavobacterium* contenus dans cette collection. D'après ces mêmes résultats, il ne semble pas exister de lien entre la distribution taxonomique associée aux isolats de *Flavobacterium* sp*.* et leur capacité à inhiber *Legionella*.

Afin de caractériser les composés impliqués dans l'activité anti-*Legionella*, l'isolat *Flavobacterium* sp. PW52 a été sélectionné pour la suite du travail. Les composés contenus dans le surnageant de culture actif de cette souche sont apparus résistants à l'action de protéases et à la température. De même, certains composés présents dans ce surnageant ont la propriété de diminuer la tension de surface, indiquant que des biosurfactants pouvaient être responsables de l'activité anti-*Legionella* observée. En accord avec ces résultats, le genre *Flavobacterium* est connu pour produire des flavolipides, un groupe de biosurfactants qui a été caractérisé en 2004 (Bodour *et al.,*2004). Ces biosurfactants présentent une originalité de structure par rapport aux composés de ce type déjà décrits. En effet, les flavolipides sont des composés amphiphiles formés d'une partie polaire constituée d'une molécule d'acide citrique et de deux molécules de cadavérine hydroxylée et d'une partie hydrophobe constituée de deux acides gras de longueurs variables (Bodour *et al.,*2004). Toutefois, ces composés n'ont jamais fait l'objet d'étude sur leur rôle en tant que composés antimicrobiens.

En suivant l'hypothèse que les composés anti-*Legionella* produits par *Flavobacterium* sp*.* PW52 étaient des flavolipides, une extraction de ces molécules à l'acétate d'éthyle a été réalisée. L'extrait obtenu conserve l'activité contre *L. pneumophila*, renforçant l'hypothèse que les flavolipides sont responsables de l'activité observée. Cet extrait a également montré une activité contre la souche amibienne *A. castellanii* sous sa forme trophozoïte. Une analyse par HPLC en phase inverse a confirmé la présence d'un mélange de composés actifs dans l'extrait organique. Toutefois, les flavolipides ne possèdent pas de propriété d'absorption permettant leur suivi à l'aide d'un détecteur UV, et sont souvent co-élués en HPLC, rendant leur isolement et donc

l'étude des espèces isolées plus complexe. Pour cette raison, les flavolipides contenus dans l'extrait organique issu du surnageant de culture de *Flavobacterium* sp. PW52 ont été analysés directement en couplage LC-MS. Ces résultats ont permis de confirmer la présence d'un mélange de 16 flavolipides dont les masses sont comprises entre 584 et 682 Da. Cependant, des analyses complémentaires en spectrométrie de masse doivent être effectuées pour confirmer ces structures. Bien qu'un seul isolat environnemental ait été utilisé pour la caractérisation de ces composés, les résultats obtenus par Adria A. Bodour en 2004 semblent confirmer le fait que la composition des mélanges de flavolipides est dépendante de la souche de *Flavobacterium* étudiée (Bodour *et al.,*2004).

S'appuyant sur le fait que les flavolipides sont des composés tensioactifs, un mécanisme d'action basé sur une lyse membranaire est proposé. Cette idée est également renforcée par la connaissance du mode d'action d'autres types de biosurfactants sur les membranes biologiques (Mnif et Ghribi, 2015). *L. pneumophila* possède également certaines particularités membranaires pouvant expliquer sa grande sensibilité aux détergents (Verdon *et al.,*2011). De plus, les résultats obtenus par cytométrie en flux sur l'amibe modèle *A. castellanii* montre une diminution du nombre de cellules sous forme trophozoïte après traitement avec un extrait contenant des flavolipides. Cette observation est accompagnée d'une augmentation de la proportion en débris cellulaires, confortant l'hypothèse d'une lyse amibienne. La perméabilité cellulaire induite par la présence de flavolipides pourra être confirmée par l'utilisation d'un marqueur de lyse cellulaire, tel que le SYTOX™ Green, qui a déjà été utilisé pour la mesure de ce type d'activité chez *A. castellanii* (Schlusselhuber *et al.,*2015).

Bilan sur la diversité de souches bactériennes anti-*Legionella* dans l'eau : vers une lutte biologique pour l'application de nouveaux traitements de l'eau

A travers ce travail, des souches appartenant à 24 genres bactériens couramment retrouvés au sein du microenvironnement de *L. pneumophila* ont été identifiées comme producteurs de composés anti-*Legionella*. Certains d'entre eux, notamment les genres *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Flavobacterium* et *Aeromonas*, ont déjà été décrits

pour leur capacité à inhiber la croissance de *Legionella* (Cotuk *et al.,*2005; Guerrieri *et al.,*2008; Loiseau *et al.,*2015). Toutefois, à l'exception de la surfactine produite par *B. subtilis*, les composés produits par ces souches antagonistes n'ont, à ce jour, pas été caractérisés. D'après les résultats obtenus dans ce travail, le microenvironnement de *Legionella* semble fournir une boîte d'outils biologiques suffisante pour lutter contre ce pathogène et éventuellement contre son hôte naturel, *A. castellanii*. De plus, certains composés identifiés, en particulier les biosurfactants, pourraient montrer un potentiel supplémentaire dans l'élimination de certains biofilms contenant *L. pneumophila* et d'autres pathogènes opportunistes de l'eau. Ce dernier paragraphe rassemble l'ensemble des données obtenues au cours de ce travail sur l'activité de composés trouvés au sein de la niche écologique de *Legionella*, susceptibles de participer à la lutte biologique contre ce pathogène (**Figure 50**).

Les bactéries des genres *Flavobacterium* et *Pseudomonas* sont fréquemment retrouvées en association avec *Legionella*, de même que les *Bacillus* sont facilement trouvés dans les eaux naturelles (Brillard *et al.,*2015; Stojek et Dutkiewicz, 2011; Vaz-Moreira *et al.,*2012). Ces genres bactériens sont connus pour produire des lipopeptides, de rhamnolipides ou des flavolipides, trois groupes de biosurfactants, partageant des mécanismes d'action similaires sur *Legionella* **(Figure 50)**.

Les mélanges de lipopeptides produits par le genre *Pseudomonas* ont montré des concentrations minimales inhibitrices (CMI) allant de 180 µg/mL à 760 µg/mL envers les souches de *L. pneumophila* de différents sérogroupes. Ces CMI sont de 90 à 610 µg/mL pour les *Legionella* non *pneumophila*. À ces concentrations, ces mélanges de lipopeptides n'ont pas d'activité sur les autres genres bactériens testés, incluant des bactéries à Gram positif et à Gram négatif, comme *K. pneumoniae*, *F. breve*, *P. aeruginosa* ou encore *A. hydrophila*, fréquemment retrouvées à l'intérieur de biofilms formés par les communautés microbiennes d'eau douce. Certains lipopeptides produits par *P. fluorescens* (anikasine) ont également montré une activité amibicide sur *Polysphondylium violaceum* (Götze *et al.,*2017).

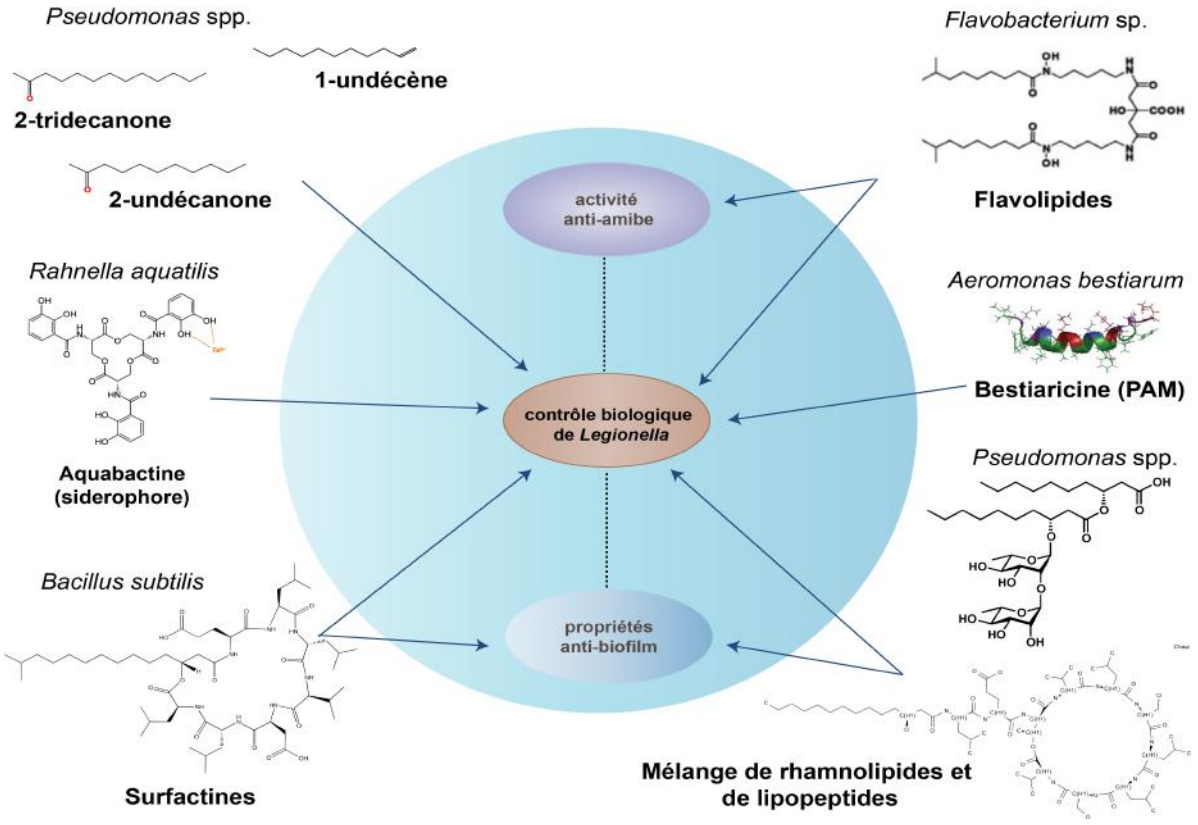


Figure 50. Bilan des composés produits par des bactéries environnementales de l'eau douce pour une lutte biologique contre *L. pneumophila*. Les bactéries issues de l'eau douce produisent divers composés pouvant agir sur *L. pneumophila* ou sur son hôte, *A. castellanii*. Ces composés caractérisés sont des peptides actifs (bestiaricine), des biosurfactants (rhamnolipides, lipopeptides, flavolipides), des sidérophores (aquabactine) ou encore des composés organiques volatiles (1-undécène, 2-undécanone, 2-tridécanone).

La surfactine produite par la souche *B. subtilis* AM1 possède une CMI de 3 à 4 µg/mL envers les souches de *L. pneumophila* testées. À une concentration de 66 µg/mL, ce composé a également montré son potentiel dans l'élimination de biofilm de *Legionella* préformés (Loiseau *et al.,*2015). D'autres travaux ont également rapporté l'activité antiadhésive de lipopeptides produit par le genre *Pseudomonas* (Janek *et al.,*2012).

En ce qui concerne les extraits de rhamnolipides, leur CMI est comprise entre 0,5 et 8 µg/ mL pour les souches non-*pneumophila* et entre 0,5 et 15 µg/ml pour les espèces *pneumophila* (Sg1, Sg3, Sg5, Sg6). Parmi les autres souches testées, les mélanges de rhamnolipides sont actifs contre *B. subtilis* entre 40 et 100 µg/mL selon la souche de *Pseudomonas*.

Dépendamment de la souche productrice, une activité peut également être observée chez d'autres bactéries, productrices de biosurfactants, retrouvées dans l'eau, incluant *F. breve* (80 µg/mL) et *K. pneumoniae* (160 µg/mL). Ces résultats sont encourageants concernant *F. breve* qui a déjà montré favoriser la croissance de *Legionella* en laboratoire (Wadowsky et Yee, 1983). Ces composés n'ont pas été testés contre un hôte naturel amibien de *Legionella* permettant sa réplication. Toutefois, un travail a déjà fait référence à l'implication des rhamnolipides produits par une souche de *Pseudomonas aeruginosa* contre l'amibe *D. discoideum* (Cosson *et al.,*2002). Enfin, les propriétés anti-biofilm des rhamnolipides ont également été confirmées chez plusieurs producteurs bactériens et contre divers biofilms (De Rienzo et Martin, 2016; Dusane *et al.,*2012; Irie *et al.,*2005).

Pour finir, les flavolipides, produits en mélange par certaines souches du genre *Flavobacterium*, sont des biosurfactants qui n'ont encore jamais été étudiés pour leur potentiel antimicrobien **(Figure 50)**. Dans ce travail, les flavolipides ont montré leur potentiel contre *L. pneumophila* Lens (Sg1) et contre *A. castellanii*. Toutefois, ces composés n'ont pas été quantifiés au cours de ce travail. Une meilleure caractérisation des flavolipides permettra de confirmer ces résultats afin de pouvoir déterminer les concentrations actives contre ces deux organismes.

Bien que ces composés soient tous actifs contre *Legionella* et présentent une faible cytotoxicité en comparaison à celle de surfactants de synthèse, il est encore difficile

d'estimer leur potentiel dans le traitement de biofilms complexes. En effet, des composés inhibiteurs de la croissance de *Legionella* peuvent également stimuler la croissance d'autres microorganismes. L'idée d'une lutte biologique doit alors être plus globale et mesurer l'effet de ces composés en conditions réelles. Par exemple, la viscosine, un lipopeptide produit par *P. fluorescens* a été montré actif contre les espèces de *Legionella* mais ce composé est également connu pour favoriser la mobilité des *Pseudomonas* et influencer la formation de biofilms (Bonnichsen *et al.,*2015; Loiseau, 2015). Des lipopeptides ont été décrits pour favoriser la formation de biofilm par la souche bactérienne productrice, incluant le massetolide A, la sessiline, la viscosine et la xantholysine (D'aes *et al.,*2014; de Bruijn *et al.,*2008; De Bruijn *et al.,*2007; Li *et al.,*2013). Au contraire, certains lipopeptides tels que l'arthrofactine, l'orfamide et la putisolvine ont été décrits pour inhiber la formation de biofilms (D'aes *et al.,*2014; Kruijt *et al.,*2009; Roongsawang *et al.,*2003). Les rhamnolipides ont été décrits pour avoir un effet sur l'augmentation de l'adhésion de *P. aeruginosa*, mais n'augmentent pas la quantité de biofilm formé (Davey *et al.,*2003). Pour compléter ces données d'activité, ces composés doivent donc être testés en conditions dynamiques, en tenant compte des communautés microbiennes fréquemment retrouvées en corrélation avec la présence de légionelles.

Les communautés bactériennes des eaux douces sont également caractérisées par leur forte proportion d'espèces affiliées au phylum Proteobacteria. Dans ce phylum, des bactéries des genres *Aeromonas* et *Rahnella*, de la famille des Gamma-proteobactéries, ont montré des activités contre *Legionella*, à travers la production d'un peptide anti-*Legionella* (bestiaricine) et d'un sidérophore (aquabactine) **(Figure 50)**. Les structures de ces deux composés ne sont pas complètement déterminées et devront faire l'objet d'un travail complémentaire de caractérisation. Même si leur mode d'action n'est pas élucidé, ces bactéries montrent un potentiel dans l'élimination ciblée de *L. pneumophila* au sein des réseaux d'eau. Enfin, l'aquabactine semble montrer un potentiel dans le contrôle d'un plus large spectre de pathogènes de l'eau, incluant les coliformes et les bactéries du genre *Legionella*. Toutefois, de par sa capacité à fixer les ions ferriques, son action ne semble envisageable que dans des circuits d'eau dépourvus d'acier.

Conclusion générale et perspectives

L'objectif principal de ce travail était de caractériser de nouveaux composés anti-*Legionella* produits par des bactéries environnementales issues d'environnements d'eau douce.

Pour y parvenir, nous avons dans un premier temps évalué l'impact de la flore bactérienne cultivable et revivifiable de cinq réservoirs d'eau douce sur la croissance de *L. pneumophila*. En déterminant l'activité anti-*Legionella* de chaque isolat par test de diffusion, ce travail a pu mettre en évidence la grande biodisponibilité de composés actifs produits par des souches environnementales de l'eau douce.

L'ensemble des bactéries isolées de ces environnements sont affiliés à 4 phyla bactériens fréquemment retrouvés dans ce type d'environnement : Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria. La comparaison entre ces données d'identification bactérienne et les données d'activité biologique laissent à penser qu'une grande diversité de bactéries environnementales produisent des composés anti-*Legionella*. Au total, 20 genres bactériens ont été décrits pour la première fois pour leur activité anti-*Legionella* dans ce travail.

Cette première partie nous a permis d'établir un constat sur le nombre et la diversité de souches bactériennes de l'eau susceptibles de participer à la lutte biologique contre *L. pneumophila*. Toutefois, l'écologie de *L. pneumophila* doit être considérée dans son ensemble afin de mettre en place une lutte biologique efficace. Il est désormais certain que les protistes phagotrophiques, et en particulier les amibes libres, participent à la persistance et à la survie de *Legionella* dans ces environnements. Par conséquent, une évaluation du potentiel anti-amibe de chaque souche bactérienne de l'eau pourra être mise en oeuvre afin d'élargir cette lutte en tenant compte du microenvironnement de *Legionella*.

Après avoir identifié chaque souche environnementale, le deuxième objectif de ce travail de thèse était de purifier et caractériser certains composés anti-*Legionella.* Pour cela, nous nous sommes concentrés sur quatre souches bactériennes appartenant aux genres *Aeromonas*, *Rahnella*, *Flavobacterium* et *Pseudomonas*.

Pour chaque genre bactérien étudié, les composés impliqués dans l'activité anti-*Legionella* observée ont été identifiés et correspondent à des biosurfactants, un peptide, un sidérophore et des composés organiques volatiles. Les différences structurales de ces composés suggèrent que la diversité des mécanismes de compétition naturellement présents dans l'eau est certainement sous-estimée. De plus, cette diversité de composés laisse à penser que la lutte biologique contre *L. pneumophila* n'est pas restreinte à l'utilisation d'un composé en particulier mais qu'elle doit tenir compte de l'écologie chimique globale du microenvironnement de *Legionella*.

De cette façon ce travail a montré que *R. aquatilis*, une entérobactérie qui est fréquemment retrouvée dans les eaux douces, produit un sidérophore dont la structure n'a été que partiellement élucidée. Toutefois, ces travaux semblent indiquer que ce composé actif est un analogue structural de l'entérobactine (Ent), le sidérophore actuellement décrit dans la littérature pour avoir la plus forte affinité pour le fer (III). Dans nos travaux, l'Ent n'induit pas d'effet sur la croissance de *Legionella* en présence de fer. A l'inverse, l'aquabactine produite par *R. aquatilis* montre une inhibition de la croissance de *L. pneumophila* en condition complémentée en Fer. D'autres expériences seront nécessaires pour estimer l'affinité de l'aquabactine pour fer (III). Toutefois, ces données semblent conduire à l'hypothèse que l'aquabactine présente un autre rôle fonctionnel que celui de chélateur de fer dans l'activité biologique observée. Certains sidérophores sont notamment connus pour augmenter la quantité d'espèces réactives à l'oxygène et induisent de cette manière un fort stress oxydatif. D'autres sont décrits pour agir comme antibiotiques en pénétrant les cellules cibles par un mécanisme de type "Cheval de Troie". L'ensemble de ces hypothèses devront par conséquent être évaluées dans la poursuite de ce travail.

Ce travail de thèse a également permis de mettre en évidence la production de peptides à activité anti-*Legionella*. Ces peptides semblent être produits par l'ensemble des souches d'*Aeromonas* spp. issues de notre collection environnementale. Plus particulièrement, nous avons identifié un peptide produit par une souche d'*A. bestiarum*, dont la masse a été estimée à 3714 Da. Même si les

bactéries du genre *Aeromonas* sont connues depuis plusieurs années pour avoir une activité contre *L. pneumophila*, les composés peptidiques associés n'ont jamais été caractérisés. De plus, aucune donnée n'a été publiée jusqu'à présent concernant la production de peptide antimicrobien par *Aeromonas* spp. D'autres expériences sont donc nécessaires pour conduire à la caractérisation de ces peptides, tant au niveau structural que moléculaire.

Une souche de *Flavobacterium* sp. a également été étudiée dans ce travail pour sa capacité à produire un mélange de flavolipides, responsables des activités anti-*Legionella* et anti-amibe observées. Les flavolipides constituent un groupe de biosurfactant peu exploré pour leur activité antimicrobienne. Il n'existe à ce jour dans la littérature qu'une seule étude portant sur la caractérisation structurale de ces composés. Ce travail de thèse a permis pour la première fois de montrer que ces composés ont des propriétés antimicrobiennes. L'étude de leur mode d'action pourra par la suite conduire à leur valorisation en tant qu'agents antimicrobiens.

Enfin, ce travail de thèse a permis de mettre en évidence que certaines souches de *Pseudomonas* spp. pouvaient inhiber *L. pneumophila* à travers la production de molécules organiques volatiles. Nous avons identifié trois composés principalement impliqués dans l'inhibition de *L. pneumophila* : le 1-undécène, le 2-tridécanone et le 2-undécanone. Au niveau moléculaire, nos résultats indiquent que la production de ces composés chez *Pseudomonas* spp. semble être régulée par l'opéron tryptophane (*trp*). Toutefois, cet opéron n'étant pas caractérisé chez les espèces de *Pseudomonas* testées, le séquençage du génome des souches correspondantes devra être réalisé prochainement. Ces expériences pourront nous permettre par la suite de confirmer si la régulation des gènes de l'opéron *trp* est impliquée dans la production de ces composés.

D'un point de vue général, un spectre large d'activité antimicrobienne pourra être réalisée sur chaque composé identifié dans ce travail, en déterminant leur concentration minimale inhibitrice ainsi que la nature de leur activité (bactéricide ou bactériostatique). Pour cela, des méthodes de dosage devront être développées afin de pouvoir quantifier ces composés préalablement. Sur la base de travaux déjà

publiés, la synthèse d'un flavolipide pourra être réalisée et servira de standard pour quantifier ceux présents dans notre mélange. Après ajout de ce composé à notre extrait brut, les flavolipides pourront être quantifiés par LC-MS en comparant les intensités obtenues pour chaque flavolipide avec celle de notre standard. Concernant l'aquabactine, sa quantification pourra être réalisée par dosage au ChromeAzurol en utilisant l'entérobactine comme standard de dosage. Enfin, la bestiaricine pourra être dans un premier temps quantifiée par dosage au microBCA (acide bicinchoninique) et la synthèse de ce peptide sera ensuite réalisée afin de pouvoir travailler sur son mécanisme d'action.

Le spectre d'activité pour chaque molécule sera réalisée contre différents sérogroupes de *L. pneumophila* mais également contre des *Legionella* non *pneumophila* comme *L. longbeachae* et *L. anisa*. Cette activité sera également évaluée contre d'autres genres bactériens retrouvés dans l'eau incluant les mycobactéries non-tuberculeuses et *K. pneumoniae*. Ce spectre d'action pourra également être élargit sur divers genres amibiens comprenant *Acanthamoeba* spp. et *V. vermiformis* qui sont fréquemment retrouvés dans les réseaux d'eau.

Le mécanisme d'action des composés diffusibles pourra être déterminé par approche biophysique sur des membranes biomimétiques telles que des liposomes. Des compositions variées de phospholipides seront utilisées. La perturbation des membranes lipidiques par ces molécules pourra être mesurée par la détection de fuite de calcéine par fluorescence.

Des expériences par résonance plasmonique à ondes guidées (PWR) pourraient également permettre d'évaluer l'affinité de ces molécules pour les membranes. Les modifications de structure et d'organisation des membranes induites par les molécules d'intérêts pourront être obtenues par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (ATR-FTIR). Enfin, des expériences de Cryo-microscopie électronique (Cryo-TEM) permettront la visualisation des dommages créés au sein des membranes modèles mais également au niveau des organismes entiers. D'autres expériences complémentaires par cytométrie en flux et de dénombrement pourront également être utilisées pour déterminer la viabilité et l'intégrité membranaire des microorganismes traités.

Les microorganismes étant principalement retrouvés sous forme sessile dans les réseaux d'eau, l'activité des composés pourra être évaluée contre des biofilms de *L. pneumophila* GFP ou DsRed. La structure du biofilm formé sera observée par microscopie confocale après marquage de la matrice à la Concanavaline A). Un biofilm naturel sera également mis en place dans un système dynamique (*Flow Cell system*) en utilisant de l'eau de rivière dopée en *Legionella* comme eau d'alimentation. Les molécules pourront être par la suite ajoutées dans le système. Après marquage au SYTO-9 des cellules, le biofilm formé sera observé par microscopie confocale à balayage. Dans un deuxième temps, la flore totale bactérienne pourra être quantifiée par PCR quantitative en utilisant le gène codant l'ARNr 16S et la population de *Legionella* sera quantifiée de la même manière en amplifiant le gène *mip* (*macrophage infectivity potentiator*).

Enfin, l'utilisation de composés naturels comme agent de contrôle des légionelles dans les réseaux d'eau requiert au préalable de vérifier leur toxicité pour l'homme ou d'autres organismes aquatiques. Pour cela, des tests de cytotoxicité en microplaques pourront être réalisés sur la lignée cellulaire A549 qui correspond à des cellules épithéliales pulmonaires humaines. Un dosage colorimétrique de la lactate déshydrogénase intracellulaire (marqueur de cytotoxicité) sera effectué. Le potentiel hémolytique des molécules pourra également être évalué par mesure de l'absorbance de l'hémoglobine à 576 nm après mise en contact avec des érythrocytes humains. La toxicité de chaque composé pourra finalement être évaluée sur le crustacé planctonique *Daphnia magnia*.

Les résultats obtenus dans ce travail de thèse montrent par conséquent que le microenvironnement de *L. pneumophila* est riche en composés actifs dont le potentiel reste toutefois à évaluer en conditions dynamiques.

Références bibliographiques

A

Aarons, S., Abbas, A., Adams, C., Fenton, A., and O'Gara, F. (**2000**). A regulatory RNA (PrrB RNA) modulates expression of secondary metabolite genes in *Pseudomonas fluorescens* F113. *Journal of Bacteriology* 182, 3913–3919.

Abu Khweek, A., and Amer, A.O. (**2018**). Factors Mediating Environmental Biofilm Formation by *Legionella pneumophila*. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 8, 18–10.

Adeleke, A., Pruckler, J., Benson, R., Rowbotham, T., Halablab, M., and Fields, B. (**1996**). *Legionella* -like amebal pathogens-phylogenetic status and possible role in respiratory disease. *Emerging Infect. Dis.* 2, 225–230.

Aizenberg-Gershtein, Y., Vaizel-Ohayon, D., and Halpern, M. (**2012**). Structure of bacterial communities in diverse freshwater habitats. *Can. J. Microbiol.* 58, 326–335.

Al-Matawah, Q.A., Al-Zenki, S.F., Qasem, J.A., Al-Waalan, T.E., and Ben Heji, A.H. (**2012**). Detection and Quantification of *Legionella pneumophila* from Water Systems in Kuwait Residential Facilities. *J Pathog* 2012, 1–5.

Al-Sulami, A.A., Al-Taee, A.M., and Yehyazarian, A.A. (**2013**). The Effect of *Aeromonas* spp. on the Growth of *Legionella pneumophila* in vitro. *Air Water Borne Diseases* 2, 1–4.

Alary, M., and Joly, J.R. (**1992**). Factors contributing to the contamination of hospital water distribution systems by *Legionella* e. *Jid* 165, 565–569.

Alballaa, S.R., Qadri, S.M., al-Furayh, O., and al-Qatary, K. (**1992**). Urinary tract infection due to *Rahnella aquatilis* in a renal transplant patient. *Journal of Clinical Microbiology* 30, 2948–2950.

Allard, K.A., Dao, J., Sanjeevaiah, P., McCoy-Simandle, K., Chatfield, C.H., Crumrine, D.S., Castignetti, D., and Cianciotto, N.P. (**2009**). Purification of Legiobactin and Importance of This Siderophore in Lung Infection by *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* 77, 2887–2895.

Allard, K.A., Viswanathan, V.K., and Cianciotto, N.P. (**2006**). lbtA and lbtB Are Required for Production of the *Legionella pneumophila* Siderophore Legiobactin. *Journal of Bacteriology* 188, 1351–1363.

Allegra, S., Grattard, F., Girardot, F., Riffard, S., Pozzetto, B., and Berthelot, P. (**2011**). Longitudinal evaluation of the efficacy of heat treatment procedures against *Legionella* spp. in hospital water systems by using a flow cytometric assay. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 1268–1275.

Alleron, L., Merlet, N., Lacombe, C., and Frère, J. (**2008**). Long-term survival of *Legionella pneumophila* in the viable but nonculturable state after monochloramine treatment. *Curr. Microbiol.* 57, 497–502.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (**1990**). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410.

Amaro, F., Gilbert, J.A., Owens, S., Trimble, W., and Shuman, H.A. (**2012**). Whole-Genome Sequence of the Human Pathogen *Legionella pneumophila* Serogroup 12 Strain 570-CO-H. *Journal of Bacteriology* 194, 1613–1614.

Amaro, F., Wang, W., Gilbert, J.A., Anderson, O.R., and Shuman, H.A. (**2015**). Diverse protist grazers select for virulence-related traits in *Legionella*. *Isme J* 9, 1607–1618.

Aoi, Y., Nakata, H., and Kida, H. (**2000**). Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* from Ushubetsu River water in Hokkaido, Japan. *Jpn. J. Vet. Res.* 48, 29–34.

Aoki, S.K. (**2005**). Contact-Dependent Inhibition of Growth in *Escherichia coli*. *Science* 309, 1245–1248.

Appelt, S., and Heuner, K. (**2017**). The Flagellar Regulon of *Legionella* —A Review. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 7, 1–13.

Arndt, H., Dietric, D., Auer, B., Cleven, E.J., Gräfenhan, T., Weitere, M., and Mylnikov, A.P. (**2000**) Functional diversity of heterotrophic flagellates in aquatic ecosystems. In *Flagellates: Unity, Diversity and Evolution*, pp. 240–268.

Arndt, H., Schmidt-Denter, K., and Auer, B. (**2003**). Protozoans and biofilms. In *Fossil and Recent Biofilms*, pp. 1–19.

Aurell, H., Etienne, J., Forey, F., Reyrolle, M., Girardo, P., Farge, P., Decludt, B., Campese, C., Vandenesch, F., and Jarraud, S. (**2003**). *Legionella pneumophila* Serogroup 1 Strain Paris: Endemic Distribution throughout France. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 3320–3322.

B

Bagg, A., and Neilands, J.B. (1987). Ferric uptake regulation protein acts as a repressor, employing iron (II) as a cofactor to bind the operator of an iron transport operon in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 26, 5471–5477.

Bajrai, L.H., Azhar, E.I., Yasir, M., Jardot, P., Barrassi, L., Raoult, D., La Scola, B., and Pagnier, I. (**2016**). *Legionella saoudiensis* sp. nov., isolated from a sewage water sample. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66, 4367–4371.

Baron, J.L., Peters, T., Shafer, R., MacMurray, B., and Stout, J.E. (**2014**). Field evaluation of a new point-of-use faucet filter for preventing exposure to *Legionella* and other waterborne pathogens in health care facilities. *Am J Infect Control* 42, 1193–1196.

Baron, S., Granier, S.A., Larvor, E., Jouy, E., Cineux, M., Wilhelm, A., Gassilloud, B., Le Bouquin, S., Kempf, I., and Chauvin, C. (**2017**). *Aeromonas* Diversity and Antimicrobial Susceptibility in Freshwater-An Attempt to Set Generic Epidemiological Cut-Off Values. *Front. Microbiol.* 8, 1-9.

Basson, A., Flemming, L.A., and Chenia, H.Y. (**2008**). Evaluation of adherence, hydrophobicity, aggregation, and biofilm development of *Flavobacterium johnsoniae*-like isolates. *Microb. Ecol.* 55, 1–14.

Bauer, M.A., Kainz, K., Carmona-Gutierrez, D., and Madeo, F. (**2018**). Microbial wars: competition in ecological niches and within the microbiome. *Microb Cell* 5, 215–219.

Beauté, J. (**2017**). Legionnaires' disease in Europe, 2011 to 2015. *Eurosurveillance* 22, 506–508.

Beauté, J., Robesyn, E., de Jong, B., European Legionnaires' Disease Surveillance Network (**2013**). Legionnaires' disease in Europe: all quiet on the eastern front? *Eur. Respir. J*. 42, 1454–1458.

Benson, R.F., and Fields, B.S. (**1998**). Classification of the genus *Legionella*. *Semin Respir Infect* 13, 90–99.

Berdal, B.P., Farshy, C.E., and Feeley, J.C. (1979). Detection of *Legionella pneumophila* antigen in urine by enzyme-linked immunospecific assay. *Journal of Clinical Microbiology* 9, 575–578.

Berjeaud, J.-M., Chevalier, S., Schlusselhuber, M., Portier, E., Loiseau, C., Aucher, W., Lesouhaitier, O., and Verdon, J. (**2016**). *Legionella pneumophila*: The Paradox of a Highly

Sensitive Opportunistic Waterborne Pathogen Able to Persist in the Environment. *Front. Microbiol.* 7, 1–16.

Berk, S.G., Ting, R.S., Turner, G.W., and Ashburn, R.J. (**1998**). Production of respirable vesicles containing live *Legionella pneumophila* cells by two *Acanthamoeba* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 279–286.

Berleman, J., and Auer, M. (**2012**). The role of bacterial outer membrane vesicles for intra- and interspecies delivery. *Environ Microbiol* 15, 347–354.

Berner, I., Greiner, M., Metzger, J., Jung, G., and Winkelmann, G. (**1991**). Identification of enterobactin and linear dihydroxybenzoylserine compounds by HPLC and ion spray mass spectrometry (LC/MS and MS/MS). *Biol Met* 4, 113–118.

Bernier, S.P., Létoffé, S., Delepierre, M., and Ghigo, J.-M. (**2011**). Biogenic ammonia modifies antibiotic resistance at a distance in physically separated bacteria. *Molecular Microbiology* 81, 705–716.

Best, A., and Abu Kwaik, Y. (**2018**). Evolution of the Arsenal of *Legionella pneumophila* Effectors To Modulate Protist Hosts. *MBio* 9, 506–516.

Bilitewski, U., Blodgett, J.A.V., Duhme-Klair, A.-K., Dallavalle, S., Laschat, S., Routledge, A., and Schobert, R. (**2017**). Chemical and Biological Aspects of Nutritional Immunity-Perspectives for New Anti-Infectives that Target Iron Uptake Systems. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 56, 14360–14382.

Biller, S.J., Schubotz, F., Roggensack, S.E., Thompson, A.W., Summons, R.E., and Chisholm, S.W. (**2014**). Bacterial vesicles in marine ecosystems. *Science* 343, 183–186.

Bingle, L.E., Bailey, C.M., and Pallen, M.J. (**2008**). Type VI secretion: a beginner's guide. *Current Opinion in Microbiology* 11, 3–8.

Birch, L.C. (1957). The meanings of competition. *The American Naturalist* 91, 5–18.

Bister, B., Bischoff, D., Nicholson, G.J., Valdebenito, M., Schneider, K., Winkelmann, G., Hantke, K., and Süssmuth, R.D. (**2004**). The structure of salmochelins: C-glucosylated enterobactins of *Salmonella enterica*. *Biometals* 17, 471–481.

Blatt, S.P., Parkinson, M.D., Pace, E., Hoffman, P., Dolan, D., Lauderdale, P., Zajac, R.A., and Melcher, G.P. (**1993**). Nosocomial Legionnaires' disease: aspiration as a primary mode of disease acquisition. *Am. J. Med.* 95, 16–22.

Bodour, A.A., Guerrero-Barajas, C., Jiorle, B.V., Malcomson, M.E., Paull, A.K., Somogyi, A., Trinh, L.N., Bates, R.B., and Maier, R.M. (**2004**). Structure and characterization of flavolipids, a novel class of biosurfactants produced by *Flavobacterium* sp. strain MTN11. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 114–120.

Bohach, G.A., and Snyder, I.S. (1983a). Characterization of surfaces involved in adherence of *Legionella pneumophila* to *Fischerella* species. *Infect. Immun.* 42, 318-325.

Bohach, G.A., and Snyder, I.S. (1983b). Cyanobacterial stimulation of growth and oxygen uptake by *Legionella pneumophila*. *Applied and Environmental Microbiology* 46, 528-531.

Bonnichsen, L., Bygvraa Svenningsen, N., Rybtke, M., De Bruijn, I., Raaijmakers, J.M., Tolker-Nielsen, T., and Nybroe, O. (**2015**). Lipopeptide biosurfactant viscosin enhances dispersal of *Pseudomonas fluorescens* SBW25 biofilms. *Microbiology* 161, 2289–2297.

Borges, V., Nunes, A., Sampaio, D.A., Vieira, L., Machado, J., Simões, M.J., Gonçalves, P., and Gomes, J.P. (**2016**). *Legionella pneumophila* strain associated with the first evidence of person-to-person transmission of Legionnaires' disease: a unique mosaic genetic backbone. *Sci. Rep.* 19, 1–11.

Bortner, C.A., Arnold, R.R., and Miller, R.D. (1989). Bactericidal effect of lactoferrin on *Legionella pneumophila*: effect of the physiological state of the organism. *Can. J. Microbiol.* 35, 1048–1051.

Bortner, C.A., Miller, R.D., and Arnold, R.R. (1986). Bactericidal effect of lactoferrin on *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* 51, 373–377.

Bozue, J.A., and Johnson, W. (**1996**). Interaction of *Legionella pneumophila* with *Acanthamoeba castellanii*: uptake by coiling phagocytosis and inhibition of phagosome-lysosome fusion. *Infect. Immun.* 64, 668–673.

Brassinga, A.K.C., Hiltz, M.F., Sisson, G.R., Morash, M.G., Hill, N., Garduno, E., Edelstein, P.H., Garduno, R.A., and Hoffman, P.S. (**2003**). A 65-kilobase pathogenicity island is unique to Philadelphia-1 strains of *Legionella pneumophila*. *Journal of Bacteriology* 185, 4630–4637.

Brencic, A., McFarland, K.A., McManus, H.R., Castang, S., Mogno, I., Dove, S.L., and Lory, S. (**2009**). The GacS/GacA signal transduction system of *Pseudomonas aeruginosa* acts exclusively through its control over the transcription of the RsmY and RsmZ regulatory small RNAs. *Molecular Microbiology* 73, 434–445.

Brenner, D.J., Steigerwalt, A.G., and McDade, J.E. (**1979**). Classification of the Legionnaires' disease bacterium: *Legionella pneumophila*, genus novum, species nova, of the family Legionellaceae, familia nova. *Ann. Intern. Med.* 90, 656–658.

Brillard, J., Dupont, C.M.S., Berge, O., Dargaignaratz, C., Oriol-Gagnier, S., Doussan, C., Broussolle, V., Gillon, M., Clavel, T., and Bérard, A. (**2015**). The Water Cycle, a Potential Source of the Bacterial Pathogen *Bacillus cereus*. *Biomed Res Int* 2015, 1–15.

Brüggemann, H., Cazalet, C., and Buchrieser, C. (**2006**). Adaptation of *Legionella pneumophila* to the host environment: role of protein secretion, effectors and eukaryotic-like proteins. *Current Opinion in Microbiology* 9, 86–94.

Bruin, J.P., Ijzerman, E.P.F., Boer, den, J.W., Mouton, J.W., and Diederen, B.M.W. (**2012**). Wild-type MIC distribution and epidemiological cut-off values in clinical *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 72, 103–108.

Buchoux, S., Lai-Kee-Him, J., Garnier, M., Tsan, P., Besson, F., Brisson, A., and Dufourc, E.J. (**2008**). Surfactin-triggered small vesicle formation of negatively charged membranes: a novel membrane-lysis mechanism. *Biophys. J.* 95, 3840–3849.

Bullen, J.J., Rogers, H.J., and Griffiths, E. (1978). Role of iron in bacterial infection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 80, 1–35.

Burnside, D.M., Wu, Y., Shafaie, S., and Cianciotto, N.P. (**2015**). The *Legionella pneumophila* Siderophore Legiobactin Is a Polycarboxylate That Is Identical in Structure to Rhizoferrin. *Infect. Immun.* 83, 3937–3945.

Burstein, D., Amaro, F., Zusman, T., Lifshitz, Z., Cohen, O., Gilbert, J.A., Pupko, T., Shuman, H.A., and Segal, G. (**2016**). Genomic analysis of 38 *Legionella* species identifies large and diverse effector repertoires. *Nat Genet.* 48, 167–175.

Burt, S. (**2004**). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 223–253.

C

Camper, A.K., and McFeters, G.A. (**1979**). Chlorine injury and the enumeration of waterborne coliform bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 37, 633–641.

Campese, C., Descours, G., Lepoutre, A., Beraud, L., Maine, C., Che, D., and Jarraud, S. (**2015**). Legionnaires' disease in France. *Med Mal Infect* 45, 65–71.

Campocasso, A., Boughalmi, M., Fournous, G., Raoult, D., and La Scola, B. (**2012**). *Legionella tunisiensis* sp. nov. and *Legionella massiliensis* sp. nov., isolated from environmental water samples. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62, 3003–3006.

Carifo, K., and Catlin, B.W. (1973). *Neisseria gonorrhoeae* auxotyping: differentiation of clinical isolates based on growth responses on chemically defined media. *Appl Microbiol* 26, 223–230.

Caron, D.A., Worden, A.Z., Countway, P.D., Demir, E., and Heidelberg, K.B. (**2008**). Protists are microbes too: a perspective. *Isme J* 3, 4–12.

Carpenter, C., and Payne, S.M. (**2014**). Regulation of iron transport systems in *Enterobacteriaceae* in response to oxygen and iron availability. *J. Inorg. Biochem.* 133, 110–117.

Carrillo, C., Teruel, J.A., Aranda, F.J., and Ortiz, A. (**2003**). Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. *Biochim. Biophys. Acta* 1611, 91–97.

Carruthers, M.D., Nicholson, P.A., Tracy, E.N., and Munson, R.S. (**2013**). *Acinetobacter baumannii* utilizes a type VI secretion system for bacterial competition. *PLoS ONE* 8, e59388.

Cartron, M.L., Maddocks, S., Gillingham, P., Craven, C.J., and Andrews, S.C. (**2006**). Feo – Transport of Ferrous Iron into Bacteria. *Biometals* 19, 143–157.

Casati, S., Conza, L., Bruin, J., and Gaia, V. (**2010**). Compost facilities as a reservoir of *Legionella pneumophila* and other *Legionella* species. *Clin. Microbiol. Infect*. 16, 945–947.

Cazalet, C., Jarraud, S., Ghavi-Helm, Y., Kunst, F., Glaser, P., Etienne, J., and Buchrieser, C. (**2008**). Multigenome analysis identifies a worldwide distributed epidemic *Legionella pneumophila* clone that emerged within a highly diverse species. *Genome Res.* 18, 431–441.

Cazalet, C., Rusniok, C., Brüggemann, H., Zidane, N., Magnier, A., Ma, L., Tichit, M., Jarraud, S., Bouchier, C., Vandenesch, F., et al. (**2004**). Evidence in the *Legionella pneumophila* genome for exploitation of host cell functions and high genome plasticity. *Nat Genet* 36, 1165–1173.

Cervero-Aragó, S., Rodríguez-Martínez, S., Puertas-Bennasar, A., and Araujo, R.M. (**2015**). Effect of Common Drinking Water Disinfectants, Chlorine and Heat, on Free *Legionella* and Amoebae-Associated *Legionella* . *PLoS ONE* 10, e0134726.

Cervero-Aragó, S., Sommer, R., and Araujo, R.M. (**2014**). Effect of UV irradiation (253.7 nm) on free *Legionella* and *Legionella* associated with its amoebae hosts. *Water Research* 67, 299–309.

Cervia, J.S., Farber, B., Armellino, D., Klocke, J., Bayer, R.-L., McAlister, M., Stanchfield, I., Canonica, F.P., and Ortolano, G.A. (**2010**). Point-of-use water filtration reduces healthcare-associated infections in bone marrow transplant recipients. *Transpl Infect Dis* 12, 238–241.

Chaftar, N., Girardot, M., Labanowski, J., Ghrairi, T., Hani, K., Frère, J., and Imbert, C. (**2016**). Comparative evaluation of the antimicrobial activity of 19 essential oils. *Adv. Exp. Med. Biol.* 901, 1–15.

Chaftar, N., Girardot, M., Quellard, N., Labanowski, J., Ghrairi, T., Hani, K., Frère, J., and Imbert, C. (**2015**). Activity of Six Essential Oils Extracted from Tunisian Plants against *Legionella pneumophila*. *Chem. Biodivers.* 12, 1565–1574.

Chang, C.-W., Chang, W.-L., Chang, S.-T., and Cheng, S.-S. (**2008**). Antibacterial activities of plant essential oils against *Legionella pneumophila*. *Water Research* 42, 278–286.

Chang, C.-W., Kao, C.-H., and Liu, Y.-F. (**2009**). Heterogeneity in chlorine susceptibility for *Legionella pneumophila* released from *Acanthamoeba* and *Hartmannella. J. Appl. Microbiol.* 106, 97–105.

Chang, H., Chen, C., and Wang, G. (**2013**). Characteristics of C-, N-DBPs formation from nitrogen-enriched dissolved organic matter in raw water and treated wastewater effluent. *Water Research* 47, 2729–2741.

Chao, Y., Mao, Y., Wang, Z., and Zhang, T. (**2015**). Diversity and functions of bacterial community in drinking water biofilms revealed by high- throughput sequencing. *Sci. Rep.* 5, 1–13.

Chatfield, C.H., and Cianciotto, N.P. (**2007**). The Secreted Pyomelanin Pigment of *Legionella pneumophila* Confers Ferric Reductase Activity. *Infect. Immun.* 75, 4062–4070.

Chatfield, C.H., Mulhern, B.J., Burnside, D.M., and Cianciotto, N.P. (**2011**). *Legionella pneumophila* LbtU Acts as a Novel, TonB-Independent Receptor for the Legiobactin Siderophore. *Journal of Bacteriology 193*, 1563–1575.

Chatfield, C.H., Mulhern, B.J., Viswanathan, V.K., and Cianciotto, N.P. (**2012**). The major facilitator superfamily-type protein LbtC promotes the utilization of the legiobactin siderophore by *Legionella pneumophila*. *Microbiology* 158, 721–735.

Chen, M., Chen, F., Yu, Y., Ji, J., and Kong, F. (**2008**). Genetic Diversity of Eukaryotic Microorganisms in Lake Taihu, a Large Shallow Subtropical Lake in China. *Microb. Ecol.* 56, 572–583.

Cheng, X., De Bruijn, I., van der Voort, M., Loper, J.E., and Raaijmakers, J.M. (**2013**). The Gac regulon of *Pseudomonas fluorescens* SBW25. *Environmental Microbiology Reports* 5, 608–619.

Chenier, M.R., Beaumier, D., Roy, R., Driscoll, B.T., Lawrence, J.R., and Greer, C.W. (**2003**). Impact of Seasonal Variations and Nutrient Inputs on Nitrogen Cycling and Degradation of Hexadecane by Replicated River Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 5170–5177.

Chiao, T.-H., Clancy, T.M., Pinto, A., Xi, C., and Raskin, L. (**2014**). Differential resistance of drinking water bacterial populations to monochloramine disinfection. *Environ. Sci. Technol.* 48, 4038–4047.

Chien, M., Morozova, I., Shi, S., Sheng, H., Chen, J., Gomez, S.M., Asamani, G., Hill, K., Nuara, J., Feder, M., et al. (**2004**). The genomic sequence of the accidental pathogen *Legionella pneumophila*. *Science* 305, 1966–1968.

Chmiel, E., Palusińska-Szysz, M., Zdybicka-Barabas, A., Cytryńska, M., and Mak, P. (**2014**). The effect of *Galleria mellonella* hemolymph polypeptides on *Legionella gormanii. Acta Biochim. Pol.* 61, 123–127.

Chord, F., Fascia, P., Mallaval, F., Cornillon, J., Roesch, L., Pozzetto, B., Grattard, F., and Berthelot, P. (**2011**). Chlorine dioxide for *Legionella* spp. disinfection: a danger for cross-linked polyethylene pipes? *J. Hosp. Infect.* 78, 242–243.

Chou, S., Bui, N.K., Russell, A.B., Lexa, K.W., Gardiner, T.E., LeRoux, M., Vollmer, W., and Mougous, J.D. (**2012**). Structure of a Peptidoglycan Amidase Effector Targeted to Gram-Negative Bacteria by the Type VI Secretion System. *CellReports* 1, 656–664.

Cianciotto, N.P. (**2015**). An update on iron acquisition by *Legionella pneumophila*: new pathways for siderophore uptake and ferric iron reduction. *Future Microbiology* 10, 841–851.

Ciesielski, C.A., Blaser, M.J., and Wang, W.L. (1986). Serogroup specificity of *Legionella pneumophila* is related to lipopolysaccharide characteristics. *Infect. Immun.* 51, 397–404.

Conover, G.M., Martinez-Morales, F., Heidtman, M.I., Luo, Z.-Q., Tang, M., Chen, C., Geiger, O., and Isberg, R.R. (**2008**). Phosphatidylcholine synthesis is required for optimal function of *Legionella pneumophila* virulence determinants. *Cell Microbiol* 10, 514–528.

Cornelis, P., Wei, Q., Andrews, S.C., and Vinckx, T. (**2011**). Iron homeostasis and management of oxidative stress response in bacteria. *Metallomics* 3, 540–10.

Correia, A.M., Ferreira, J.S., Borges, V., Nunes, A., Gomes, B., Capucho, R., Gonçalves, J., Antunes, D.M., Almeida, S., Mendes, A., et al. (**2016**). Probable Person-to-Person Transmission of Legionnaires' Disease. *N Engl J Med* 374, 497–498.

Cosson, P., Zulianello, L., Join-Lambert, O., Faurisson, F., Gebbie, L., Benghezal, M., Van Delden, C., Curty, L.K., and Köhler, T. (**2002**). *Pseudomonas aeruginosa* virulence analyzed in a *Dictyostelium discoideum* host system. *Journal of Bacteriology* 184, 3027–3033.

Costa, J., da Costa, M.S., and Verlssimo, A. (**2010**). Colonization of a therapeutic spa with *Legionella* spp: a public health issue. *Research in Microbiology* 161, 18–25.

Costerton, J.W., Lewet owski, Z., Cakdwell, E., Korber, D.R., and Lappin-Scott, H.M. (**1995**). Microbial Biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 711–745.

Cotuk, A., Dogruoz, N., Zeybek, Z., Kimiran-Erdem, A., and Ilhan-Sungur, E. (**2005**). The effects of *Pseudomonas* and *Aeromonas* strains on *Legionella pneumophila* growth. *Annals of Microbiology* 55, 219–224.

Coulon, C., Collignon, A., McDonnell, G., and Thomas, V. (**2010**). Resistance of *Acanthamoeba* cysts to disinfection treatments used in health care settings. *Journal of Clinical Microbiology* 48, 2689–2697.

Cowgill, K.D., Lucas, C.E., Benson, R.F., Chamany, S., Brown, E.W., Fields, B.S., and Feikin, D.R. (**2005**). Recurrence of legionnaires disease at a hotel in the United States Virgin Islands over a 20-year period. *Clin. Infect. Dis.* 40, 1205–1207.

Cunha, B.A., Burillo, A., and Bouza, E. (**2016**). Legionnaires' disease. *Lancet* 387, 376–385.

Currie, S.L., Beattie, T.K., Knapp, C.W., and Lindsay, D.S.J. (**2014**). *Legionella* spp. in UK composts-a potential public health issue? *Clin. Microbiol. Infect*. 20, O224–O229.

Cytryńska, M., Mak, P., Zdybicka-Barabas, A., Suder, P., and Jakubowicz, T. (**2007**). Purification and characterization of eight peptides from *Galleria mellonella* immune hemolymph. *Peptides* 28, 533–546.

D

D'aes, J., Kieu, N.P., Léclère, V., Tokarski, C., Olorunleke, F.E., De Maeyer, K., Jacques, P., Höfte, M., and Ongena, M. (**2014**). To settle or to move? The interplay between two classes of cyclic lipopeptides in the biocontrol strain *Pseudomonas* CMR12a. *Environ Microbiol* 16, 2282–2300.

D'Auria, G., Jiménez-Hernández, N., Peris-Bondia, F., Moya, A., and Latorre, A. (**2010**). *Legionella pneumophila* pangenome reveals strain-specific virulence factors. *BMC Genomics* 11, 181–13.

Darveau, R.P., Blake, J., Seachord, C.L., Cosand, W.L., Cunningham, M.D., Cassiano-Clough, L., and Maloney, G. (**1992**). Peptides related to the carboxyl terminus of human platelet factor IV with antibacterial activity. *J. Clin. Invest.* 90, 447–455.

Davey, M.E., Caiazza, N.C., and O'toole, G.A. (**2003**). Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology* 185, 1027–1036.

Davies, J. (**2013**). Specialized microbial metabolites: functions and origins. *The Journal of Antibiotics* 66, 361–364.

Davies, J., and Ryan, K.S. (**2011**). Introducing the Parvome: Bioactive Compounds in the Microbial World. *ACS Chem. Biol.* 7, 252–259.

De Bruijn, I., de Kock, M.J.D., de Waard, P., van Beek, T.A., and Raaijmakers, J.M. (**2008**). Massetolide A biosynthesis in *Pseudomonas* fluorescens. *Journal of Bacteriology* 190, 2777–2789.

De Bruijn, I., de Kock, M.J.D., Yang, M., de Waard, P., van Beek, T.A., and Raaijmakers, J.M. (**2007**). Genome-based discovery, structure prediction and functional analysis of cyclic lipopeptide antibiotics in *Pseudomonas* species. *Molecular Microbiology* 63, 417–428.

De Felipe, K.S., Pampou, S., Jovanovic, O.S., Pericone, C.D., Ye, S.F., Kalachikov, S., and Shuman, H.A. (**2005**). Evidence for Acquisition of *Legionella* Type IV Secretion Substrates via Interdomain Horizontal Gene Transfer. *Journal of Bacteriology* 187, 7716–7726.

De Oliveira, D.W.F., Cara, A.B., Lechuga-Villena, M., García-Román, M., Melo, V.M.M., Gonçalves, L.R.B., and Vaz, D.A. (**2017**). Aquatic toxicity and biodegradability of a surfactant produced by *Bacillus subtilis* ICA56. *J Environ Sci Health a Tox Hazard Subst Environ Eng* 52, 174–181.

De Rienzo, M.A.D., and Martin, P.J. (**2016**). Effect of Mono and Di-rhamnolipids on Biofilms Pre-formed by *Bacillus subtilis* BBK006. *Curr. Microbiol.* 73, 183–189.

Debroas, D., Domaizon, I., Humbert, J.-F., Jardillier, L., Lepère, C., Oudart, A., and Taïb, N. (**2017**). Overview of freshwater microbial eukaryotes diversity: a first analysis of publicly available metabarcoding data. *FEMS Microbiol. Ecol.* 93, 684–14.

Declerck, P. (**2010**). Biofilms: the environmental playground of *Legionella pneumophila*. *Environ Microbiol* 12, 557–566.

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

Declerck, P., Behets, J., Margineanu, A., van Hoef, V., De Keersmaecker, B., and Ollevier, F. (**2009**). Replication of *Legionella pneumophila* in biofilms of water distribution pipes. *Microbiol. Res.* 164, 593–603.

Derre, I., and Isberg, R.R. (**2004**). *Legionella pneumophila* Replication Vacuole Formation Involves Rapid Recruitment of Proteins of the Early Secretory System. *Infect. Immun.* 72, 3048–3053.

Di Bella, M.A., Fedders, H., De Leo, G., and Leippe, M. (**2011**). Localization of antimicrobial peptides in the tunic of *Ciona intestinalis* (Ascidiacea, Tunicata) and their involvement in local inflammatory-like reactions. *Results Immunol* 1, 70–75.

Dias, R. de O., and Franco, O.L. (**2015**). Cysteine-stabilized αβ defensins: From a common fold to antibacterial activity. *Peptides* 72, 64–72.

Diederen, B.M.W. (**2008**). *Legionella* spp. and Legionnaires' disease. *Journal of Infection* 56, 1–12.

Dietersdorfer, E., Kirschner, A., Schrammel, B., Ohradanova-Repic, A., Stockinger, H., Sommer, R., Walochnik, J., and Cervero-Aragó, S. (**2018**). Starved viable but non-culturable (VBNC) *Legionella* strains can infect and replicate in amoebae and human macrophages. *Water Research* 141, 428–438.

Doléans-Jordheim, A., Akermi, M., Ginevra, C., Cazalet, C., Kay, E., Schneider, D., Buchrieser, C., Atlan, D., Vandenesch, F., Etienne, J., *et al.* (**2006**). Growth-phase-dependent mobility of the lvh-encoding region in *Legionella pneumophila* strain Paris. *Microbiology* 152, 3561–3568.

Données InVs (**2017**). Evolution du nombre de cas et du taux d'incidence des cas notifiés de légionellose en France, 1988-2017. Site InVs S70–S76.

Dooling, K.L., Toews, K.-A., Hicks, L.A., Garrison, L.E., Bachaus, B., Zansky, S., Carpenter, L.R., Schaffner, B., Parker, E., Petit, S., *et al.* (**2015**). Active Bacterial Core Surveillance for Legionellosis - United States, 2011-2013. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 64, 1190–1193.

Downing, J.A., Prairie, Y.T., Cole, J.J., Duarte, C.M., Tranvik, L.J., Striegl, R.G., McDowell, W.H., Kortelainen, P., Caraco, N.F., JM, M., *et al.* (**2006**). The global abundance and size distribution of lakes, ponds, and impoundments. *Limnology and Oceanography* 51, 2388–2397.

Ducret, A., Chabalier, M., and Dukan, S. (**2014**). Characterization and resuscitation of "non-culturable" cells of *Legionella pneumophila*. *BMC Microbiol.* 14, 1-10.

Duffy, B.K., and Défago, G. (**2000**). Controlling instability in gacS-gacA regulatory genes during inoculant production of *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 3142–3150.

Dupuy, M., Berne, F., Herbelin, P., Binet, M., Berthelot, N., Rodier, M.-H., Soreau, S., and Héchard, Y. (**2014**). Sensitivity of free-living amoeba trophozoites and cysts to water disinfectants. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 217, 335–339.

Duron, O., Doublet, P., Vavre, F., and Bouchon, D. (**2018**). The Importance of Revisiting Legionellales Diversity. *Trends Parasitol. in press*

Dusane, D.H., Dam, S., Nancharaiah, Y.V., Kumar, A.R., Venugopalan, V.P., and Zinjarde, S.S. (**2012**). Disruption of Yarrowia lipolytica biofilms by rhamnolipid biosurfactant. *Aquat Biosyst* 8, 17.

E

Edelstein, P.H., Edelstein, M.A., Shephard, L.J., Ward, K.W., and Ratcliff, R.M. (**2012**). *Legionella steelei* sp. nov., isolated from human respiratory specimens in California, USA, and South Australia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62, 1766–1771.

Edgar, R.C. (**2004a**). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32, 1792–1797.

Edgar, R.C. (2004b**). MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* 19, 113–119.**

Eisnor, J.D., and Gagnon, G.A. (**2004**). Impact of secondary disinfection on corrosion in a model water distribution system. *Journal of Wat Supp. Res. and Technology* 53, 441–452.

El-Hendawy, H.H., Osman, M.E., and Sorour, N.M. (**2003**). Characterization of two antagonistic strains of *Rahnella aquatilis* isolated from soil in Egypt. *Folia Microbiol.* (Praha) 48, 799–804.

El-Hendawy, H.H., Osman, M.E., and Sorour, N.M. (**2005**). Biological control of bacterial spot of tomato caused by *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria by *Rahnella aquatilis*. *Microbiol. Res.* 160, 343–352.

Essar, D.W., Eberly, L., Han, C.Y., and Crawford, I.P. (**1990**). DNA sequences and characterization of four early genes of the tryptophan pathway in *Pseudomonas* aeruginosa. *Journal of Bacteriology* 172, 853–866.

Ewann, F., and Hoffman, P.S. (**2006**). Cysteine Metabolism in *Legionella pneumophila*: Characterization of an L-Cystine-Utilizing Mutant. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 3993–4000.

Exner, M., Kramer, A., Lajoie, L., Gebel, J., Engelhart, S., and Hartemann, P. (**2005**). Prevention and control of health care-associated waterborne infections in health care facilities. *Am J Infect Control* 33, S26–S40.

Ezzeddine, H., Van Ossel, C., Delmée, M., and Wauters, G. (1989). *Legionella* spp. in a hospital hot water system: effect of control measures. *Journal of Hospital Infection* 13, 121–131.

F

Fadli, M., Saad, A., Sayadi, S., Chevalier, J., Mezrioui, N.-E., Pagès, J.-M., and Hassani, L. (**2012**). Antibacterial activity of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* essential oils against nosocomial infection - bacteria and their synergistic potential with antibiotics. *Phytomedicine* 19, 464–471.

Falkinham, J.O., III (**2015**). Common Features of Opportunistic Premise Plumbing Pathogens. *Int J Environ Res Public Health* 12, 4533–4545.

Fallon, R.J., and Rowbotham, T.J. (**1990**). Microbiological investigations into an outbreak of Pontiac fever due to *Legionella micdadei* associated with use of a whirlpool. *J. Clin. Pathol.* 43, 479–483.

Farhat, M., Moletta-Denat, M., Frère, J., Onillon, S., Trouilhé, M.-C., and Robine, E. (**2012**). Effects of disinfection on *Legionella* spp., eukarya, and biofilms in a hot water system. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 6850–6858.

Fedders, H., and Leippe, M. (**2008**). A reverse search for antimicrobial peptides in *Ciona intestinalis*: identification of a gene family expressed in hemocytes and evaluation of activity. *Dev. Comp. Immunol.* 32, 286–298.

Fedders, H., Michalek, M., Grötzinger, J., and Leippe, M. (**2008**). An exceptional salt-tolerant antimicrobial peptide derived from a novel gene family of haemocytes of the marine invertebrate *Ciona intestinalis*. *Biochem. J.* 416, 65–75.

Feeley, J.C., Gibson, R.J., Gorman, G.W., Langford, N.C., Rasheed, J.K., Mackel, D.C., and Baine, W.B. (1979). Charcoal-Yeast Extract Agar: Primary Isolation Medium for *Legionella pneumophila*. *Journal of Clinical Microbiology* 10, 437–441.

Feeley, J.C., Gorman, G.W., Weaver, R.E., Mackel, D.C., and Smith, H.W. (1978). Primary isolation media for Legionnaires disease bacterium. *Journal of Clinical Microbiology* 8, 320–325.

Feng, S., Tan, C.H., Cohen, Y., and Rice, S.A. (**2016**). Isolation of *Bdellovibrio bacteriovorus* from a tropical wastewater treatment plant and predation of mixed species biofilms assembled by the native community members. *Environ Microbiol* 18, 3923–3931.

Fetzner, S. (**2014**). Quorum quenching enzymes. *J. Biotechnol* 201, 1–13.

Fields, B.S., Benson, R.F., and Besser, R.E. (**2002**). *Legionella* and Legionnaires' Disease: 25 Years of Investigation. *Clinical Microbiology Reviews* 15, 506–526.

Figueira, V., Vaz-Moreira, I., Silva, M., and Manaia, C.M. (**2011**). Diversity and antibiotic resistance of *Aeromonas* spp. in drinking and waste water treatment plants. *Water Research* 45, 5599–5611.

Fisher-Hoch, S.P., Bartlett, C.L., Tobin, J.O., Gillett, M.B., Nelson, A.M., Pritchard, J.E., Smith, M.G., Swann, R.A., Talbot, J.M., and Thomas, J.A. (1981). Investigation and control of an outbreaks of legionnaires' disease in a district general hospital. *Lancet* 1, 932–936.

Flemming, H.-C., and Wingender, J. (**2010**). The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 8, 623–633.

Flemming, H.C., and Wingender, J. (**2001**). Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)-Part I: Structural and ecological aspects. *Water Science & Technology* 43, 1–8.

Fliermans, C. (**1996**). Ecology of *Legionella*: From Data to Knowledge with a Little Wisdom. *Microb. Ecol.* 32, 203–228.

Fliermans, C.B., Cherry, W.B., Orrison, L.H., Smith, S.J., Tison, D.L., and Pope, D.H. (**1981**). Ecological distribution of *Legionella pneumophila*. *Applied and Environmental Microbiology* 41, 9–16.

Franco, I.S., Shuman, H.A., and Charpentier, X. (**2009**). The perplexing functions and surprising origins of *Legionella pneumophila* type IV secretion effectors. *Cell Microbiol* 11, 1435–1443.

Frank, J.A., Reich, C.I., Sharma, S., Weisbaum, J.S., Wilson, B.A., and Olsen, G.J. (**2008**). Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 2461–2470.

Fraser, D.W., Tsai, T.R., Orenstein, W., Parkin, W.E., Beecham, H.J., Sharrar, R.G., Harris, J., Mallison, G.F., Martin, S.M., McDade, J.E., *et al.* (1977). Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. *N Engl J Med* 297, 1189–1197.

Fratamico, P.M., and Cooke, P.H. (**1996**). Isolation of *Bdellovibrio* that prey on *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* species and application for removal of prey from stainless steel surfaces. *Journal of Food Safety* 16, 161–173.

Fry, J.C. and Staples, D.G. (1976). Distribution of *Bdellovibrio bacteriovorus* in sewage works, river water, and sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 31, 469–474.

Fry, N.K., Warwick, S., Saunders, N.A., and Embley, T.M. (**1991**). The use of 16S ribosomal RNA analyses to investigate the phylogeny of the family *Legionellaceae*. *J. Gen. Microbiol.* 137, 1215–1222.

Furuhata, K., Hara, M., Yoshida, S.-I., and Fukuyama, M. (**2004**). Distribution of *Legionella* spp. in hot spring baths in Japan. *Kansenshogaku Zasshi* 78, 710–716.

G

Galet, J., Deveau, A., Hôtel, L., Frey-Klett, P., Leblond, P., and Aigle, B. (**2015**). *Pseudomonas fluorescens* Pirates both Ferrioxamine and Ferricoelichelin Siderophores from *Streptomyces ambofaciens*. *Applied and Environmental Microbiology* 81, 3132–3141.

Gao, Y., Zhou, P., Lin, Y.E., Vidic, R.D., Stout, J.E., Stout (**2001**). Efficacy of DBNPA Against *Legionella pneumophila*: Experimental Results in a Model Water System. *Ashrae* 107, 184–190.

Garbeva, P., Hordijk, C., Gerards, S., and de Boer, W. (**2014**a). Volatile-mediated interactions between phylogenetically different soil bacteria. *Front. Microbiol.* 5, 289.

Garbeva, P., Hordijk, C., Gerards, S., and de Boer, W. (**2014**b). Volatiles produced by the mycophagous soil bacterium *Collimonas*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 87, 639–649.

García, M.T., Jones, S., Pelaz, C., Millar, R.D., and Abu Kwaik, Y. (**2007**). *Acanthamoeba polyphaga* resuscitates viable non-culturable *Legionella pneumophila* after disinfection. *Environ Microbiol* 9, 1267–1277.

Garrity, G.M., Brown, A., and Vickers, R.M. (**1980**). *Tatlockia* and *Fluoribacter*: Two New Genera of Organisms Resembling *Legionella pneumophila*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 30, 609–614.

George, J.R., Pine, L., Reeves, M.W., and Harrell, W.K. (**1980**). Amino acid requirements of *Legionella pneumophila*. *Journal of Clinical Microbiology* 11, 286–291.

Glick, T.H., Gregg, M.B., Berman, B., Mallison, G., Rhodes, W.W., and Kassanoff, I. (**1978**). Pontiac fever. An epidemic of unknown etiology in a health department: I. Clinical and epidemiologic aspects. *Am. J. Epidemiol.* 107, 149–160.

Godhe, A., Asplund, M.E., Harnstrom, K., Saravanan, V., Tyagi, A., and Karunasagar, I. (**2008**). Quantification of Diatom and Dinoflagellate Biomasses in Coastal Marine Seawater Samples by Real-Time PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 7174–7182.

Goldoni, P., Visca, P., Pastoris, M.C., Valenti, P., and Orsi, N. (**1991**). Growth of *Legionella* spp. under conditions of iron restriction. *Journal of Medical Microbiology* 34, 113–118.

Gomez-Valero, L., and Buchrieser, C. (**2013**). Genome Dynamics in *Legionella*: The Basis of Versatility and Adaptation to Intracellular Replication. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 3, a009993–a009993.

Gomez-Valero, L., Rusniok, C., Jarraud, S., Vacherie, B., Rouy, Z., Barbe, V., Medigue, C., Etienne, J., and Buchrieser, C. (**2011**). Extensive recombination events and horizontal gene transfer shaped the *Legionella pneumophila* genomes. *BMC Genomics* 12, 536.

Gomila, M., Peña, A., Mulet, M., Lalucat, J., and García-Valdés, E. (**2015**). Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas*. *Front. Microbiol. 6*, 214.

Götze, S., Herbst-Irmer, R., Klapper, M., Görls, H., Schneider, K.R.A., Barnett, R., Burks, T., Neu, U., and Stallforth, P. (**2017**). Structure, Biosynthesis, and Biological Activity of the Cyclic Lipopeptide Anikasin. *ACS Chem. Biol*. 12, 2498–2502.

Graells, T., Ishak, H., Larsson, M., and Guy, L. (**2018**). The all-intracellular order *Legionella* les is unexpectedly diverse, globally distributed and lowly abundant. *FEMS Microbiol. Ecol. in press*

Grass, G. (**2006**). Iron Transport in *Escherichia coli*: All has not been said and Done. *Biometals* 19, 159–172.

Greub, G., and Raoult, D. (**2004**). Microorganisms Resistant to Free-Living Amoebae. *Clinical Microbiology Reviews* 17, 413–433.

Guerrieri, E., Bondi, M., Sabia, C., de Niederhäusern, S., Borella, P., and Messi, P. (**2008**). Effect of bacterial interference on biofilm development by *Legionella pneumophila*. *Curr. Microbiol.* 57, 532–536.

Guettler, M.V., Rumler, D., and Jain, M.K. (**1999**). *Actinobacillus succinogenes* sp. nov., a novel succinic-acid-producing strain from the bovine rumen. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 207–216.

Gustafson, J.E., Liew, Y.C., Chew, S., Markham, J., Bell, H.C., Wyllie, S.G., and Warmington, J.R. (**1998**). Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. *Lett. Appl. Microbiol.* 26, 194–198.

H

Han, S.H., Lee, S.J., Moon, J.H., Park, K.H., Yang, K.Y., Cho, B.H., Kim, K.Y., Kim, Y.W., Lee, M.C., Anderson, A.J., *et al.* (**2006**). GacS-dependent production of 2R, 3R-butanediol by *Pseudomonas chlororaphis* O6 is a major determinant for eliciting systemic resistance against *Erwinia carotovora* but not against *Pseudomonas syringae* pv. tabaci in tobacco. *Mol. Plant Microbe* Interact. 19, 924–930.

Harb, O.S., Venkataraman, C., Haack, B.J., Gao, L.Y., and Kwaik, Y.A. (**1998**). Heterogeneity in the attachment and uptake mechanisms of the Legionnaires' disease bacterium, *Legionella pneumophila*, by protozoan hosts. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 126–132.

Harrell, L.J., Cameron, M.L., and O'Hara, C.M. (1989). *Rahnella aquatilis*, an unusual gram-negative rod isolated from the bronchial washing of a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Journal of Clinical Microbiology* 27, 1671–1672.

Harrison, F., Paul, J., Massey, R.C., and Buckling, A. (**2007**). Interspecific competition and siderophore-mediated cooperation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Isme J* 2, 49–55.

Hassan, K.A., Johnson, A., Shaffer, B.T., Ren, Q., Kidarsa, T.A., Elbourne, L.D.H., Hartney, S., Duboy, R., Goebel, N.C., Zabriskie, T.M., *et al.* (**2010**). Inactivation of the GacA response regulator in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 has far-reaching transcriptomic consequences. *Environ Microbiol* 12, 899–915.

Hayes, C.S., Aoki, S.K., and Low, D.A. (**2010**). Bacterial Contact-Dependent Delivery Systems. *Annu. Rev. Genet.* 44, 71–90.

Heerklotz, H., and Seelig, J. (**2007**). Leakage and lysis of lipid membranes induced by the lipopeptide surfactin. Eur. *Biophys. J.* 36, 305–314.

Helbig, J.H., Bernander, S., Castellani Pastoris, M., Etienne, J., Gaia, V., Lauwers, S., Lindsay, D., Luck, P.C., Marques, T., Mentula, S., *et al.* (**2002**). Pan-European study on culture-proven Legionnaires' disease: distribution of *Legionella pneumophila* serogroups and monoclonal subgroups. Eur. J. *Clin. Microbiol. Infect*. Dis. 21, 710–716.

Henderson, J.P., Crowley, J.R., Pinkner, J.S., Walker, J.N., Tsukayama, P., Stamm, W.E., Hooton, T.M., and Hultgren, S.J. (**2009**). Quantitative metabolomics reveals an epigenetic blueprint for iron acquisition in uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS Pathog.* 5, e1000305.

Hibbing, M.E., Fuqua, C., Parsek, M.R., and Peterson, S.B. (**2009**). Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat Rev Microbiol* 8, 15–25.

Hickey, E.K., and Cianciotto, N.P. (**1994**). Cloning and sequencing of the *Legionella pneumophila* fur gene. *Gene* 143, 117–121.

Hickey, E.K., and Cianciotto, N.P. (**1997**). An iron- and fur-repressed *Legionella pneumophila* gene that promotes intracellular infection and encodes a protein with similarity to the *Escherichia coli* aerobactin synthetases. *Infect. Immun.* 65, 133–143.

Hider, R.C., and Kong, X. (**2010**). Chemistry and biology of siderophores. *Nat Prod Rep* 27, 637–21.

Hijnen, W.A.M., Beerendonk, E.F., and Medema, G.J. (**2006**). Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: A review. *Water Research* 40, 3–22.

Hilbi, H., Hoffmann, C., and Harrison, C.F. (**2011**). *Legionella* spp. outdoors: colonization, communication and persistence. *Environmental Microbiology Reports* 3, 286–296.

Hilbi, H., Segal, G., and Shuman, H.A. (**2001**). Icm/dot-dependent upregulation of phagocytosis by *Legionella pneumophila*. *Molecular Microbiology* 42, 603–617.

Hindahl, M.S., and Iglewski, B.H. (**1984**). Isolation and characterization of the *Legionella pneumophila* outer membrane. *Journal of Bacteriology* 159, 107–113.

Ho, B.T., Dong, T.G., and Mekalanos, J.J. (**2013**). A View to a Kill: The Bacterial Type VI Secretion System. *Cell Host and Microbe* 15, 9–21.

Hoefler, B.C., Gorzelnik, K.V., Yang, J.Y., Hendricks, N., Dorrestein, P.C., and Straight, P.D. (**2012**). Enzymatic resistance to the lipopeptide surfactin as identified through imaging mass spectrometry of bacterial competition. *Proc Natl Acad Sci USA* 109, 13082–13087.

Hoffman, P.S., Pine, L., and Bell, S. (**1983**). Production of superoxide and hydrogen peroxide in medium used to culture *Legionella pneumophila*: catalytic decomposition by charcoal. *Applied and Environmental Microbiology* 45, 784–791.

Holinger, E.P., Ross, K.A., Robertson, C.E., Stevens, M.J., Harris, J.K., and Pace, N.R. (**2014**). Molecular analysis of point-of-use municipal drinking water microbiology. *Water Research* 49, 225–235.

Holmes, C., Cervia, J.S., Ortolano, G.A., and Canonica, F.P. (**2010**). Preventive efficacy and cost-effectiveness of point-of-use water filtration in a subacute care unit. *Am J Infect Control* 38, 69–71.

Hood, R.D., Singh, P., Hsu, F., GUvener, T., Carl, M.A., Trinidad, R.R.S., Silverman, J.M., Ohlson, B.B., Hicks, K.G., Plemel, R.L., *et al.* (**2010**). A Type VI Secretion System of *Pseudomonas aeruginosa* Targets a Toxin to Bacteria. *Cell Host and Microbe* 7, 25–37.

Horwitz, M.A. (**1983a**). The Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes. *J. Exp. Med.* 158, 2108–2126.

Horwitz, M.A. (**1983b**). Formation of a novel phagosome by the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) in human monocytes. *J. Exp. Med.* 158, 1319–1331.

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

Horwitz, M.A., and Maxfield, F.R. (1984). *Legionella pneumophila* inhibits acidification of its phagosome in human monocytes. *J. Cell Biol.* 99, 1936–1943.

Hsu, B.-M., Chen, C.-H., Wan, M.-T., and Cheng, H.-W. (**2006**). *Legionella* prevalence in hot spring recreation areas of Taiwan. *Water Research* 40, 3267–3273.

Hsu, T.-K., Wu, S.-F., Hsu, B.-M., Kao, P.-M., Tao, C.-W., Shen, S.-M., Ji, W.-T., Huang, W.-C., and Fan, C.-W. (**2015**). Surveillance of parasitic *Legionella* in surface waters by using immunomagnetic separation and amoebae enrichment. *Pathogens and Global Health* 109, 328–335.

Huang, S.W., Hsu, B.M., Ma, P.H., and Chien, K.T. (**2009**). *Legionella* prevalence in wastewater treatment plants of Taiwan. *Water Science & Technology* 60, 1303–1309.

Hug, L.A., Baker, B.J., Anantharaman, K., Brown, C.T., Probst, A.J., Castelle, C.J., Butterfield, C.N., Hernsdorf, A.W., Amano, Y., Ise, K., *et al.* (**2016**). A new view of the tree of life. *Nat Microbiol* 1, 16048.

Humann, J., and Lenz, L.L. (**2009**). Bacterial Peptidoglycan-Degrading Enzymes and Their Impact on Host Muropeptide Detection. *J Innate Immun* 1, 88–97.

Husband, P.S., and Boxall, J.B. (**2011**). Asset deterioration and discolouration in water distribution systems. *Water Research* 45, 113–124.

I

Irie, Y., O'toole, G.A., and Yuk, M.H. (**2005**). *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids disperse *Bordetella bronchiseptica* biofilms. *FEMS Microbiology Letters* 250, 237–243.

Isaac, D.T., Laguna, R.K., Valtz, N., and Isberg, R.R. (**2015**). MavN is a *Legionella pneumophila* vacuole-associated protein required for efficient iron acquisition during intracellular growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 112, E5208–E5217.

Isenman, H.L., Chambers, S.T., Pithie, A.D., MacDonald, S.L.S., Hegarty, J.M., Fenwick, J.L., Maze, M.J., Metcalf, S.C.L., and Murdoch, D.R. (**2016**). Legionnaires' disease caused by *Legionella longbeachae*: Clinical features and outcomes of 107 cases from an endemic area. *Respirology* 21, 1292–1299.

Izard, D., Gavini, F., Trinel, P.A., and Leclere, H. (**1979**). *Rahnella aquatilis*, a new member of the *Enterobacteriaceae*. *Ann. Microbiol. (Paris)* 130, 163–177.

J

Jackson, L., and Whiting, R.C. (**1992**). Reduction of an *Escherichia coli* K12 Population by *Bdellovibrio bacteriovorus* Under Various In Vitro Conditions of Parasite: Host Ratio, Temperature, or pH. *Journal of Food Protection* 55, 859–861.

James, B.W., Mauchline, W.S., Dennis, P.J., and Keevil, C.W. (**1997**). A study of iron acquisition mechanisms of *Legionella pneumophila* grown in chemostat culture. *Curr. Microbiol.* 34, 238–243.

James, B.W., Mauchline, W.S., Fitzgeorge, R.B., Dennis, P.J., and Keevil, C.W. (**1995**). Influence of iron-limited continuous culture on physiology and virulence of *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* 63, 4224–4230.

Janek, T., Łukaszewicz, M., and Krasowska, A. (**2012**). Antiadhesive activity of the biosurfactant pseudofactin II secreted by the Arctic bacterium *Pseudomonas fluorescens* BD5. *BMC Microbiol.* 12, 24.

Jenssen, H., and Hancock, R.E.W. (**2009**). Antimicrobial properties of lactoferrin. *Biochemistry* 91, 19–29.

Jin, D., Kong, X., Cui, B., Jin, S., Xie, Y., Wang, X., and Deng, Y. (**2018**). Bacterial communities and potential waterborne pathogens within the typical urban surface waters. *Sci Rep* 8, 13368.

Johnson, W., Varner, L., and Poch, M. (**1991**). Acquisition of iron by *Legionella pneumophila*: role of iron reductase. *Infect. Immun.* 59, 2376–2381.

Jones, D.P., Go, Y.-M., Anderson, C.L., Ziegler, T.R., Kinkade, J.M., JR, and Kirlin, W.G. (**2004**). Cysteine/cystine couple is a newly recognized node in the circuitry for biologic redox signaling and control. *The FASEB Journal* 18, 1246–1248.

Jordaan, K., and Bezuidenhout, C.C. (**2012**). The impact of physico-chemical water quality parameters on bacterial diversity in the Vaal River, South Africa. *Water SA* 39

Joshi, A., Kostiuk, B., Rogers, A., Teschler, J., Pukatzki, S., and Yildiz, F.H. (**2016**). Rules of Engagement: The Type VI Secretion System in Vibrio cholerae. *Trends in Microbiology* 25, 267–279

K

Kac, G., and Fagon, J.Y. (**2002**). Legionnaires'disease: more unresolved questions. *Rev Med Interne* 23, 415–418.

Kaddes, A., Parisi, O., Berhal, C., Ben Kaab, S., Fauconnier, M.-L., Nasraoui, B., Jijakli, M.H., Massart, S., and De Clerck, C. (**2016**). Evaluation of the Effect of Two Volatile Organic Compounds on Barley Pathogens. *Molecules* 21, 1124.

Kadurugamuwa, J.L., and Beveridge, T.J. (**1996**). Bacteriolytic Effect of Membrane Vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* on Other Bacteria Including Pathogens: Conceptually New Antibiotics. *Journal of Bacteriology* 178, 2767–2774.

Kaevska, M., Videnska, P., Sedlar, K., and Slana, I. (**2016**). Seasonal changes in microbial community composition in river water studied using 454-pyrosequencing. *Springerplus* 5, 409.

Kang, B.R., Lee, J.H., Ko, S.J., Lee, Y.H., Cha, J.S., Cho, B.H., and Kim, Y.C. (**2004**). Degradation of acyl-homoserine lactone molecules by *Acinetobacter* sp. strain C1010. *Can. J. Microbiol.* 50, 935–941.

Kenagy, E., Priest, P.C., Cameron, C.M., Smith, D., Scott, P., Cho, V., Mitchell, P., and Murdoch, D.R. (**2017**). Risk Factors for *Legionella longbeachae* Legionnaires' Disease, New Zealand. *Emerging Infect. Dis.* 23, 1148–1154.

Khan, M.A., Knox, N., Prashar, A., Alexander, D., Abdel-Nour, M., Duncan, C., Tang, P., Amatullah, H., Santos, Dos, C.C., Tijet, N., *et al.* (**2013**). Comparative Genomics Reveal That Host-Innate Immune Responses Influence the Clinical Prevalence of *Legionella pneumophila* Serogroups. *PLoS ONE* 8, e67298–19.

Khor, W.C., Puah, S.M., Tan, J.A.M.A., Puthucheary, S.D., and Chua, K.H. (**2015**). Phenotypic and Genetic Diversity of *Aeromonas* Species Isolated from Fresh Water Lakes in Malaysia. *PLoS ONE* 10, e0145933.

Kilvington, S., and Price, J. (**1990**). Survival of *Legionella pneumophila* within cysts of *Acanthamoeba polyphaga* following chlorine exposure. *J. Appl. Bacteriol.* 68, 519–525.

Kim, B.R., Anderson, J.E., Mueller, S.A., Gaines, W.A., and Kendall, A.M. (**2002**). Literature review-efficacy of various disinfectants against *Legionella* in water systems. *Water Research* 36, 4433–4444.

Kimiran Erdem, A., and Yazici, A. (**2008**). An in vitro evaluation of the interactions of *Legionella pneumophila* serogroups 2 to 14 strains with other bacteria in the same habitat. *Annals of Microbiology* 58, 395–401.

Kimura, S., Tateda, K., Ishii, Y., Horikawa, M., Miyairi, S., Gotoh, N., Ishiguro, M., and Yamaguchi, K. (**2009**). *Pseudomonas aeruginosa* Las quorum sensing autoinducer suppresses growth and biofilm production in *Legionella* species. *Microbiology* 155, 1934–1939.

King, C.H., Shotts, E.B., Wooley, R.E., and Porter, K.G. (1988). Survival of coliforms and bacterial pathogens within protozoa during chlorination. *Applied and Environmental Microbiology* 54, 3023–3033.

Kirschner, A.K.T. (**2016**). Determination of viable *Legionella* e in engineered water systems: Do we find what we are looking for? *Water Research* 93, 276–288.

Kodama, H., Ishimoto, M., Jono, A., and Okuda, U. (1974). Isolation and serotyping distribution of *Pseudomonas aeruginosa* from river water. *Kansenshogaku Zasshi* 49, 385–393.

Koehbach, J. (**2017**). Structure-Activity Relationships of Insect Defensins. *Front Chem* 5, 45.

Koide, M., Arakaki, N., and Saito, A. (**2001**). Distribution of *Legionella longbeachae* and other *Legionella* e in Japanese potting soils. J. Infect. *Chemother.* 7, 224–227.

Koide, M., Miyata, T., Nukina, M., Teramoto, T., Nakanishi, H., Kamiki, T., Umeda, B., and Nakai, H. (**1989**). A strain of *Pseudomonas vesicularis* isolated from shower hose which supports the multiplication of *Legionella*. *Kansenshogaku Zasshi* 63, 1160–1164.

Koide, M., Saito, A., Okazaki, M., Umeda, B., and Benson, R.F. (**1999**). Isolation of *Legionella longbeachae* serogroup 1 from potting soils in Japan. *Clin. Infect. Dis.* 29, 943–944.

Korshunova, T.Y., Ramírez-Bahena, M.-H., Chetverikov, S.P., Igual, J.M., Peix, Á., and Loginov, O. (**2016**). *Pseudomonas* turukhanskensis sp. nov., isolated from oil-contaminated soils. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66, 4657–4664.

Królasik, J., Zakowska, Z., Krepska, M., and Klimek, L. (**2010**). Resistance of bacterial biofilms formed on stainless steel surface to disinfecting agent. Pol. *J. Microbiol.* 59, 281–287.

Kruijt, M., Tran, H., and Raaijmakers, J.M. (**2009**). Functional, genetic and chemical characterization of biosurfactants produced by plant growth-promoting *Pseudomonas putida* 267. *J. Appl. Microbiol.* 107, 546–556.

Kuchta, J.M., Navratil, J.S., Shepherd, M.E., Wadowsky, R.M., Dowling, J.N., States, S.J., and Yee, R.B. (**1993**). Impact of Chlorine and Heat on the Survival of *Hartmannella*

vermiformis and Subsequent Growth of *Legionella pneumophila*. Applied and Environmental Microbiology 59, 4096–4100.

Kumar, S., Stecher, G., and Tamura, K. (**2016**). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. Molecular Biology and Evolution 33, 1870–1874.

Kurilkina, M.I., Zakharova, Y.R., Galachyants, Y.P., Petrova, D.P., Bukin, Y.S., Domysheva, V.M., Blinov, V.V., and Likhoshway, Y.V. (**2016**). Bacterial community composition in the water column of the deepest freshwater Lake Baikal as determined by next-generation sequencing. FEMS Microbiol. Ecol. 92.

Kuroki, H., Miyamoto, H., Fukuda, K., Iihara, H., Kawamura, Y., Ogawa, M., Wang, Y., Ezaki, T., and Taniguchi, H. (**2007**). *Legionella impletisol*i sp. nov. and *Legionella yabuuchiae* sp. nov., isolated from soils contaminated with industrial wastes in Japan. Systematic and Applied Microbiology 30, 273–279.

Kuzdan, C., Soysal, A., Özdemir, H., Coşkun, Ş., Akman, İ., Bilgen, H., Özek, E., and Bakır, M. (**2015**). *Rahnella aquatilis* Sepsis in a Premature Newborn. Case Rep Pediatr 2015, 860671–860673.

Kwon, S., Moon, E., Kim, T.-S., Hong, S., and Park, H.-D. (**2011**). Pyrosequencing demonstrated complex microbial communities in a membrane filtration system for a drinking water treatment plant. Microbes Environ. 26, 149–155.

L

La Scola, B. (**2004**). *Legionella drancourtii* sp. nov., a strictly intracellular amoebal pathogen. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 54, 699–703.

Labows, J.N., McGinley, K.J., Webster, G.F., and Leyden, J.J. (1980). Headspace analysis of volatile metabolites of *Pseudomonas aeruginosa* and related species by gas chromatography-mass spectrometry. Journal of Clinical Microbiology 12, 521–526.

Laird, K., Kurzbach, E., Score, J., Tejpal, J., Chi Tangyie, G., and Phillips, C. (**2014**). Reduction of *Legionella* spp. in water and in soil by a citrus plant extract vapor. Applied and Environmental Microbiology 80, 6031–6036.

Lambert, M.A., and Moss, C.W. (1989). Cellular Fatty Acid Compositions and Isoprenoid Quinone Contents of 23 *Legionella* Species. Journal of Clinical Microbiology 27, 465–473.

Lambert, R.J., Skandamis, P.N., Coote, P.J., and Nychas, G.J. (**2001**). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. J. Appl. Microbiol. 91, 453–462.

Lau, H.Y., and Ashbolt, N.J. (**2009**). The role of biofilms and protozoa in *Legionella* pathogenesis: implications for drinking water. J. Appl. Microbiol. *107*, 368–378.

LeChevallier, M.W., Cawthon, C.D., and Lee, R.G. (1988). Inactivation of biofilm bacteria. Applied and Environmental Microbiology 54, 2492–2499.

Lee, H.K., Shim, J.I., Kim, H.E., Yu, J.Y., and Kang, Y.H. (**2010**). Distribution of *Legionella* species from environmental water sources of public facilities and genetic diversity of *L. pneumophila* serogroup 1 in South Korea. Applied and Environmental Microbiology 76, 6547–6554.

Lee, Y.S., Yun, E.K., Jang, W.S., Kim, I., Lee, J.H., Park, S.Y., Ryu, K.S., Seo, S.J., Kim, C.H., and Lee, I.H. (**2004**). Purification, cDNA cloning and expression of an insect defensin from the great wax moth, *Galleria mellonella*. Insect Mol. Biol. 13, 65–72.

Lefèvre, E., Roussel, B., Amblard, C., and Sime-Nget o, T. (**2008**). The Molecular Diversity of Freshwater Picoeukaryotes Reveals High Occurrence of Putative Parasitoids in the Plankton. *PLoS ONE* 3, e2324–10.

Lefranc, M., Thenot, A., Lepere, C., and Debroas, D. (**2005**). Genetic Diversity of Small Eukaryotes in Lakes Differing by Their Trophic Status. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 5935–5942.

Leinweber, A., Weigert, M., and Kümmerli, R. (**2018**). The bacterium *Pseudomonas aeruginosa* senses and gradually responds to interspecific competition for iron. *Evolution* 72, 1515–1528.

Leippe, M. (**1995**). Ancient weapons: NK-lysin, is a mammalian homolog to pore-forming peptides of a protozoan parasite. *Cell* 83, 17–18.

Lepere, C.L.E., Masquelier, S., Mangot, J.-F.C.O., Debroas, D., and Domaizon, I. (**2010**). Vertical structure of small eukaryotes in three lakes that differ by their trophic status: a quantitative approach. *ISME J.* 4, 1509–1519.

Lerner, T.R., Lovering, A.L., Bui, N.K., Uchida, K., Aizawa, S.-I., Vollmer, W., and Sockett, R.E. (**2012**). Specialized Peptidoglycan Hydrolases Sculpt the Intra-bacterial Niche of Predatory *Bdellovibrio* and Increase Population Fitness. *PLoS Pathog.* 8, e1002524–18.

Létoffé, S., Audrain, B., Bernier, S.P., Delepierre, M., and Ghigo, J.-M. (**2014**). Aerial exposure to the bacterial volatile compound trimethylamine modifies antibiotic resistance of physically separated bacteria by raising culture medium pH. *MBio* 5, e00944–13.

Letunic, I., and Bork, P. (**2016**). Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Research* 44, W242–W245.

Li, L., Jiao, Z., Hale, L., Wu, W., and Guo, Y. (**2014**). Disruption of gene pqqA or pqqB reduces plant growth promotion activity and biocontrol of crown gall disease by *Rahnella aquatilis* HX2. *PLoS ONE* 9, e115010.

Li, L., Mendis, N., Trigui, H., Oliver, J.D., and Faucher, S.P. (**2014**). The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Front. Microbiol.* 5, 258.

Li, Q., Yu, S., Li, L., Liu, G., Gu, Z., Liu, M., Liu, Z., Ye, Y., Xia, Q., and Ren, L. (**2017**). Microbial Communities Shaped by Treatment Processes in a Drinking Water Treatment Plant and Their Contribution and Threat to Drinking Water Safety. *Front. Microbiol.* 8, 2465.

Li, W., Rokni-Zadeh, H., De Vleeschouwer, M., Ghequire, M.G.K., Sinnaeve, D., Xie, G.-L., Rozenski, J., Madder, A., Martins, J.C., and De Mot, R. (**2013**). The antimicrobial compound xantholysin defines a new group of *Pseudomonas* cyclic lipopeptides. *PLoS ONE* 8, e62946.

Li, Y., Jiang, W., Gao, R., Cai, Y., Guan, Z., and Liao, X. (**2018**). Fe(III)-based immobilized metal-affinity chromatography (IMAC) method for the separation of the catechol siderophore from *Bacillus tequilensis* CD36. *Biotech* 8, 392.

Liles, M.R., Scheel, T.A., and Cianciotto, N.P. (**2000**). Discovery of a nonclassical siderophore, legiobactin, produced by strains of *Legionella pneumophila*. *Journal of Bacteriology* 182, 749–757.

Lin, H., Zhang, S., Zhang, S., Lin, W., and Yu, X. (**2017**). The function of advanced treatment process in a drinking water treatment plant with organic matter-polluted source water. *Environ Sci Pollut Res Int* 24, 8924–8932.

Lin, T., Zhou, D., Yu, S., and Chen, W. (**2016**). The removal process of 2,2-dichloroacetamide (DCAcAm), a new disinfection by-product, in drinking water treatment process and its toxicity on zebrafish. *Chemosphere* 159, 403–411.

Lin, Y.E., Stout, J.E., and Yu, V.L. (**2011**). Controlling *Legionella* in hospital drinking water: an evidence-based review of disinfection methods. *Infect Control Hosp Epidemiol* 32, 166–173.

Lin, Y.S., Stout, J.E., Yu, V.L., and Vidic, R.D. (**1998**). Disinfection of water distribution systems for *Legionella*. *Semin Respir Infect* 13, 147–159.

Lloyd, D., Turner, N.A., Khunkitti, W., Hann, A.C., Furr, J.R., and Russell, A.D. (**2001**). Encystation in *Acanthamoeba castellanii*: development of biocide resistance. *J. Eukaryot. Microbiol.* 48, 11–16.

Loiseau, C. (**2015**). Contrôle de *Legionella* par des agents antimicrobiens produits par des bactéries environnementales. *Thèse Université de Poitiers*.

Loiseau, C., Portier, E., Depayras, S., Schlusselhuber, M., Corre, M.H., Berjeaud, J.M., and Verdon, J. (**2018**). Highlighting the potency of biosurfactants produced by *Pseudomonas* strains as anti-*Legionella* agents. *Biomed Res Int*.

Loiseau, C., Schlusselhuber, M., Bigot, R., Bertaux, J., Berjeaud, J.-M., and Verdon, J. (**2015**). Surfactin from *Bacillus subtilis* displays an unexpected anti-*Legionella* activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 5083–5093.

Lou, J.-C., Huang, C.-E., Han, J.-Y., and Huang, Y.-J. (**2010**). Generation of disinfection by-products (DBPs) at two advanced water treatment plants. *Environ Monit Assess* 162, 365–375.

Louden, B.C., Haarmann, D., and Lynne, A.M. (**2011**). Use of Blue Agar CAS Assay for Siderophore Detection. *Journal of Microbiology & Biology Education* 12, 51–53.

Luck, P.C., Jacobs, E., Roske, I., Schroter-Bobsin, U., Dumke, R., and Gronow, S. (**2010**). *Legionella* dresdenensis sp. nov., isolated from river water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60, 2557–2562.

Lurie-Weinberger, M.N., Gomez-Valero, L., Merault, N., Glöckner, G., Buchrieser, C., and Gophna, U. (**2010**). The origins of eukaryotic-like proteins in *Legionella pneumophila*. *International Journal of Medical Microbiology* 300, 470–481.

M

Ma, J., He, Y., Hu, B., and Luo, Z.Q. (**2013**). Genome Sequence of an Environmental Isolate of the Bacterial Pathogen *Legionella pneumophila*. *Genome Announcements* 1, 6001–6002.

Ma, L.-S., Hachani, A., Lin, J.-S., Filloux, A., and Lai, E.-M. (**2014**). *Agrobacterium tumefaciens* Deploys a Superfamily of Type VI Secretion DNase Effectors as Weapons for Interbacterial Competition In Planta. *Cell Host and Microbe* 16, 94–104.

Mampel, J., Spirig, T., Weber, S.S., Haagensen, J.A.J., Molin, S., and Hilbi, H. (**2006**). Planktonic Replication Is Essential for Biofilm Formation by *Legionella pneumophila* in a Complex Medium under Static and Dynamic Flow Conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 2885–2895.

Manz, W., Wendt-Potthoff, K., Neu, T.R., Szewzyk, U., and Lawrence, J.R. (**1999**). Phylogenetic Composition, Spatial Structure, and Dynamics of Lotic Bacterial Biofilms

Investigated by Fluorescent in Situ Hybridization and Confocal Laser Scanning Microscopy. *Microb. Ecol.* 37, 225–237.

Marchand, A., Verdon, J., Lacombe, C., Crapart, S., Héchard, Y., and Berjeaud, J.M. (**2011**). Anti-*Legionella* activity of staphylococcal hemolytic peptides. *Peptides* 32, 845–851.

Marston, B.J., Lipman, H.B., and Breiman, R.F. (**1994**). Surveillance for Legionnaires' disease. Risk factors for morbidity and mortality. *Arch. Intern. Med.* 154, 2417–2422.

Martinez-Murcia, A.J., Monera, A., Saavedra, M.J., Oncina, R., Lopez-Alvarez, M., Lara, E., and Figueras, M.J. (**2011**). Multilocus phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas*. *Systematic and Applied Microbiology* 34, 189–199.

Martinez, R.J., Bruce, D., Detter, C., Goodwin, L.A., Han, J., Han, C.S., Held, B., Land, M.L., Mikhailova, N., Nolan, M., *et al.* (**2012**). Complete genome sequence of Rahnella sp. strain Y9602, a gammaproteobacterium isolate from metal- and radionuclide-contaminated soil. *Journal of Bacteriology* 194, 2113–2114.

Martino, M.E., Fasolato, L., Montemurro, F., Rosteghin, M., Manfrin, A., Patarnello, T., Novelli, E., and Cardazzo, B. (**2011**). Determination of Microbial Diversity of *Aeromonas* Strains on the Basis of Multilocus Sequence Typing, Phenotype, and Presence of Putative Virulence Genes. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 4986–5000.

Masters, S., Wang, H., Pruden, A., and Edwards, M.A. (**2015**). Redox gradients in distribution systems influence water quality, corrosion, and microbial ecology. *Water Research* 68, 140–149.

Mathavan, I., and Beis, K. (**2012**). The role of bacterial membrane proteins in the internalization of microcin MccJ25 and MccB17. *Biochem. Soc. Trans.* 40, 1539–1543.

Maze, M.J., Slow, S., Cumins, A.-M., Boon, K., Goulter, P., Podmore, R.G., Anderson, T.P., Barratt, K., Young, S.A., Pithie, A.D., *et al.* (**2014**). Enhanced detection of Legionnaires' disease by PCR testing of induced sputum and throat swabs. *Eur. Respir. J*. 43, 644–646.

McClelland, M.R., Vaszar, L.T., and Kagawa, F.T. (**2004**). Pneumonia and osteomyelitis due to *Legionella longbeachae* in a woman with systemic lupus erythematosus. *Clin. Infect. Dis.* 38, e102–e106.

McCoy, W.F., Wireman, J.W., and Lashen, E.S. (**1986**). Efficacy of methylchloro/methylisothiazolone biocide against *Legionella pneumophila* in cooling tower water. *J. Ind. Microbiol.* 49–56.

McDade, J.E., Shepard, C.C., Fraser, D.W., Tsai, T.R., Redus, M.A., and Dowdle, W.R. (**1977**). Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *N Engl J Med* 297, 1197–1203.

McNeill, L.S., and Edwards, M. (**2002**). The importance of temperature in assessing iron pipe corrosion in water distribution systems. *Environ Monit Assess* 77, 229–242.

Mengaud, J.M., and Horwitz, M.A. (**1993**). The major iron-containing protein of *Legionella pneumophila* is an aconitase homologous with the human iron-responsive element-binding protein. *Journal of Bacteriology* 175, 5666–5676.

Mérault, N., Rusniok, C., Jarraud, S., Gomez-Valero, L., Cazalet, C., Marin, M., Brachet, E., Aegerter, P., Gaillard, J.L., Etienne, J., *et al.* (**2011**). Specific real-time PCR for simultaneous detection and identification of *Legionella pneumophila* serogroup 1 in water and clinical samples. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 1708–1717.

Mercante, J.W., and Winchell, J.M. (**2015**). Current and emerging *Legionella* diagnostics for laboratory and outbreak investigations. *Clinical Microbiology Reviews* 28, 95–133.

Mercy, C., Ize, B., Salcedo, S.P., de Bentzmann, S., and Bigot, S. (**2016**). Functional Characterization of *Pseudomonas* Contact Dependent Growth Inhibition (CDI) Systems. *PLoS ONE* 11, e0147435–21.

Merino, E., Jensen, R.A., and Yanofsky, C. (**2008**). Evolution of bacterial *trp* operons and their regulation. *Current Opinion in Microbiology 11*, 78–86.

Miller, M.B., and Bassler, B.L. (**2001**). Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol*. 55, 165–199.

Mnif, I., and Ghribi, D. (**2015**). Review lipopeptides biosurfactants: Mean classes and new insights for industrial, biomedical, and environmental applications. *Biopolymers* 104, 129–147.

Mondello, F., Girolamo, A., Scaturro, M., and Ricci, M.L. (**2009**). Determination of *Legionella pneumophila* susceptibility to *Melaleuca alternifolia* Cheel (tea tree) oil by an improved broth micro-dilution method under vapour controlled conditions. *J. Microbiol. Methods* 77, 243–248.

Montes, J.C., Hamdani, F., Creus, J., Touzain, S., and Correc, O. (**2014**). Impact of chlorinated disinfection on copper corrosion in hot water systems. Applied Surface *Science* 314, 686–696.

Morse, R.P., Nikolakakis, K.C., Willett, J.L.E., Gerrick, E., Low, D.A., Hayes, C.S., and Goulding, C.W. (**2012**). Structural basis of toxicity and immunity in contact-dependent growth inhibition (CDI) systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* 109, 21480–21485.

Moss, C.W., and Dees, S.B. (**1979**). Cellular Fatty Acid Composition of WIGA, a *Rickettsia*-Like Agent Similar to the Legionnaires Disease Bacterium. *Journal of Clinical Microbiology* 10, 390–391.

Moss, C.W., Weaver, R.E., Dees, S.B., and Cherry, W.B. (1977). Cellular Fatty Acid Composition of Isolates from Legionnaires Disease. *Journal of Clinical Microbiology* 6, 140–143.

Müller, M.M., Kügler, J.H., Henkel, M., Gerlitzki, M., Hörmann, B., Pöhnlein, M., Syldatk, C., and Hausmann, R. (**2012**). Rhamnolipids-next generation surfactants? *J. Biotechnol*. *162*, 366–380.

Muraca, P.W., Yu, V.L., and Goetz, A. (**1990**). Disinfection of water distribution systems for *Legionella*: a review of application procedures and methodologies. *Infect Control Hosp Epidemiol* 11, 79–88.

Murga, R., Forster, T.S., Brown, E., Pruckler, J.M., Fields, B.S., and Donlan, R.M. (**2001**). Role of biofilms in the survival of *Legionella pneumophila* in a model potable-water system. *Microbiology* 147, 3121–3126.

N

Naylor, J., and Cianciotto, N.P. (**2004**). Cytochrome cmaturation proteins are critical for in vivo growth of *Legionella pneumophila*. *FEMS Microbiology Letters* 241, 249–256.

Neilands, J.B. (1981a). Iron absorption and transport in microorganisms. *Annu. Rev. Nutr.* 1, 27–46.

Neilands, J.B. (1981b). Microbial iron compounds. *Annu. Rev. Biochem.* 50, 715–731.

Newton, H.J., Ang, D.K.Y., van Driel, I.R., and Hartland, E.L. (**2010**). Molecular Pathogenesis of Infections Caused by *Legionella pneumophila*. *Clinical Microbiology Reviews* 23, 274–298.

Newton, R.J., and McLellan, S.L. (**2015**). A unique assemblage of cosmopolitan freshwater bacteria and higher community diversity differentiate an urbanized estuary from oligotrophic Lake Michigan. *Front. Microbiol.* 6, 1028.

Ng, W.-L., and Bassler, B.L. (**2009**). Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annu. Rev. Genet.* 43, 197–222.

Nguyen, T.M.N., Ilef, D., Jarraud, S., Rouil, L., Campese, C., Che, D., Haeghebaert, S., Ganiayre, F., Marcel, F., Etienne, J., *et al.* (**2005**). A Community-Wide Outbreak of Legionnaires Disease Linked to Industrial Cooling Towers— How Far Can Contaminated Aerosols Spread? *Jid* 193, 102–111pu.

Nikolaev, Y.A., and Plakunov, V.K. (**2007**). Biofilm—"City of microbes" or an analogue of multicellular organisms? *Microbiology* 76, 125–138.

Nishida, T., Hara, N., Watanabe, K., Shimizu, T., Fujishima, M., and Watarai, M. (**2018**). Crucial Role of *Legionella pneumophila* TolC in the Inhibition of Cellular Trafficking in the Protistan Host Paramecium tetraurelia. *Front. Microbiol.* 9, 374–379.

Nostro, A., Sudano Roccaro, A., Bisignano, G., Marino, A., Cannatelli, M.A., Pizzimenti, F.C., Cioni, P.L., Procopio, F., and Blanco, A.R. (**2007**). Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and Sta*phylococcus epidermidis* biofilms. *Journal of Medical Microbiology* 56, 519–523.

O

O'Brien, I.G., and Gibson, F. (1970). The structure of enterochelin and related 2,3-dihydroxy-N-benzoylserine conjugates from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 215, 393–402.

O'Connor, T.J., Zheng, H., VanRheenen, S.M., Ghosh, S., Cianciotto, N.P., and Isberg, R.R. (**2016**). Iron Limitation Triggers Early Egress by the Intracellular Bacterial Pathogen *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* 84, 2185–2197.

O'Loughlin, R.E., Kightlinger, L., Werpy, M.C., Brown, E., Stevens, V., Hepper, C., Keane, T., Benson, R.F., Fields, B.S., and Moore, M.R. (**2007**). Restaurant outbreak of Legionnaires' disease associated with a decorative fountain: an environmental and case-control study. *BMC Infect. Dis.* 7, 93.

Ogata, H., La Scola, B., Audic, S., Renesto, P., Blanc, G., Robert, C., Fournier, P.-E., Claverie, J.-M., and Raoult, D. (**2006**). Genome Sequence of *Rickettsia bellii* Illuminates the Role of Amoebae in Gene Exchanges between Intracellular Pathogens. *PLoS Genet* 2, e76–12.

Ossowicki, A., Jafra, S., and Garbeva, P. (**2017**). The antimicrobial volatile power of the rhizospheric isolate *Pseudomonas donghuensis* P482. *PLoS ONE* 12, e0174362.

Ozanic, M., Gobin, I., Brezovec, M., Marecic, V., Trobonjaca, Z., Abu Kwaik, Y., and Santic, M. (**2016**). *F. novicida*-Infected *A. castellanii* Does Not Enhance Bacterial Virulence in Mice. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 6, 56.

P

Palmer, A., Painter, J., Hassler, H., Richards, V.P., Bruce, T., Morrison, S., Brown, E., Kozak-Muiznieks, N.A., Lucas, C., and McNealy, T.L. (**2016**). *Legionella clemsonensis* sp. nov.: a green fluorescing *Legionella* strain from a patient with pneumonia. *Microbiol Immunol* 60, 694–701.

Palusińska-Szysz, M., Janczarek, M., Kalitynski, R., Dawidowicz, A.L., and Russa, R. (**2011**). *Legionella bozemanae* synthesizes phosphatidylcholine from exogenous choline. *Microbiol. Res.* 166, 87–98.

Palusińska-Szysz, M., Zdybicka-Barabas, A., Pawlikowska-Pawlęga, B., Mak, P., and Cytryńska, M. (**2012**). Anti-*Legionella dumoffii* activity of *Galleria mellonella* defensin and apolipophorin III. *Int J Mol Sci* 13, 17048–17064.

Palusińska-Szysz, M., Zdybicka-Barabas, A., Reszczyńska, E., Luchowski, R., Kania, M., Gisch, N., Waldow, F., Mak, P., Danikiewicz, W., Gruszecki, W.I., *et al.* (**2016**). The lipid composition of *Legionella dumoffii* membrane modulates the interaction with *Galleria mellonella* apolipophorin III. *Biochim. Biophys. Acta* 1861, 617–629.

Pamp, S.J., and Tolker-Nielsen, T. (**2007**). Multiple Roles of Biosurfactants in Structural Biofilm Development by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 189, 2531–2539.

Pan, Y., Breidt, F., and Kathariou, S. (**2006**). Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in a simulated food processing environment. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 7711–7717.

Park, M., Yun, S.T., Kim, M.S., Chun, J., and Ahn, T.I. (**2004**). Phylogenetic characterization of *Legionella* -like endosymbiotic -bacteria in Amoeba proteus: a proposal for "Candidatus Legionella jeonii" sp. nov. *Environ Microbiol* 6, 1252–1263.

Park, T. (1954). Experimental studies of interspecies competition. *Physiological Zoology* 27, 177–238.

Parry, J.D. (**2004**). Protozoan grazing of freshwater biofilms. *Adv. Appl. Microbiol.* 54, 167–196.

Parte, A.C. (**2018**). LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature, 20 years on. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 68, 1825–1829.

Pascual, J., García-López, M., Bills, G.F., and Genilloud, O. (**2015**). *Pseudomonas granadensis* sp. nov., a new bacterial species isolated from the Tejeda, Almijara and Alhama Natural Park, Granada, Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65, 625–632.

Pearce, M.M., Theodoropoulos, N., Mandel, M.J., Brown, E., Reed, K.D., and Cianciotto, N.P. (**2012**). *Legionella cardiaca* sp. nov., isolated from a case of native valve endocarditis in a human heart. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62, 2946–2954.

Peypoux, F., Bonmatin, J.M., and Wallach, J. (**1999**). Recent trends in the *Biochemistry* of surfactin. Appl. Microbiol. Biotechnol. 51, 553–563.

Pine, L., George, J.R., Reeves, M.W., and Harrell, W.K. (1979). Development of a chemically defined liquid medium for growth of *Legionella pneumophila*. *Journal of Clinical Microbiology* 9, 615–626.

Pinto, A.J., Xi, C., and Raskin, L. (**2012**). Bacterial community structure in the drinking water microbiome is governed by filtration processes. *Environ. Sci. Technol.* 46, 8851–8859.

Poch, M.T., and Johnson, W. (**1993**). Ferric reductases of *Legionella pneumophila*. *Biometals* 6, 107–114.

Portier, E., Zheng, H., Sahr, T., Burnside, D.M., Mallama, C., Buchrieser, C., Cianciotto, N.P., and Héchard, Y. (**2014**). IroT/mavN, a new iron-regulated gene involved in *Legionella pneumophila* virulence against amoebae and macrophages. *Environ Microbiol* 17, 1338–1350.

Post, F.J. (1977). The microbial ecology of the Great Salt Lake. *Microb. Ecol.* 3, 143–165.

Powers, M.J., Sanabria-Valentín, E., Bowers, A.A., and Shank, E.A. (**2015**). Inhibition of Cell Differentiation in *Bacillus subtilis* by *Pseudomonas protegens*. *Journal of Bacteriology* 197, 2129–2138.

Pravinkumar, S.J., Edwards, G., Lindsay, D., Redmond, S., Stirling, J., House, R., Kerr, J., Anderson, E., Breen, D., Blatchford, O., *et al.* (**2010**). A cluster of Legionnaires' disease caused by *Legionella longbeachae* linked to potting compost in Scotland, **2008**-**2009**. *Eurosurveillance* 15, 19496.

Pukatzki, S., Ma, A.T., Sturtevant, D., Krastins, B., Sarracino, D., Nelson, W.C., Heidelberg, J.F., and Mekalanos, J.J. (**2006**). Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 1528–1533.

Q

Qin, T., Yan, G., Ren, H., Zhou, H., Wang, H., Xu, Y., Zhao, M., Guan, H., Li, M., and Shao, Z. (**2013**). High prevalence, genetic diversity and intracellular growth ability of *Legionella* in hot spring environments. *PLoS ONE* 8, e59018.

Qin, Y., Hou, J., Deng, M., Liu, Q., Wu, C., Ji, Y., and He, X. (**2016**). Bacterial abundance and diversity in pond water supplied with different feeds. *Sci Rep.* 6, 35232.

Qiu, J., and Luo, Z.-Q. (**2017**). *Legionella* and *Coxiella* effectors: strength in diversity and activity. *Nat Rev Microbiol* 1–15.

R

Raaijmakers, J.M., De Bruijn, I., Nybroe, O., and Ongena, M. (**2010**). Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiol Rev* 34, 1037–1062.

Rasch, J., Krüger, S., Fontvieille, D., Ünal, C.M., Michel, R., Labrosse, A., and Steinert, M. (**2016**). *Legionella* -protozoa-nematode interactions in aquatic biofilms and influence of Mip on *Caenorhabditis elegans* colonization. *International Journal of Medical Microbiology* 1–9.

Raza, W., Ling, N., Liu, D., Wei, Z., Huang, Q., and Shen, Q. (**2016**a). Volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* WR-1 restrict the growth and virulence traits of *Ralstonia solanacearum*. *Microbiol. Res.* 192, 103–113.

Raza, W., Wang, J., Wu, Y., Ling, N., Wei, Z., Huang, Q., and Shen, Q. (**2016**b). Effects of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens* on the growth and virulence traits of tomato bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 7639–7650.

Rebuffat, S. (**2012**). Microcins in action: amazing defence strategies of Enterobacteria. *Biochem. Soc. Trans.* 40, 1456–1462.

Reeves, M.W., Pine, L., Hutner, S.H., George, J.R., and Harrell, W.K. (**1981**). Metal requirements of *Legionella pneumophila*. *Journal of Clinical Microbiology* 13, 688–695.

Reeves, M.W., Pine, L., Neilands, J.B., and Balows, A. (**1983**). Absence of siderophore activity in *Legionella* species grown in iron-deficient media. *Journal of Bacteriology* 154, 324–329.

Rendueles, O., and Ghigo, J.-M. (**2015**). Mechanisms of Competition in Biofilm Communities. *Microbiology Spectrum* 3, 1–18.

Richardson, I.R. (**1990**). The incidence of *Bdellovibrio* spp. in man-made water systems: coexistence with *Legionella*'s. *J. Appl. Bacteriol.* 69, 134–140.

Richardson, S.D. (**2002**). The role of GC-MS and LC-MS in the discovery of drinking water disinfection by-products. *J Environ Monit* 4, 1–9.

Ríhová, J., Nováková, E., Husník, F., and Hypša, V. (**2017**). *Legionella* Becoming a Mutualist: Adaptive Processes Shaping the Genome of Symbiont in the Louse *Polyplax serrata*. *Genome Biol Evol* 9, 2946–2957.

Rittig, M.G., Schröppel, K., Seack, K.H., Set er, U., NDiaye, E.N., Maridonneau-Parini, I., Solbach, W., and Bogdan, C. (**1998**). Coiling Phagocytosis of Trypanosomatids and Fungal Cells. *Infect. Immun.* 66, 4331–4339.

Rizzardi, K., Winiecka-Krusnell, J., Ramliden, M., Alm, E., Andersson, S., and Byfors, S. (**2015**). *Legionella norrlandica* sp. nov., isolated from the biopurification systems of wood processing plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65, 598–603.

Robey, M., and Cianciotto, N.P. (**2002**). *Legionella pneumophila* feoAB Promotes Ferrous Iron Uptake and Intracellular Infection. *Infect. Immun.* 70, 5659–5669.

Robey, M., O'Connell, W., and Cianciotto, N.P. (**2001**). Identification of *Legionella pneumophila* rcp, a pagP-like gene that confers resistance to cationic antimicrobial peptides and promotes intracellular infection. *Infect. Immun.* 69, 4276–4286.

Rodgers, F.G., Greaves, P.W., Macrae, A.D., and Lewis, M.J. (1980). Electron microscopic evidence of flagella and pili on *Legionella pneumophila*. *J. Clin. Pathol.* 33, 1184–1188.

Roig, J., and Rello, J. (**2003**). Legionnaires' disease: a rational approach to therapy. *J. Antimicrob. Chemother.* 51, 1119–1129.

Rolando, M., Escoll, P., Nora, T., Botti, J., Boitez, V., Bedia, C., Daniels, C., Abraham, G., Stogios, P.J., Skarina, T., *et al.* (**2016**). *Legionella pneumophila* S1P-lyase targets host sphingolipid metabolism and restrains autophagy. *Proc Natl Acad Sci USA* 113, 1901–1906.

Roongsawang, N., Hase, K.I., Haruki, M., Imanaka, T., Morikawa, M., and Kanaya, S. (**2003**). Cloning and characterization of the gene cluster encoding arthrofactin synthetase from *Pseudomonas* sp. MIS38. *Chem. Biol.* 10, 869–880.

Russell, A.B., Hood, R.D., Bui, N.K., LeRoux, M., Vollmer, W., and Mougous, J.D. (**2011**). Type VI secretion delivers bacteriolytic effectors to target cells. *Nature* 475, 343–347.

Russell, A.B., LeRoux, M., Hathazi, K., Agnello, D.M., Ishikawa, T., Wiggins, P.A., Wai, S.N., and Mougous, J.D. (**2013**). Diverse type VI secretion phospholipases are functionally plastic antibacterial effectors. *Nature* 496, 508–512.

S

Sabaté, D.C., and Audisio, M.C. (**2013**). Inhibitory activity of surfactin, produced by different *Bacillus subtilis* subsp. subtilis strains, against *Listeria monocytogenes* sensitive and bacteriocin-resistant strains. *Microbiol. Res.* 168, 125–129.

Sadiq, R., and Rodriguez, M.J. (**2004**). Disinfection by-products (DBPs) in drinking water and predictive models for their occurrence: a review. *Sci. Total Environ.* 321, 21–46.

Sahr, T., Brüggemann, H., Jules, M., Lomma, M., Albert-Weissenberger, C., Cazalet, C., and Buchrieser, C. (**2009**). Two small ncRNAs jointly govern virulence and transmission in *Legionella pneumophila*. *Molecular Microbiology* 72, 741–762.

Samrakandi, M.M., Roques, C., and Michel, G. (**1997**). Influence of trophic conditions on exopolysaccharide production: bacterial biofilm susceptibility to chlorine and monochloramine. *Can. J. Microbiol.* 43, 751–758.

Sandkovsky, U., Sandkovsky, G., Suh, J., Smith, B., Sharp, V., and Polsky, B. (**2008**). *Legionella* pneumonia and HIV: case reports and review of the literature. *AIDS Patient Care STDS* 22, 473–481.

Schlusselhuber, M., Humblot, V., Casale, S., Méthivier, C., Verdon, J., Leippe, M., and Berjeaud, J.-M. (**2015**). Potent antimicrobial peptides against *Legionella pneumophila* and its environmental host, *Acanthamoeba castellanii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 4879–4891.

Schooling, S.R., Charaf, U.K., Allison, D.G., and Gilbert, P. (**1999**). A role for rhamnolipid in biofilm dispersion. *Biofilms* 1, 91–99.

Schooling, S.R., and Beveridge, T.J. (**2006**). Membrane Vesicles: an Overlooked Component of the Matrices of Biofilms. *Journal of Bacteriology* 188, 5945–5957.

Schroeder, G.N., Petty, N.K., Mousnier, A., Harding, C.R., Vogrin, A.J., Wee, B., Fry, N.K., Harrison, T.G., Newton, H.J., Thomson, N.R., *et al.* (**2010**). *Legionella pneumophila* Strain 130b Possesses a Unique Combination of Type IV Secretion Systems and Novel Dot/Icm Secretion System Effector Proteins. *Journal of Bacteriology* 192, 6001–6016.

Schulz, S., and Dickschat, J.S. (**2007**). Bacterial volatiles: the smell of small organisms. *Nat Prod Rep* 24, 814–842.

Segal, G., Feldman, M., and Zusman, T. (**2005**). The Icm/Dot type-IV secretion systems of *Legionella pneumophila* and *Coxiella burnetii*. *FEMS Microbiol Rev* 29, 65–81.

Seow, Y.X., Yeo, C.R., Chung, H.L., and Yuk, H.-G. (**2014**). Plant essential oils as active antimicrobial agents. *Crit Rev Food Sci Nutr* 54, 625–644.

Seydlová, G., and Svobodová, J. (**2008**). Development of membrane lipids in the surfactin producer *Bacillus subtilis*. *Folia Microbiol.* 53, 303–307.

Shafee, T.M.A., Lay, F.T., Phan, T.K., Anderson, M.A., and Hulett, M.D. (**2017**). Convergent evolution of defensin sequence, structure and function. *Cell. Mol. Life Sci.* 74, 663–682.

Shah, A.D., and Mitch, W.A. (**2012**). Halonitroalkanes, halonitriles, haloamides, and N-nitrosamines: a critical review of nitrogenous disinfection byproduct formation pathways. *Environ. Sci. Technol.* 46, 119–131.

Shaheen, M., and Ashbolt, N.J. (**2017**). Free-Living Amoebae Supporting Intracellular Growth May Produce Vesicle-Bound Respirable Doses of *Legionella* Within Drinking Water Systems. *Expo Health* 10, 201–209.

Sheffer, P.J., Stout, J.E., Wagener, M.M., and Muder, R.R. (**2005**). Efficacy of new point-of-use water filter for preventing exposure to *Legionella* and waterborne bacteria. *Am J Infect Control* 33, S20–S25.

Sherr, E.B., and Sherr, B.F. (**2002**). Significance of predation by protists in aquatic microbial food webs. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81, 293–308.

Silva, N., Alves, S., Gonçalves, A., Amaral, J.S., and Poeta, P. (**2013**). Antimicrobial activity of essential oils from Mediterranean aromatic plants against several foodborne and spoilage bacteria. *Food Sci Technol Int* 19, 503–510.

Sio, C.F., Otten, L.G., Cool, R.H., Diggle, S.P., Braun, P.G., Bos, R., Daykin, M., Camara, M., Williams, P., and Quax, W.J. (**2006**). Quorum Quenching by an N-Acyl-Homoserine Lactone Acylase from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Infect. Immun.* 74, 1673–1682.

Smith-Somerville, H.E., Huryn, V.B., Walker, C., and Winters, A.L. (**1991**). Survival of *Legionella pneumophila* in the cold-water ciliate *Tetrahymena vorax*. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 2742–2749.

Sockett, R.E., and Lambert, C. (**2004**). *Bdellovibrio* as therapeutic agents: a predatory renaissance? *Nat Rev Micro* 2, 669–675.

Sohlenkamp, C., and Geiger, O. (**2016**). Bacterial membrane lipids: diversity in structures and pathways. *FEMS Microbiol Rev* 40, 133–159.

Solórzano-Santos, F., and Miranda-Novales, M.G. (**2012**). Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Curr. Opin. Biotechnol.* 23, 136–141.

Song, D.-F., Zhu, M.-Y., and Gu, Q. (**2014**). Purification and characterization of Plantaricin ZJ5, a new bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ZJ5. *PLoS ONE* 9, e105549.

Srinivasan, A., Bova, G., Ross, T., Mackie, K., Paquette, N., Merz, W., and Perl, T.M. (**2003**). A 17-month evaluation of a chlorine dioxide water treatment system to control *Legionella* species in a hospital water supply. *Infect Control Hosp Epidemiol* 24, 575–579.

Stainer, D.W., and Scholte, M.J. (**1970**). A simple chemically defined medium for the production of phase I *Bordetella pertussis*. *J. Gen. Microbiol*. 63, 211–220.

States, S.J., Conley, L.F., Ceraso, M., Stephenson, T.E., Wolford, R.S., Wadowsky, R.M., McNamara, A.M., and Yee, R.B. (**1985**). Effects of metals on *Legionella pneumophila* growth in drinking water plumbing systems. *Applied and Environmental Microbiology* 50, 1149–1154.

Steele, T.W., Moore, C.V., and Sangster, N. (**1990**). Distribution of *Legionella longbeachae* serogroup 1 and other *Legionellae* in potting soils in Australia. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 2984–2988.

Steinert, M., Flügel, M., Schuppler, M., Helbig, J.H., Supriyono, A., Proksch, P., and Luck, P.C. (**2001**). The Lly protein is essential for p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase activity in *Legionella pneumophila*. *FEMS Microbiology Letters* 203, 41–47.

Steinert, M., Heuner, K., Buchrieser, C., Albert-Weissenberger, C., and Glöckner, G. (**2007**). *Legionella* pathogenicity: Genome structure, regulatory networks and the host cell response. *International Journal of Medical Microbiology* 297, 577–587.

Stewart, C.R., Muthye, V., and Cianciotto, N.P. (**2012**). *Legionella pneumophila* persists within biofilms formed by *Klebsiella pneumoniae*, *Flavobacterium* sp., and *Pseudomonas fluorescens* under dynamic flow conditions. *PLoS ONE 7*, e50560.

Stewart, P.S., and Franklin, M.J. (**2008**). Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Micro* 6, 199–210.

Stojek, N.M., and Dutkiewicz, J. (**2011**). Co-existence of *Legionella* and other Gram-negative bacteria in potable water from various rural and urban sources. *Ann Agric Environ Med* 18, 330–334.

Stolp, H., and Starr, M.P. (**1965**). Bacteriolysis. *Annu. Rev. Microbiol*. 19, 79–104.

Straight, P.D., Willey, J.M., and Kolter, R. (**2006**). Interactions between *Streptomyces coelicolor* and *Bacillus subtilis*: Role of Surfactants in Raising Aerial Structures. *Journal of Bacteriology* 188, 4918–4925.

Straus, W.L., Plouffe, J.F., File, T.M., Lipman, H.B., Hackman, B.H., Salstrom, S.J., Benson, R.F., and Breiman, R.F. (**1996**). Risk factors for domestic acquisition of legionnaires disease. Ohio legionnaires Disease Group. *Arch. Intern. Med.* 156, 1685–1692.

Swart, A.L., Harrison, C.F., Eichinger, L., Steinert, M., and Hilbi, H. (**2018**). *Acanthamoeba* and *Dictyostelium* as Cellular Models for *Legionella* Infection. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 8, 167–17.

T

Tahir, H.A.S., Gu, Q., Wu, H., Niu, Y., Huo, R., and Gao, X. (**2017**). *Bacillus* volatiles adversely affect the physiology and ultra-structure of *Ralstonia solanacearum* and induce systemic resistance in tobacco against bacterial wilt. *Sci Rep* 7, 40481.

Taylor, M., Ross, K., and Bentham, R. (**2009**). *Legionella*, Protozoa, and Biofilms: Interactions Within Complex Microbial Systems. *Microb. Ecol.* 58, 538–547.

The department of Health Australian Government (**2006**). *Communicable Diseases Surveillance in Australia*

Thomas, W.M., Eccles, J., and Fricker, C. (**1999**). Laboratory observations of biocide efficiency against *Legionella* in model cooling tower systems. *ASHRAE*

Thomas, X., Destoumieux-Garzón, D., Peduzzi, J., Afonso, C., Blond, A., Birlirakis, N., Goulard, C., Dubost, L., Thai, R., Tabet, J.-C., *et al.* (**2004**). Siderophore peptide, a new type of post-translationally modified antibacterial peptide with potent activity. *J. Biol. Chem.* 279, 28233–28242.

Tilney, L.G., Harb, O.S., Connelly, P.S., Robinson, C.G., and Roy, C.R. (**2001**). How the parasitic bacterium *Legionella pneumophila* modifies its phagosome and transforms it into rough ER: implications for conversion of plasma membrane to the ER membrane. *J. Cell. Sci.* 114, 4637–4650.

Tison, D.L., Pope, D.H., Cherry, W.B., Fliermans, C.B. (**1980**). Growth of *Legionella pneumophila* in association with blue-green algae (cyanobacteria). *Applied and Environmental Microbiology*. 39, 456-459.

Tomov, A., Kassovsky, V., Chorbadjiiska, L., Tsvetkova, E., Tsanev, N., and Vencheva, Z. (**1982)**. Lytic activity of *Bdellovibrio bacteriovorus* against bacteria of the family Legionellaceae. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A* 252, 96–100.

Tossa, P., Deloge-Abarkan, M., Zmirou-Navier, D., Hartemann, P., and Mathieu, L. (**2006**). Pontiac fever: an operational definition for epidemiological studies. *BMC Public Health* 6, 607–610.

Toze, S., Cahill, M., Sly, L.I., and Fuerst, J.A. (**1994**). The effect of *Aeromonas* strains on the growth of *Legionella*. *Journal of Applied Bacteriology* 77, 169–174.

Toze, S., Sly, L.I., MacRae, I.C., and Fuerst, J.A. (**1990**). Inhibition of Growth of *Legionella* Species by Heterotrophic Plate Count Bacteria Isolated from Chlorinated Drinking Water. *Curr. Microbiol.* 21, 139–143.

Travis, T.C., Brown, E.W., Peruski, L.F., Siludjai, D., Jorakate, P., Salika, P., Yang, G., Kozak, N.A., Kodani, M., Warner, A.K., *et al.* (**2012**). Survey of *Legionella* species found in thai soil. *Int J Microbiol* 2012, 218791–218794.

Traxler, M.F., Seyedsayamdost, M.R., Clardy, J., and Kolter, R. (**2012**). Interspecies modulation of bacterial development through iron competition and siderophore piracy. *Molecular Microbiology* 86, 628–644.

Tremblay, Y.D.N., Hathroubi, S., and Jacques, M. (**2014**). Les biofilms bactériens: leur importance en santé animale et en santé publique. *The Can Journ of Vet. Res* 78, 110–116.

Türetgen, I. (**2004**). Comparison of the efficacy of free residual chlorine and monochloramine against biofilms in model and full scale cooling towers. *Biofouling* 20, 81–85.

Turner, N.A., Russell, A.D., Furr, J.R., and Lloyd, D. (**2000**). Emergence of resistance to biocides during differentiation of *Acanthamoeba castellanii*. *J. Antimicrob. Chemother.* 46, 27–34.

U

Ultee, A., Gorris, L.G., and Smid, E.J. (**1998**). Bactericidal activity of carvacrol towards the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *J. Appl. Microbiol.* 85, 211–218.

V

Van Heijnsbergen, E., Schalk, J.A.C., Euser, S.M., Brandsema, P.S., Boer, den, J.W., and de Roda Husman, A.M. (**2015**). Confirmed and Potential Sources of *Legionella* Reviewed. *Environ. Sci. Technol. 49*, 4797–4815.

Vassiliadis, G., Destoumieux-Garzón, D., Lombard, C., Rebuffat, S., and Peduzzi, J. (**2010**). Isolation and characterization of two members of the siderophore-microcin family, microcins M and H47. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 288–297.

Vaz-Moreira, I., Nunes, O.C., and Manaia, C.M. (**2012**). Diversity and antibiotic resistance in *Pseudomonas* spp. from drinking water. *Sci. Total Environ.* 426, 366–374.

Veldkamp, H. (**1975**). The role of bacteria in energy flow and nutrient cycling. *Unifying Concepts in Ecology* pp 44–49.

Venkataraman, B.C., Haack, B.J., Bondada, S., and Kwaik, Y.A. (**1997**). Identification of a Gal/GalNAc Lectin in the Protozoan *Hartmanella vermiformis* as a Potential Receptor for Attachment and Invasion by the Legionnaires' Disease Bacterium. *J. Exp. Med.* 186, 537–547.

Verdon, J., Berjeaud, J.-M., Lacombe, C., and Héchard, Y. (**2008**). Characterization of anti-*Legionella* activity of warnericin RK and delta-lysin I from *Staphylococcus warneri*. *Peptides* 29, 978–984.

Verdon, J., Falge, M., Maier, E., Bruhn, H., Steinert, M., Faber, C., Benz, R., and Héchard, Y. (**2009**). Detergent-like activity and alpha-helical structure of warnericin RK, an anti-*Legionella* peptide. *Biophys. J.* 97, 1933–1940.

Verdon, J., Labanowski, J., Sahr, T., Ferreira, T., Lacombe, C., Buchrieser, C., Berjeaud, J.-M., and Héchard, Y. (**2011**). Fatty acid composition modulates sensitivity of *Legionella pneumophila* to warnericin RK, an antimicrobial peptide. BBA - *Biomembranes* 1808, 1146–1153.

Vervaeren, H., Temmerman, R., Devos, L., Boon, N., and Verstraete, W. (**2006**). Introduction of a boost of *Legionella pneumophila* into a stagnant-water model by heat treatment. *FEMS Microbiol. Ecol.* 58, 583–592.

Villanueva, C.M., Cantor, K.P., Cordier, S., Jaakkola, J.J.K., King, W.D., Lynch, C.F., Porru, S., and Kogevinas, M. (**2004**). Disinfection byproducts and bladder cancer: a pooled analysis. *Epidemiology 15*, 357–367.

Villanueva, C.M., Gracia-Lavedan, E., Bosetti, C., Righi, E., Molina, A.J., Martín, V., Boldo, E., Aragonés, N., Perez-Gomez, B., Pollan, M., *et al.* (**2017**). Colorectal Cancer and Long-Term Exposure to Trihalomethanes in Drinking Water: A Multicenter Case-Control Study in Spain and Italy. *Environ. Health Perspect*. 125, 56–65.

Vlamakis, H., Chai, Y., Beauregard, P., Losick, R., and Kolter, R. (**2013**). Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. *Nat Rev Microbiol* 11, 157–168.

W

Wadowsky, R.M., and Yee, R.B. (**1983**). Satellite growth of *Legionella pneumophila* with an environmental isolate of *Flavobacterium* breve. *Applied and Environmental Microbiology* 46, 1447–1449.

Walker, J.T., Mackerness, C.W., Mallon, D., Makin, T., Williets, T., and Keevil, C.W. (**1995**). Control of *Legionella pneumophila* in a hospital water system by chlorine dioxide. *J. Ind. Microbiol.* 15, 384–390.

Walker, T., Klasson, L., Sebaihia, M., Sanders, M.J., Thomson, N.R., Parkhill, J., and Sinkins, S.P. (**2007**). Ankyrin repeat domain-encoding genes in the wPip strain of *Wolbachia* from the Culex pipiens group. *BMC Biol* 5, 39–39.

Wardman, P., and Candeias, L.P. (**1996**). Fenton chemistry: an introduction. *Radiat. Res.* 145, 523–531.

Watanabe, K., Nakao, R., Fujishima, M., Tachibana, M., Shimizu, T., and Watarai, M. (**2016**). Ciliate *Paramecium* is a natural reservoir of *Legionella pneumophila*. *Sci Rep* 6 1–15.

Watson, K., Shaw, G., Leusch, F.D.L., and Knight, N.L. (**2012**). Chlorine disinfection by-products in wastewater effluent: Bioassay-based assessment of toxicological impact. *Water Research* 46, 6069–6083.

Whittaker, R.H., and Margulis, L. (**1978**). Protist classification and the kingdoms of organisms. *BioSystems* 10, 3–18.

Wieland, H., Ullrich, S., Lang, F., and Neumeister, B. (**2005**). Intracellular multiplication of *Legionella pneumophila* depends on host cell amino acid transporter SLC1A5. *Molecular Microbiology* 55, 1528–1537.

Wijesundara, N.M., and Rupasinghe, H.P.V. (**2018**). Essential oils from *Origanum vulgare* and *Salvia officinalis* exhibit antibacterial and anti-biofilm activities against *Streptococcus pyogenes*. *Microb. Pathog.* 117, 118–127.

Wilhelm, S. (**2017**). Chrome Azural S (CAS) Plate Assay for Iron-Binding Compounds v1. *Protocols.Io.*

Willett, J.L.E., Ruhe, Z.C., Goulding, C.W., Low, D.A., and Hayes, C.S. (**2015**). Contact-Dependent Growth Inhibition (CDI) and CdiB/CdiA Two-Partner Secretion Proteins. *J. Mol. Biol.* 427, 3754–3765.

Williams, T.M. (**2007**). The Mechanism of Action of Isothiazolone Biocides. *PowerPlant Chemistry* 9, 14–22.

Willumeit, R., Kumpugdee, M., Funari, S.S., Lohner, K., Navas, B.P., Brandenburg, K., Linser, S., and Andrä, J. (**2005**). Structural rearrangement of model membranes by the peptide antibiotic NK-2. *Biochim. Biophys. Acta* 1669, 125–134.

Wingender, J., Neu, T.R., and Flemming, H.-C. (**1999**). Microbial Extracellular Polymeric Substances *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*.

Winiecka-Krusnell, J., and Linder, E. (**2001**). Bacterial infections of free-living amoebae. *Research in Microbiology* 152, 613–619.

Winkelmann, G. (**2009**). Microbial siderophore-mediated transport. *Biochem Soc Trans* 30,1–6.

Woese, C.R., Ket ler, O., and Wheelis, M.L. (**1990**). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. Proc *Natl Acad Sci USA* 87, 4576–4579.

Wright, G.D. (**2005**). Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. *Advanced Drug Delivery Reviews* 57, 1451–1470.

Wu, H., Zhang, J., Mi, Z., Xie, S., Chen, C., and Zhang, X. (**2015**). Biofilm bacterial communities in urban drinking water distribution systems transporting waters with different purification strategies. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 1947–1955.

Wu, X., Xi, W., Ye, W., and Yang, H. (**2007**). Bacterial community composition of a shallow hypertrophic freshwater lake in China, revealed by 16S rRNA gene sequences. *FEMS Microbiol. Ecol.* 61, 85–96.

X

Xie, S., Zang, H., Wu, H., Uddin Rajer, F., and Gao, X. (**2018**). Antibacterial effects of volatiles produced by *Bacillus* strain D13 against *Xanthomonas oryzae* pv. oryzae. *Mol. Plant Pathol.* 19, 49–58.

Xu, L., and Luo, Z.-Q. (**2013**). Cell biology of infection by *Legionella pneumophila*. *Microbes and Infection* 15, 157–167.

Y

Yang, G., Benson, R.F., Ratcliff, R.M., Brown, E.W., Steigerwalt, A.G., Thacker, W.L., Daneshvar, M.I., Morey, R.E., Saito, A., and Fields, B.S. (**2012**). *Legionella* nagasakiensis sp. nov., isolated from water samples and from a patient with pneumonia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62, 284–288.

Yip, E.S., Burnside, D.M., and Cianciotto, N.P. (**2011**). Cytochrome c4 is required for siderophore expression by *Legionella pneumophila*, whereas cytochromes c1 and c5 promote intracellular infection. *Microbiology* 157, 868–878.

Yu, S., Lin, T., Chen, W., and Tao, H. (**2015**). The toxicity of a new disinfection by-product, 2,2-dichloroacetamide (DCAcAm), on adult zebrafish (*Danio rerio*) and its occurrence in the chlorinated drinking water. *Chemosphere* 139, 40–46.

Yu, V.L., Plouffe, J.F., Pastoris, M.C., Stout, J.E., Schousboe, M., Widmer, A., Summersgill, J., File, T., Heath, C.M., Paterson, D.L., *et al.* (**2002**). Distribution of *Legionella* species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: an international collaborative survey. *Jid* 186, 127–128.

Yuan, L., Zhang, S., Wang, Y., Li, Y., Wang, X., and Yang, Q. (**2018**). Surfactin Inhibits Membrane Fusion during Invasion of Epithelial Cells by Enveloped *Viruses. J. Virol.* 92, 403.

Z

Zanetti, F., Stampi, S., De Luca, G., Fateh-Moghadam, P., Antonietta, M., Sabattini, B., and Checchi, L. (**2000**). Water characteristics associated with the occurrence of *Legionella pneumophila* in dental units. *Eur. J. Oral Sci.* 108, 22–28.

Zdybicka-Barabas, A., Palusińska-Szysz, M., Gruszecki, W.I., Mak, P., and Cytryńska, M. (**2014**). *Galleria mellonella* apolipophorin III - an apolipoprotein with anti-*Legionella pneumophila* activity. *Biochim. Biophys. Acta* 1838, 2689–2697.

Zhang, Y.-M., and Rock, C.O. (**2008**). Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nat Rev Micro* 6, 222–233.

Zhang, Z., McCann, C., Stout, J.E., Piesczynski, S., Hawks, R., Vidic, R., and Yu, V.L. (**2007**). Safety and efficacy of chlorine dioxide for *Legionella* control in a hospital water system. *Infect Control Hosp Epidemiol* 28, 1009–1012.

Zhao, H., Shao, D., Jiang, C., Shi, J., Li, Q., Huang, Q., Rajoka, M.S.R., Yang, H., and Jin, M. (**2017**). Biological activity of lipopeptides from *Bacillus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101, 5951–5960.

Zheng, H., Chatfield, C.H., Liles, M.R., and Cianciotto, N.P. (**2013**). Secreted Pyomelanin of *Legionella pneumophila* Promotes Bacterial Iron Uptake and Growth under Iron-Limiting Conditions. *Infect. Immun.* 81, 4182–4191.

Zuber, S., Carruthers, F., Keel, C., Mattart, A., Blumer, C., Pessi, G., Gigot-Bonnefoy, C., Schnider-Keel, U., Heeb, S., Reimmann, C., *et al.* (**2003**). GacS sensor domains pertinent to the regulation of exoproduct formation and to the biocontrol potential of *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Mol. Plant Microbe Interact. 16*, 634–644.

Zubkov, M., and Sleigh, M. (**1999**). Growth of Amoebae and Flagellates on Bacteria Deposited on Filters. *Microb. Ecol.* 37, 107–115.

Zwart, G., Crump, B.C., Kamst-van Agterveld, M.P., Hagen, F., and Han, S.-K. (**2002**). Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers. *Aquat Microb Ecol* 28, 141–155.

Annexe

Hindawi
BioMed Research International
Volume 2018, Article ID 8194368, 15 pages
https://doi.org/10.1155/2018/8194368

Research Article

Highlighting the Potency of Biosurfactants Produced by *Pseudomonas* Strains as Anti-*Legionella* Agents

Clémence Loiseau,[1] Emilie Portier,[1] Marie-Hélène Corre,[1] Margot Schlusselhuber,[2] Ségolène Depayras,[3] Jean-Marc Berjeaud,[1] and Julien Verdon[1]

[1]*Laboratoire Ecologie & Biologie des Interactions, UMR CNRS 7267, Université de Poitiers, France*
[2]*Laboratoire Aliments Bioprocédés Toxicologie Environnements, EA 4651, Normandie Univ, UNICAEN, UNIROUEN, Caen, France*
[3]*Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement, EA 4312, Université de Rouen, France*

Correspondence should be addressed to Julien Verdon; julien.verdon@univ-poitiers.fr

Received 6 July 2018; Revised 12 September 2018; Accepted 27 September 2018; Published 22 October 2018

Academic Editor: Horacio Bach

Copyright © 2018 Clémence Loiseau et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Legionella pneumophila, the causative agent of Legionnaires' disease, is a waterborne bacterium mainly found in man-made water systems in close association with free-living amoebae and multispecies biofilms. *Pseudomonas* strains, originating from various environments including freshwater systems or isolated from hospitalized patients, were tested for their antagonistic activity towards *L. pneumophila*. A high amount of tested strains was thus found to be active. This antibacterial activity was correlated to the presence of tensioactive agents in culture supernatants. As *Pseudomonas* strains were known to produce biosurfactants, these compounds were specifically extracted and purified from active strains and further characterized using reverse-phase HPLC and mass spectrometry methods. Finally, all biosurfactants tested (lipopeptides and rhamnolipids) were found active and this activity was shown to be higher towards *Legionella* strains compared to various other bacteria. Therefore, described biosurfactants are potent anti-*Legionella* agents that could be used in the water treatment industry although tests are needed to evaluate how effective they would be under field conditions.

1. Introduction

Bacteria of the *Legionella* genus are Gram-negative natural inhabitants of freshwater environments. Among the 65 *Legionella* species referenced to date, *L. pneumophila* is the leading cause of severe pneumonia called Legionnaires' disease (LD). Furthermore the serogroup 1 is responsible for 82.9% of the cases in Europe [1] and for over 80% of the cases worldwide [2, 3]. *L. pneumophila* can colonize man-made water settings from natural water sources, being now considered as an opportunistic plumbing pathogen. Through the literature, we can notice that LD outbreaks have been linked to a variety of water sources like cooling towers, drinking water supply systems, spa pools, and even street cleaning trucks [4–6]. Multiplication of *Legionella* in those artificial water systems is highly facilitated by temperatures around 35°C and factors such as water stagnation, poor maintenance, no or reduced water disinfection and the presence of free-living protozoa feeding on biofilms [7, 8]. Biofilms have been identified as an ecological key niche in which *L. pneumophila* survives and stays in wait for its natural hosts, amoebae, and ciliates [9]. Indeed, protozoan predators are the natural hosts of *L. pneumophila*, and humans are accidental hosts as judged by the evidence that only a single and recent case of probable human-to-human transmission has been reported to date [10]. Following the uptake of *L. pneumophila* by phagocytic cells, this bacterium avoids lysosome mediated degradation and forms a unique replication-permissive compartment within its host cell, called the *Legionella* containing vacuole (LCV) [11]. After replication, they are able to evade LCV, escape from the spent host cell, and disseminate in the environment looking for new suitable hosts (for recent review see [12]).

In order to survive in water sources, *L. pneumophila* is facing other biological challengers aside from protozoa as represented by others microbial inhabitants. In 2008, a study

screened 80 aquatic bacterial strains including 5 referenced strains and showed that 66.2% displayed antagonistic activity against *L. pneumophila* [13]. Interestingly, among the *Pseudomonas* genus (representing 75% of all tested strains), 72% were active. However, to date, the antagonistic molecules of interest remain uncharacterized. On the other hand, several authors have shown that many *Pseudomonas* species can produce biosurfactants which are surface-active compounds. Those compounds known to display various functional properties like in structural biofilm formation/cells dispersion also exhibit particularly lytic and growth-inhibitory activities against a broad range of microorganisms, including viruses, mycoplasmas, bacteria, fungi, and oomycetes [14–16]. Among the wide range of structurally different biosurfactants that have been identified to date, *Pseudomonas* species can produce glycolipids and lipopeptides [17, 18]. Lipopeptides are constituted by a lipid tail linked to a short cyclic or linear peptide moiety. Based on differences in the length and composition of the lipid moiety as well as in the type, number and configuration of the amino acids in the peptide chain were initially classified into four groups: Amphisin, syringomycin, tolaasin, and viscosin [19]. However, several lipopeptides produced by *Pseudomonas* spp. which were characterized later displayed structural features which differ from these archetypes like putisolvins, syringofactins, and orfamides that extend the initial classification [20–22]. The first lipopeptide described in the literature and which remains the best known biosurfactant to date is surfactin produced by many *Bacillus* strains [23]. Members of the surfactin family are constituted of a heptapeptide moiety linked to a β-hydroxylated fatty acid to form a cyclic lactone ring and display antiviral and antibacterial activities [24]. Recently, a surfactin mixture produced by the strain *B. subtilis* AM1 was found active against various *Legionella* strains, including nonpneumophila, *pneumophila* serogroup 1, and *pneumophila* nonserogroup 1 strains [25]. To the best of our knowledge, this is the first time that such an activity was demonstrated and this study remains the only one published so far. This activity was striking as several reviews have highlighted a limited activity of many lipopeptides against Gram-negative bacteria [14, 15, 17]. However, lipopeptides produced by *Pseudomonas* and *Bacillus* species have not been tested extensively for activity against other saprophytic bacteria, but mostly for activity against human pathogenic bacteria like *Bacillus* sp. or *Mycobacterium* sp. [14]. The surfactin mixture from *B. subtilis* AM1 was also able to break down existing biofilms of *L. pneumophila* [25] suggesting that it could represent a potent tool for the biological control of the pathogen in the water treatment industry.

Rhamnolipids are glycolipid secondary metabolites typically constituted of dimer of 3-hydroxy fatty acids linked through a beta glycosidic bond to a mono- or di-rhamnose moiety [26]. Up to now, more than one hundred rhamnolipids homologues have been discovered mainly in *Pseudomonas* species even if several bacteria belonging to other genera like *Burkholderia* or *Acinetobacter* were also reported to produce rhamnolipids [27]. These amphiphilic biodegradable molecules have been reported to be useful as biological control agents due to their intrinsic wide-ranging antimicrobial potency [28]. For example, the mixture (six homologues) extracted from the *P. aeruginosa* LBI strains displayed a high activity against many bacterial strains like *Enterobacter aerogenes* and *Proteus mirabilis* with MIC between 4 and 8 μg/ml [29]. Also, various bacterial species were sensitive to the *P. aeruginosa* 47T2 mixture (up to 11 homologues), *Enterobacter aerogenes* being by far the most sensitive one (MIC of 4 μg/ml) [30]. To date, except for surfactin which was already described for its anti-*Legionella* activity [25], neither lipopeptide nor rhamnolipid mixture was reported to be active against bacteria of the *Legionella* genus.

The aim of our study was to discover and characterize natural anti-*Legionella* compounds produced by *Pseudomonas* strains. Therefore, a bacterial collection with both clinical and environmental strains was built and screened to find *Pseudomonas* sp. with the capacity to inhibit the growth of *L. pneumophila*. Biomolecules responsible for this antagonistic activity were then purified by RP-HPLC and their chemical structures were elucidated by LC-MS-MS. Antimicrobial activities were determined against selected Gram-positive and Gram-negative indicator strains including many *Legionella* species.

2. Materials and Methods

2.1. Bacterial Strains. *Pseudomonas* strains used in this study are listed in Table 1 while other bacterial strains are listed in Tables 5 and 6. *Pseudomonas* strains were routinely cultured at 28°C for nonaeruginosa strains or 37°C for *aeruginosa* strains either on LB agar plates or in LB broth under shaking (180 rpm). LB was composed of 5 g/l Yeast extract, 10g/l Tryptone and 5 g/l NaCl. *Legionella* strains were cultured at 37°C either on buffered charcoal yeast extract (BCYE) agar plates or in buffered yeast extract (BYE) liquid medium under shaking (150 rpm). BYE was composed of 5 g/l N-(2-Acetamido)-2-aminoethanesulfonic acid, 10 g/l Yeast extract and pH 6.9. BCYE was made from BYE by adding 2 g/l Activated charcoal and 15 g/l Agar. *L. pneumophila* Lens CIP 108286 [31] was used as the main target for anti-*Legionella* activity assays. Other bacteria were grown either on Brain Heart Infusion (BHI; Fisher Scientific, Illkirch, France) agar plates or broth, at 30°C or 37°C, depending on the tested strain.

2.2. Culture Conditions and Reagents. Rhamnolipids production was achieved by cultivating *Pseudomonas* strains at 30°C for 96 h under shaking (180 rpm) in a mineral salt medium (MSM) with mannitol (20 $g.l^{-1}$) as the only carbon source [41]. For lipopeptides production, *Pseudomonas* strains were grown at 17°C for 96 h under shaking (180 rpm) in MSM medium supplemented with glucose (20 $g.l^{-1}$).

A commercial solution of rhamnolipids was purchased from Sigma-Aldrich (Reference R95DD; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Rhamnolipids were dissolved in a water/acetonitrile (ACN) (65:35, v/v) mixture with 4 mM ammonium acetate at a final concentration of 5 $mg.ml^{-1}$. Stock solutions were stored at 4°C and freshly diluted in sterile distilled water prior to each experiment. All other

reagents were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA) unless stated otherwise.

2.3. In Vitro Antibacterial Assays

2.3.1. Spot on Lawn Assay. The target *strain, L. pneumophila* Lens, was spread (100 μl at OD_{600} = 0.1) onto a BCYE agar plate. Then, 10 μl of overnight cultures of each *Pseudomonas* strain was spotted onto the surface of the agar plate before incubation for 96 h at 28°C or 37°C. An inhibition area, around the producing strain, revealed the antibacterial activity.

2.3.2. Well Diffusion Assay. A *L. pneumophila* Lens suspension (100 μl at OD_{600} = 0.1) was spread onto a BCYE agar plate. Wells were punched into the agar and filled with 100 μl of 15 times concentrated supernatants of active *Pseudomonas* strains. Plates were then incubated 96 h at 37°C. Antibacterial activity was revealed by a zone of inhibition around the well.

2.3.3. Determination of Minimum Inhibitory Concentrations. Minimum inhibitory concentrations (MICs) of biosurfactants towards various bacterial strains were measured according to the dilution method detailed elsewhere [42]. MIC was defined as the lowest concentration of biosurfactant required to totally inhibit the growth of a selected strain after a chosen incubation period (24 h or 96 h), depending on the tested strain.

2.4. Detection of Biosurfactants

2.4.1. Drop Collapse Test. A drop of 50 μl of each active *Pseudomonas* strain supernatant, containing 2.5 μl of a 20 mg. ml^{-1} methylene blue solution, was placed on a piece of parafilm. Drops containing biosurfactants collapse, whereas nonsurfactant-containing drops remain stable. In this study, concentrated LB broth (15X) was used as a negative control while surfactin produced by *Bacillus subtilis* LMG 28342 [25] was used as a positive control.

2.4.2. Amino Acids and Sugars Detection. The peptide moiety of lipopeptides was detected using a 0.25% ninhydrin solution (prepared in acetone and acetic acid). A sample volume of 10 μl was spotted onto a silica plate (Saint-Louis, MO, USA). The plate was then sprayed with ninhydrin and heated at 105°C until development of a purple color. Surfactin produced by *Bacillus subtilis* LMG 28342 [25] was used as a positive control. The sugar moiety of rhamnolipids was detected using a 0.15% anthrone solution. A sample volume of 10 μl was spotted onto a silica plate and the plate was then sprayed with anthrone. The presence of sugars was revealed by the development of a blue color. Glucose and a commercial solution of rhamnolipids were both used as positive controls.

2.5. Extraction of Biosurfactants

2.5.1. Lipopeptides. Bacteria were removed from MSM culture medium by centrifugation (10,000 x g, 30 min, 4°C) and the resulting supernatant was sterilized by filtration through a 0.22 μm syringe filter (Sarstedt AG & Co. KG, Germany). Then, the cell-free supernatant was extracted three times with ethyl acetate (1:1, v/v). The collected organic fractions were evaporated under vacuum, and the residue was dissolved in 5 ml of H_2O/ACN (3:2, v/v). The resulting solution was termed "Lipopeptides raw extract".

2.5.2. Rhamnolipid. Bacteria were removed from MSM culture medium by centrifugation (10,000 x g, 30 min, 4°C) and the resulting supernatant was sterilized by filtration through a 0.22 μm syringe filter (Sarstedt AG & Co. KG, Germany). The supernatant pH was then adjusted to 3 (using 1M HCl). The resulting acidified cell-free supernatant was extracted three times with ethyl acetate (1:1, v/v) and the collected organic fractions were evaporated under vacuum. The crude extract was then dissolved in 5 ml of H_2O/ACN (3:2, v/v) and the solution was named "Rhamnolipids raw extract".

2.6. Purification of Biosurfactants

2.6.1. Lipopeptides. The "Lipopeptides raw extracts" were diluted in a H_2O/ACN (1:1, v/v) mixture with 0.2% formic acid and separated by reverse-phase HPLC. Separation was conducted on a Chromolith® SpeedROD RP-18e reverse-phase HPLC column (4.6 x 50 mm) (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) with a Dionex P680 HPLC pump, fitted with a Dionex UltiMate 3000 detector. Elution was monitored at 205 nm, 214 nm and 280 nm. Separation was carried out using a H_2O/ACN/formic acid 0.2% (v/v) solvent system. After an initial 2 min wash with 60% ACN, elution was achieved in 23 min at a flow rate of 0.8 ml min^{-1} with an 18 min linear gradient from 60 to 100% ACN, followed by a 5 min wash with 100% ACN. All the collected fractions were lyophilized and stored at -20°C for further studies.

2.6.2. Rhamnolipids. The "Rhamnolipids raw extracts" were diluted in a H_2O/ACN (1:1, v/v) mixture with 4 mM ammonium acetate and separated by reverse-phase HPLC similarly as described above for lipopeptides. Separation was carried out using a H_2O/ACN/4mM ammonium acetate solvent system. After an initial 4 min wash with 35% ACN, elution was achieved in 31 min at a flow rate of 0.4 ml min^{-1} with a 5 min linear gradient from 35% to 50% ACN, 50% ACN for 6 min, followed by a linear 20 min gradient from 50% to 90% ACN. Fractions were collected every minute, lyophilized and stored at -20°C for further studies.

2.7. Mass Spectrometry Analyses of Biosurfactants. The molecular masses of biosurfactants were determined by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) with a Xevo Q-TOF (Waters, Milford, MA, USA) mass spectrometer. Samples were suspended in 50% ACN/0.2% formic acid (v/v). LC-MS mass spectra were performed, in positive mode for lipopeptides and negative mode for rhamnolipids, with a cone voltage ramping from 20 to 40 V. The spray voltage was set to 3.0 kV, the source temperature to 120°C and the desolvation temperature to 450°C. The LC separation

was conducted using the same column and gradient as for HPLC analyses indicated previously except for the flow rate which was reduced to 0.5 ml min^{-1}. LC-MS/MS mass spectra were performed in the MS^E mode (Waters, Milford, MA, USA). Briefly, in the MS^E mode, mass spectrometric scans alternate all along the experiment between low (10 V) and high (ramping from 30 to 60 V) fragmentation energy delivering for the same LC separation two chromatograms corresponding to MS and MS/MS analyses, respectively.

3. Results

3.1. Screening of a Pseudomonas Collection. Twenty-one *Pseudomonas* sp. strains of environmental or clinical origin and representing eight different species were screened for antagonistic activity against *L. pneumophila* Lens using a spot on lawn assay. As presented in Table 1, an inhibition zone was observed around all colonies of *P. aeruginosa* (3/3), *P. fluorescens* (5/5), and, with a smaller diameter, *P. syringae* (2/2). *P. otitidis* 4014 and *P.* sp. DSS73 also displayed a large zone of inhibition. Surprisingly, only one of the 4 *P. putida* strains tested appeared to be active against *L. pneumophila* Lens. Therefore, these strains inhibited *L. pneumophila* Lens growth via the production of, at least, one diffusible active compound. On the contrary, no zone of inhibition was observed around colonies of all tested *P. fulva* strains (3/3) as well as *P. cepacia* 4512 and *P. libanensis* 4000. These strains did not secrete any anti-*Legionella* compound or in too low concentration to be detected.

In order to demonstrate that antimicrobial compounds were effectively secreted by all the active strains, their culture supernatants were also tested against *L. pneumophila* Lens by well diffusion assay on BCYE plates (Table 1). Crude supernatants did not show any antibacterial activity but after being concentrated 15 times, an anti-*Legionella* activity, related to a zone of inhibition around the well containing samples, was observed. Anti-*Legionella* compounds were indeed secreted by active bacteria cultivated in broth medium, but at quite low amounts.

3.2. Chemical Nature of Active Compounds. Different members of the genus *Pseudomonas* are known to produce biosurfactants with antimicrobial activities [15, 28]. To check if the anti-*Legionella* activity could be attributed to biosurfactants, their presence in the culture supernatant was determined by the drop collapse test. This qualitative test is indicative of the surface-active and wetting activities [43] and it represents an indirect measurement of surface activity of a biosurfactant. Interestingly, the drops of culture supernatant for all inactive strains remained stable, whereas the culture supernatant of all active strains induced a drop collapse (Table 2). These results indicate that the anti-*Legionella* compounds secreted by *Pseudomonas* strains were correlated to the presence of biosurfactants. Therefore, putative biosurfactants were extracted from culture supernatants using ethyl acetate as previously described [41, 44]. The subsequent extracts were found active against *L. pneumophila* when tested using well diffusion assay (Table 1). On the contrary, similar extracts obtained from inactive strains did not display any activity. Moreover, all aqueous extracts that correspond to the remaining cell-free supernatants after extraction with ethyl acetate were found inactive too.

The extracts obtained from the three *P. aeruginosa* strains and *P. otitidis* 4014 were found positively colored by anthrone, but not ninhydrin, revealing the presence of glucidic compounds whereas all the other active extracts were only colored by ninhydrin (Table 2). These results indicated that tested *P. aeruginosa* strains could produce rhamnolipids as well as *P. otitidis* 4014. Other active strains were found to produce biosurfactants containing peptidic moieties, probably lipopeptides. Finally, inactive strains did not produce any glucidic or peptidic biosurfactants as indicated by the lack of coloration (Table 2).

3.3. Purification and Identification of Lipopeptides. *P. fluorescens* (MAFD21c, DSS73, MFAO2, PfA7b, and MFAH4a) and *P. putida* MFAF88 were grown in MSM medium [44] and lipopeptides were extracted with ethyl acetate. For each strain, RP-HPLC chromatograms of ethyl acetate extracts displayed at least two peaks (data not shown) which could correspond to lipopeptides, according to Janek and coworkers [44]. In parallel, extracts were analyzed by LC-MS and LC-MS/MS in order to characterize active molecules. Results of these analyses are summarized in Table 3. All of the active fractions were found to contain a molecule displaying a molecular mass already described in the literature (Table 3) except for the *P.* sp. DSS73 fraction with a retention time of 11.9 min. The latter one molecular mass, which was named Amphisin-like, is reduced by 14 Da as compared to Amphisin and could correspond to the replacement of a leucine residue by a valine in the peptidic part of the molecule. The other lipopeptides produced by this strain correspond to Amphisin and Tensin which were also found in the *P. fluorescens* MFAO2 extract (Table 3). *P. putida* MFAF88 lipopeptides were identified as Putisolvin I and II. Massetolide E and Viscosin were identified in the *P. fluorescens* PfA7b extract. Finally, *P. fluorescens* MHA4a and MFAD21c were both found to produce PPZPM-1a and PPZPM-2a. Finally, full 1:1 identification is likely for the various lipopeptides, but must await further confirmation through chemical or genomic sequence analysis (Supplementary Table S1).

To estimate the proportion between lipopeptides contained in each extract, the relative quantity for each molecule was measured (Table 3). For some strains, in our conditions, lipopeptides were produced in similar amounts (*P. fluorescens* PfA7b and *P. fluorescens* MFAH4a) whereas for most of strains (*P. fluorescens* MFAO2, MFAD21c, *P.* sp. DSS73, and *P. putida* MFAF88) proportions of lipopeptides produced were really dissimilar. Thus, proportions of Amphisin, Amphisin-like and Tensin produced by the strain DSS73 were 78.4%, 18.2% and 3.4%, respectively, whereas for *P. fluorescens* MFAO2, the biosurfactant mixture was composed of 6.1% of Amphisin and 93.9% of Tensin.

3.4. Purification and Identification of Rhamnolipids. To characterize the chemical structure of rhamnolipids produced by

Table 1: Anti-*Legionella pneumophila* activity of *Pseudomonas* strains.

Pseudomonas strains	Anti-*Legionella* activity[a]		Reference/Source[b]
	Colony	Concentrated supernatant (15X)	
P. aeruginosa 8H	+++	+++	EBI collection
P. aeruginosa CHA	+++	+++	[32]
P. aeruginosa UCBPP-PA14	+++	+++	[33]
P. cepacia 4512	-	-	EBI collection
P. sp DSS73	+++	++	[34]
P. fluorescens MFAD21c	+++	+	[35]
P. fluorescens MFAH4a	+++	+	[35]
P. fluorescens MFAO2	+++	++	[35]
P. fluorescens MFE01	+++	+	[36]
P. fluorescens PfA7b	+++	+	LMSM collection
P. fulva 1324	-	-	EBI collection
P. fulva B6	-	-	EBI collection
P. fulva B8	-	-	EBI collection
P. libanensis 4000	-	-	EBI collection
P. otitidis 4014	+++	+	EBI collection
P. putida 1243	-	-	EBI collection
P. putida 1312	-	-	EBI collection
P. putida MFAF88	++	+	[35]
P. putida MFAK14	-	-	[35]
P. syringae MFAA66a	+	-	[35]
P. syringae MFAE88	+	-	[35]

The anti-*Legionella* activity of the concentrated supernatant for each strain grown in LB medium is the mean of three independent experiments.
[a]-: no activity.
+: zone of inhibition with a diameter < 4 mm.
++: zone of inhibition with a diameter between 4 and 8 mm.
+++: zone of inhibition with a diameter > 8 mm.
[b]EBI: Laboratoire Ecologie & Biologie des Interactions, UMR CNRS 7267, Université de Poitiers; LMSM: Laboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement, EA4312, Université de Rouen.

P. aeruginosa strains (8H, CHA and UCBPP-PA14) and *P. otitidis* 4014, bacteria were cultivated in MSM broth containing mannitol as the only carbon source [41]. Rhamnolipids extracted with ethyl acetate from culture supernatants were then separated using RP-HPLC. Because rhamnolipids have no UV-absorptive properties, fractions were blind collected every minute during the elution and then tested against *L. pneumophila*. In parallel, extracts were analyzed by LC-MS and LC-MS/MS in order to characterize active molecules. All fractions, which were found active against *Legionella*, contained rhamnolipids with at least two congeners. Rhamnolipids consist of one or two units of rhamnose linked to one or two hydroxylated fatty acid with C8 to C12 chains, which could be saturated or not. The molecular masses of pseudomolecular ions and characteristic fragments observed, respectively, in MS and MS/MS spectra are listed in Table 4. Several types of rhamnolipids congeners of molecular masses in the range m/z 473-703, depending on their number of rhamnose residues and the length of their fatty acid chains, were observed. Structural characterization was achieved using MS/MS spectra by detection of characteristic fragments [29] and an example is detailed on Figures 1 and 2. The m/z of the pseudomolecular ion $[M\text{-}H]^-$ of component A is 649 Da (Figure 1(a)). Thus, the parent ion at m/z 649 was fragmented by MS/MS and showed daughter ions at m/z 479 (x), 309, 339 (y), and 169 (z) (Figure 1(b)). Fragment at m/z 309 is characteristic of di-rhamnolipids. Indeed, it corresponds to the di-rhamnosyl residue (Figure 2). The fragment at m/z 339 corresponds to the lipid moiety composed of two hydroxylated fatty acids containing ten carbons (C10). The fragment at m/z 479 results from the rupture of the ester bond between the two fatty acids. This fragment is characteristic of di-rhamnolipids carrying a C10 hydroxylated fatty acid directly linked to the carbohydrate part of the molecule. Taken together, the component A is a di-rhamnolipid carrying two C10 hydroxylated fatty acids (Rha-Rha-C_{10} -C_{10}) (Figure 2).

Up to 29 rhamnolipids homologues containing one or two rhamnose residues linked to one or two hydroxylated fatty acids were identified in *Pseudomonas* culture supernatants (Table 4). *P. aeruginosa* PA14 produced the highest number of homologues (25) and the lowest was found for *P. aeruginosa*

Table 2: Determination of the chemical nature of active compounds produced by *Pseudomonas* strains.

Pseudomonas strains	Drop collapse assay	Ethyl acetate extract activity	Coloration by anthrone	Coloration by ninhydrin
P. aeruginosa 8H	+	+	+	-
P. aeruginosa CHA	+	+	+	-
P. aeruginosa UCBPP-PA14	+	+	+	-
P. cepacia 4512	-	-	-	-
P. sp DSS73	+	+	-	+
P. fluorescens MFAD21c	+	+	-	+
P. fluorescens MFAH4a	+	+	-	+
P. fluorescens MFAO2	+	+	-	+
P. fluorescens MFE01	+	+	-	+
P. fluorescens PfA7b	+	+	-	+
P. fulva 1324	-	-	-	-
P. fulva B6	-	-	-	-
P. fulva B8	-	-	-	-
P. libanensis 4000	-	-	-	-
P. otitidis 4014	+	+	+	-
P. putida 1243	-	-	-	-
P. putida 1312	-	-	-	-
P. putida MFAF88	+	+	-	+
P. putida MFAK14	-	-	-	-
P. syringae MFAA66a	+	+	-	+
P. syringae MFAE88	+	+	-	+

+: three independent assays give a positive result.
-: three independent assays give a negative result.

8H (11). Only 7 rhamnolipid homologues (Rha-C_{10} C_8; Rha-C_{10} C_{10}; Rha-Rha-C_{10} C_8; Rha-Rha-C_{10} C_{10}; Rha-Rha-C_{10} $C_{12:1}$; Rha-Rha-C_{10} C_{12}; Rha-Rha-C_{10}) were produced by the 3 strains. Interestingly, *P. aeruginosa* 8H secreted only di-rhamnosyl carrying two fatty acids species.

Finally, the orcinol reaction revealed that extracts contained rhamnose amounts of 79.95 ± 16.61 mg/ml for *P. aeruginosa* 8H, 66.84 ± 3.43 mg/ml for *P. aeruginosa* CHA, 10.99 ± 4.18 mg/ml for *P. aeruginosa* UCBPP-PA14 and 4.07 ± 1.56 mg/ml for *P. otitidis* 4014. It has to be noted that the rhamnolipid content of *P. aeruginosa* 8H extract is overestimated because it contains only di-rhamnosyl rhamnolipids contrarily to the other strains extracts.

3.5. Anti-Legionella Activity of Biosurfactants

3.5.1. Lipopeptides. Firstly, HPLC fractions corresponding to identified lipopeptides were collected, concentrated and tested against *L. pneumophila*. All fractions were found active except those corresponding to the molecules with the lowest proportions, Putisolvin II (23.4%), Amphisin-like (18.2%), Tensin in DSS73 extract (3.4%) and Amphisin in MFAO2 extract (6.1%) (Table 3). Because Amphisin and Tensin were found active when obtained in larger amounts from other extracts, we supposed that Tensin from the strain DSS73, Putisolvin II and Amphisin-like appeared inactive because of their low concentration. It has to be noted that it is impossible to quantify the amounts of lipopeptides using classical colorimetric methods. To confirm this proposal, fractions corresponding to each of these two molecules were obtained from more than twenty HPLC runs and pooled before being concentrated. In both cases, fractions were found active against *L. pneumophila*. In conclusion, all the lipopeptides produced by *Pseudomonas* species were found to be active against *L. pneumophila*.

Secondly, the antagonistic potency of the purified lipopeptide mixtures was determined against various bacterial strains previously used in antibacterial assays [25, 45, 46]. Because it was difficult to quantify the lipopeptide content of extracts, activities were expressed as a function of the first twofold dilution of the extract which totally inhibited the growth of the target bacteria (Table 5). All of the mixtures were more or less active against *Legionella* species. However, mixtures were not active against the other Gram-negative or Gram-positive bacteria tested so far. Thus, these results highly suggest a specific activity of lipopeptide mixtures against bacteria of the *Legionella* genus. The *P. fluorescens* MFAH4a extract seemed to be the less active one, with activities observed only for undiluted to four times diluted solutions. On the contrary, *P. fluorescens* PfA7b extract appeared to be the most antibacterial extract (Table 5).

3.5.2. Rhamnolipids. MICs of the rhamnolipid mixtures produced by *Pseudomonas* strains cultured in MSM broth were

TABLE 3: Pseudomolecular ions and main product ions obtained in positive mode from ESI-MSn (n=1, 2) analyses of purified active HPLC fractions from ethyl acetate extract of *Pseudomonas* sp. cell-free supernatants.

Producing strain	Name	$[M+H]^+$	Main product ions in MS-MS (m/z)	R_t [min]	Relative area (%)	Anti-*L. pneumophila* activity	Reference
P. putida MFAF88	Putisolvin I	1380.7	454; 567; 863; 927; 1040; 1169	14.7	76.6	+	[20]
	Putisolvin II	1394.7	1054; 1183	15.7	23.4	-	
P. fluorescens PfA7b	Massetolide E	1112.6	496; 595; 829; 700	13.9	54.8	+	[37]
	Viscosin/Massetolide F	1126.6	496; 595; 714; 843	14.8	45.2	+	
P. fluorescens MFAD21c	PPZPM-1a	1253.8	284; 496; 609; 970; 1235	11.2	61.7	+	[38]
	PPZPM-2a	1239.8	284; 496; 595; 956; 1221	12.2	38.3	+	
P. fluorescens MFAH4a	PPZPM-1a	1253.8	284; 496; 609; 970; 1235	11.2	53.1	+	[38]
	PPZPM-2a	1239.8	284; 496; 595; 956; 1221	12.1	46.9	+	
P. sp DSS73	Amphisin	1395.6	482; 595; 997; 1112	12.5	78.4	+	[39, 40]
	Amphisin-like	1384.7	482; 595; 997; 1098	11.9	18.2	-	
	Tensin	1409.5	482; 595; 1011; 1026	13.2	3.4	-	
P. fluorescens MFAO2	Amphisin	1395.6	482; 595; 997; 1112	12.7	6.1	-	[39, 40]
	Tensin	1409.8	482; 595; 1011; 1026	13.2	93.9	+	

Table 4: Chemical composition of rhamnolipid mixtures produced by *Pseudomonas* strains.

Rhamnolipid structure	[M-H]⁻ (*m/z*)	Ion fragments (*m/z*)	*Pseudomonas* strain			
			PA14	8H	CHA	4014
Mono-rhamno-di-lipid						
Rha-C8-C8	447	Nd	+	-	-	-
Rha-C10-C8:1	473	327	-	-	-	+
Rha-C8:1-C10	473	333	-	-	-	+
Rha-C10-C8	475	333	+	-	+	+
Rha-C8-C10	475	305	+	-	+	+
Rha-C10-C10	503	339, 333, 169	+	-	+	+
Rha-C10-C12:1	529	333, 195	+	-	+	-
Rha-C12:1-C10	529	359, 169	+	-	+	-
Rha-C10-C12	531	333	+	-	-	-
Rha-C12-C10	531	361	+	-	-	-
Di-rhamno-mono-lipid						
Rha-Rha-C8	451	Nd	+	-	+	-
Rha-Rha-C10	479	Nd	+	-	+	-
Rha-Rha-C12:2	503	Nd	+	-	+	-
Di-rhamno-di-lipid						
Rha-Rha-C8:1-C8:1	589	449, 309, 279, 140	-	-	-	+
Rha-Rha-C8-C8	593	451, 142	+	+	+	-
Rha-Rha-C10-C8	621	479, 142	+	+	+	+
Rha-Rha-C8-C10	621	451, 169	+	+	+	+
Rha-Rha-C10-C10:1	647	479, 337, 309, 167	-	+	-	-
Rha-Rha-C8-C12:1	647	451	+	-	-	-
Rha-Rha-C12:1-C8	647	505	+	-	-	-
Rha-Rha-C10-C10	649	479, 339, 309, 169	+	+	+	+
Rha-Rha-C11-C10	665	494, 309, 169	+	+	-	-
Rha-Rha-C10-C11	665	479, 309, 184	+	+	-	-
Rha-Rha-C10-C12:1	675	479, 365, 309, 195	+	+	+	+
Rha-Rha-C12:1-C10	675	505, 365, 309, 169	+	+	+	+
Rha-Rha-C10-C12	677	479, 367, 309, 197	+	+	+	+
Rha-Rha-C12-C10	677	507, 367, 309, 169	+	+	+	+
Rha-Rha-C12-C12:1	703	507, 311	+	-	-	-
Rha-Rha-C12:1-C12	703	505, 311	+	-	-	-

+: presence of the rhamnolipid in the extract.
-: absence of the rhamnolipid in the extract.
Nd: not detected.

determined against the same collection of bacterial strains used for lipopeptides. Results are given in Table 6. Extracts were found highly active against all the *Legionella* sp. tested with low MIC values between 0.027 and 25 μg/ml. The mixture produced by *P. aeruginosa* 8H was the most effective against *Legionella* sp, with the lowest MIC values. On the opposite, the extract originating from *P. aeruginosa* CHA culture supernatant and commercial rhamnolipid mixture displayed 10 to 100-fold higher MICs.

Interestingly, rhamnolipid mixtures were found less or not active against other tested bacteria. *B. subtilis* appeared sensitive to the rhamnolipid extracts but not to commercial mixture. The *P. aeruginosa* 8H extract displayed activity against most of the other bacteria tested but not *S. aureus*. In contrast, *S. aureus* was found sensitive to *P. aeruginosa* CHA (52.5 μg/ml) extracts. Finally, the *P. aeruginosa* 8H extract appears about 2 to 10 times more active than the one from *P. aeruginosa* PA14 and displays an anti-*Legionella* activity from 5 to 50 times higher than both *P. aeruginosa* CHA and the commercial mixture. Taken together, these results indicate that *Legionella* sp. are particularly sensitive to the rhamnolipid mixtures produced by *Pseudomonas* sp.

In order to evaluate the activity of various homologues of rhamnolipids, HPLC fractions obtained from the four

Table 5: Antibacterial spectrum of lipopeptide mixtures produced by *Pseudomonas* strains.

		MIC of lipopeptide mixtures (mg/ml)					
		DSS73	MFAD21c	MFAF88	MFAH4a	MFAO2	PfA7b
Gram positive	*B. subtilis* LMG 28342	-	-	-	-	-	-
	E. faecalis V583	-	-	-	-	-	-
	L. ivanovii Li4pVS2	-	-	-	-	-	-
	L. monocytogenes EGDe ATCC BAA-679	-	-	-	-	-	-
Gram negative	*A. hydrophila* LMG 2844	-	-	-	-	-	-
	E. coli LMG 2092	-	-	-	-	-	-
	F. breve LMG 4011	-	-	-	-	-	-
	K. pneumoniae 050283	-	-	-	-	-	-
	P. aeruginosa LMG 1242	-	-	-	-	-	-
	P. aeruginosa UCBPP-PA14	-	-	-	-	-	-
	S. enterica J18	-	-	-	-	-	-
	L. bozemanii ATCC 33217	0.09	0.14	0.61	0.19	0.38	0.20
	L. dumoffii ATCC 33279	0.09	0.14	0.30	0.19	0.38	0.20
	L. feeleii ATCC 35072	0.09	0.14	0.15	0.19	0.04	0.20
	L. longbeachae ATCC 33484	0.18	0.14	0.30	0.19	0.19	0.20
	L. micdadei ATCC 33218	0.18	0.27	0.30	0.19	0.19	0.20
	L. pneumophila ATCC 33155 (Sg 3)	0.18	0.27	0.61	0.38	0.38	0.40
	L. pneumophila ATCC 33215 (Sg 6)	0.36	0.27	0.61	0.38	0.38	0.40
	L. pneumophila ATCC 33216 (Sg5)	0.18	0.27	0.30	0.38	0.19	0.40
	L. pneumophila ATCC Baa74 130b	0.36	0.27	0.61	0.76	0.38	0.40
	L. pneumophila Corby (Sg1)	0.18	0.27	0.61	0.38	0.38	0.40
	L. pneumophila Lens CIP 108286 (Sg 1)	0.36	0.54	0.61	0.76	0.38	0.40

-: no growth of inhibition was detected even with undiluted lipopeptide mixture (0.72 mg/ml for the DSS73 mixture, 1.08 mg/ml for the MFAD21c mixture, 0.76 mg/ml for the MFAH4a mixture, 0.76 mg/ml for the MFAO2 mixture, 1.6 mg/ml for the PfA7b mixture, and 1.22 mg/ml for the MFAF88 mixture).

Bacteria (10^6 CFU/ml) were incubated in BYE or BHI medium with two-fold dilutions of lipopeptide mixtures. Results correspond to the MIC after incubation for 24h or 96 h at 37°C depending on the tested strain and are the mean of three independent experiments.

Bacterial strains were obtained from various culture collections: ATCC: American Type Culture Collection, CIP: Collection Institut Pasteur, France, and LMG: BCCM/LMG Bacteria Collection, Ghent University, Belgium. The Corby strain was kindly provided by the Centre National de Référence des Légionelles (Lyon, France). Other strains were from the laboratory culture collection. Sg: serogroup.

Table 6: Antibacterial spectrum of rhamnolipid mixtures produced by *Pseudomonas* strains.

	MIC of rhamnolipid mixtures (μg/ml)				
	8H	CHA	PA14	4014	Commercial mixture
A. hydrophila LMG 2844	-	-	-	-	-
B. subtilis AM1	41.2	80	26.3	100	-
E. faecalis V583	41.2	-	-	-	-
E. coli DH5Y	20.6	-	-	-	-
F. breve LMG 4011	82.5	-	-	-	-
K. pneumoniae 050283	165	-	-	-	-
L. bozemanii ATCC 33217	0.2	6.2	1.6	5.2	7.8
L. dumoffii ATCC 33279	0.4	12.5	0.4	5.2	15.6
L. feeleii ATCC 35072	0.2	6.2	0.4	3.9	11.7
L. longbeachae ATCC 33484	0.4	12.5	3.3	7.9	13.1
L. micdadei ATCC 33218	0.03	3.1	3.3	3.9	15.6
L. pneumophila ATCC 33155 (Sg 3)	0.2	12.5	3.3	15.8	8.8
L. pneumophila ATCC 33215 (Sg 6)	0.2	6.2	0.4	7.9	3.9
L. pneumophila ATCC 33216 (Sg5)	0.05	25	1.6	7.9	19.5
L. pneumophila ATCC Baa74 130b	0.05	12.5	0.4	7.9	15.6
L. pneumophila Corby (Sg1)	0.2	12.5	3.3	5.2	11.7
L. pneumophila Lens CIP 108286 (Sg1)	0.4	12.5	1.6	10.5	11.7
L. ivanovii Li4pVS2	41.2	-	-	-	-
L. monocytogenes EGDe ATCC BAA-679	41.2	-	-	-	-
P. aeruginosa LMG 1242	-	-	-	-	-
P. aeruginosa PA14	82.5	-	-	-	-
S. enterica J18	82.5	-	-	-	-
S. aureus ATCC 29213	-	805	52.5	50	-

-: no growth of inhibition was detected even with undiluted rhamnolipid mixture (660 μg/ml for the 8H mixture, 1610 μg/ml for the CHA extract, 105 μg/ml for the PA14 extract, 100 μg/ml for the 4014 extract, and 250 μg/ml for the commercial mixture).
Bacteria (10^6 CFU/ml) were incubated in BYE or BHI medium with two-fold dilutions of rhamnolipid mixtures. Results correspond to the MIC after incubation for 24h or 96 h at 37°C depending on the tested strain and are the mean of three independent experiments.
Bacterial strains were obtained from various culture collections: ATCC: American Type Culture Collection, CIP: Collection Institut Pasteur, France, and LMG: BCCM/LMG Bacteria Collection, Ghent University, Belgium. The Corby strain was kindly provided by the Centre National de Référence des Légionelles (Lyon, France). Other strains were from the laboratory culture collection. Sg: serogroup.

producing strains were tested against *L. pneumophila* and then their content was analyzed by LC-MS in order to identify all the rhamnolipid species (Data not shown). All fractions were found more or less active against *Legionella* according to their amount of rhamnolipids, estimated from their peaks area in LC-MS chromatograms (data not shown). However, all these fractions were found to contain at least two rhamnolipid homologues. Consequently, even if many of these molecules are undoubtedly active against *Legionella*, it is not possible to affirm which one is effectively active against *Legionella*.

4. Discussion

Artificial water settings provide suitable conditions for growth and multiplication of waterborne pathogens including *L. pneumophila*. In those nutrient-poor environments, *L. pneumophila* is able to interact positively with other microorganisms to obtain the nutrients it requires to survive [9, 47]. Although much work has been conducted on the stimulation of *Legionella* growth by other microorganisms, little work has been done on the negative interactions that occur between *Legionella* bacteria and other microorganisms in man-made water systems. Compilation of latest findings shows that many bacterial genera isolated from drinking water pipes were able to inhibit the growth of *Legionella* species [13, 48–50]. While active isolated strains were taxonomically diverse, bacteria belonging to the *Pseudomonas* genus were always found or tested. Another constant of those studies is the lack of molecular identification of active compounds that have been thought to be bacteriocins or bacteriocin-like substances [13, 48].

To further investigate the chemical nature of those anti-*Legionella* compounds, a *Pseudomonas* sp. collection, comprising both environmental and clinical strains, was defined and screened. Among the 21 tested strains, 14 were active against *L. pneumophila* (66.7%). This result is in good agreement with the data published by Guerrieri and coworkers as they found 72% of active *Pseudomonas* strains in their collection [13]. The anti-*Legionella* compounds secreted by *Pseudomonas* strains were then correlated to the presence of biosurfactants, as *Pseudomonas* members are well known to produce many biosurfactants with antimicrobial activities [15, 28].

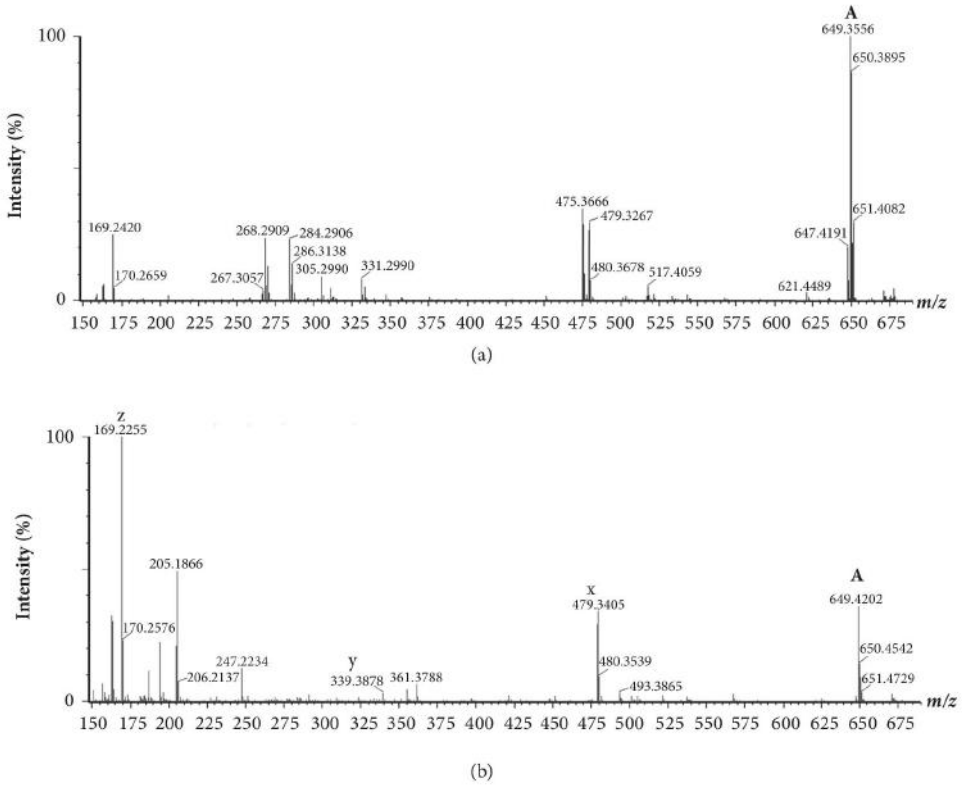


FIGURE 1: MS (a) and MS/MS (b) spectra of the RP-HPLC fraction eluted at 19 min from *P. aeruginosa* CHA extract.

Lipopeptides constitute a specific class of microbial secondary metabolites produced by a wide range of microorganisms. Moreover, those produced by *Bacillus* and *Pseudomonas* species are the most studied by far [17]. Here, all active fractions purified from five *P. fluorescens* and one *P. putida* ethyl acetate extracts contained various already known lipopeptides. According to the literature, only the molecule with a molecular mass of 1383 Da is original. Thus, this lipopeptide was named Amphisin-like as its molecular mass is 14 Da lower than the molecular mass of Amphisin [39]. We also found lipopeptides belonging to the orfamide group named PPZPMs, a group of CLPs thought to be the missing link between the viscosin and Amphisin groups due to the number of amino acids forming the cyclic moiety [22, 38]. Lipopeptides are mainly characterized by highly structural diversity and are considered as multifunctional microbial tools. Indeed, they exhibit a very wide range of biological activities including lytic and growth-inhibitory activities against a broad range of microorganisms [14]. In particular, many authors have reported antibacterial activities (for review see [17]). Usually, Gram-negative bacteria are poorly inhibited by lipopeptides whereas Gram-positive bacteria appear more susceptible [15, 17, 19]. To date, only one lipopeptide was reported to be active against *Legionella* species [25]. It corresponds to surfactin, a well characterized lipopeptide produced by *Bacillus* species. However, all the lipopeptides tested were found active against *Legionella* species. It is the first time, to our knowledge, that *Pseudomonas* biosurfactants were shown to be active against *Legionella*. Interestingly, other Gram-negative and Gram-positive bacteria tested were insensitive to those compounds used at a similar concentration. In many studies, when available, MIC values of lipopeptides against bacteria ranged from less than 10 μg/ml (massetolide A and viscosin against *M. tuberculosis*) to around 1 mg/L (milkisin against *S. enterica*) [37, 51]. Thus, MIC determined in this study were in a similar concentration range. Nevertheless, *Legionella* species appeared more sensitive to surfactin than to *Pseudomonas* lipopeptides as MIC values were lower (1-4 μg/ml) [25]. Interestingly, Loiseau and coworkers showed that nonlegionella bacterial strains tested were resistant to surfactin, even at the highest tested concentration (265 μg/mL). Taken together, those data highlight a very specific sensitivity of *Legionella* bacteria to lipopeptides.

Interestingly, rhamnolipids extracts were active against all the *Legionella* tested, whatever their species. The percentage of di-rhamno-di-lipid in each mixture was higher than those of monorhamno-di-lipid and di-rhamno-monolipid. This result is in good agreement with previous observation of Arino and coworkers [52]. Interestingly, the *P. aeruginosa* 8H extract, which is the more active, contained the lower number of rhamnolipid congeners as compared to other extracts. It could be related to the higher concentration of each rhamnolipid molecule in the extract. Indeed, in all cases,

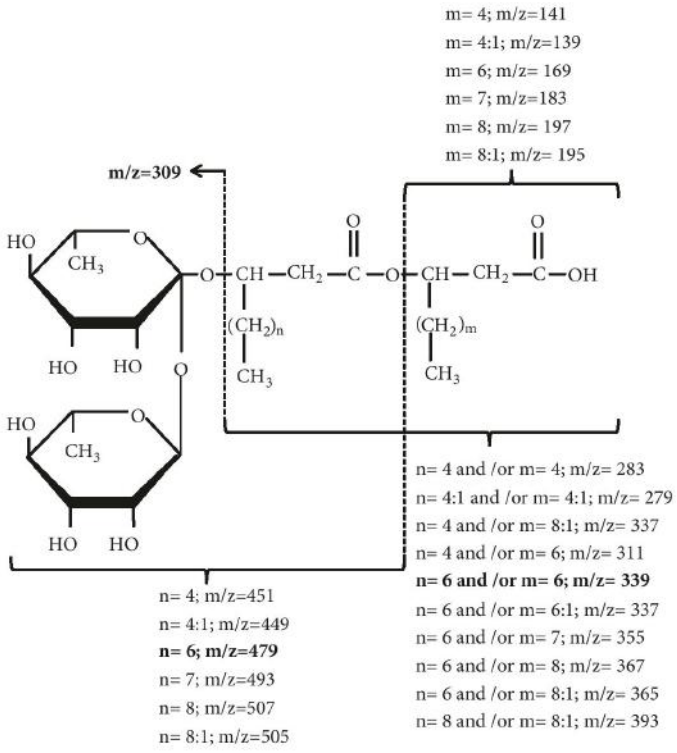


FIGURE 2: Fragmentation of di-rhamnolipids observed in MS/MS analysis. The *m/z* of the fragments as a function of the structures of fatty acids is indicated.

the rhamnolipid content was evaluated as a function of its rhamnose content. Thus, the mean concentration of each congener is higher for *P. aeruginosa* 8H which contained 11 different rhamnolipids than those of *P. aeruginosa* CHA (16 congeners), PA14 (25 congeners) and *P. otitidis* 4014 (13 congeners). However, this cannot explain the higher activity of *P. aeruginosa* PA14 as compared to *P. aeruginosa* CHA. The other main difference of *P. aeruginosa* 8H extract as compared to the others corresponds to its content restricted to di-rhamnosyl species which could then be related to its higher anti-*Legionella* activity. Moreover, this *P. aeruginosa* 8H extract was found to be the most active towards no-*Legionella* strains except *S. aureus* and *B. subtilis* for which the *P. aeruginosa* PA14 and *P. otitidis* 4014 extracts were found the most active. On the other hand, the insensitivity of *S. aureus* to the *P. aeruginosa* 8H extract could be related to its particular content restricted to di-rhamnosyl species. Indeed, the comparison of the rhamnolipids congeners produced by *P. aeruginosa* PA14 (this study), CHA (this study), AT10 [53], LBI [29] and RL 47T2 [30] did not reveal the presence of a specific anti-*Staphylococcus aureus* compound. However, all these extracts contained monorhamnosyl species which could be postulated to exert this specific activity. Strikingly, *Legionella* species were shown to be highly sensitive to rhamnolipid mixtures as MIC values were quite low (0.03-19.5 μg/ml) while throughout the literature, many sensitive bacterial species displayed higher MIC values [27, 28]. Does *Legionella* bacteria possess some specificity that could explain this high sensitivity? As these compounds are membrane active, maybe a part of the answer is hidden in the composition of the cell envelope. Indeed, *Legionella* are also highly sensitive to detergents (SDS, Tween 80, Triton X-100...) or detergent-like molecules such as antimicrobial peptides [25, 45, 54, 55]. Thus, the phospholipid composition of *Legionella* cell envelope as well as the membrane thickness, the fluidity, the presence of phospholipids clusters and even composition of the lipopolysaccharide could be key parameters involved in *Legionella* sensitivity towards membrane-active compounds [56].

5. Conclusions

In this study, we showed, for the first time, that biological challengers present in the microenvironment of *Legionella* such as *Pseudomonas* bacteria exhibit antagonistic activity because of the production of various biosurfactants species. These compounds are known to be multifunctional biomolecules with many depicted potential biotechnological applications including their use as antimicrobials [57]. Thus, the wide sensitivity of *Legionella* species to rhamnolipids and lipopeptides make biosurfactants promising tool for their biological control in water treatment industry although experimental data are needed to evaluate how effective biosurfactants would be in real conditions.

Data Availability

The data used to support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

Conflicts of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest regarding the publication of this paper.

Authors' Contributions

Clémence Loiseau and Emilie Portier contributed equally to this work.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge S. Rebuffat for technical assistance in the identification of *P. fluorescens* MFAD21c and MFAF4a lipopeptides. This study was funded by 4 grants. C. Loiseau was supported by a grant from the French Minister of Research. This work was partly supported by an internal funding of the CNRS UMR 7267 Laboratory and partly granted by the following 2015–2020 programs: the State-Region Planning Contracts (CPER) and the European Regional Development Fund (FEDER).

Supplementary Materials

Table S1: lipopeptide structures detected in active HPLC fractions from ethyl acetate extract of *Pseudomonas* sp. cell-free supernatants according to their pseudomolecular ion masses as described in the literature. *(Supplementary Materials)*

References

[1] J. Beauté, "Legionnaires' disease in Europe, 2011 to 2015," *Eurosurveillance*, vol. 22, no. 27, 2017.

[2] V. L. Yu, J. F. Plouffe, M. C. Pastoris et al., "Distribution of legionella species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: An international collaborative survey," *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 186, no. 1, pp. 127-128, 2002.

[3] H. J. Newton, D. K. Y. Ang, I. R. Van Driel, and E. L. Hartland, "Molecular pathogenesis of infections caused by Legionella pneumophila," *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 23, no. 2, pp. 274–298, 2010.

[4] J. O. Falkinham, E. D. Hilborn, M. J. Arduino, A. Pruden, and M. A. Edwards, "Epidemiology and ecology of opportunistic premise plumbing pathogens: Legionella pneumophila, Mycobacterium avium, and Pseudomonas aeruginosa," *Environmental Health Perspectives*, vol. 123, no. 8, pp. 749–758, 2015.

[5] R. Lesnik, I. Brettar, and M. G. Höfle, "Legionella species diversity and dynamics from surface reservoir to tap water: From cold adaptation to thermophily," *The ISME Journal*, vol. 10, no. 5, pp. 1064–1080, 2016.

[6] N. Valero, M. De Simón, P. Gallés et al., "Street cleaning trucks as potential sources of Legionella pneumophila," *Emerging Infectious Diseases*, vol. 23, no. 11, pp. 1880–1882, 2017.

[7] N. J. Ashbolt, "Environmental (saprozoic) pathogens of engineered water systems: Understanding their ecology for risk assessment and management," *Pathogens*, vol. 4, no. 2, pp. 390–405, 2015.

[8] L. E. Garrison, J. M. Kunz, L. A. Cooley et al., "Vital Signs: Deficiencies in Environmental Control Identified in Outbreaks of Legionnaires' Disease-North America, 2000-2014," *American Journal of Transplantation*, vol. 16, no. 10, pp. 3049–3058, 2016.

[9] M. Abdel-Nour, C. Duncan, D. E. Low, and C. Guyard, "Biofilms: The stronghold of Legionella pneumophila," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 14, no. 11, pp. 21660–21675, 2013.

[10] A. M. Correia, J. S. Ferreira, and V. Borges, "Probable person-to-person transmission of Legionnaires' disease," *The New England Journal of Medicine*, vol. 374, no. 5, pp. 497-498, 2016.

[11] K. Bärlocher, A. Welin, and H. Hilbi, "Formation of the Legionella replicative compartment at the crossroads of retrograde trafficking," *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, vol. 7, p. 482, 2017.

[12] G. Oliva, T. Sahr, and C. Buchrieser, "The Life Cycle of L. pneumophila: Cellular Differentiation Is Linked to Virulence and Metabolism," *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, vol. 8, pp. 1–12, 2018.

[13] E. Guerrieri, M. Bondi, C. Sabia, S. De Niederhäusern, P. Borella, and P. Messi, "Effect of bacterial interference on biofilm development by Legionella pneumophila," *Current Microbiology*, vol. 57, no. 6, pp. 532–536, 2008.

[14] J. M. Raaijmakers, I. de Bruijn, O. Nybroe, and M. Ongena, "Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics," *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 34, no. 6, pp. 1037–1062, 2010.

[15] M. Inès and G. Dhouha, "Lipopeptide surfactants: Production, recovery and pore forming capacity," *Peptides*, vol. 71, pp. 100–112, 2015.

[16] S. J. Pamp and T. Tolker-Nielsen, "Multiple roles of biosurfactants in structural biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*," *Journal of Bacteriology*, vol. 189, no. 6, pp. 2531–2539, 2007.

[17] I. Mnif and D. Ghribi, "Lipopeptides biosurfactants: Mean classes and new insights for industrial, biomedical, and environmental applications," *Biopolymers*, vol. 104, no. 3, pp. 129–147, 2015.

[18] V. U. Irorere, L. Tripathi, R. Marchant, S. McClean, and I. M. Banat, "Microbial rhamnolipid production: a critical re-evaluation of published data and suggested future publication criteria," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 101, no. 10, pp. 3941–3951, 2017.

[19] J. M. Raaijmakers, I. De Bruijn, and M. J. D. De Kock, "Cyclic lipopeptide production by plant-associated Pseudomonas spp.: Diversity, activity, biosynthesis, and regulation," *Molecular Plant-Microbe Interactions*, vol. 19, no. 7, pp. 699–710, 2006.

[20] I. Kuiper, E. L. Lagendijk, R. Pickford et al., "Characterization of two Pseudomonas putida lipopeptide biosurfactants, putisolvin I and II, which inhibit biofilm formation and break down existing biofilms," *Molecular Microbiology*, vol. 51, no. 1, pp. 97–113, 2004.

[21] A. D. Berti, N. J. Greve, Q. H. Christensen, and M. G. Thomas, "Identification of a biosynthetic gene cluster and the six associated lipopeptides involved in swarming motility of Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000," *Journal of Bacteriology*, vol. 189, no. 17, pp. 6312–6323, 2007.

[22] H. Gross, V. O. Stockwell, M. D. Henkels, B. Nowak-Thompson, J. E. Loper, and W. H. Gerwick, "The Genomisotopic Approach: A Systematic Method to Isolate Products of Orphan Biosynthetic Gene Clusters," *Chemistry & Biology*, vol. 14, no. 1, pp. 53–63, 2007.

[23] K. Arima, A. Kakinuma, and G. Tamura, "Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by Bacillus subtilis: Isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 31, no. 3, pp. 488–494, 1968.

[24] M. Ongena and P. Jacques, "Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol," *Trends in Microbiology*, vol. 16, no. 3, pp. 115–125, 2008.

[25] C. Loiseau, M. Schlusselhuber, R. Bigot, J. Bertaux, J.-M. Berjeaud, and J. Verdon, "Surfactin from Bacillus subtilis displays an unexpected anti-Legionella activity," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 99, no. 12, pp. 5083–5093, 2015.

[26] G. Soberón-Chávez, F. Lépine, and E. Déziel, "Production of rhamnolipids by Pseudomonas aeruginosa," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 68, no. 6, pp. 718–725, 2005.

[27] J. Chen, Q. Wu, Y. Hua, J. Chen, H. Zhang, and H. Wang, "Potential applications of biosurfactant rhamnolipids in agriculture and biomedicine," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 101, no. 23-24, pp. 8309–8319, 2017.

[28] A. M. Abdel-Mawgoud, F. Lépine, and E. Déziel, "Rhamnolipids: Diversity of structures, microbial origins and roles," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 86, no. 5, pp. 1323–1336, 2010.

[29] M. Benincasa, A. Abalos, I. Oliveira, and A. Manresa, "Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by Pseudomonas aeruginosa LBI from soapstock," *Antonie van Leeuwenhoek-Journal of Microbiology*, vol. 85, no. 1, pp. 1–8, 2004.

[30] E. Haba, A. Pinazo, O. Jauregui, M. J. Espuny, M. R. Infante, and A. Manresa, "Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by Pseudomonas aeruginosa 47T2 NCBIM 40044," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 81, no. 3, pp. 316–322, 2003.

[31] C. Cazalet, S. Jarraud, Y. Ghavi-Helm et al., "Multigenome analysis identifies a worldwide distributed epidemic Legionella pneumophila clone that emerged within a highly diverse species," *Genome Research*, vol. 18, no. 3, pp. 431–441, 2008.

[32] B. Toussaint, I. Delic-Attree, and P. M. Vignais, "Pseudomonas aeruginosa contains an IHF-like protein that binds to the algD promoter," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 196, no. 1, pp. 416–421, 1993.

[33] L. Rahme, E. Stevens, S. Wolfort, J. Shao, R. Tompkins, and F. Ausubel, "Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals," *Science*, vol. 268, pp. 1899–1902, 1995.

[34] A. Groboillot, F. Portet-Koltalo, F. le Derf, M. J. G. Feuilloley, N. Orange, and C. D. Poc, "Novel application of cyclolipopeptide amphisin: Feasibility study as additive to remediate polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) contaminated sediments," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 12, no. 3, pp. 1787–1806, 2011.

[35] C. Duclairoir Poc, J. Verdon, A. Groboillot et al., "Original Research Article Airborne fluorescent pseudomonads: What potential for virulence?" *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences (IJCMAS)*, vol. 3, no. 8, pp. 708–722, 2014.

[36] V. Decoin, C. Barbey, D. Bergeau et al., "A type VI secretion system is involved in Pseudomonas fluorescens bacterial competition," *PLoS ONE*, vol. 9, no. 2, 2014.

[37] J. Gerard, R. Lloyd, T. Barsby, P. Haden, M. T. Kelly, and R. J. Andersen, "Massetolides A-H, antimycobacterial cyclic depsipeptides produced by two pseudomonads isolated from marine habitats," *Journal of Natural Products*, vol. 60, no. 3, pp. 223–229, 1997.

[38] H. Weisshoff, S. Hentschel, I. Zaspel, R. Jarling, E. Krause, and T. L. H. Pham, "PPZPMs - A novel group of cyclic lipodepsipeptides produced by the Phytophthora alni associated strain Pseudomonas sp. JX090307 - The missing link between the viscosin and amphisin group," *Natural Product Communications (NPC)*, vol. 9, no. 7, pp. 989–996, 2014.

[39] D. Sørensen, T. H. Nielsen, C. Christophersen, J. Sørensen, and M. Gajhede, "Cyclic lipoundecapeptide amphisin from Pseudomonas sp. Strain DSS73," *Acta Crystallographica Section C: Crystal Structure Communications*, vol. 57, no. 9, pp. 1123-1124, 2001.

[40] T. H. Nielsen, C. Thrane, C. Christophersen, U. Anthoni, and J. Sørensen, "Structure, production characteristics and fun gel antagonism of tensin—a new antifungal cyclic lipopeptide from *Pseudomonas fluorescens* strain 96.578," *Journal of Applied Microbiology*, vol. 89, no. 6, pp. 992–1001, 2000.

[41] E. Déziel, F. Lépine, D. Dennie, D. Boismenu, O. A. Mamer, and R. Villemur, "Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids produced by Pseudomonas aeruginosa strain 57RP grown on mannitol or naphthalene," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, vol. 1440, no. 2-3, pp. 244–252, 1999.

[42] J. Verdon, J.-M. Berjeaud, C. Lacombe, and Y. Héchard, "Characterization of anti-Legionella activity of warnericin RK and delta-lysin I from Staphylococcus warneri," *Peptides*, vol. 29, no. 6, pp. 978–984, 2008.

[43] N. H. Youssef, K. E. Duncan, D. P. Nagle, K. N. Savage, R. M. Knapp, and M. J. McInerney, "Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms," *Journal of Microbiological Methods*, vol. 56, no. 3, pp. 339–347, 2004.

[44] T. Janek, M. Łukaszewicz, T. Rezanka, and A. Krasowska, "Isolation and characterization of two new lipopeptide biosurfactants produced by Pseudomonas fluorescens BD5 isolated from water from the Arctic Archipelago of Svalbard," *Bioresource Technology*, vol. 101, no. 15, pp. 6118–6123, 2010.

[45] M. Schlusselhuber, V. Humblot, S. Casale et al., "Potent antimicrobial peptides against Legionella pneumophila and its environmental host, Acanthamoeba castellanii," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 99, no. 11, pp. 4879–4891, 2015.

[46] J. Verdon, P. Coutos-Thevenot, M.-H. Rodier et al., "Armadillidin H, a glycine-rich peptide from the terrestrial crustacean Armadillidium vulgare, displays an unexpected wide antimicrobial spectrum with membranolytic activity," *Frontiers in Microbiology*, vol. 7, 2016.

[47] M. Taylor, K. Ross, and R. Bentham, "Legionella, protozoa, and biofilms: Interactions within complex microbial systems," *Microbial Ecology*, vol. 58, no. 3, pp. 538–547, 2009.

[48] A. Cotuk, N. Dogruoz, Z. Zeybek, A. Kimiran-Erdem, and E. Ilhan-Sungur, "The effects of Pseudomonas and Aeromonas strains on Legionella pneumophila growth," *Annals of Microbiology*, vol. 55, no. 3, pp. 219–224, 2005.

[49] S. Toze, L. I. Sly, I. C. MacRae, and J. A. Fuerst, "Inhibition of growth of Legionella species by heterotrophic plate count

bacteria isolated from chlorinated drinking water," *Current Microbiology*, vol. 21, no. 2, pp. 139–143, 1990.

[50] A. G. Solimini, A. Cottarelli, L. Marinelli, and M. De Giusti, "Factors influencing persistence of Legionella pneumophila serogroup 1 in laboratory cocultures," *BMC Microbiology*, vol. 14, no. 1, pp. 1–8, 2014.

[51] M. Schlusselhuber, J. Godard, M. Sebban et al., "Characterization of Milkisin, a Novel Lipopeptide With Antimicrobial Properties Produced By Pseudomonas sp. UCMA 17988 Isolated From Bovine Raw Milk," *Frontiers in Microbiology*, vol. 9, 2018.

[52] S. Arino, R. Marchal, and J.-P. Vandecasteele, "Identification and production of a rhamnolipidic biosurfactant by a Pseudomonas species," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 45, no. 1-2, pp. 162–168, 1996.

[53] A. Abalos, A. Pinazo, M. R. Infante, M. Casals, F. García, and A. Manresa, "Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by Pseudomonas aeruginosa AT10 from soybean oil refinery wastes," *Langmuir*, vol. 17, no. 5, pp. 1367–1371, 2001.

[54] J. Verdon, M. Falge, E. Maier et al., "Detergent-like activity and a-helical structure of warnericin RK, an anti-Legionella peptide," *Biophysical Journal*, vol. 97, no. 7, pp. 1933–1940, 2009.

[55] A. Marchand, J. Verdon, C. Lacombe, S. Crapart, Y. Héchard, and J. M. Berjeaud, "Anti-Legionella activity of staphylococcal hemolytic peptides," *Peptides*, vol. 32, no. 5, pp. 845–851, 2011.

[56] J.-M. Berjeaud, S. Chevalier, M. Schlusselhuber et al., "Legionella pneumophila: The paradox of a highly sensitive opportunistic waterborne pathogen able to persist in the environment," *Frontiers in Microbiology*, vol. 7, 2016.

[57] D. K. F. Santos, R. D. Rufino, J. M. Luna, V. A. Santos, and L. A. Sarubbo, "Biosurfactants: Multifunctional biomolecules of the 21st century," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 17, no. 3, pp. 1–31, 2016.

Annexe

MARIE-HELENE CORRE,
27-08-1989
***Adresse personnelle** : 2 Chemin des Ecoliers (Apt 111), 86580 Vouneuil-sous-biard*
***Adresse professionnelle** : Laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions - UMR CNRS 7267*
Equipe Microbiologie de l'Eau, Bâtiment B36/37,1 Rue Georges Bonnet TSA 51106
86073 POITIERS Cedex 9
(+33) 783576951
marie.helene.corre@univ-poitiers.fr



Formation Universitaire

2016-2018 : Doctorat en Biochimie, Médecine, Santé – Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie – Université de Poitiers (86) - Thèse soutenue le 10 Décembre 2018
2014-2015 : M. Sc. Biologie Moléculaire – option Biologie des systèmes. Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie (IRIC) -Université de Montréal (QC) – Canada. Mention Très-Bien
2013-2014 : Maîtrise de Biochimie et Biotechnologies. Université de Toulouse Paul Sabatier (31). Mention Assez-Bien.
2012-2013 : Licence de Biologie - parcours Biochimie, Biologie Moléculaire, Cellulaire et Génétique. Université de Poitiers (86). Mention Assez-Bien
2011-2012 : DEUG de Biologie – parcours Biochimie, Biologie Moléculaire, Cellulaire et Génétique. Université de Poitiers (86). Mention Assez-Bien
2009-2011 : DUT de Biologie Appliquée – option Industrie Alimentaire et Biologique. IUT de Mont-de-Marsan (40)
2008-2009 : Prépa**.** Institut de Préparation aux Examens et Concours, Poitiers (86)

Expériences de recherche

- **Depuis Septembre 2018 : Attachée Temporaire d'Enseignement et de Recherche** *Laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions, UMR CNRS 7267, équipe MDE, Université de Poitiers (86), France*
- **Janvier 2016 - Décembre 2018 : Doctorante en biologie** *Laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions, UMR CNRS 7267, équipe MDE, Université de Poitiers (86), France* « Identification et caractérisation de molécules produites par des souches bactériennes environnementales pour la lutte biologique contre *Legionella pneumophila*. » Sous la direction du Pr Jean-Marc BERJEAUD et du Dr Julien VERDON.
- **Septembre 2014 – Juin 2015 : Stage pratique en laboratoire (M.sc)** *Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie (IRIC), Université de Montréal (QC), Canada* « Exploration du répertoire peptidique du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I) ». Sous la direction du Pr. Pierre THIBAULT et du Dr Claude PERREAULT.
- **Juillet 2014 – Août 2014 : Stage pratique en laboratoire (volontaire)** *Centre de Physiopathologie de Toulouse-Purpan (CPTP), INSERM UMR 1043, CHU Purpan (31), France* « Analyse moléculaire de l'inhibition des lymphocytes T par les co-récepteurs CD5 » Sous la direction du Dr Renaud LESOURNE
- **Septembre 2013 – Décembre 2013 : Stage UE « initiation à la recherche » (Master 1)** *Laboratoire de Recherche en Sciences Végétales, UMR 5546 UPS/CNRS, site INRA Auzeville-Tolosane (31), France* « Caractérisation structurale des Facteurs Myc impliqués dans les étapes précoces de la symbiose mycorhizienne à arbuscules » Sous la direction du Dr Virginie PUECH-PAGES

Annexe

- **Avril 2013 – Juillet 2013: Stage pratique en laboratoire (Licence)** *Laboratoire Chimie et Microbiologie de l'Eau, UMR CNRS 6008, Université de Poitiers (86), France* « Etude protéomique de l'action d'une molécule anti-*Legionella*, la cérulénine » Sous la direction du Dr Julien Verdon
- **Avril 2011 – Juin 2011 : Stage pratique en laboratoire (DUT)** *Laboratoire de Biochimie Spécialisée, CHU de Nice (06), France* « Analyse d'oligosaccharides par spectrométrie de masse appliquée au diagnostic des pathologies lysosomales» Sous la direction du Dr Raymond MENGUAL.

Bourse et prix

Bourse universitaire Persévérance (M.Sc) 2014-2015. Organisme émetteur : IRIC – Montréal *(Canada)* – 20000 $CA
1er prix du jury au concours MT180 2017 de l'Université de Poitiers. Organisme émetteur : Université de Poitiers (*France*) – 1000€
1er prix du jury au concours 3MT 2017 de l'Université de Poitiers. Organisme émetteur : Groupe COIMBRA – 500€

Communications scientifiques

Articles soumis dans journaux à comités de lecture

« Exploiting the richness of environmental waterborne bacterial species to find natural *Legionella* pneumophila competitors ». Marie-Hélène Corre, Vincent Delafont, Anasthasia Legrand, Jean-Marc Berjeaud, Julien Verdon. *Frontiers in Microbiology*, 2018 doi : 10.3389/fmicb.2018.03360 (IF : 4,019)

« Highlighting the potency of biosurfactants produced by Pseudomonas strains as anti-*Legionella* agents ». Clémence Loiseau, Emilie Portier, Marie-Hélène Corre, Margot Schlusselhuber, Ségolène Depayras, Jean-Marc Berjeaud, Julien Verdon, *BioMed Research International*, 2018 doi : 10.1155/2018/8194368 (IF : 2,583)

Communications orales

Août 2018 : Congrès international de l'ESGLI – Lyon, France. « Exploring the potential of environmental waterborne bacteria to find new natural anti-*Legionella* compounds ». Marie-Hélène Corre, Anasthasia Legrand, Vincent Delafont, Jean-Marc Berjeaud, Julien Verdon.
Décembre 2017 : Journée EBI – Poitiers, France. « Rôle des bactéries environnementales dans la lutte biologique contre *Legionella pneumophila* ». Marie-Hélène Corre, Sophie Lecomte, Jean-Marc Berjeaud, Julien Verdon.
Octobre 2017 : GDR MuFoPAM – Bordeaux, France. « Activité anti-*Legionella* d'un peptide produit par une souche d'*Aeromonas bestiarum* ». Marie-Hélène Corre, Sophie Lecomte, Jean-Marc Berjeaud, Julien Verdon.

Communications par affiche

Octobre 2017 : Congrès de la Société Française de Microbiologie – Paris, France. « Valorisation du rôle des bactéries environnementales dans la lutte biologique contre *Legionella pneumophila.* » Marie-Hélène Corre, Sophie Lecomte, Camille Juin, Jean-Marc Berjeaud, Julien Verdon.
Février 2017 : Antimicrobial peptide Gordon Research Conference – Ventura, Californie. « Armadillidins : antimicrobial activities, structure and mode of action. » Julien Verdon, Marie-Hélène Corre, Pierre Coutos-Thevenot, Marie-Hélène Rodier, Céline Landon, Ségolène Depayras, Sylvain La

Camera, Bouziane Moumen, Pierre Greve, Didier Bouchon, Jean-Marc Berjeaud, Christine Braquart-Varnier.
Juin 2016 : **Antimicrobial Peptide Symposium** - Montpellier, France. « Armadillidins : antimicrobial activities, structure and mode of action. » Julien Verdon, Marie-Hélène Corre, Pierre Coutos-Thevenot, Marie-Hélène Rodier, Céline Landon, Ségolène Depayras, Sylvain La Camera, Bouziane Moumen, Pierre Greve, Didier Bouchon, Jean-Marc Berjeaud, Christine Braquart-Varnier.

Activités d'enseignement

Depuis Septembre 2018 : ATER, 196 heures d'enseignement - Université de Poitiers (86).
- **UE Bases expérimentales en Biologie** – L2 Sciences du Vivant – 16H TD 36H TP
- **UE Génie Biomédical** – L3 Sciences du Vivant- 16H TD 16H TP
- **UE Microbiologie Appliquée** - M1 Génie Cellulaire – 07H TP
- **UE Métabolisme Cellulaire 1** - L1 Sciences du Vivant - 60H TD
- **UE Métabolisme Cellulaire 2** - L2 Sciences du Vivant - 60H TD

Septembre 2016- Aout 2018 : Doctorant contractuel à activité complémentaire d'enseignement (DCACE)- 128 heures d'enseignement – Université de Poitiers (86).
- **UE Outils scientifiques pour biologistes** – L1 Sciences du Vivant – 26H TD 44H TP
- **UE Microbiologie générale** – L1 Sciences du Vivant- 14H TD 16HTP
- **UE Méthodes d'analyses des macromolécules**- M1 Physiologie, Neurosciences, Biologie Cellulaire et Moléculaire – 24H TP 4H TD

Langues
Français, Anglais

Résumé

Les circuits et réseaux d'eau subissent épisodiquement des problèmes de contamination par des microorganismes tels que *Legionella pneumophila*, conduisant à la dégradation de la qualité microbiologique de l'eau circulante. De nouveaux moyens de traitements doivent être mis en place de façon notamment à limiter l'usage de biocides chimiques. Ce travail de thèse s'inscrit dans cette problématique et a pour objectif d'identifier de nouveaux composés actifs contre *L. pneumophila* en tenant compte de son comportement et de ses interactions au sein de son microenvironnement.

De manière à obtenir des composés produits par des souches bactériennes appartenant à la même niche écologique que *L. pneumophila,* une campagne de prélèvement d'eau a été réalisée. Un total de 273 isolats environnementaux ont été isolés et testés contre *L. pneumophila*. Les résultats obtenus indiquent que 178 de ces isolats (65%) présentent une activité anti-*Legionella*. Quatre souches ont ensuite été sélectionnées (*Aeromonas bestiarum* PoW257, *Rahnella aquatilis* PoW265, *Flavobacterium spp.* PW52 et *Pseudomonas spp* PW329) et les composés actifs produits ont été caractérisés. *A. bestiarum* PoW257 produit un peptide anti-*Legionella*. *Flavobacterium* sp. PW52 produit un mélange de composés anti-*Legionella* ayant des propriétés tensioactives, les flavolipides. *Pseudomonas* sp. PW329 produit des composés organiques volatiles, identifiés par SPME-GC-MS, actifs contre *L. pneumophila.* Enfin, *R. aquatilis* PoW265 produit un sidérophore à activité anti-*Legionella*.

Mots clés : *Legionella*, eau douce , communautés bactériennes, biosurfactants, composés antimicrobiens, sidérophore.

Abstract

Water is essential to sustain life and water sources used for human consumption must be biologically safe, to avoid any risk for health. Indeed, the most common and widespread health risk associated with drinking water are infectious diseases caused by pathogenic microorganisms such as *Legionella pneumophila*. However, more efforts are needed to control disinfection by-products and minimize people exposure to potentially hazardous chemicals while maintaining adequate disinfection to ensure good water quality. Thus, this work aimed to find natural antibacterial compounds to control *L. pneumophila* growth using bacteria from freshwater environments.

Environmental aquatic bacteria were sampled from five freshwater sources to get a large culturable bacterial collection. A total of 273 bacterial isolates were recovered and screened for their ability to produce anti-*Legionella* compounds. Among those, 178 (65%) were shown to be active against *L. pneumophila*. Four strains (*Aeromonas bestiarum* PoW257, *Rahnella aquatilis* PoW265, *Flavobacterium* spp. PW52, and *Pseudomonas* spp PW329) were next selected for the characterization of their active compounds. *A. bestiarum* PoW257 produces an anti-*Legionella* peptide, and *Flavobacterium* spp PW52 produces a mixture of anti-*Legionella* compounds with surface active properties, named flavolipids. Finally *Pseudomonas* sp. PW329 delivers many volatile organic compounds, and *R. aquatilis* PoW 265 produces a anti-*Legionella* siderophore.

Keywords: *Legionella*, freshwater environments, bacterial communities, biosurfactants, antimicrobials compounds, siderophore.