



## AVIS DE SOUTENANCE

M. ISSAM HASNI présente ses travaux en soutenance le :

**Judi 02 juillet 2020 de 11h00 à 12h30**

**Salle 8**  
**VISIOCONFERENCE**  
**IHU – Méditerranée Infection**  
\*\*\*\*\*  
19-21 boulevard Jean Moulin  
**13385 MARSEILLE Cedex 05**

en vue de l'obtention du diplôme : **Doctorat en Biologie santé- Maladies Infectieuses**

La soutenance est publique.

Titre des travaux : ETUDE DE L'AMIBE WILLAERTIA MAGNA C2c MAKY ET DES AMIBES LIBRES APPARTENANT AU PHYLUM DES AMOEBOZOA PAR APPROCHES MULTI-OMIQUES.

Ecole doctorale : Sciences de la vie et de la santé (62)  
Unité de recherche : Microbes Evolution Phylogénie et Infections  
Directeur : M. BERNARD LA SCOLA, PROFESSEUR DES UNIVERSITES  
Codirecteur : Mme SANDRINE DEMANECHÉ, PERSONNALITE EXTERIEURE

### Membres du jury

| Nom                    | Qualité                     | Etablissement                     | Rôle               |
|------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|--------------------|
| Mme SABINE FAVRE-BONTE | MAITRE DE CONFERENCES (HDR) | UNIVERSITE LYON 1                 | Rapporteur du jury |
| M. YANN HECHARD        | PROFESSEUR DES UNIVERSITES  | UNIVERSITE POITIERS               | Rapporteur du jury |
| M. ERIC GHIGO          | DIRECTEUR DE RECHERCHE      | STAT UP TECHNO JOUVENCE MARSEILLE | Membre du jury     |
| Mme GIOVANNA MOTTOLA   | MAITRE DE CONFERENCES (HDR) | UNIVERSITE D'AIX-MARSEILLE        | Membre du jury     |
| Mme SANDRINE DEMANECHÉ | PERSONNALITE EXTERIEURE     |                                   | Co-Directeur       |
| M. BERNARD LA SCOLA    | PROFESSEUR DES UNIVERSITES  | UNIVERSITE D'AIX-MARSEILLE        | Directeur          |

**Le Doyen**

**Georges LEONETTI**



## Résumé

Les amibes libres sont des microorganismes unicellulaires eucaryotes vivant dans les sols ou les milieux aquatiques. Ces protistes sont des prédateurs dans l'environnement, jouant un rôle important dans la régulation des communautés microbiennes. Cependant, de nombreux microorganismes ont évolué pour résister à la digestion amibienne favorisant ainsi la propagation de bactéries potentiellement pathogènes dans l'environnement telles que les *Legionella pneumophila*. Ces dernières sont en effet capables de se répliquer au sein des *Acanthamoeba* spp. et des *Vermamoeba* spp. *Willartia magna* C2c maky en revanche s'illustre par sa capacité à éliminer ce pathogène. Fondée sur cette propriété, la société Amoéba a développé un biocide naturel afin de contrôler la prolifération des légionelles au sein des réseaux d'eau. Mon travail de thèse réalisé à l'Institut Hospitalo-Universitaire Méditerranée Infection à Marseille, en étroite collaboration avec la société Amoéba a permis d'entreprendre un programme de recherche reposant sur l'étude des amibes libres. Cette thèse se décompose en plusieurs projets. Nous avons dans un premier temps réalisé une analyse approfondie de l'amibe *W. magna* utilisée comme substance active du biocide naturel « Biomeba ». Nous avons ensuite exploré le monde des *Amoebozoa*. Lors de nos travaux, nous avons combiné différentes stratégies associant des analyses multi-omiques de nos protistes (génomiques, transcriptomiques et protéomiques) à des méthodes de culture.

Dans la première partie de cet ouvrage, nous présenterons nos travaux qui ont permis d'améliorer les connaissances sur l'amibe libre *W. magna*. Le séquençage et l'analyse du génome de *W. magna* a fourni des informations essentielles pour le développement de l'entreprise. Le génome est composé de séquences d'origines diverses, témoignant d'un échange de gènes latéraux avec des microorganismes environnementaux. De plus, le contenu génétique nous a permis de mettre en place un système d'identification spécifique par biologie moléculaire de notre espèce amibienne. Les analyses *in silico* et *in vitro* ont démontré la pathogénicité de cette amibe. Les analyses multi-omiques ont apporté des renseignements complémentaires sur le métabolisme et la biologie de l'amibe, fournissant des pistes d'études importantes dans le but d'améliorer les conditions de culture. Des expériences de co-culture ont révélé la capacité de *W. magna* à éliminer *in vitro* des souches pathogènes de *L. pneumophila*.

Dans la seconde partie de cet ouvrage, nos travaux ont porté sur la description et la caractérisation d'amibes libres appartenant à l'embranchement des *Amoebozoa* sur le plan génomique. En effet, l'analyse génomique des protistes est une méthode essentielle pour comprendre l'évolution des eucaryotes. Cependant, peu de génomes ont été séquencés et publiés dans les journaux scientifiques. Le séquençage des génomes de *Vermamoeba vermiformis*, d'*Acanthamoeba triangularis* - deux souches de références - et d'une souche d'*Acanthamoeba castellanii* issue d'un coprolithe ancien ont permis d'enrichir les bases de données de séquences génomiques public. L'investigation génomique de ces trois amibes a révélé l'importance et l'impact des échanges d'informations génétiques entre bactéries, virus et protistes dans l'évolution des micro-organismes. Nous avons identifié des gènes de virulence associés aux kératites lors d'une étude comparative des génomes d'amibes. Nos expérimentations ont été complétées par des travaux de culture révélant l'importance des amibes libres en tant que support cellulaire afin d'isoler de nouveaux virus géants et d'évaluer la pathogénicité d'une souche bactérienne intracellulaire.

L'ensemble de ces travaux ont amélioré nos connaissances sur les amibes libres appartenant aux phylums des *Excavata* et *Amoebozoa* en apportant des informations essentielles sur l'évolution, le métabolisme et leurs interactions avec le monde microbien.

**Mots-clés :** *Willartia magna*, Amibes libres, Génomique, Transcriptomique, Protéomique, Amoéba, *Acanthamoeba*, *Vermamoeba*.

## Abstract

Free-living amoebas are eukaryotic unicellular microorganisms living in soil or aquatic environments. These protists are predators in the environment, playing an important role in the regulation of microbial communities. However, many microorganisms have evolved to resist amoebal digestion, thereby promoting the spread of potentially pathogenic bacteria in the environment such as *Legionella pneumophila*. Although some amoebal species such as *Acanthamoeba* spp. and *Vermamoeba* spp. are permissive in contact with *L. pneumophila*, *Willartia magna* has demonstrated the ability to eliminate a pathogenic strain of *L. pneumophila*. Based on this property, the company Amoéba has developed a natural biocide in order to control the proliferation of legionella in water networks. Our thesis work carried out at the Mediterranean Infection Institute, in close collaboration with the company Amoéba, made it possible to undertake a research program based on the study of free-living amoebas. This thesis is divided into several projects, we first carried out an in-depth analysis of the amoeba *W. magna* used as active substance in the natural biocide "Biomeba". We then explored the world of *Amoebozoa*. During our work, we used different strategies combining multi-omic analysis of our protists (genomics, transcriptomics and proteomics) and culture methods.

In the first part of this manuscript, we will present our work which has improved knowledge of the *W. magna*. The sequencing and analysis of the genome of *W. magna* has provided essential information for the development of the Amoéba society. The genome is composed of genes from diverse origins, reflecting the impact of lateral gene transfers with environmental microorganisms. *In silico* and *in vitro* analyzes have shown that this amoeba is not pathogenic. The multi-omic analyzes provided additional information on the metabolism and biology of the amoeba providing important lines of study in order to improve the culture conditions. *In vitro* tests demonstrated the capacity of *W. magna* to eliminate pathogenic strains of *L. pneumophila*.

In the second part of this work, our work focused on the description and characterization of FLAs belonging to the phylum of *Amoebozoa* on the genomic level. Indeed, genomic analysis of protists is an essential method for understanding the evolution of eukaryotes, however few genomes have been sequenced and published in scientific journals. The sequencing of the genomes of *Vermamoeba vermiformis*, *Acanthamoeba triangularis* and *Acanthamoeba castellanii* isolated from an ancient coprolite have made it possible to enrich the databases of public genomic sequences. Genomic investigation of these three amoebas has revealed the importance and impact of the lateral gene transfers between bacteria, viruses and protists in the evolution of microorganisms. We identified virulence genes associated with keratitis in a comparative study of amoebae genomes. Finally, our experiments were supplemented by culture works revealing the importance of FLAs as a cellular support in order to isolate new giant viruses and to assess the pathogenicity of an intracellular bacterial strain.

This work has improved our knowledge of free-living amoebas belonging to the phylum of *Excavata* and *Amoebozoa* by providing essential information on evolution, metabolism and their interactions with the microbial world.

**Key words:** *Willartia magna*, Free-living amoebas, Genomics, Transcriptomic, Proteomics, Amoéba, *Acanthamoeba*, *Vermamoeba*.