



Étude de l'interaction entre *L. pneumophila* et l'autophagie de la cellule hôte

Virginie Lelogeais

► To cite this version:

Virginie Lelogeais. Étude de l'interaction entre *L. pneumophila* et l'autophagie de la cellule hôte. Biologie cellulaire. Université de Lyon, 2016. Français. NNT : 2016LYSE1168 . tel-01827235

HAL Id: tel-01827235

<https://theses.hal.science/tel-01827235>

Submitted on 2 Jul 2018

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

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



N°d'ordre NNT : 2016LYSE1168

THESE de DOCTORAT de L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 341 :
Evolution, Ecosystèmes, Microbiologie, Modélisation

Spécialité de doctorat : Infectiologie

Soutenue publiquement le 04 octobre 2016, par :
Virginie Marie Isis LELOGEAIS

**Etude de l'interaction entre *L. pneumophila* et
l'autophagie de la cellule hôte**

Devant le jury composé de :

DE BOLLE, Xavier	Professeur	Université de Namur	Rapporteur
HECHARD, Yann	Professeur	Université de Poitiers	Rapporteur
BONAZZI, Matteo	Chargé de recherche	Université de Montpellier	Rapporteur
SALCEDO, Suzana	Chargé de recherche	Université de Lyon 1	Examinatrice
DOUBLET, Patricia	Professeur	Université de Lyon 1	Directrice de thèse
VAVRE, Fabrice	Directeur de recherche	Université de Lyon 1	Co-directeur de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et

Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directeur Général des Services

M. le Professeur Frédéric FLEURY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud –
Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et
Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C.

VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la
Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Département de formation et Centre de Recherche
en Biologie Humaine

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme C. FELIX

Département GEP

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques
et Sportives

Directeur : M. Y.VANPOULLE

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon
Polytech Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. le Professeur E.PERRIN

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. N. LEBOISNE

Etude de l'interaction entre *L. pneumophila* et l'autophagie de la cellule hôte

L. pneumophila est l'agent responsable de la légionellose, une pneumonie sévère associée à 10% de mortalité. Cette bactérie intracellulaire a acquis la capacité de survivre et de se répliquer dans des cellules humaines. *L. pneumophila* sécrète notamment un grand nombre d'effecteurs par son système de sécrétion de type IV, qui interagissent avec différentes voies cellulaires, dont l'autophagie. L'autophagie est une voie de dégradation conservée qui permet aux cellules eucaryotes de réguler l'homéostasie cellulaire et d'éliminer des agents pathogènes intracellulaires. Néanmoins, nombre d'entre eux ont évolué pour manipuler cette voie à leur propre avantage. Même si l'interaction entre *L. pneumophila* et l'autophagie a été rapportée, aucun modèle clair n'est déterminé. Dans cette étude, nous montrons qu'une infection à *L. pneumophila* induit une stimulation globale de l'autophagie, mais que ce phénotype dépend des souches utilisées, et notamment de la présence de certains effecteurs. De plus, l'inhibition de l'autophagie est liée à un défaut de réplication intracellulaire suggérant que cette voie est bénéfique à la bactérie. Afin de rechercher les déterminants génétiques impliqués dans cette interaction, nous avons identifié des effecteurs communs sécrétés par le système de sécrétion de type IV entre *L. pneumophila* et *Coxiella burnetii*, une bactérie de l'ordre des *Legionellales* connue pour stimuler et détourner l'autophagie cellulaire. La capacité des mutants de ces effecteurs à induire l'autophagie chez *L. pneumophila* a été analysée. Si aucun d'entre eux ne semble impliqué dans la modulation de l'autophagie, cette étude suggère d'autres fonctions pour ces effecteurs conservés.

Mots clés : *Legionella*, autophagie, infection, effecteurs

Adresses :

Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI)	
INSERM U1111, CNRS UMR5308, Université Lyon 1, ENS de Lyon	
10 Rue Raphaël Dubois	21 Avenue Tony Garnier
69622 Villeurbanne Cedex	69365 Lyon Cedex 07
France	France

Study of the interaction between *L. pneumophila* and host cell autophagy

Legionella pneumophila is responsible for the legionellosis disease, a severe pneumonia associated with 10% mortality rate. This intracellular bacterium has evolved the ability to survive and replicate within human cells. Notably, *L. pneumophila* secretes a high number of type IV secretion system effectors that interfere with many cellular pathways including autophagy. Autophagy, a highly conserved degradative pathway, allows eukaryotic cells to regulate cell homeostasis and fight intracellular pathogens. Nevertheless numerous microorganisms have evolved strategies to subvert this mechanism to their own advantage. The interaction between *L. pneumophila* and autophagy has been reported but remains unclear. In this study, we show that *L. pneumophila* infection induces a global stimulation of autophagy, but importantly this autophagy stimulation depends on the bacterial strain. Moreover, we also observed that inhibition of autophagy results in decreased intracellular bacterial proliferation suggesting that host cell autophagy is beneficial for *L. pneumophila*. In order to decipher the molecular determinants involved in the interaction with autophagy, we identified common effectors secreted by the type IV secretion system between *L. pneumophila* and *Coxiella burnetii*, a bacterium from the order *Legionellales* responsible for Q fever and known to stimulate and hijack host cell autophagy. Mutant of these common effectors in *L. pneumophila* were analysed. While, none of them seems to be implicated in autophagy modulation, this study suggests other functions for these conserved effectors.

Key words : *Legionella*, autophagy, infection, effectors

Table des matières

Table des matières	7
Listes des figures, tableaux et abréviations	11
Liste des figures.....	11
Liste des tableaux.....	15
Liste des abréviations	17
Avant propos	23
Etude bibliographique	25
I. <i>Legionella pneumophila</i>	27
1. La légionellose	27
1.1. Microbiologie de <i>L. pneumophila</i>	27
1.2. Tableau clinique, détection et traitements de la légionellose	29
2. Variabilité génétique	31
2.1. Les éléments génétiques mobiles	32
2.2. Les polymorphismes nucléotidiques	33
2.3. Les protéines de type eucaryote ou contenant des domaines eucaryotes.....	35
3. Les systèmes de sécrétion et de translocation	37
3.1. Les systèmes de sécrétion de type I, II et V	37
3.2. Les systèmes de sécrétion de type IV	38
4. Cycle de vie intracellulaire	40
4.1. Adhésion à la cellule hôte	41
4.2. Mode d'entrée.....	43
4.3. Biogenèse d'une vacuole favorable à la réplication bactérienne	45
4.3.a. Modulation de la composition lipidique de la LCV	46
4.3.b. Recrutement et modification des petites GTPases à la LCV	49
4.3.c. Echappement à la voie de dégradation endocytaire.....	52
4.4. Détournement des voies cellulaires	54
4.4.a. Perturbation de la voie de sécrétion, des mitochondries et du cytosquelette	54
4.4.b. Modulation de l'expression des gènes de l'hôte.....	56
4.4.c. Exploitation de la machinerie de l'ubiquitination de l'hôte	57
4.5. Transitions de phases	59
4.6. Régulation de la mort cellulaire et sortie des bactéries	61
5. Synthèse	62
II. Les bactéries intracellulaires et l'autophagie	65
1. L'autophagie.....	66

1.1. Vue globale de l'autophagie.....	68
1.2. Initiation	69
1.3. Elongation.....	72
1.4. Maturation.....	74
2. Les bactéries intracellulaires et l'autophagie	76
2.1. <i>Sodalis pierantonius</i> , une bactérie endosymbiotique dégradée par autophagie ..	77
2.2. <i>Streptococcus pyogenes</i> , une bactérie dégradée par autophagie mais également capable de l'inhiber.....	78
2.3. Exemples de bactéries qui inhibent l'autophagie.....	82
2.3.a. <i>Shigella flexneri</i>	82
2.3.b. <i>Listeria monocytogenes</i>	84
2.4. <i>Salmonella Typhimurium</i> , une bactérie dégradée par autophagie mais également capable de la détourner	88
2.5. Exemples de bactéries qui détournent l'autophagie	92
2.5.a. <i>Brucella abortus</i>	92
2.5.b. <i>Coxiella burnetii</i>	93
III. <i>Legionella pneumophila</i> et l'autophagie de l'hôte	97
1. Interaction entre <i>L. pneumophila</i> et l'autophagie des amibes <i>Dictyostelium discoideum</i>	97
2. Interaction entre <i>L. pneumophila</i> et l'autophagie des macrophages murins.....	101
2.1. Macrophages restrictifs dérivés de la lignée murine C57BL/6	102
2.1.a. Etude des mutants bactériens capables de se répliquer en macrophages restrictifs.....	102
2.1.b. Le cas de l'effecteur bactérien RavZ	104
2.1.c. Modèle d'interaction entre <i>L. pneumophila</i> et l'autophagie cellulaire des macrophages restrictifs	104
2.2. Macrophages permissifs dérivés de la lignée murine A/J.....	106
3. Interaction entre <i>L. pneumophila</i> et l'autophagie des cellules humaines.....	108
4. Synthèse	111
5. Objectifs	112
Résultats	115
I. Etude de l'interaction entre <i>L. pneumophila</i> et l'autophagie de l'hôte	117
II. Etude des effecteurs conservés entre <i>L. pneumophila</i> et <i>C. burnetii</i>	149
1. Histoire évolutive	149
2. Analyses biologiques.....	159
Discussion et conclusions	165

Matériels et Méthodes	173
I. Culture des bactéries	175
1. Souches d' <i>Escherichia coli</i>	175
2. Souches de <i>Legionella pneumophila</i>	175
II. Plasmides	177
III. Clonage	179
1. Extraction de l'ADN génomique de <i>L. pneumophila</i>	179
2. Construction de la souche <i>L. pneumophila</i> Paris pXDC50-ravZ	179
2.1. Construction du plasmide pXDC50-ravZ	179
2.2. Transformation de <i>L. pneumophila</i> par électroporation	180
3. Construction des mutants chez <i>L. pneumophila</i>	181
3.1. Construction des cassettes de recombinaison homologue	181
3.2. Transformation par compétence naturelle	183
4. Contrôle des souches construites et utilisées dans cette étude	184
IV. Entretien des cellules eucaryotes	185
1. Cellules épithéliales HeLa et monocytes U937 humains	185
2. Amibes <i>Acanthamoeba castellanii</i>	186
V. Protocoles d'infection	187
1. De cellules épithéliales HeLa par <i>L. pneumophila</i>	187
2. De monocytes U937 différenciés en macrophages par <i>L. pneumophila</i>	187
3. D'amibes <i>Acanthamoeba castellanii</i> par <i>L. pneumophila</i>	188
VI. Analyse de l'autophagie cellulaire	189
1. Modulation de l'autophagie par des siARN	189
1.1. Fonction des siARN	189
1.2. Transfection des cellules HeLa	190
1.3. Vérification de l'efficacité de transfection	190
1.3.a. Lyse des cellules	190
1.3.b. Analyse des protéines ATG5 et STX17 par western-blot	191
2. Modulation de l'autophagie par des drogues	192
3. Suivi de l'autophagie par cytométrie en flux et cytométrie d'image	193
4. Suivi de l'autophagie par western-blot	194
VII. Analyse de la réplication bactérienne	197
1. Par comptage de colonies	197
2. Par cytométrie en flux	198
3. Par lecteur de plaque	198
VIII. Analyses statistiques	201
Références	203

Listes des figures, tableaux et abréviations

Liste des figures

Figure 1 : Morphologie de <i>Legionella pneumophila</i>	28
Figure 2 : La légionellose en France.....	30
Figure 3 : Répartition des gènes cœurs et spécifiques au sein de différentes souches de <i>L. pneumophila</i> appartenant au sérogroupe-1	32
Figure 4 : Phylogénie des souches de laboratoire dérivées de <i>L. pneumophila</i> Philadelphia-1	34
Figure 5 : Réplication de différents clones de <i>L. pneumophila</i> Philadelphia dans des macrophages murins.....	35
Figure 6 : Répartition des gènes codant les protéines de type eucaryote ou à domaines eucaryotes au sein de différents génomes de <i>L. pneumophila</i> appartenant au sérogroupe-1	36
Figure 7 : Les systèmes de sécrétion chez <i>L. pneumophila</i>	39
Figure 8 : Cycle de vie intracellulaire de <i>L. pneumophila</i>	41
Figure 9 : Protéines de <i>L. pneumophila</i> impliquées dans l'adhésion de la bactérie aux cellules hôtes	43
Figure 10 : Modes d'entrée de <i>L. pneumophila</i> dans les cellules hôtes	45
Figure 11 : La voie de dégradation endocytaire	45
Figure 12 : Les phosphoinositides et les petites GTPases RAB et ARF.....	47
Figure 13 : Remodelage des phosphoinositides à la surface de la LCV.....	49
Figure 14 : Rôle de la petite GTPase RAB1 dans la biogenèse de la LCV.....	51
Figure 15 : Perturbation de la voie de dégradation endocytaire par les effecteurs de <i>L. pneumophila</i>	53
Figure 16 : Perturbation de la voie de sécrétion, des mitochondries et du cytosquelette par les effecteurs de <i>L. pneumophila</i>	55
Figure 17 : Détournement de la machinerie d'ubiquitination de l'hôte par les effecteurs de <i>L. pneumophila</i>	59
Figure 18 : Cycle biphasique de <i>L. pneumophila</i>	60
Figure 19 : Les différents types d'autophagie	66
Figure 20 : Déroulement de l'autophagie	67
Figure 21 : Schéma global de l'autophagie.....	68
Figure 22 : Les récepteurs et adaptateurs autophagiques	69
Figure 23 : Activation de l'autophagie par inhibition du complexe mTORC	71

Figure 24 : Les complexes d'initiation de l'autophagie	72
Figure 25 : Systèmes de conjugaison de type ubiquitine impliqués dans la formation de LC3-II	73
Figure 26 : Fusion membranaire entre l'autophagosome et le lysosome	75
Figure 27 : Rôle de l'autophagie dans le cycle de vie intracellulaire de <i>Sodalis pierantonius</i>	78
Figure 28 : Rôle de l'autophagie dans le cycle de vie intracellulaire de <i>Streptococcus pyogenes</i>	81
Figure 29 : Rôle de l'autophagie dans le cycle de vie intracellulaire de <i>Shigella flexneri</i>	84
Figure 30 : Rôle de l'autophagie dans le cycle de vie intracellulaire de <i>Listeria monocytogenes</i>	87
Figure 31 : Rôle de l'autophagie dans le cycle de vie intracellulaire de <i>Salmonella Typhimurium</i>	91
Figure 32 : Rôle de l'autophagie dans le cycle de vie intracellulaire de <i>Brucella abortus</i>	93
Figure 33 : Rôle de l'autophagie dans le cycle de vie intracellulaire de <i>Coxiella burnetii</i>	95
Figure 34 : L'amibe <i>Dictyostelium discoideum</i>	98
Figure 35 : Réplication de différentes souches de <i>L. pneumophila</i> dans des amibes <i>D. discoideum</i> sauvages ou déficientes pour <i>atg9</i>	99
Figure 36 : Interaction entre <i>L. pneumophila</i> et l'autophagie des amibes	100
Figure 37 : Réplication de <i>L. pneumophila</i> dans des macrophages dérivés de différentes lignées murines	101
Figure 38 : Acquisition de marqueurs autophagiques dans des macrophages dérivés de souris C57BL/6J infectés par <i>L. pneumophila</i> ou traités avec de la rapamycine	103
Figure 39 : Interaction entre <i>L. pneumophila</i> et l'autophagie des macrophages restrictifs dérivés de la lignée murine C57BL/6	105
Figure 40 : Réplication de différentes souches de <i>L. pneumophila</i> dans des macrophages dérivés de souris A/J	106
Figure 41 : Acquisition de marqueurs autophagiques par <i>L. pneumophila</i> dans des macrophages dérivés de moelle osseuse de souris A/J	107
Figure 42 : Interaction entre <i>L. pneumophila</i> et l'autophagie des macrophages permissifs dérivés de la lignée murine A/J	108
Figure 43 : <i>L. pneumophila</i> au sein d'une vacuole à double membrane dans des monocytes primaires humains	109
Figure 44 : Interaction entre <i>L. pneumophila</i> et l'autophagie de cellules humaines	111
Figure 45 : Arbre phylogénétique de l'effecteur Lpp0327 (SdeA)	151
Figure 46 : Arbre phylogénétique de l'effecteur Lpp0750 (AnkX)	152
Figure 47 : Arbre phylogénétique de l'effecteur Lpp1682	153
Figure 48 : Arbre phylogénétique de l'effecteur Lpp2058	154

Figure 49 : Arbre phylogénétique de l'effecteur Lpp2174 (LpnE)	155
Figure 50 : Arbre phylogénétique de l'effecteur Lpp2248 (AnkH).....	156
Figure 51 : Arbre phylogénétique de l'effecteur Lpp2308.....	157
Figure 52 : Arbre phylogénétique de l'effecteur Lpp2615.....	158
Figure 53 : Contrôle de la croissance axénique et de l'émission de fluorescence mCherry des mutants construits chez la souche <i>L. pneumophila</i> Paris utilisés dans cette étude	159
Figure 54 : Caractérisation des mutants de <i>L. pneumophila</i> dans des cellules épithéliales humaines HeLa	161
Figure 55 : Crible de la réplication intracellulaire des mutants de <i>L. pneumophila</i> dans les amibes <i>A. castellanii</i>	162
Figure 56 : Crible de la réplication intracellulaire des mutants de <i>L. pneumophila</i> dans les macrophages dérivés de la lignée monocyttaire U937	163
Figure 57 : Répartition des effecteurs sécrétés par le SST4 Dot/Icm	168
Figure 58 : L'effecteur Lpp2286 de <i>L. pneumophila</i> Paris n'est pas impliqué dans la modulation de l'autophagie.....	169
Figure 59 : <i>L. pneumophila</i> module l'autophagie cellulaire à un niveau optimal	170
Figure 60 : Modèle d'interaction entre différentes souches de <i>L. pneumophila</i> et l'autophagie cellulaire de cellules épithéliales humaines	172
Figure 61 : Représentation graphique du plasmide pXDC50	177
Figure 62 : Stratégie de clonage des mutants chez <i>L. pneumophila</i>	182
Figure 63 : Effet des siATG5 et siSTX17 sur l'autophagie	190
Figure 64 : Effet de la rapamycine sur l'autophagie	192
Figure 65 : Effet de la bafilomycine sur l'autophagie.....	192
Figure 66 : Analyse des autophagosomes par cytométrie en flux	193
Figure 67 : Analyse de la réplication bactérienne par comptage de colonies	197
Figure 68 : Analyse de la réplication bactérienne par cytométrie en flux.....	198
Figure 69 : Analyse de la réplication bactérienne par lecteur de plaque	199

Liste des tableaux

Tableau 1 : Distribution des protéines de plusieurs espèces de bactéries intracellulaires en fonction de leur similarité avec différents taxons.....	36
Tableau 2 : Conservation des effecteurs interagissant avec l'autophagie au sein de différentes souches appartenant au séro groupe-1 de <i>L. pneumophila</i>	112
Tableau 3 : Effecteurs conservés entre <i>L. pneumophila</i> et <i>C. burnetii</i>	149
Tableau 4 : Souches d' <i>Escherichia coli</i> utilisées dans cette étude.....	175
Tableau 5 : Souches de <i>Legionella pneumophila</i> utilisées dans cette étude.....	176
Tableau 6 : Liste 1 des amorces utilisées dans cette étude.....	180
Tableau 7 : Liste 2 des amorces utilisées dans cette étude.....	183
Tableau 8 : Liste des cellules eucaryotes utilisées dans cette étude.....	185
Tableau 9 : Séquences des siARN utilisés dans cette étude.....	189
Tableau 10 : Interprétation du niveau d'autophagie en fonction de la quantité des protéines P62, LC3-I et LC3-II	195

Liste des abréviations

A

aBCV autophagic BCV
ACES acide N-(2-acetamido)-2-aminoethanesulfonique
Act actin assembly-inducing protein
ADN acide désoxyribonucléique
ADP adénosine diphosphate
ALR autophagic lysosome reformation
AMBRA activating molecule in becn1-regulated autophagy
AMP adénosine monophosphate
AMPK AMP-activated protein kinase
Ank ankyrine
AP acide phosphatidique
ARF ADP ribosylation factor
ARN acide ribonucléique
ARNm ARN messenger
ARP actin-related protein
Asd aspartate- β -semialdehyde dehydrogenase
ATP adenosine triphosphate
ATG pour autophagy
ATP adénosine triphosphate
AYE ACES-buffered yeast extract

B

BAT HLA-B-associated transcript
BCL B-cell lymphoma
BCV Brucella-containing vacuole
BCYE buffered CYE
DdrA diol dehydratase-reactivating factor large subunit A
BIF Bax-interacting factor
Blast basic local alignment search tool

BNIP3 BCL2 /adenovirus E1B 19kDa interacting protein
BRCA breast cancer
BSA bovine serum albumine

C

Caspase cysteiny-l-aspartate-cleaving protease
Ceg coregulated with the effector encoding genes
CLK Cdc2-like kinase
Connecdenn Denn domain-containing protein
CpxR conjugative plasmid expression
Cullin selecting cellular proteins for ubiquitin-mediated proteasomal degradation
CYE charcoal yeast extract agar

D

DAG diacylglycérol
DAPI 4',6-diamidino-2-phénylindole
Ddl degrés de liberté
DDR diol dehydratase-reactivating factor large subunit
Denn differentially expressed in neoplastic versus normal cells
DFCP double EYVE domain-containing protein
DMEM Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO diméthylsulfoxyde
DO densité optique
Dot defective in organelle trafficking

DRAM damage-regulated autophagy
modulator

E

e (valeur) expect

E glutamine

eBCV endosomal BCV

EDF extended depth of field

EDTA éthylène diamine tétraacétique

EEA early endosome antigen

EEF ekaryotic translation elongation
factor

EGD E.G.D. Murray (découverte de *L.*
monocytogenes)

Enh enhance entry

ESCRT endosomal sorting complexes
required for transport

F

F phenylalanine

F (plasmide) fertilité

FIP200 focal adhesion kinase family
interacting protein of 200 kDa

Fla flagellum

FVD fixable viability dye

FYCO1 FYVE and coiled-to-coil domain
containing protein

G

GAG glycosaminoglycanes sulfatés

GAP GTPase-activating protein

GAS group A *streptococcus*

GC guanine-cytosine

GcAv GAS-containing autophagosome-
like vacuoles

GCN general control nonderepressible

GDI guanosine dissociation inhibitors

GDF GDI dissociation factors

GEF guanine nucleotide exchange factor

GFP green fluorescent protein

GobX golgi-localized U-box E3 ligase

GTPases guanosine triphosphatases

H

HEK293 human embryonic kidney cell line

HeLa Henrietta Lacks, lignée cellulaire de
cellules cervicales humaines

Hep-2 human epithelial cell line type 2,
cellules épithéliales humaines du larynx

HMEC-1 human microvesicular endothelial
cell line

HOPS homotypic fusion and protein
sorting

Hsc70 heat shock cognate of the Hsp70
family

Hsp60 60-kDa heat shock protein

Htp high temperature protein

I

ICE integrative and conjugative elements

Icm intracellular multiplication

IκB inhibitor of κB

IKK IκB kinase

Inc incompatibilité

Ini internaline

InVS pour institut de veille sanitaire

IPAF ice protease-activating factor

K

K lysine

kDa kilodalton

L

LAP LC3-associated phagocytosis
Lad L. pneumophila adenylate cyclase
LacI operon lactose inhibitor
LacO operon lactose operator
Lai L. pneumophila adhesion molecule
homologous with integrin analogue of *S. cerevisiae*
LAMP lysosome associated membrane
protein
LBBE laboratoire de biométrie et de
biologie evolutive
LC3 MAP 1A/1B-light chain 3
Lcl Legionella collagen-like protein
LCV Legionella-containing vacuole
LCV (*C. burnetii*) large cell variant
Leg Legionella ekaryotic-like gene
Lep Legionella effector protein
Lgt Legionella glucosyltransferase
Lic lipopolsaccharide core
Lid lowered viability in the presence of
dotA
LIR LC3-interacting region
LLO listétiolysine O
Lna Legionella NF- κ B activator
LncP Legionella nucleotide carrier protein
Lpd lipoamide dehydrogenase
Lpg L. pneumophila Philadelphia-1 gene
LpnE L. pneumophila entry
LPS lipopolsaccharide
Lse Legionella SNARE effector
Ltp Legionella translocated protein
Lub Legionella U-box protein
Lvg Legionella virulence gene
Lvh Legionella vir homologues

M

MAB monoclonal antibody subgrouping
MAP microtubule-associated protein
MEF mouse embryonic fibroblast
MERLIN moesin-ezrin-radixin-like protein
Mip macrophage infectivity potentiator
Mob mobilisation
MOI multiplicity of infection
Momp major outer membrane protein
MTM3 myotubularin-related protein
MTOC microtubule organizing center
mTORC mammalian target of rapamycin
complex ou mechanistic target of
rapamycin complex
MVP major vault protein

N

N asparagine
NAD nicotinamide adenine dinucleotide
NADase NAD glycohydrolase
NAIP neuronal apoptosis inhibitory protein
NAP NCK-associated protein
NBR1 nighbor of BRCA
NCK non-catalytic region of tyrosine
kinase adaptor protein
NDP52 nuclear dot protein 52 kDa
NeuA N-acetylneuraminate cytidyl
transferase
NF- κ B nuclear factor κ B
NOD nucleotide oligomerization domain
NP40 Nonidet P-40

O

OATL ornithine aminotransferase-like
protein

OCRL oculocerebrorenal syndrome of Lowe

OKP7 kératinocytes oropharyngés primaires immortalisés

OM omégasome

OPTN optineurin pour optic neuropathy-inducing

ORF open reading frame

ORP oxysterol-binding protein-related protein

P

PAI pathogeny island

PAMP pathogen-associated molecular pattern

PAS phagophore assembly site ou preautophagosomal structure

pb paire de bases

PBS phosphate buffered saline

PC phosphatidylcholine

PCR polymerase chain reaction

PDG peptidoglycane

PE phosphatidylethanolamine

PFGE pulsed-field gel electrophoresis

PI phosphatidylinositol

PI3KC3 PI3K de classe III

PI3P phosphatidylinositol 3 phosphate

PI(3,4,5)P₃ phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate

PI4P5K phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase

PI4P phosphatidylinositol-4-phosphate

PI(4,5)P₂ phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate

PI4KIIIβ phosphatidylinositol 4-kinase

Pie plasticity island of effectors

Pil piline

PKC protéine kinase

Plc phospholipases C

PMA phorbol 12-myristate 13-acétate

PmrA pneumococcal multidrug resistance protein

Ptaq promoter derived from trp and lac promoters

PVDF polyvinylidene difluoride

PYG peptone yeast glucose

Q

Q glutamate

R

R arginine

RAB RAS analogue in brain

Ral (RalF) recruitment of ARF to the Legionella phagosome

RAL (RALB) Ras like proto-oncogene

RAN RAS-related nuclear protein

RANBP1 (RAN binding protein)

RAS rat sarcoma

rBCV replicative BCV

RBS ribosomal binding site

RCE RAS converting CAAX endopeptidase

RE réticulum endoplasmique

Rep replication

RFU relative fluorescence unit

RH recombinaison homologue

RILP RAB-interacting lysosomal protein

RNA ribonucleic acid

RNS reactive nitrogen species

ROS reactive oxygen species

rpm rotations par minute

RPMI Roswell park memorial institute
RpoS RNA polymerase σigma S
RpsL 30S ribosomal subunit protein S12
RrnB 16S ribosomal RNA
RtxA repeat in toxin
RUBICON Run domain beclin1-interacting
 and cysteine-rich domain-containing
 protein

S

SAC suppressor of actin
SAMDC S-adenosylmethionine
decarboxylase
SAR secretion associated ras-superfamily
 gene
SBT sequence-based typing
SCV (*C. burnetii*) small cell variant
SCV Salmonella-containing vacuole
SdcA SidC paralogue
Sde substrate of the Dot/Icm system
Sdh succinate dehydrogenase
SDS sodium dodécyl sulfate
Sec secretion
SEC secretory
SEL-1 suppressor of *C. elegans* lin-12
SERCA sarco/endoplasmic reticulum
Ca²⁺-ATPase
Sid substrate of Icm/Dot transporter
SIF *Salmonella*-induced filaments
SKP S-phase kinase-associated protein
SLAP spacious *Listeria*-containing
 phagosomes
SLO (streptolysine O)
SNAP29 synaptosome associated protein
29 kDa

SNARE soluble N-ethylmaleimide-
 sensitive factor attachment protein
receptor
SNP single nucleotide polymorphism
SpeB streptococcal pyrogenic exotoxin
SQSTM sequestosome
SST1 système de sécrétion de type I
SST2 système de sécrétion de type II
SST3 système de sécrétion de type III
SST4 système de sécrétion de type IV
SST5 système de sécrétion de type V
ST sequence-type
STX syntaxine
SV40 simian virus 40
SVF sérum de veau fœtal

T

TAE tris-acetate-EDTA
Tat twin-arginine translocation
TBK tank-binding kinase
TECPR tectonin beta-propeller repeat
 containing
TEMED tétraméthyléthylènedjamine
THP-1 macrophages dérivés de
 monocytes humains
TLR Toll-like receptor
TOCA transducer of Cdc42-dependent
actin assembly protein
Tra transfert
TRIM tripartite motif-containing protein
Tris trishydroxyméthylaminométhane

U

UBD Ub-binding domain
ULK uncoordinated-51-like kinase
UPR unfolding protein response

UVRAG ultraviolet radiation resistance-
associated gene

V

V valine

VAMP vesicle-associated membrane
protein

VATA v-ATPase A-subunit

v-ATPase vacuolar ATPase

VipD VPS inhibitor proteins

Vir virulence

VMP vacuole membrane protein

VPS vacuolar protein sorting-associated
protein

W

WB western-blot

WIPI WD-repeat protein interacting with
phosphoinositides

WGS whole genome sequencing

Y

Y tyrosine

Avant propos

Ce manuscrit de thèse fait dans une première partie l'état de l'art des connaissances sur la bactérie *Legionella pneumophila*. Cette bactérie est ubiquitaire dans les environnements hydro-telluriques et est responsable d'une pneumonie sévère nommée légionellose. Même si des traitements existent pour cette maladie, environ 10% d'échecs thérapeutiques subsistent. La variabilité du génome bactérien est importante et se caractérise par la présence/absence d'éléments mobiles, de polymorphismes nucléotidiques ou du répertoire de gènes codant notamment des protéines de type eucaryote. Il est traité plus en détail, le cycle de vie intracellulaire de cette bactérie capable d'infecter à la fois des cellules phagocytaires et non phagocytaires en survivant dans une vacuole. Les étapes d'adhésion, d'entrée, de biogenèse de cette vacuole, les transitions de phases ainsi que le contrôle de la mort cellulaire sont étudiées, avec en particulier un aperçu du rôle de différentes protéines bactériennes dans ces étapes. Ce manuscrit établit ensuite l'ensemble des connaissances actuelles sur différents modèles de bactéries interagissant avec l'autophagie de la cellule hôte. L'autophagie est en effet une voie de dégradation permettant de réguler l'homéostasie cellulaire et de dégrader des agents pathogènes. C'est pour cette raison que certains organismes pathogènes et notamment des bactéries ont développé des stratégies pour inhiber l'autophagie, masquer leur surface afin d'éviter leur reconnaissance par cette voie, ou encore la détourner pour en bénéficier. En effet, l'autophagie peut fournir des éléments nutritifs et/ou de la membrane aux bactéries qui sauront l'utiliser. Enfin, cette première partie recense avec précision les différentes études portant sur l'interaction entre *L. pneumophila* et l'autophagie de la cellule hôte.

Même si depuis 2003 de nombreuses études rapportent une interaction entre *L. pneumophila* et l'autophagie de l'hôte, cette relation et les mécanismes impliqués ne sont pas élucidés. Les résultats obtenus pendant ma thèse et présentés dans la deuxième partie de ce manuscrit contribuent à une meilleure connaissance de cette relation entre *L. pneumophila* et l'autophagie. Ces travaux mettent notamment en évidence que la variation génétique au sein des souches de *L. pneumophila* aboutit à une interaction différente de ces souches avec l'autophagie cellulaire. Durant la première année de ma thèse, il a été montré que la bactérie *Coxiella burnetii*, responsable d'une zoonose appelée fièvre Q, bénéficie de l'autophagie de la cellule hôte. Des résultats préliminaires obtenus durant cette thèse, dans le cadre de l'étude de la bactérie *L. pneumophila* suggèrent que cette bactérie bénéficie également de l'autophagie. Etant donné la proximité phylogénétique de ces deux genres bactériens, une hypothèse a été émise selon laquelle ces deux bactéries peuvent interagir avec l'autophagie de la cellule hôte par l'intermédiaire de protéines bactériennes homologues. Une collaboration a permis d'identifier des protéines homologues entre les deux bactéries puis différents cribles ont été réalisés. Ces cribles mettent en avant que

certaines de ces protéines semblent impliquées dans l'entrée, la réplication ou la sortie de *L. pneumophila*. Cependant aucune relation n'a pu être établie entre ces protéines et l'autophagie cellulaire.

Une troisième partie de ce manuscrit consiste en la discussion des résultats obtenus durant ces trois années de thèse. Il est émis différentes hypothèses sur le rôle de l'autophagie dans le cycle infectieux de différentes souches de *L. pneumophila*. L'histoire évolutive du répertoire des effecteurs sécrétés par le SST4 Dot/Icm de *L. pneumophila* et des *Legionellales* est également abordée.

Pour terminer, dans une quatrième partie de ce manuscrit, les différents outils et méthodes d'analyse utilisés pour mener à bien ce projet sont répertoriés. Il est notamment présenté les différentes souches bactériennes et lignées de cellules hôtes eucaryotes utilisées, ainsi que différents protocoles d'infection et méthodes d'analyses.

Etude bibliographique

I. *Legionella pneumophila*

1. La légionellose

La première épidémie recensée de pneumonie due à *Legionella pneumophila* a eu lieu lors de la 58^{ième} convention annuelle de la Légion américaine en 1976 à Philadelphie. C'est pour cette raison que la maladie associée a été appelée « maladie du légionnaire ». Depuis, il est courant que cette maladie soit nommée légionellose. Lors de cette première épidémie, 182 individus ont été infectés et 29 sont décédés en dépit d'un traitement antibiotique. L'eau a été considérée comme la source de l'épidémie bien que le mode de contamination n'ait pas été établi (Fraser *et al.*, 1977). C'est en avril 1979 que la taxonomie *Legionella pneumophila* a été proposée et la souche responsable de cette épidémie a été nommée *Legionella pneumophila* Philadelphia-1 (Brenner *et al.*, 1979). La caractérisation et l'étude de cette bactérie a mis en évidence qu'il existait, depuis 1943, d'autres cas de maladies humaines associées au genre *Legionella* (Winn, 1988).

1.1. Microbiologie de *L. pneumophila*

Plus de 60 espèces de *Legionella* ont été décrites à ce jour (<http://www.bacterio.net>). Ces gammaprotéobactéries appartiennent à l'ordre des *Legionellales* qui comprend également les genres *Rickettsiella* et *Coxiella*. Ce sont des bactéries à Gram négatif dont la paroi est constituée de deux membranes lipidiques séparées par le périplasme (McDade *et al.*, 1977). Ces espèces sont divisées en sérogroupes basé sur la structure du LPS (lipopolysaccharide) bactérien (Zähringer *et al.*, 1995). Ces bacilles ont une taille comprise entre 0,3 et 0,4µm de largeur et entre 2 et 4µm de longueur (McDade *et al.*, 1977 ; Chandler *et al.*, 1979a) (**Figure 1a**). Parfois, des formes filamenteuses plus grandes allant jusqu'à 50µm de longueur peuvent être observées, notamment en culture axénique (McDade *et al.*, 1977 ; Chandler *et al.*, 1979b). Cette bactérie aérobie ne forme pas de spores (Chandler *et al.*, 1979a, 1979b ; Brenner, 1986) et possède des pili qui ne semblent pas exprimés lors de l'infection (Rodgers *et al.*, 1980). L'espèce *L. pneumophila* n'est pas encapsulée et est mobile grâce à un ou plusieurs flagelles en position polaire ou latérale (Thomason *et al.*, 1979 ; Hébert *et al.*, 1984) (**Figure 1b**). Au contraire, l'espèce *L. longbeachae* synthétise une capsule et est dépourvue de flagelles, ce qui suggère de fortes variations génétiques entre les espèces du genre *Legionella* (Cazalet *et al.*, 2010).

(a)

(b)

Chandler *et al.*, 1979b

Thomason *et al.*, 1979

Figure 1 : Morphologie de *Legionella pneumophila*

(a) Cliché de microscopie électronique à transmission de *L. pneumophila* après une culture en milieu liquide, à un grossissement de x90 000 (Chandler *et al.*, 1979b). Cette bactérie possède une membrane interne (IM), une membrane externe (OM), des vacuoles (v) et un nucléoïde filamenteux (n). **(b)** Cliché de microscopie de *L. pneumophila* après une culture sur milieu gélosé, à un grossissement de x1 500. Certaines bactéries présentent un pilus localisé à un pôle bactérien.

Les bactéries du genre *Legionella* sont ubiquitaires dans les environnements hydro-telluriques tels que l'eau et les sols humides. En particulier, l'espèce *L. longbeachae* est plutôt retrouvée dans les compostes et les terreaux (Currie et Beattie, 2015) tandis que l'espèce *L. pneumophila* est principalement présente dans les réservoirs naturels d'eau comme les lacs (Fliermans *et al.*, 1981), les océans (Palmer *et al.*, 1993) et les mers (Heller *et al.*, 1998). La concentration bactérienne dans ces environnements est faible, ce qui limite le risque pour l'homme. Néanmoins, l'omniprésence de cette bactérie rend impossible la prévention de son entrée dans les installations humaines de réseaux d'eau. *L. pneumophila* est notamment détectable dans les fontaines décoratives, les spas, les piscines, les systèmes de climatisation ou les tours aéroréfrigérantes (Borella *et al.*, 2005). L'eau chaude stagnante dans les canalisations est idéale à la multiplication bactérienne, ce qui conduit à l'accumulation d'une grande quantité de bactéries qui peuvent contaminer l'homme une fois aérosolisées (Borella *et al.*, 2005). Dans ces environnements aquatiques, *L. pneumophila* est sujette à la dégradation par les amibes, cependant, cette bactérie a évolué afin non seulement d'échapper à cette dégradation mais aussi de se multiplier activement dans ces hôtes. Une vingtaine d'espèces d'amibes et deux espèces de ciliés peuvent notamment être le support de la réplication de cette bactérie (Lau et Ashbolt, 2009 ; Dupuy *et al.*, 2016). Lorsque *L. pneumophila* est sous sa forme planctonique dans l'eau, elle n'est pas capable de se multiplier (Wadowsky *et al.*, 1988), ainsi, les amibes seraient un moyen pour cette bactérie de se répliquer efficacement tout en étant protégée des stress environnementaux. Les biofilms multi-espèces formés dans les canalisations sont également un moyen de protection pour la bactérie (Abdel-Nour *et al.*, 2013).

1.2. Tableau clinique, détection et traitements de la légionellose

La légionellose, contractée suite à l'inhalation de gouttelettes d'eau contaminées, existe sous deux formes cliniques. La fièvre de Pontiac, originellement identifiée en 1968 dans la ville de Pontiac au Michigan (Glick *et al.*, 1978) est une forme bénigne de légionellose. Elle se manifeste, après une période d'incubation d'un à deux jours, par des symptômes pseudo-grippaux qui peuvent durer jusqu'à cinq jours. Cette maladie guérit spontanément en l'absence de traitement et est rarement diagnostiquée sauf lors d'épidémies (Glick *et al.*, 1978 ; Phin *et al.*, 2014). La maladie du légionnaire, forme pulmonaire grave de la légionellose, présente un tableau clinique variable dont les premiers signes sont généralement une intense fatigue physique, de la fièvre et une toux puis la maladie évolue en pneumonie sévère. La principale source de contamination pour la légionellose est l'inhalation de gouttelettes d'eau contaminées. Tandis que la transmission d'homme à homme de cette maladie n'avait jamais été observée, un premier cas a été rapporté en 2015 au Portugal (Borges *et al.*, 2016).

Lorsqu'un patient présente les symptômes de la légionellose, le dépistage de la bactérie est possible en recherchant les antigènes solubles, en particulier le LPS, détectable dans les urines un à deux jours après l'apparition des premiers signes cliniques (Campese *et al.*, 2015). Ce test est particulièrement sensible au séro groupe-1 de l'espèce *L. pneumophila* prédominant dans les cas cliniques (Yu *et al.*, 2002). Pour la détection d'un autre séro groupe, d'une autre espèce et l'identification de la bactérie, la culture, des tests immunologiques et des tests de biologie moléculaire peuvent être utilisés (Ginevra and Freney, 2011). La culture permet la détection et l'identification du genre bactérien basé sur des critères d'auxotrophie et d'aspects macroscopiques. De plus, elle oriente l'identification de l'espèce, en particulier, suite à l'observation de pigments ou d'autofluorescence. D'autres tests phénotypiques basés sur des anticorps spécifiques qui reconnaissent différents épitopes du LPS permettent de déterminer l'appartenance à l'espèce et aux sérogroupes au sein de ces espèces. Les tests de biologie moléculaire peuvent être utilisés sur des prélèvements cliniques ou sur des bactéries isolées suite à leur culture. Ces tests pratiqués en compléments des techniques de phénotypages permettent d'augmenter le pouvoir discriminant de l'identification et de typer les bactéries. Le séquençage de l'ARN16S et du gène *mip* (macrophage infectivity potentiator) détermine respectivement le genre et l'espèce bactérienne. Plusieurs techniques de typages existent dont le SBT (sequenb-based typing) utilisé pour son fort pouvoir discriminant et sa reproductibilité (Lück *et al.*, 2013 ; Khodr *et al.*, 2016). Le SBT est dérivé du MLST (multilocus sequentyping) et est basé sur le séquençage de sept fragments de gènes dont deux gènes de ménages *asd* (aspartate- β -semialdehyde dehydrogenase) et *neuA* (N-acetylneuraminate cytidyl transferase) et cinq gènes associés à la virulence *flaA* (flagelline du flagelle), *pilE* (piline du pilus long), *mip*, *momp* (major outer membrane protein) et *proA* (zinc metalloprotease). Un allèle est attribué

à chaque séquence, ce qui définit un ST (sequence-type). La grande majorité des cas cliniques mondiaux de légionellose recensés dans la communauté sont dus à l'espèce *L. pneumophila*, et plus particulièrement à des souches appartenant au séro groupe-1 (Yu *et al.*, 2002). Il est à noter qu'en Australie et en Nouvelle-Zélande, les espèces *L. pneumophila* et *L. longbeachae* ont une prévalence similaire et représentent entre un tiers et la moitié des cas communautaires de légionellose (Graham *et al.*, 2012). Sans qu'aucune explication ne soit connue à ce jour, le séro groupe-1 de *L. pneumophila* est prédominant dans les cas cliniques sans l'être dans l'environnement. En France, par exemple, il est responsable de 95,4% des cas cliniques de légionellose mais représente seulement 28,4% des isolats environnementaux (Doleans *et al.*, 2004).

La maladie du légionnaire est traitée par des antibiotiques allant d'une monothérapie aux macrolides jusqu'à une combinaison de fluoroquinolones et de macrolides, en fonction de la sévérité de la maladie (Phin *et al.*, 2014 ; Campèse *et al.*, 2015). Le taux de mortalité moyen associé à cette maladie est de 10%, en dépit d'une prise en charge thérapeutique précoce et adaptée et augmente en présence de facteurs de risques tels que le sexe, l'âge, le tabagisme ou l'immunodéficience (Phin *et al.*, 2014 ; Campèse *et al.*, 2015). Actuellement, aucune explication des échecs thérapeutiques n'a été rapportée mais il est possible que des facteurs génétiques humains et/ou la présence de résistances bactériennes aux antibiotiques soient impliqués (Massip *et al.*, en préparation). La légionellose reste donc un problème de santé publique et est une maladie à déclaration obligatoire en France depuis 1987 (InVS pour Institut de Veille Sanitaire). En France, environ 1 300 cas de légionellose sont recensés par an depuis une dizaine d'année malgré la mise en place de différents dispositifs de prévention (Campèse *et al.*, 2015, InVS) (**Figure 2**).

d'après l'InVS

Figure 2 : La légionellose en France

L'évolution du nombre de cas et du taux annuel d'incidence de la légionellose est suivie en France depuis 1988. Les statistiques obtenues jusqu'en 2014 sont représentées sur ce graphique.

2. Variabilité génétique

Les souches Philadelphia-1, Paris et Lens appartenant au séro groupe-1 ont été les premières dont le génome a été séquencé (Gomez-Valero et Buchrieser, 2013). Le génome de la souche Philadelphia-1, responsable de l'épidémie historique de 1976, a été séquencé en 2004 (Chien *et al.*, 2004). La souche Paris a initialement été considérée comme endémique à la région parisienne sur la base d'une analyse sur 10 ans, de 1988 à 1997, montrant qu'un tiers des cas de légionellose étaient dus à un clone de *L. pneumophila* du séro groupe-1 qui fut nommé « Paris » (Lawrence *et al.*, 1999). Cette souche a ensuite été retrouvée dans toute la France, en Europe puis au niveau mondial (Aurell *et al.*, 2003 ; Cazalet *et al.*, 2008a). La souche Lens, quant à elle, a été identifiée lors d'une épidémie s'étendant de novembre 2003 à janvier 2004 dans un périmètre incluant la ville de Lens. L'étude de cette épidémie a mis en évidence que le transport de gouttelettes d'eau contaminées dans l'atmosphère pouvait se faire sur une distance de plus de six kilomètres, ce qui n'avait encore jamais été rapporté (Nguyen *et al.*, 2006). La comparaison des génomes de la souche Paris et de la souche Lens révèle une forte variabilité génétique entre ces souches. En effet, 14% des gènes de la souche Paris ne sont pas retrouvés dans la souche Lens et réciproquement, la souche Lens présente 10% de gènes qui lui sont spécifiques (Cazalet *et al.*, 2004). A titre de comparaison, l'étude des génomes des souches de *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18 et Ty2 montre que la souche CT18 a 1,8% de gènes spécifiques et la souche Ty2 en a uniquement 0,6% (Deng *et al.*, 2003).

Le séquençage de cinq génomes supplémentaires du séro groupe-1 de l'espèce *L. pneumophila* issus de la souche clinique d'Angleterre Corby, ville aux alentours de Birmingham (Steinert *et al.*, 2007 ; Glöckner *et al.*, 2008), de la souche clinique d'Espagne Alcoy, ville aux alentours de Valence (D'Auria *et al.*, 2010), de la souche clinique des Etats-Unis 130b, isolée dans une ville de l'Ohio (Schroeder *et al.*, 2010), de la souche clinique française Lorraine (Ginevra *et al.*, 2008 ; Gomez-Valero *et al.*, 2011a) et de la souche environnementale française HL 0604 1035 (Gomez-Valero *et al.*, 2011a) a permis une étude génomique comparative. Chacune des huit souches séquencées présente un chromosome circulaire d'une taille comprise entre 3,3 et 3,6 millions de paires de bases, qui code pour environ 3 mille gènes et qui possède un pourcentage en GC (guanine-cytosine) de 38% (Gomez-Valero et Buchrieser, 2013). De plus, chacune de ces souches présente jusqu'à 11% de gènes spécifiques, ce qui confirme la diversité génétique au sein des souches du séro groupe-1 de l'espèce *L. pneumophila* (Gomez-Valero et Buchrieser, 2013) (**Figure 3**). Depuis, des études de comparaison génomique à grande échelle sur des dizaines, voire des centaines de génomes permettent de souligner à quel point les génomes de l'espèce *L. pneumophila* et du genre *Legionella* sont plastiques et dynamiques (Burstain *et al.*, 2016 ; Qin *et al.*, 2016).

d'après Gomez-Valero et Buchrieser, 2013

Figure 3 : Répartition des gènes cœurs et spécifiques au sein de différentes souches de *L. pneumophila* appartenant au séro groupe-1

Chaque pétale représente un génome avec une couleur associée. Le nombre central représente les gènes cœurs, c'est-à-dire les gènes orthologues partagés entre tous les génomes. Les nombres au sein de chaque pétale correspondent à la quantité et au pourcentage de gènes spécifiques à chaque génome.

2.1. Les éléments génétiques mobiles

La principale source de diversité au sein de l'espèce *L. pneumophila* provient des éléments génétiques mobiles, probablement acquis par différents transferts horizontaux entre des espèces de *Legionella*, des souches de *L. pneumophila* ou même avec un hôte eucaryote. Les transferts horizontaux chez les bactéries peuvent se faire par (i) l'intermédiaire de phages qui incorporent de l'ADN dans le chromosome bactérien, (ii) la conjugaison de plasmides ou de gènes chromosomiques suite à un contact direct entre des bactéries ou (iii) la transformation de l'ADN environnant. Les bactériophages ciblant *L. pneumophila* sont mal connus, néanmoins la bactérie possède des pili de conjugaison et est naturellement compétente pour la transformation (Lammertyn *et al.*, 2007 ; Grigor'ev *et al.*, 2008 ; Stone et Kwaik, 1998 ; Stone et Kwaik, 1999). De plus, la présence d'ARN (acide ribonucléique) de transfert, de gènes liés à des phages, de transposases ainsi que d'un fort pourcentage en GC sur les éléments génétiques mobiles de *L. pneumophila* suggère l'acquisition de ces derniers par transferts horizontaux. Plusieurs éléments génétiques mobiles ont été identifiés dans les génomes de différentes souches de *L. pneumophila* et quelques exemples sont présentés dans ce manuscrit.

La région *lvh* (*Legionella vir homologues*) code pour un SST4 (système de sécrétion de type IV) qui est impliqué dans la conjugaison de plasmides et dans la virulence de *L. pneumophila* (Segal *et al.*, 1999 ; Bandyopadhyay *et al.*, 2007, 2013). Le réarrangement de l'élément conjugatif et intégratif (ICE, integrative and conjugative element) codant pour le *lvh* est différent en fonction des souches de *L. pneumophila*, ce qui suggère des origines et des acquisitions indépendantes de cette région (Cazalet *et al.*, 2008a). Cet ICE peut être intégré

au génome ou être libre sous forme circulaire et cette transition semble corrélée à la phase de croissance de la bactérie. En effet, en milieu liquide l'intégration chromosomique de la région *lvh* prend place au moment de la phase exponentielle et post-exponentielle de la croissance bactérienne (Doleans-Jordheim *et al.*, 2006).

La souche Philadelphia-1 contient un îlot de pathogénicité (PAI pour pathogeny island) de 65 mille paires de bases dont certains gènes seraient impliqués dans la réponse au stress oxydatif, ainsi qu'un second SST4 (Brassinga *et al.*, 2003). Ce SST4 code, entre autre, pour des protéines homologues aux protéines Tra (transfert) associées au plasmide F (fertilité) d'*Escherichia coli*, qui seraient responsables de la synthèse et de l'assemblage du pilus F (Brassinga *et al.*, 2003). Cet îlot de pathogénicité est retrouvé dans certaines souches de *L. pneumophila* et dans l'espèce *L. anisa*, ce qui suggère que des transferts horizontaux entre différentes espèces de *Legionella* peuvent avoir lieu (Cazalet *et al.*, 2008a). De même, un plasmide de 132 mille paires de bases de la souche Paris, code notamment pour des facteurs de virulence homologues à ceux présents dans un plasmide de l'espèce *L. longbeachae*, ce qui montre un transfert horizontal récent entre les deux espèces bactériennes (Cazalet *et al.*, 2004).

2.2. Les polymorphismes nucléotidiques

Entre la souche Paris et la souche Philadelphia-1, il existe 4% de polymorphismes nucléotidiques, ce qui est élevé puisqu'en comparaison ce pourcentage n'est que de 0,4% entre des souches de *L. longbeachae* (Cazalet *et al.*, 2010). L'analyse du séquençage global (WGS, whole genome sequencing) de 53 isolats de *L. pneumophila* a mis en évidence que les polymorphismes nucléotidiques sont majoritairement présents dans le génome accessoire des souches qui représente environ la moitié du génome. En effet, les polymorphismes du génome cœur, c'est-à-dire des gènes partagés entre tous les isolats, ne représentent que 2,8% des polymorphismes totaux (Qin *et al.*, 2016). Les événements de recombinaison sont donc fréquents au sein de l'espèce *L. pneumophila* (Qin *et al.*, 2016). A titre de comparaison, le séquençage global de 85 isolats de *Streptococcus suis* a révélé que 31% des polymorphismes sont observés sur le génome cœur qui représente environ un tiers du génome bactérien (Chen *et al.*, 2013).

L'utilisation depuis 40 ans de la souche historique *L. pneumophila* Philadelphia-1 dans les laboratoires a conduit à une dérive génétique de cette souche. Il existe deux grandes lignées dérivées de la souche initiale qui sont la souche JR32 et la souche Lp02. Une étude phylogénétique a retracé l'évolution de ces deux clones et a notamment mis en avant certains polymorphismes nucléotidiques qui influencent la virulence de *L. pneumophila*. Cette étude révèle qu'il existe neuf polymorphismes nucléotidiques entre l'isolat clinique séquencé de référence Philadelphia-1 et celui qui a été à l'origine de la dérive des souches JR32 et Lp02. Cependant, certains d'entre eux pourraient être dus à une limite

des techniques de séquençage, à cause de la présence de zones de répétitions. Ces polymorphismes nucléotidiques sont présents dans les souches JR32 et Lp02 qui possèdent en plus, respectivement, sept et six polymorphismes spécifiques (Rao *et al.*, 2013) (**Figure 4**).

Rao *et al.*, 2013

Figure 4 : Phylogénie des souches de laboratoire dérivées de *L. pneumophila* Philadelphia-1

Grâce au séquençage Illumina, différentes souches de *L. pneumophila* ont été séquencées et comparées à la séquence de référence de la souche clinique Philadelphia-1. L'identification de chaque polymorphisme nucléotidique (SNP) ainsi que des insertions et des délétions (INDEL) a été utilisée pour construire cet arbre phylogénétique.

La mutation K88R observée dans le gène *rpsL* (30S ribosomal subunit protein S12) des souches JR32 et Lp02 confère à la bactérie la résistance à la streptomycine. L'étude de la réplication bactérienne dans des macrophages primaires dérivés de moelle osseuse de souris A/J, révèle que la souche Philadelphia-1 est incapable de se répliquer dans ce modèle cellulaire, contrairement à la souche Lp02 (**Figure 5**) (Zhu *et al.*, 2015 ; Zhu et Luo, 2015). La réplication bactérienne est dépendante de la mutation K88R sur le gène *rpsL* puisque l'introduction de celle-ci dans la souche Philadelphia-1 promeut la réplication bactérienne dans les macrophages (**Figure 5**). Réciproquement, l'introduction de la version sauvage du gène *rpsL* dans la souche Lp02 inhibe sa capacité répliative. De façon intéressante, la mutation K43N dans le gène *rpsL* confère également la résistance à la streptomycine mais ne permet pas la réplication bactérienne (Zhu *et al.*, 2015 ; Zhu et Luo, 2015) (**Figure 5**). Bien qu'aucun mécanisme ne soit encore défini pour expliquer ces phénotypes, ces résultats mettent en avant l'influence des polymorphismes nucléotidiques sur la virulence de différents clones de la souche *L. pneumophila* Philadelphia-1.

d'après Zhu *et al.*, 2015

Figure 5 : Réplication de différents clones de *L. pneumophila* Philadelphia dans des macrophages murins

Des macrophages dérivés de monocytes de moelle osseuse de souris A/J ont été infectés à une MOI (multiplicity of infection) de 0,05 par différents clones de *L. pneumophila* Philadelphia puis la réplication bactérienne a été mesurée à différent temps après l'infection.

2.3. Les protéines de type eucaryote ou contenant des domaines eucaryotes

L'analyse génomique comparative des souches Philadelphia-1, Paris et Lens révèle la présence d'une centaine de protéines similaires à des protéines eucaryotes ou contenant des domaines homologues à des motifs présents principalement ou uniquement chez les eucaryotes (Cazalet *et al.*, 2004 ; de Felipe *et al.*, 2005 ; Lurie-Weinberger *et al.*, 2010). La présence de ces protéines reflète la possibilité de transferts horizontaux entre la bactérie et son hôte eucaryote suite aux interactions étroites entre les deux organismes. Bien que le mécanisme d'acquisition des gènes codant ces protéines ne soit pas élucidé, la compétence naturelle de *L. pneumophila* pourrait être à l'origine de l'incorporation d'ARN eucaryote dépourvu d'introns (Gomez-Valero et Buchrieser, 2013). Les gènes codant ce type de protéines sont nombreux chez *L. pneumophila* puisqu'ils représentent environ 3,5% du génome (**Tableau 1**). D'autres bactéries intracellulaires comme *Rickettsia bellii* contiennent ces gènes, cependant leur présence n'est pas une caractéristique des bactéries intracellulaires (Cazalet *et al.*, 2008b) (**Tableau 1**).

Espèce bactérienne Taxon	<i>Legionella pneumophila</i> Paris	<i>Legionella pneumophila</i> Lens	<i>Legionella pneumophila</i> Philadelphia-1	<i>Rickettsia bellii</i>	<i>Wolbachia pipientis</i>
Bactérie	2380 (79%)	2287 (79,5%)	2345 (79,7%)	1047 (73,3%)	866 (72,5%)
Eucaryote	105 (3,5%)	99 (3,4%)	101 (3,4%)	98 (6,8%)	43 (3,5%)
Archée	15 (0,5%)	14 (0,5%)	11 (0,4%)	7 (0,5%)	4 (0,3%)
Virus	3 (0,1%)	3 (0,1%)	4 (0,1%)	30 (2%)	30 (2,5%)

<i>Espèce bactérienne</i> Taxon	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Francisella tularensis</i>	<i>Shigella flexneri</i>	<i>Salmonella Typhimurium</i>	<i>Coxiella burnetii</i>
Bactérie	2586 (90%)	1348 (84%)	4025 (96,2%)	4213 (95,2%)	1384 (68,6%)
Eucaryote	10 (0,4%)	26 (1,6%)	0 (0%)	3 (0,06%)	55 (2,7%)
Archée	5 (0,2%)	10 (0,6%)	0 (0%)	2 (0,04%)	18 (0,9%)
Virus	51 (1,8%)	6 (0,4%)	31 (0,7)	38 (0,86%)	1 (0,05%)

d'après Cazalet *et al.*, 2008b

Tableau 1 : Distribution des protéines de plusieurs espèces de bactéries intracellulaires en fonction de leur similarité avec différents taxons

La présence de protéines homologues à des protéines eucaryotes ou contenant des domaines eucaryotes suggère que la bactérie sécrète ces protéines pour interagir avec son hôte. Par conséquent, ces protéines auraient un rôle essentiel dans la virulence de *L. pneumophila*. L'analyse des génomes des souches Philadelphia-1, Paris et Lens a mis en évidence que jusqu'à 10% de ces protéines sont spécifiques à chaque souche (Lurie-Weinberger *et al.*, 2010) (**Figure 6**). En élargissant l'étude à d'autres souches du séroroupe-1, seulement 56% de ces protéines sont conservées (Gomez-Valero *et al.*, 2011a). Ces données suggèrent qu'il existe une diversité au sein de ces protéines de type eucaryote sécrétées par la bactérie. Ainsi, chaque souche, dont les souches Philadelphia-1, Paris et Lens pourraient interagir différemment avec leurs hôtes.

d'après Lurie-Weinberger *et al.*, 2010

Figure 6 : Répartition des gènes codant les protéines de type eucaryote ou à domaines eucaryotes au sein de différents génomes de *L. pneumophila* appartenant au séroroupe-1

Chaque cercle représente un génome avec une couleur associée. Le nombre central indique la quantité de gènes codant des protéines homologues à des protéines eucaryotes ou contenant des domaines eucaryotes partagés entre les génomes. Les nombres uniques à chaque cercle correspondent à ces mêmes gènes spécifiques à chaque génome et les nombres au croisement de plusieurs cercles, à ces gènes partagés par deux génomes.

3. Les systèmes de sécrétion et de translocation

La virulence de *L. pneumophila* est directement liée à sa capacité à sécréter des centaines de protéines bactériennes par différents systèmes de sécrétion. Tandis que le système de sécrétion de type I semble réservé à l'espèce *L. pneumophila* (Cazalet *et al.*, 2010), les systèmes de sécrétion de type II, IVA et IVB sont conservés au sein du genre *Legionella* (Gomez-Valero *et al.*, 2011b ; Gomez-Valero et Buchrieser, 2013). Le système de sécrétion de type V quant à lui, serait restreint à la souche Paris de l'espèce *L. pneumophila* (Cazalet *et al.*, 2004). Une fois de plus, ces observations mettent en avant la variabilité génétique au sein du genre *Legionella* et même entre différentes souches de l'espèce *L. pneumophila*.

3.1. Les systèmes de sécrétion de type I, II et V

Bien que la présence d'un SST1 (système de sécrétion de type I) fut prédite par analyse bioinformatique depuis plus de 10 ans, ce n'est que récemment que ce système de sécrétion a été fonctionnellement caractérisé (Jacobi et Heuner, 2003 ; Fuche *et al.*, 2015). Le SST1 permettrait la sécrétion de la protéine RtxA (repeats in structural toxin) qui serait son unique substrat (**Figure 7a**). Cette protéine serait impliquée dans le cycle infectieux de *L. pneumophila*, notamment au niveau de l'adhésion et de l'entrée de la bactérie dans les cellules hôtes (Fuche *et al.*, 2015).

La découverte du gène *pilD*, codant pour un des composants du SST2 (système de sécrétion de type II) a été le premier indice indiquant la présence d'un tel système chez *L. pneumophila* (Liles *et al.*, 1998, 1999). Par la suite, d'autres gènes ont été trouvés (Hales et Shuman, 1999 ; Rossier et Cianciotto, 2001 ; Rossier *et al.*, 2004) puis le séquençage complet des génomes a permis l'identification de l'ensemble des gènes nécessaires à la structure du SST2 (Cazalet *et al.*, 2004 ; Chien *et al.*, 2004 ; Glöckner *et al.*, 2008 ; D'Auria *et al.*, 2010 ; Schroeder *et al.*, 2010). Le SST2 sécrète des protéines bactériennes du périplasme à l'extérieur de la bactérie (**Figure 7b**), ce qui suggère la présence de systèmes additionnels qui permettent la traversée des protéines du cytosol de la bactérie jusqu'au périplasme. Il existe le système Sec (secretion) qui permet le passage de protéines non repliées et le système Tat (twin-arginine translocation) qui exporte des protéines conformées (Berks *et al.*, 2003 ; de Keyser *et al.*, 2003). *L. pneumophila* possède trois systèmes : un système Sec qui couple la traduction et l'exportation de protéines en simultané, un autre système Sec qui permet le passage de protéines déjà traduites et un système Tat (Cazalet *et al.*, 2004 ; Chien *et al.*, 2004 ; De Buck *et al.*, 2004 ; Lammertyn et Anné, 2004 ; Rossier et Cianciotto, 2005 ; Geukens *et al.*, 2006) (**Figure 7b**). Le SST2 sécrète moins d'une trentaine de protéines bactériennes qui seraient impliquées dans la réplication de la bactérie au sein de certaines amibes, macrophages et cellules épithéliales humaines (Cianciotto, 2013).

L'analyse du génome de la souche Paris révèle la présence d'un SST5 (système de sécrétion de type V) putatif. Cet auto-transporteur ne semble pas conservé dans les autres souches de *L. pneumophila* et permettrait à la souche Paris une meilleure adhérence aux cellules de mammifères et/ou une meilleure agrégation lors de la formation de biofilms (Cazalet *et al.*, 2004).

3.2. Les systèmes de sécrétion de type IV

L. pneumophila possède deux SST4 (systèmes de sécrétion de type IV), le SST4A aussi appelé Lvh (**Figure 7c**), et le SST4B également nommé Dot/Icm (defective in organelle traficking/intracellular multiplication) (**Figure 7d**). Le SST4A est homologue au système Vir (virulence) de conjugaison de plasmide identifié chez *Agrobacterium tumefaciens*. Ce système est composé de 11 protéines homologues sur les 12 qui forment le complexe chez *A. tumefaciens* (Segal *et al.*, 1999). Le SST4A est important pour la conjugaison de plasmide (Segal *et al.*, 1999) (**Figure 7c**) et aurait un rôle dans la virulence de la bactérie, en particulier en agissant en collaboration avec le SST4 Dot/Icm (Bandyopadhyay *et al.*, 2007, 2013).

Les gènes codant le SST4 Dot/Icm ont tout d'abord été identifiés suite à l'analyse de différents mutants bactériens. Deux types de mutants ont été isolés, d'une part les mutants incapables de se répliquer et qui n'induisent pas la mort du macrophage (*icm*, intracellular multiplication) et d'autre part, ceux qui ne détournent pas la voie de dégradation endocytaire (*dot*, defective for organelle trafficking) (Segal *et al.*, 1998 ; Vogel *et al.*, 1998). Parmi les 26 protéines qui forment le SST4 Dot/Icm, 20 sont homologues aux protéines formant le système de transfert des plasmides de type IncI (incompatibilité) (Sexton et Vogel, 2002). Bien que quelques données de structure soient disponibles, l'organisation du SST4 Dot/Icm n'est pas complètement élucidée (Kubori et Nagai, 2016). Néanmoins, il est connu que ce système de sécrétion permet le transfert de plasmides et de protéines bactériennes, nommées effecteurs (Vogel *et al.*, 1998 ; Nagai *et al.*, 2002) (**Figure 7d**). Il est à noter que le mutant bactérien délété du gène *dotA* présente un SST4 Dot/Icm non fonctionnel bien que la fonction de cette protéine ne soit pas identifiée. Ce mutant est incapable de se multiplier au sein des cellules hôtes et est classiquement utilisé comme témoin d'avirulence pour étudier le cycle intracellulaire de *L. pneumophila* (Berger *et al.*, 1994 ; Roy et Isberg, 1997).

Le SST4 Dot/Icm est essentiel à la multiplication intracellulaire de *L. pneumophila* et est le plus important appareil de sécrétion de la bactérie. En effet, jusqu'à 300 effecteurs peuvent être sécrétés par ce système de sécrétion dont environ 70 sont caractérisés à ce jour. Ce répertoire d'effecteurs est large et divers puisque seulement 7 effecteurs sur les 300 sont conservés au sein du genre *Legionella* (Burstein *et al.*, 2016). D'autre part, la redondance fonctionnelle et génétique du répertoire d'effecteurs permet probablement à *L. pneumophila* de se répliquer dans divers hôtes protozoaires de l'environnement et il est

possible que chaque paralogue soit spécifique à un hôte particulier (Luo and Isberg, 2004 ; Lau et Ashbolt, 2009 ; O'Connor et al., 2011 ; Dupuy et al., 2016). Plusieurs stratégies ont été adoptées afin d'identifier les effecteurs putatifs sécrétés par le SST4 Dot/Icm. La recherche par analyse bioinformatique de protéines de type eucaryote au sein des génomes de la souche Philadelphia-1, Paris et Lens a mis en évidence de nombreux effecteurs putatifs (Cazalet et al., 2004 ; Chien et al., 2004 ; de Felipe et al., 2005 ; Brüggemann et al., 2006a ; Pan et al., 2008a). Comme précédemment évoqué, ces protéines sont probablement sécrétées par la bactérie afin d'interagir avec son hôte. Par ailleurs, l'identification de séquences de fixation d'éléments régulateurs tels que PmrA (pneumococcal multidrug resistance protein) ou CpxR (conjugative plasmid expression) en amont des gènes codant les effecteurs a servi de base à de nombreuses autres études bioinformatiques (Zusman et al., 2007 ; Altman et Segal, 2008 ; Zusman et al., 2008). La recherche d'une séquence signal au sein des effecteurs est également une stratégie, même si aucune séquence consensus n'est établie (Nagai et al., 2005 ; Burstein et al., 2009 ; Huang et al., 2011 ; Lifshitz et al., 2013). De façon plus expérimentale, une étude a été réalisée sur la sécrétion de tous les produits des cadres ouverts de lecture (ORF, open reading frame) de plus de 300 paires de bases. Pour ce faire, les auteurs ont fusionné chacune de ces ORF au gène codant la β -lactamase sans peptide signal. Si l'effecteur est sécrété dans le cytosol de la cellule hôte, la β -lactamase va hydrolyser un composé fluorescent puis induire l'émission d'une fluorescence spécifique (Zhu et al., 2011a). Cette technique est classiquement utilisée pour vérifier la sécrétion des effecteurs par le SST4 Dot/Icm. En parallèle, il a été montré que certains effecteurs ont besoin de protéines chaperonnes, telles que les complexes IcmS/IcmW ou IcmS/LvgA (Legionella yirulence gene) pour être sécrétés dans la cellule hôte (Vincent et Vogel, 2006 ; Coers et al., 2000 ; Sutherland et al., 2012). Cela permettrait de contrôler temporellement la sortie des effecteurs connus pour être synthétisés par la bactérie et disponibles dès le contact avec la cellule hôte (Charpentier et al., 2009). Ces couples de chaperonnes faciliteraient la sécrétion des effecteurs en interagissant avec des protéines inhibitrices complexées aux effecteurs (Cambronne et Roy, 2007).

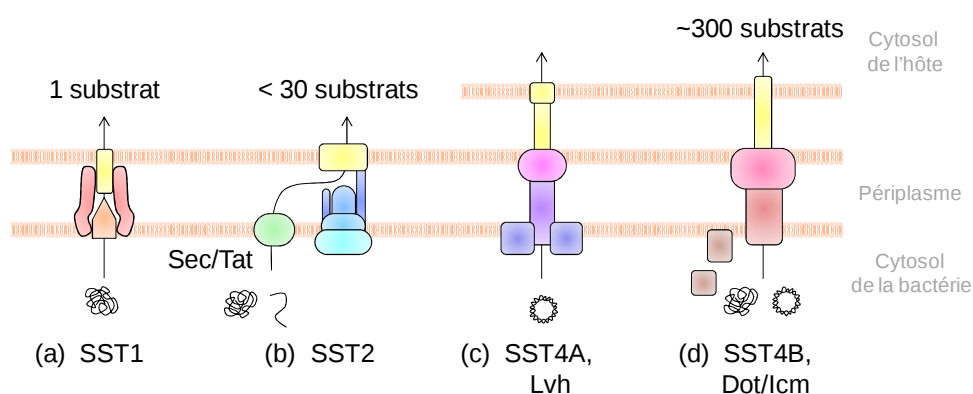


Figure 7 : Les systèmes de sécrétion chez *L. pneumophila*

Représentation schématique des différents systèmes de sécrétion présents chez *L. pneumophila*. **(a)** Le SST1 permettrait la sécrétion d'une seule protéine, RtxA. **(b)** Le SST2 en collaboration avec les systèmes d'exportation Sec/Tat est responsable de la sécrétion d'une petite trentaine de protéines bactériennes. **(c)** Le SST4A Lvh permet la conjugaison de plasmide tandis que **(d)** le SST4B Dot/Icm permet la sécrétion d'environ 300 protéines bactériennes en plus de la conjugaison de plasmides.

4. Cycle de vie intracellulaire

Les protozoaires, en particulier les amibes sont l'hôte et le réservoir naturel de *L. pneumophila* qui ne se multiplie pas dans l'eau sous sa forme planctonique (Rowbotham, 1980 ; Wadowsky *et al.*, 1988 ; Lau et Ashbolt, 2009 ; Dupuy *et al.*, 2016). La conservation de nombreuses voies cellulaires entre les amibes et les macrophages humains explique la capacité de cette bactérie à infecter l'homme de façon accidentelle (Gao *et al.*, 1997). Lors d'une infection humaine, la bactérie est retrouvée dans les poumons à la fois au sein de vacuoles dans des macrophages alvéolaires et dans le milieu extracellulaire proche de macrophages lysés (Chandler *et al.*, 1979a). Le réservoir primaire de l'infection humaine serait les macrophages alvéolaires et les neutrophiles (Copenhaver *et al.*, 2014). Les cellules alvéolaires épithéliales, qui sont le principal type cellulaire de l'épithélium respiratoire, seraient un réservoir secondaire qui permettrait notamment à la bactérie d'échapper au système immunitaire (Mody *et al.*, 1993).

L'infection débute par l'adhésion et l'entrée de la bactérie dans la cellule hôte au sein d'une vacuole (Horwitz, 1983a, 1984) (**Figure 8a**). Très rapidement, dès quinze minutes après l'internalisation, la majorité des vacuoles contenant la bactérie (LCV, *Legionella*-containing vacuole) interagissent avec des vésicules dérivées du RE (réticulum endoplasmique) qui les entourent et fusionnent avec elles (**Figure 8b**). Après une heure d'infection, les LCV interagissent non seulement avec le RE mais également avec une ou plusieurs mitochondries. Tandis que la moitié des LCV sont localisées entre la membrane plasmique et le noyau de la cellule hôte, l'autre moitié se retrouve dans une invagination du noyau (Horwitz, 1983a) (**Figure 8c**). Ensuite, les LCV localisent de moins en moins avec le RE ou les mitochondries et la plupart d'entre elles sont associées avec des vésicules issues du RE rugueux, présentant des ribosomes à leur surface (Horwitz, 1983a) (**Figure 8d**). Après huit heures d'infection, les LCV ont des ribosomes à leur surface puis les bactéries se répliquent jusqu'à la consommation des nutriments puis sortent de la cellule hôte (Horwitz et Silverstein, 1980 ; Horwitz, 1983a ; Rechnitzer *et al.*, 1992) (**Figure 8e**).

Chacune de ces phases sont maintenant détaillées ainsi que certaines protéines sécrétées par la bactérie, en particulier l'ensemble de celles sécrétées par SST4 Dot/Icm qui ont une fonction connue à ce jour. Pour plus de commodité, les protéines évoquées dans cette partie sont considérées comme des effecteurs sécrétés par le SST4 Dot/Icm de *L. pneumophila*, sauf si un autre mode de sécrétion est spécifiquement mentionné.

d'après Horwitz et Silverstein, 1980 ; Horwitz, 1983 ; Horwitz, 1984 ; Rehnitz et al., 1992

Figure 8 : Cycle de vie intracellulaire de *L. pneumophila*

Dessin représentatif du cycle intracellulaire de *L. pneumophila* au sein d'une cellule hôte. Chaque étape est agrémentée d'un cliché de microscopie électronique à transmission. (a) Une fois entrée dans la cellule hôte, la bactérie réside dans une vacuole qui interagit (b) avec des vésicules dérivées du RE, (c) des mitochondries puis (d) du RE rugueux. (e) Une fois la LCV mature, la bactérie se réplique.

4.1. Adhésion à la cellule hôte

L. pneumophila est équipée d'un flagelle qui lui permet de se mouvoir dans l'environnement jusqu'à la rencontre avec une cellule hôte qu'elle peut infecter (Thomason et al., 1979). Les récepteurs cellulaires aux molécules du complément C1 et C3 ont été les premiers décrits comme impliqués dans la phagocytose de *L. pneumophila* par des monocytes primaires (Payne et Horwitz, 1987). La protéine de surface bactérienne Momp, sécrétée par la bactérie grâce à un mécanisme non identifié, lie les molécules du complément C1 et C3, ce qui facilite l'entrée de la bactérie dans ces cellules (Bellinger-Kawahara et Horwitz, 1990 ; Mintz et al., 1995 ; Krinos et al., 1999) (**Figure 9**). Une autre protéine de surface, Lcl (*Legionella* collagen-like protein) est sécrétée par le SST2 de *L. pneumophila* et interagit avec le récepteur du complément C1q. Cela favorise l'entrée de la bactérie dans des macrophages dérivés de monocytes (U937) et dans des pneumocytes (A549) (Vandersmissen et al., 2010) (**Figure 9**). De façon plus générale, cette protéine est une adhésine qui lie les GAG (glycosaminoglycanes sulfatés) présents sur toutes les cellules de mammifères nucléées et a en plus un rôle dans l'entrée de la bactérie dans les amibes *Acanthamoeba castellanii* et *Hartmannella vermiformis* (Duncan et al., 2011 ; Abdel-Nour et al., 2014) (**Figure 9**).

L'identification des loci *enh1* et *enh2* (enhance entry) a mis en évidence la protéine RtxA (repeat in toxin) présente dans le locus *enh1* et la protéine EnhC présente dans le locus *enh2*. Ces deux protéines seraient impliquées dans l'adhésion bactérienne à des cellules épithéliales du larynx (Hep-2, human epithelial cell line type 2) ainsi qu'à des macrophages dérivés de monocytes (THP-1) (Cirillo *et al.*, 2000). La protéine RtxA serait sécrétée par le SST1 de *L. pneumophila* et a plusieurs fonctions (Fuche *et al.*, 2015). Cette protéine forme des pores, ce qui est cytotoxique pour des monocytes et est impliquée dans la virulence de la bactérie dans un modèle d'infection de souris A/J (Cirillo *et al.*, 2001, 2002). Concernant l'adhésion, il est connu que la protéine RtxA d'autres genres bactériens lie des récepteurs de type intégrine $\beta 2$. Les récepteurs du complément aux molécules C1 et C3 étant des intégrines $\beta 2$, cette protéine pourrait faciliter l'adhésion de la bactérie en liant ces récepteurs (Cirillo *et al.*, 2000, 2001, 2002) (**Figure 9**). EnhC est une protéine à domaines eucaryotes répétés SEL-1 (suppressor of *C. elegans* lin-12) dont la cible cellulaire pour l'adhésion bactérienne n'a pas encore été découverte (Cirillo *et al.*, 2000) (**Figure 9**). LpnE (*L. pneumophila* entry) est une autre protéine à domaines SEL-1 importante pour l'adhésion de la bactérie aux macrophages dérivés de monocytes (THP-1) et aux pneumocytes (A549) (Newton *et al.*, 2007) (**Figure 9**). Il est à noter que le mode de sécrétion de ces deux protéines à domaines eucaryotes reste à être identifié (Newton *et al.*, 2007).

D'autres protéines bactériennes dont les cibles cellulaires ne sont pas identifiées sont impliquées dans l'adhésion de *L. pneumophila*. L'étude des pili de type IV a révélé que le pilus long de 0,8 à 1,5 μ m a un rôle dans l'adhésion de la bactérie à des cellules épithéliales (HeLa, Henrietta Lacks), des macrophages dérivés de monocytes (U937) et des amibes *Acanthamoeba polyphaga* (Stone et Kwaik, 1998) (**Figure 9**). L'effecteur LadC (*L. pneumophila* adenylate cyclase) dont le mode de sécrétion n'est pas identifié, permet l'adhésion de la bactérie à des macrophages dérivés de monocytes (THP-1) (Newton *et al.*, 2008) (**Figure 9**). Finalement, l'intégrine LaiA (*L. pneumophila* adhesion molecule homologous with integrin analogue of *S. cerevisiae*), également appelée SdeA (substrate of the Dot/Icm system), est sécrétée par le SST4 Dot/Icm et est présente à la surface de la bactérie. Cette protéine favorise l'adhésion et l'invasion des pneumocytes (A549) (Chang *et al.*, 2005) (**Figure 9**). La chaperonne bactérienne Hsp60 (60-kDa heat shock protein), également nommée HtpB (high temperature protein), est aussi sécrétée par le SST4 Dot/Icm et se localise à la surface de la bactérie (Chong *et al.*, 2006). Cette chaperonne a plusieurs fonctions (cf. 1.4.4.a.) et favorise notamment l'adhésion de la bactérie à des cellules épithéliales (HeLa) (Garduño *et al.*, 1998) (**Figure 9**). De plus, comme cela a été décrit pour plusieurs chaperonnes, Hsp60/HtpB aurait une fonction immuno-modulatrice suite à son interaction avec des récepteurs cellulaires (Retzlaff *et al.*, 1996 ; Henderson, 2010). Il n'est pas à exclure que dès que la bactérie et la cellule hôte entrent en contact, LaiA/SdeA et Hsp60/HtpB soit sécrétées à l'intérieur de la cellule hôte et favorisent l'internalisation de la

bactérie. A titre d'exemple, la chaperonne Hsp60/HtpB semble manipuler les filaments d'actines grâce à son interaction avec la protéine cellulaire MERLIN (moesin-ezrin-radixin-like protein) qui ancre les filaments d'actine à la membrane plasmique (Chong *et al.*, 2009 ; Garduño *et al.*, 2011 ; Nasrallah, 2015). Ainsi, dès le contact entre la bactérie et l'hôte, cette protéine pourrait être sécrétée dans le cytosol de la cellule et moduler l'actine afin d'induire l'internalisation de la bactérie.

Bien que de nombreuses protéines soient identifiées pour leur rôle dans l'adhésion et l'internalisation de la bactérie dans les cellules hôtes, ce mécanisme reste largement non élucidé. Il est à noter que certaines de ces protéines ne sont pas conservées au sein des espèces non-*pneumophila*, ce qui expliquerait en partie la différence de virulence observée entre les espèces de *Legionella* (Stone et Kwaik, 1998 ; Cirillo *et al.*, 2002 ; Chang *et al.*, 2005 ; Newton *et al.*, 2007 ; D'Auria *et al.*, 2008 ; Duncan *et al.*, 2011 ; Gomez-Valero *et al.*, 2011b).

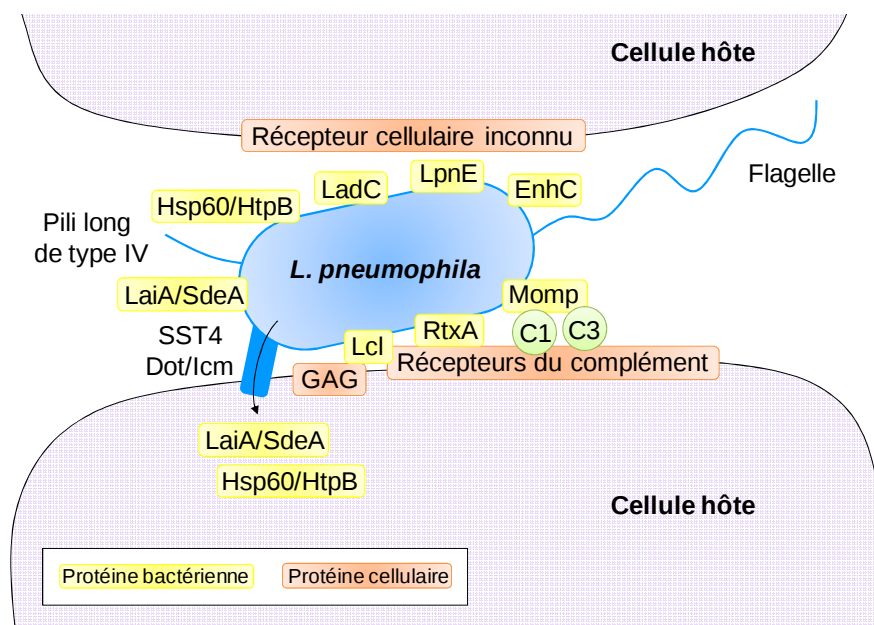


Figure 9 : Protéines de *L. pneumophila* impliquées dans l'adhésion de la bactérie aux cellules hôtes

L. pneumophila sécrète différentes protéines qui permettent l'adhésion puis l'internalisation de la bactérie. La protéine Momp lie les molécules C1 et C3 du complément qui se fixent sur les récepteurs cellulaires du complément. RtxA et Lcl lieraient également ces récepteurs. De plus, Lcl est capable de lier les GAG présents à la surface de cellules de mammifères nucléées. EnhC, LpnE, LadC, Hsp60/HtpB, le pilus long et LaiA/SdeA sont d'autres acteurs de l'adhésion bactérienne pour lesquels les cibles cellulaires restent inconnues.

4.2. Mode d'entrée

Une fois que la bactérie adhère à son hôte, une communication s'établit entre les deux organismes par la transduction de signaux qui aboutissent à la phagocytose. Suite à l'adhésion de *L. pneumophila*, une tyrosine kinase cellulaire ainsi que la PKC (protéine

kinase) sont activées, ce qui induit la phosphorylation de différents substrats conduisant au remodelage du cytosquelette d'actine. Ce mécanisme ne serait pas spécifique à *L. pneumophila* puisqu'il est également déclenché au cours de la phagocytose d'*Escherichia coli* (Coxon *et al.*, 1998). Néanmoins, l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques suggère que l'actine cellulaire est essentielle à l'internalisation de la bactérie dans des macrophages dérivés de monocytes (HL-60, U937) (Hilbi *et al.*, 2001 ; Hayashi *et al.*, 2008). De plus, l'actine et la coronine, une protéine liant l'actine, sont relocalisées au niveau du site d'adhésion de la bactérie (Hayashi *et al.*, 2008). Même si les signaux impliqués dans l'entrée de *L. pneumophila* au sein des cellules hôtes ne sont pas clairement élucidés, plusieurs modes d'entrée ont été identifiés.

Il a tout d'abord été observé que la souche *L. pneumophila* Philadelphia-1 est internalisée par un pseudopode en spirale (Horwitz, 1984 ; Rechnitzer et Blom, 1989) (**Figure 10a**). Ce mécanisme semble indépendant de la virulence bactérienne mais dépendant d'un élément présent à la surface de la bactérie (Horwitz, 1984). En effet, les bactéries mortes sont également internalisées par un pseudopode en spirale tandis que les bactéries incubées dans du sérum, contenant du complément et des anticorps spécifiques, sont phagocytées classiquement, c'est-à-dire entre deux pseudopodes (**Figure 10b**). Le mode d'entrée diffère en fonction de l'espèce de *Legionella* et de la souche de *L. pneumophila* puisque contrairement à *L. pneumophila* Philadelphia-1, l'espèce *L. micdadei* et la souche *L. pneumophila* Knoxville-1 sont phagocytées par deux pseudopodes (Rechnitzer et Blom, 1989). Par la suite, il a été mis en évidence que le mode de culture de la bactérie influence également le type d'entrée. Lorsque la souche *L. pneumophila* 130b est cultivée sur un milieu gélosé, la moitié des bactéries sont phagocytées par un pseudopode à spirale et l'autre moitié par deux pseudopodes (Cirillo *et al.*, 1999). Le traitement de cette souche avec du complément favorise la phagocytose classique, tandis que la phagocytose des bactéries développées au contact d'amibes se fait préférentiellement par un pseudopode en spirale (Cirillo *et al.*, 1999). Par ailleurs, *L. pneumophila* utilise la macropinocytose pour entrer dans des macrophages dérivés de souris A/J et des amibes *Dictyostelium discoideum*. (Watarai *et al.*, 2001 ; Peracino *et al.*, 2010) (**Figure 10c**). Ce mode d'entrée est classiquement utilisé par les bactéries pathogènes, c'est notamment le type d'internalisation de *S. Typhimurium* dans des cellules épithéliales (Francis *et al.*, 1993 ; Lim et Gleeson, 2011).

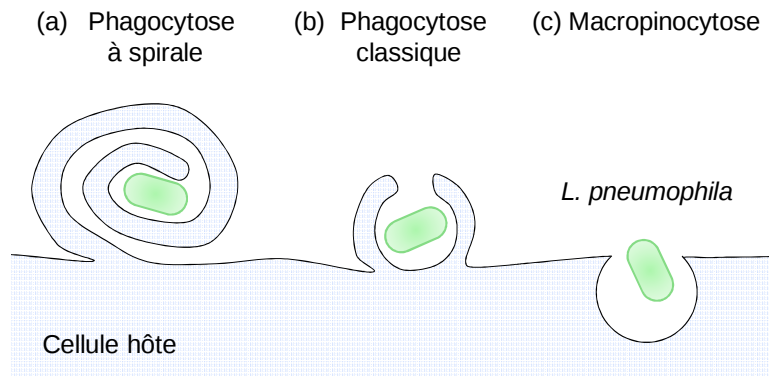


Figure 10 : Modes d'entrée de *L. pneumophila* dans les cellules hôtes

En fonction du mode de culture, de la souche de *L. pneumophila* et de l'espèce de *Legionella*, la bactérie peut entrer dans les cellules hôtes par (a) phagocytose à spirale, (b) phagocytose classique ou (c) macropinocytose.

4.3. Biogenèse d'une vacuole favorable à la réplication bactérienne

Une fois internalisée dans la cellule hôte, une bactérie réside dans une vacuole qui est normalement orientée vers la voie de dégradation endocytique. Cette vacuole interagit et fusionne avec des endosomes précoces, tardifs puis des lysosomes, ce qui conduit à l'acidification de la vacuole et au déversement d'enzymes qui détruisent l'agent pathogène internalisé (Flannagan *et al.*, 2009) (**Figure 11**). *L. pneumophila* a développé des mécanismes, en particulier environ 300 effecteurs sécrétés par son SST4 Dot/Icm qui interagissent avec différentes voies cellulaires afin de modifier la vacuole. La formation d'une LCV permet à *L. pneumophila* d'échapper à la dégradation endocytique et de se répliquer activement dans les cellules hôtes.

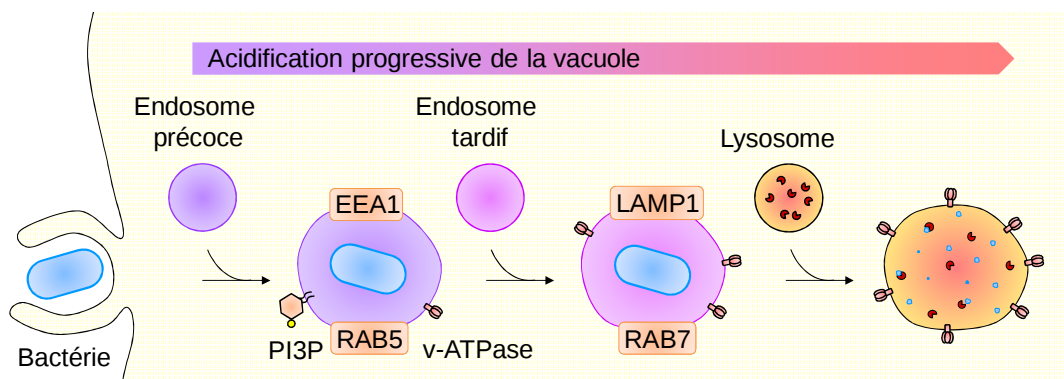


Figure 11 : La voie de dégradation endocytique

Lorsqu'une bactérie entre dans une cellule hôte, elle se retrouve dans une vacuole qui suit la voie de dégradation endocytique. Cette vacuole fusionne avec des endosomes précoces et acquiert différents marqueurs tels que les protéines EEA1 (early endosome antigen), RAB5 (RAS (rat sarcoma) analogue in brain) et le lipide PI3P (phosphatidylinositol 3 phosphate). Ensuite, la vacuole fusionne avec des endosomes tardifs, permettant le recrutement de LAMP1 (lysosome associated membrane protein 1) et RAB7 à sa surface. Enfin, la vacuole fusionne avec les lysosomes, ce qui conduit à la dégradation de la bactérie internalisée. L'acquisition progressive de la v-ATPase (vacuolar adenosine triphosphase) permet une acidification graduelle de la vacuole, qui participe également à la dégradation de la bactérie.

4.3.a. Modulation de la composition lipidique de la LCV

Les différents compartiments cellulaires sont définis par leur composition en lipides, notamment en phosphoinositides, et en protéines, en particulier en petites GTPases (guanosine triphosphatases) (De Matteis et Godi, 2004 ; Behnia et Munro, 2005). Les phosphoinositides sont des dérivés du PI (phosphatidylinositol) qui peuvent être phosphorylés ou déphosphorylés en différentes positions, grâce à des kinases ou phosphatases cellulaires (De Matteis et Godi, 2004) (**Figure 12a**). Les petites GTPases sont des interrupteurs moléculaires dont les deux familles principales sont les GTPases RAB (RAS (rat sarcoma) analogue in brain) et ARF (ADP (adénosine diphosphate)-ribosylation factor). Ces protéines sont modulées par différentes protéines à activité GDI (guanosine dissociation inhibitor), GDF (GDI dissociation factor), GEF (guanine nucleotide exchange factor) et GAP (GTPase-activating protein) (Behnia et Munro, 2005) (**Figure 12b**). L'ensemble de ces mécanismes participe à la dynamique du trafic vésiculaire. Ainsi, les premières étapes essentielles pour la formation de la LCV sont la modulation de la composition lipidique et le recrutement de protéines spécifiques à sa surface.

Suite à l'entrée de *L. pneumophila* dans la cellule hôte, en particulier dans l'amibe *Dictyostelium discoideum*, la LCV est enrichie en PI(4,5)P₂ (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate) et PI(3,4,5)P₃ (phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate) recrutés lors de la phagocytose et en PI4P (phosphatidylinositol-4-phosphate) présent dans la membrane plasmique (De Matteis et Godi, 2004 ; Behnia et Munro, 2005 ; Flannagan *et al.*, 2009). Ensuite, le PI(3,4,5)P₃ et le PI4P sont rapidement modifiés en PI3P (phosphatidylinositol 3 phosphate), le marqueur lipidique des phagosomes et macropinosomes impliqué dans le commencement de la voie de dégradation endocytyque (Behnia et Munro, 2005 ; Flannagan *et al.*, 2009 ; Weber *et al.*, 2014a) (**Figure 11**). Un mutant bactérien dépourvu du gène *icmT*, c'est-à-dire sans SST4 Dot/Icm fonctionnel, n'est pas capable de contrecarrer l'accumulation de PI3P sur la LCV et la dégradation par la voie endocytyque. Au contraire, dans le cas d'une souche sauvage de *L. pneumophila*, des effecteurs limitent l'accumulation de PI3P qui sera transitoire au profit de l'acquisition de PI4P, un lipide principalement retrouvé sur le Golgi et le RE. L'accumulation de PI4P permet à la bactérie de recruter et de fusionner avec des vésicules du RE afin d'échapper à la voie de dégradation endocytyque et d'agrandir sa vacuole (Weber *et al.*, 2014a).

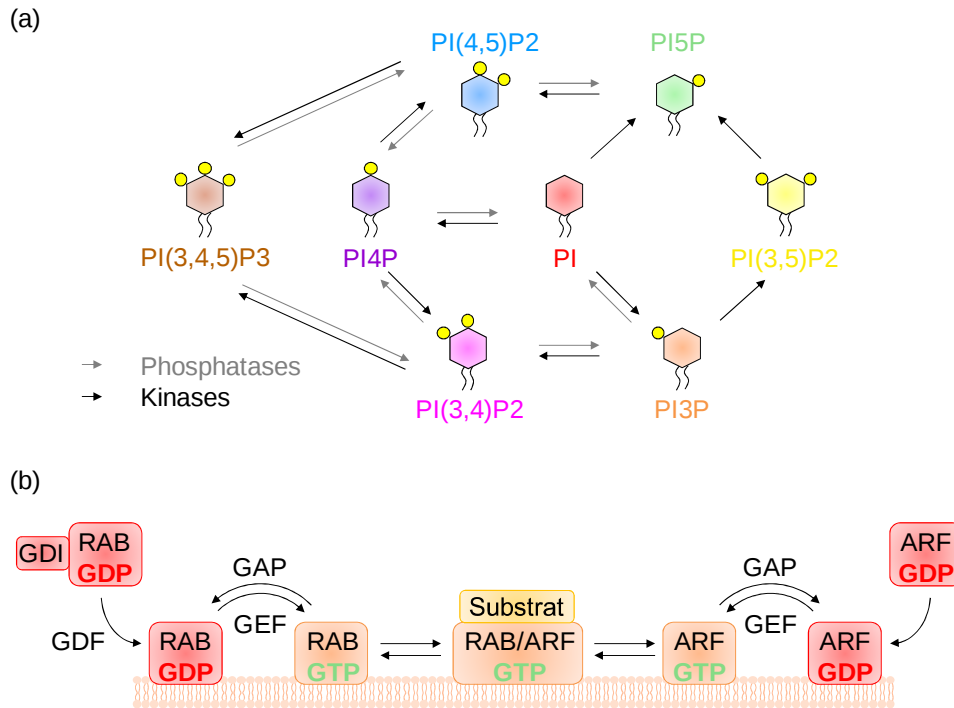


Figure 12 : Les phosphoinositides et les petites GTPases RAB et ARF

(a) Les phosphoinositides sont des dérivés phosphorylés du PI. Ils sont composés de deux acides gras, reliés à un groupement phosphate grâce à un glycérol. Cet acide phosphatidique est lié à un inositol qui peut être phosphorylé en différentes positions par des kinases ou phosphatases cellulaires. **(b)** Les GTPases RAB sont complexées dans le cytosol avec le GDI. Le GDF libère les GTPases RAB qui s'ancrent dans la membrane. Les GEF activent l'échange du GDP en GTP ce qui permet aux GTPases RAB de se lier à leur substrat. Les GAP mettent fin à ce processus en induisant l'hydrolyse du GTP, puis les GTPases RAB se retrouvent complexées au GDI dans le cytosol. L'hélice amphipatique des GTPases ARF est repliée dans une poche hydrophobe dans le cytosol. Cette hélice peut s'ancrer dans la membrane où les GEF activent et les GAP désactivent les GTPases ARF.

SidF (substrate of *Icm/Dot* transporter) et SidP ont été les premiers effecteurs de *L. pneumophila* connus pour métaboliser directement les phosphoinositides. SidF est ancré à la LCV grâce à des domaines transmembranaires et déphosphoryle le PI(3,4)P₂ et le PI(3,4,5)P₃ en PI4P et PI(4,5)P₂, ce qui participe à l'accumulation de PI4P à la surface de la LCV (Hsu *et al.*, 2012) (**Figure 13**). SidP, quant à lui, limiterait l'accumulation de PI3P à la surface de la LCV en induisant sa déphosphorylation (Toulabi *et al.*, 2013) (**Figure 13**). Bien que LppA (*L. pneumophila* phytase) soit capable d'hydrolyser le PI(3,4)P₂ et le PI(4,5)P₂ en PI4P *in vitro*, l'étude d'un mutant déficient pour le gène *lppA* a révélé que la quantité de PI4P à la surface de la LCV est identique par rapport à une infection avec une souche sauvage (Weber *et al.*, 2014b). Cet effecteur a également une activité phytase (phytate phosphatase), c'est-à-dire la capacité à hydrolyser et inactiver le phytate (Weber *et al.*, 2014b). Cela permettrait à la bactérie de récupérer des micronutriments chélatés par le phytate, en particulier du fer essentiel à la réplication bactérienne (Reeves *et al.*, 1981 ; Weber *et al.*, 2014b).

Certains effecteurs sécrétés par *L. pneumophila* recrutent des enzymes cellulaires qui modulent la composition lipidique de la LCV. L'effecteur LpnE est sécrété par la bactérie grâce à un mécanisme encore non élucidé (Newton *et al.*, 2007). Cet effecteur lie le PI3P qui s'accumule transitoirement sur la LCV ainsi qu'OCRL1 (oculocerebrorenal syndrome of Lowe), une phosphatase cellulaire qui déphosphoryle le PI(4,5)P₂ en PI4P (Weber *et al.*, 2009) (**Figure 13**). RalF (recruitment of ARF to the *Legionella* phagosome), le premier effecteur identifié comme sécrété par le SST4 Dot/Icm de *L. pneumophila* est ancré à la LCV grâce à un groupe d'acides aminés aromatiques (Nagai *et al.*, 2002 ; Folly-Klan *et al.*, 2013). Cet effecteur recrute et active la petite GTPase ARF1 grâce à une activité GEF (Nagai *et al.*, 2002 ; Folly-Klan *et al.*, 2013). ARF1 est normalement localisée au niveau du Golgi où elle recrute la PI4KIIIβ (phosphatidylinositol 4-kinase), ce qui conduit à la formation de PI4P à partir de PI (Godi *et al.*, 1999 ; Behnia et Munro, 2005). Ainsi, il est probable que l'interaction entre RalF et ARF1 participe à l'accumulation de PI4P à la surface de la LCV (**Figure 13**). D'autre part, la PI4KIIIβ serait également activée par l'action combinée des effecteurs LpdA (lipoamide dehydrogenase) et LecE (lethal effect on yeast growth). La bactérie exploite la palmitoylation de la cellule hôte pour ancrer la phospholipase LpdA à la surface de la LCV (Schroeder *et al.*, 2015). Cet effecteur hydrolyse la phosphatidylcholine en acide phosphatidique puis LecE, en interagissant probablement avec une phosphatase cellulaire, convertit l'acide phosphatidique en DAG (diacylglycérol) (**Figure 13**). La production de DAG induit le recrutement de la PKC qui active la PKD qui interagit à son tour avec la PI4KIIIβ (Viner *et al.*, 2012) (**Figure 13**). Bien que le rôle de l'effecteur PlcC (phospholipase C), également appelé CegC1 (coregulated with the effector encoding genes), ne soit pas élucidé, cette phospholipase peut produire du DAG à partir de différents substrats (Aurass *et al.*, 2013). Il est donc possible que cet effecteur participe à l'accumulation de PI4P à la surface de la LCV par la production de DAG (**Figure 13**). PlcA et PlcB sont deux phospholipases sécrétées par le SST2 homologues à PlcC (Aurass *et al.*, 2013). Comme PlcC, ces deux effecteurs pourraient favoriser la production de PI4P à la LCV. Par ailleurs, la PI4KIIIα cellulaire facilite également l'enrichissement de la LCV en PI4P (Hubber *et al.*, 2014) (**Figure 13**).

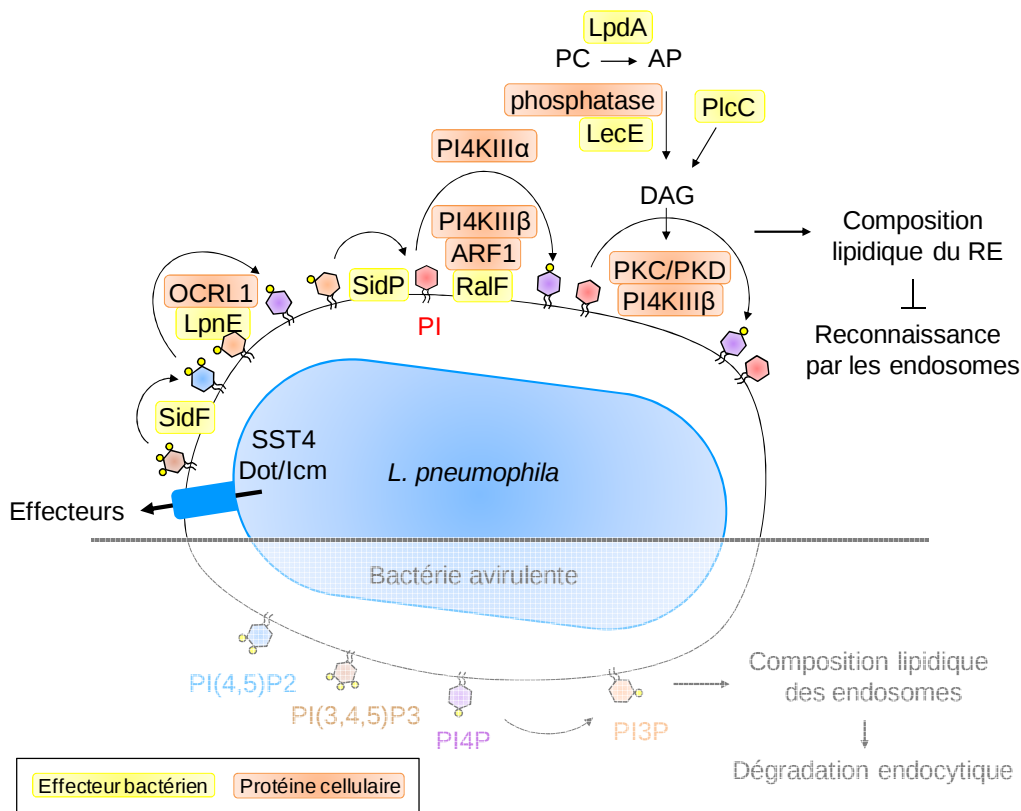


Figure 13 : Remodelage des phosphoinositides à la surface de la LCV

Dès l'entrée de la bactérie dans la cellule hôte, *L. pneumophila* sécrète des effecteurs par son SST4 Dot/Icm qui participent à remodeler la composition lipidique de la LCV. Le PI(3,4,5)P3 présent sur la LCV suite à l'internalisation de la bactérie est déphosphorylé par l'effecteur SidF en PI(4,5)P2, lui-même déphosphorylé en PI4P par la phosphatase cellulaire OCRL1, recrutée par LpnE ancré à la LCV grâce à du PI3P. Par ailleurs, le PI3P accumulé de façon transitoire sur la LCV est déphosphorylé en PI par l'effecteur SidP, puis phosphorylé en PI4P grâce à l'effecteur RalF et aux protéines cellulaires ARF1 et PI4KIIIα et/ou β. L'effecteur LpdA produit de l'AP (acide phosphatidique) à partir de PC (phosphatidylcholine) qui est hydrolysé en DAG par une phosphatase cellulaire activée par l'effecteur LecE. L'effecteur PlcC conduit également à la production de DAG. Le DAG est ensuite transformé en PI4P par les kinases cellulaires PI4KIIIα et/ou β.

4.3.b. Recrutement et modification des petites GTPases à la LCV

En plus d'interagir avec ARF1 à la LCV, *L. pneumophila* induit le recrutement d'autres petites GTPases permettant l'interaction et la fusion entre la LCV et des vésicules du RE afin d'agrandir sa vacuole et d'échapper à la voie de dégradation endocytaire. SidM encore appelé DdrA (diol dehydratase-reactivating factor large subunit A) a été le premier effecteur bactérien décrit comme capable de recruter et d'activer une petite GTPase cellulaire, RAB1 (Murata et al., 2006). RAB1 est impliquée dans la régulation du trafic entre le RE et le Golgi et est très finement manipulée par la bactérie grâce à différents effecteurs qui induisent de nombreuses modifications post-traductionnelles de cette petite GTPase (Behnia et Munro, 2005). Le PI4P présent sur la membrane de la LCV sert d'ancrage à SidM (Brombacher et al., 2009 ; Schoebel et al., 2010 ; Del Campo et al., 2014). Cet effecteur induit (i) le recrutement de RAB1 à la LCV grâce à son activité GDF (Machner et Isberg, 2007 ; Schoebel et al., 2009 ; Zhu et al., 2010), (ii) l'activation de cette petite GTPase à l'aide d'une

fonction GEF (Machner et Isberg, 2007 ; Schoebel *et al.*, 2009 ; Zhu *et al.*, 2010) et enfin (iii) l'activation constitutive de cette protéine suite à son AMPylation, ce qui empêche l'action des GAP et l'inhibition par le GDI (Müller *et al.*, 2010 ; Oesterlin *et al.*, 2012 ; Hardiman et Roy, 2014) (**Figure 14a**). L'effecteur LidA (*l*owered *v*iability *i*n the presence of *g*otA) s'ancre à la LCV grâce à des interactions avec le PI3P ou avec moins d'affinité avec le PI4P (Conover *et al.*, 2003 ; Brombacher *et al.*, 2009 ; Zhu *et al.*, 2011b) (**Figure 14a**). Cet effecteur stabilise les formes activées et AMPylées de RAB1 et participerait à sa séquestration au niveau de la membrane de la LCV (Cheng *et al.*, 2012). De plus, LidA aurait un rôle d'adaptateur dans le recrutement des vésicules du RE à la LCV en se liant aux vésicules dérivées du RE ou à RAB1 (Neunuebel *et al.*, 2012) (**Figure 14a**). Bien qu'aucun mécanisme n'ait été découvert, LidA est également capable d'interagir avec d'autres petites GTPases comme RAB6, RAB8, RAB14 et RAB18 normalement situées au niveau du Golgi ou des peroxysomes mais qui relocalisent à la LCV (Machner et Isberg, 2006 ; Urwyler *et al.*, 2009 ; Hutagalung et Novick, 2011 ; Schoebel *et al.*, 2011 ; Gronemeyer *et al.*, 2013 ; So *et al.*, 2016). Les petites GTPases RAB6 et RAB8 peuvent lier OCRL1, ce qui participerait à l'accumulation de PI4P à la surface de la LCV (Hou *et al.*, 2011). Une fois les vésicules du RE à proximité de la LCV, SidM stimule la fusion membranaire des deux compartiments grâce aux protéines SNARE cellulaires (*s*oluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor *a*ttachment protein *r*eceptor). En effet, des protéines STX (*s*yntaxine) dérivées de la membrane plasmique sont présentes sur la LCV et des protéines SEC22b (*s*ecretory) sont localisées sur les vésicules dérivées du RE (Arasaki *et al.*, 2012) (**Figure 14a**).

L'activité de RAB1 est très exploitée par la bactérie, ainsi, l'AMPylation n'est pas la seule modification post-traductionnelle que peut subir cette petite GTPase. L'effecteur bactérien AnkX (*a*nkyrine) phosphocholine RAB1 indépendamment des activités de SidM (Mukherjee *et al.*, 2011) (**Figure 14b**). L'effecteur LidA stabiliserait RAB1 phosphocholiné, en plus de sa forme active et/ou AMPylée, cependant RAB1 se retrouverait soit sous sa forme AMPylée, soit sous sa forme phosphocholinée (Neunuebel *et al.*, 2012 ; Hardiman et Roy, 2014) (**Figure 14b**). Par ailleurs, AnkX induit la phosphocholination de RAB35, impliquée dans le transport des vésicules au niveau de la membrane plasmique et des endosomes (Hutagalung et Novick, 2011). Tandis que la phosphocholination de RAB1 réduit modérément l'activité GEF de SidM, celle de RAB35 inhibe l'activation de cette petite GTPase par la protéine cellulaire Connecdenn (Denn (*d*ifferentially *e*xpressed in *n*eoplastic versus *n*ormal cells) domain-containing protein) (Mukherjee *et al.*, 2011 ; Goody *et al.*, 2012). Même si le rôle de la phosphocholination de RAB35 n'est pas encore élucidé, cette modification post-traductionnelle sur RAB1 limiterait le transport vésiculaire sur les microtubules afin d'empêcher la fusion entre les endosomes tardifs et la LCV (Pan *et al.*, 2008b) (**Figure 14b**).

D'autres effecteurs de *L. pneumophila* permettent de réguler finement les modifications post-traductionnelles de RAB1, ce qui suggère un contrôle temporel de la sécrétion des effecteurs par le SST4 Dot/Icm. L'AMPylation ou la phosphocholination de RAB1 n'influence pas l'activité GAP des protéines cellulaires mais inhibe celle de l'effecteur bactérien LepB (*Legionella* effector protein) (Müller *et al.*, 2010 ; Goody *et al.*, 2012). Ainsi, l'effecteur SidD dé-AMPyle RAB1 et l'effecteur Lem3 (*Legionella* effector identified by machine learning) dé-phosphocholine cette petite GTPase, ce qui permet ensuite l'inhibition de cette protéine grâce à l'activité GAP de l'effecteur LepB (Ingmundson *et al.*, 2007 ; Neunuebel *et al.*, 2011 ; Tan et Luo, 2011 ; Tan *et al.*, 2011 ; Goody *et al.*, 2012) (**Figure 14a, b**). LepB peut également inhiber d'autres petites GTPases comme RAB3, RAB8, RAB13 et RAB35, ce qui suggère un large spectre d'action de cet effecteur (Mihai Gazdag *et al.*, 2013). RAB35 serait donc régulé comme RAB1, en étant activé et AMPylé par SidM puis dé-AMPylé par SidD avant d'être inactivé par LepB (Neunuebel *et al.*, 2011 ; Tan et Luo, 2011 ; Mihai Gazdag *et al.*, 2013). D'autre part, la phosphatase cellulaire SAC1 (*suppressor of actin*) consomme le PI4P à la surface de la LCV, ce qui favorise la dissociation des effecteurs qui lient le PI4P, comme SidM, et qui sont impliqués dans la maturation précoce de la LCV (Hubber *et al.*, 2014). Ce mécanisme participerait donc à moduler l'expression temporelle des effecteurs sécrétés par *L. pneumophila*.

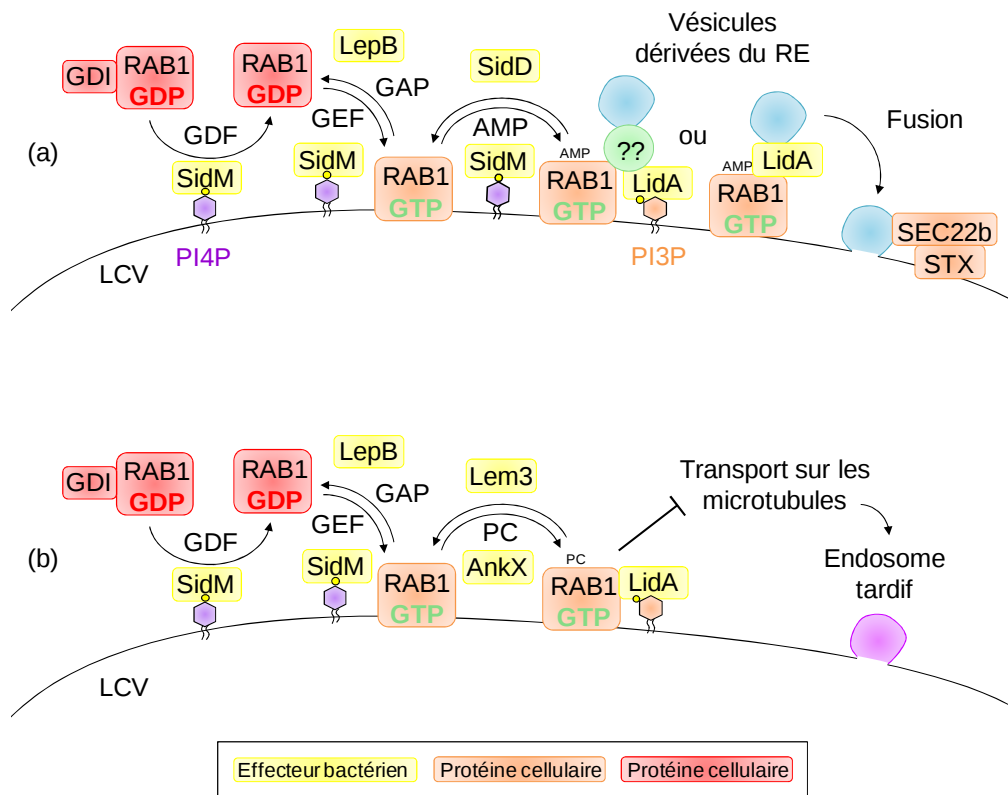


Figure 14 : Rôle de la petite GTPase RAB1 dans la biogenèse de la LCV

(a) SidM est ancré au niveau de la membrane de la LCV par son interaction avec le PI4P. Cet effecteur recrute RAB1 grâce à son activité GDF puis l'active constitutivement à l'aide d'une fonction GEF et de l'AMPylation. L'effecteur LidA lie le PI3P et participerait au recrutement des vésicules du RE qui fusionnent à la LCV grâce à SidM et aux protéines SNARE STX et Sec22b. Ce processus prend fin lorsque SidD dé-AMPyle RAB1 puis LepB inactive RAB1 par son activité GAP. (b) Par ailleurs, SidM permet le recrutement de RAB1 qui peut être phosphocholiné par l'effecteur AnkX et stabilisé par l'effecteur LidA. Cette modification post-traductionnelle limiterait le transport sur les microtubules afin d'éviter la fusion entre la LCV et les endosomes tardifs. L'inactivation de RAB1 est induite par la déphosphocholination assurée par Lem3 et l'activité GAP de LepB.

4.3.c. Echappement à la voie de dégradation endocytyque

En masquant la surface de la LCV avec des marqueurs du RE tels que le PI4P et la petite GTPase RAB1, *L. pneumophila* inhibe le recrutement d'endosomes précoces et éloigne spatialement la LCV de la voie de dégradation endocytyque. De plus, *L. pneumophila* empêche la fusion de la LCV avec les endosomes et les lysosomes et limite l'acidification de sa vacuole (Horwitz, 1983b ; Horwitz et Maxfield, 1984).

L'effecteur VipD (VPS (vacuole protein sorting) inhibitor proteins) se lie à RAB5 et à RAB22, présents sur les endosomes précoces, ce qui empêcherait ces petites GTPases de se lier à leurs substrats tel que EEA1 (early endosome antigen) (Shohdy *et al.*, 2005 ; Ku *et al.*, 2012 ; Lucas *et al.*, 2014) (**Figure 15**). De plus, VipD a une activité phospholipase qui participe à l'élimination du PI3P à la surface des endosomes, ce qui inhibe le recrutement des protéines de fusion et d'EEA1 (Gaspar et Machner, 2014) (**Figure 15**). Cet effecteur perturbe ainsi la voie de dégradation endocytyque et limiterait la fusion de la LCV aux endosomes précoces (Clemens *et al.*, 2000). La structure de l'effecteur Lpg0393 (*L. pneumophila* Philadelphia-1 gene) suggère une activité GEF pour RAB5, RAB21 et RAB22. Bien que la fonction de cet effecteur ne soit pas déterminée, il est possible que l'activation de RAB5 et RAB22 participe au recrutement de VipD aux endosomes et à l'inhibition du recrutement des endosomes précoces à la LCV (Sohn *et al.*, 2015) (**Figure 15**). Les effecteurs SetA (subversion of eukaryotic traffic) et LtpD (*Legionella* translocated protein) lient le PI3P et sont localisés à la surface des endosomes précoces, des endosomes tardifs, des lysosomes et aussi de la LCV (Heidtman *et al.*, 2009 ; Jank *et al.*, 2012 ; Harding *et al.*, 2013) (**Figure 15**). Même si le rôle de ces effecteurs n'est pas identifié, le domaine N-terminal de l'effecteur SetA est homologue aux toxines A et B de *Clostridium difficile* qui sont connues pour inactiver les petites GTPases de la famille RHO par glycosylation (Jank *et al.*, 2012). De plus, LtpD interagit avec la protéine cellulaire IMPA1 (inositol monophosphatase), une phosphatase qui produit du myo-inositol, précurseur de PI (Harding *et al.*, 2013). Ces deux effecteurs pourraient participer à la désorganisation de la voie de dégradation endocytyque. D'autres effecteurs dont les mécanismes ne sont pas identifiés semblent impliqués dans la perturbation du trafic endosomal et l'inhibition de la fusion de la LCV avec les endosomes ou les lysosomes. Les effecteurs LegC2 (*Legionella* eukaryotic-like gene), LegC3 et LegC7 participeraient à bloquer la fusion de la LCV avec les endosomes et les lysosomes (de Felipe *et al.*, 2008 ; Bennett *et al.*, 2013 ; O'Brien *et al.*, 2015) (**Figure 15**). Le

gène codant l'effecteur PieA (plasticity island of effectors) a la particularité d'être localisé dans une zone plastique du génome et n'est présent que chez la souche *L. pneumophila* Philadelphia-1 (Ninio *et al.*, 2009). Cet effecteur, acquis par transfert horizontal, modifie la morphologie des lysosomes, et localise à la LCV, même si son recrutement à lieu après que d'autres effecteurs bactériens ou protéines cellulaires aient permis la maturation de la LCV (Ninio *et al.*, 2009) (**Figure 15**). Cet effecteur est un exemple supplémentaire qui suggère une régulation temporelle de la sécrétion des effecteurs par le SST4 Dot/Icm de *L. pneumophila*. PieE et PieG sont deux autres effecteurs de la famille des gènes *pie* qui localisent sur des vacuoles et pourraient participer à perturber le trafic vésiculaire (Ninio *et al.*, 2009).

L. pneumophila n'est pas seulement capable de perturber la voie de dégradation endocytaire et d'inhiber la fusion des endosomes ou des lysosomes avec la LCV, elle maintient également un pH neutre au sein de sa LCV. L'effecteur SidK interagit avec la protéine cellulaire VATA (v-ATPas (vacuolar adenosine triphosphase) A-subunit), une sous-unité de la v-ATPase, ce qui inhibe l'hydrolyse de l'ATP et le transport de protons au sein de la LCV (Xu *et al.*, 2010) (**Figure 15**). L'inhibition de l'acidification de la LCV lors des phases précoces d'infection, empêche la dégradation de la bactérie et lui permet de se transformer en une forme tolérant l'acidification.

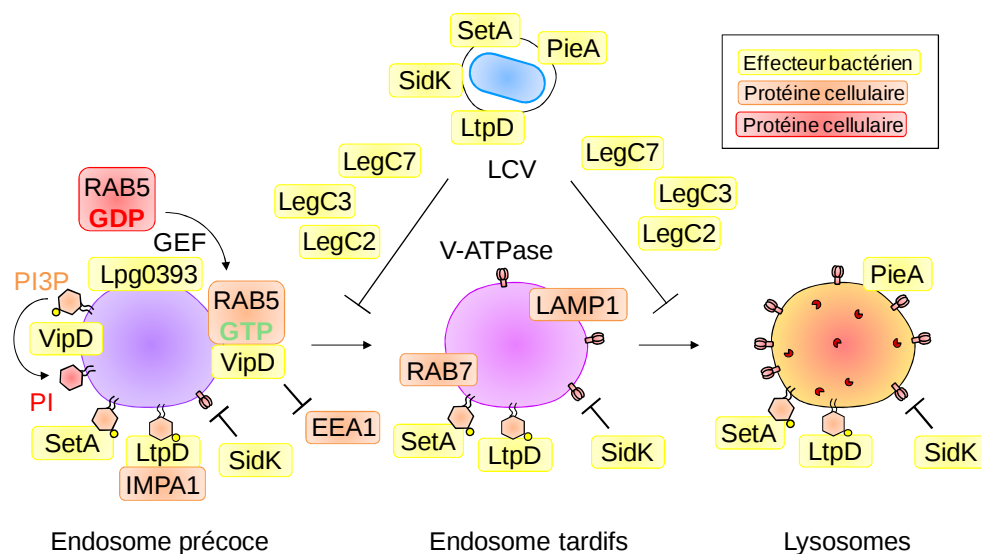


Figure 15 : Perturbation de la voie de dégradation endocytaire par les effecteurs de *L. pneumophila*

L'effecteur bactérien VipD permet la déphosphorylation du PI3P, essentiel au recrutement de nombreuses protéines impliquées dans la voie de dégradation endocytaire. De plus, l'effecteur Lpg0393 activerait RAB5 puis VipD lie RAB5, ce qui limite le recrutement de protéines cellulaires comme EEA1. Les effecteurs SetA et LtpD lient le PI3P et localisent sur les endosomes, lysosomes et la LCV. Leurs rôles ne sont pas identifiés même si LtpD peut interagir avec la phosphatase cellulaire IMPA1. L'effecteur SidK inhibe l'acidification de la LCV en interagissant avec la v-ATPase cellulaire. Les effecteurs LegC2, LegC3, LegC7 et PieA participeraient à la désorganisation de la voie endocytaire et à l'inhibition de la fusion de la LCV avec cette voie.

4.4. Détournement des voies cellulaires

4.4.a. Perturbation de la voie de sécrétion, des mitochondries et du cytosquelette

Grâce au très grand nombre d'effecteurs sécrétés par le SST4 Dot/Icm, *L. pneumophila* perturbe globalement la cellule en interagissant avec la voie de sécrétion, les mitochondries et le cytosquelette. L'effecteur Ceg9 perturbe le trafic entre le RE et le Golgi (Heidtmann *et al.*, 2009) tandis que l'effecteur RidL (retromer interactor decorating LCV) inhibe le trafic rétrograde entre le Golgi et le RE en interagissant avec VPS29 (vacuolar protein sorting-associated protein), une sous unité du complexe rétrograde (Finsel *et al.*, 2013) (**Figure 16**). Par ailleurs, l'effecteur LpdA, déjà mentionné dans ce manuscrit pour son activité phospholipase qui participe à l'accumulation de PI4P à la LCV (cf. 1.4.3.a.), se retrouve également à la surface de la membrane plasmique, des endosomes précoces et du Golgi. L'accumulation d'acide phosphatidique produit par cette phospholipase perturbe l'intégrité du Golgi et pourrait désorganiser le trafic vésiculaire au niveau de la membrane plasmique (Schroeder *et al.*, 2015) (**Figure 16**). La bactérie utilise la machinerie de farnésylation de l'hôte pour ancrer l'effecteur LseA (*Legionella* SNARE effector) au niveau des membranes du Golgi. Même si le rôle de cet effecteur n'est pas connu, il agit comme une protéine SNARE et serait impliqué dans la régulation de la fusion membranaire au niveau du Golgi (King *et al.*, 2015) (**Figure 16**). L'effecteur Ceg19 est recruté au niveau des endosomes tardifs et jouerait un rôle dans le transport entre le Golgi, les endosomes tardifs et les lysosomes (Heidtmann *et al.*, 2009) (**Figure 16**). De façon plus globale, l'effecteur PieE est recruté au niveau de la LCV et interagit avec plusieurs GTPases RAB impliquées dans le trafic entre le RE et le Golgi et dans le trafic des endosomes (Ninio *et al.*, 2009 ; Mousnier *et al.*, 2014). Bien que ces GTPases RAB peuvent localiser à la LCV, il n'est pas à exclure que cet effecteur perturbe le trafic vésiculaire en plus d'avoir une fonction au niveau de la LCV (Hoffmann *et al.*, 2014) (**Figure 16**).

L'effecteur LncP (*Legionella* nucleotide carrier protein) est très hydrophobe, ce qui lui permet de traverser plusieurs membranes pour s'ancrer au niveau de la membrane interne des mitochondries (Dolezal *et al.*, 2012) (**Figure 16**). Cet effecteur serait impliqué dans le transport de l'ATP à l'extérieur des mitochondries afin d'apporter de l'énergie à la bactérie (Dolezal *et al.*, 2012) (**Figure 16**). La chaperonne bactérienne Hsp60/HtpB a plusieurs fonctions et est impliquée dans l'adhésion de la bactérie à la cellule hôte (cf. 1.4.1). Même si aucun mécanisme n'est découvert, cette chaperonne est sécrétés dans le cytoplasme de la cellule hôte et semble participer (i) à l'inhibition de la fusion entre la LCV et les lysosomes, (ii) au recrutement des mitochondries à la LCV en interagissant avec la chaperonne cellulaire localisée aux mitochondries Hsp10 et (iii) à l'apport de polyamines à la bactérie par la modulation de cette voie en se liant avec la protéine cellulaire SAMDC (*S*-adenosylmethionine decarboxylase) (Chong *et al.*, 2009 ; Garduño *et al.*, 2011 ; Nasrallah,

2015) (**Figure 16**). Il est à noter que d'autres effecteurs bactériens interagissent avec les mitochondries afin de réguler la balance vie/mort de la cellule hôte (cf. 1.4.6.).

L'effecteur VipA est localisé au niveau des endosomes précoces et active la polymérisation de l'actine *in vitro* tandis que l'effecteur Ceg14 inhibe cette polymérisation *in vitro* (Franco *et al.*, 2012 ; Guo *et al.*, 2014 ; Bugalhão *et al.*, 2016) (**Figure 16**). La protéine kinase LegK2 est localisée sur la LCV où elle inhibe la polymérisation de l'actine en phosphorylant la protéine cellulaire ARP2/3 (actin-related protein) (**Figure 16**). Cette interaction participerait à inhiber la fusion entre la LCV et les endosomes tardifs ou les lysosomes (Hervet *et al.*, 2011 ; Michard *et al.*, 2015). Par ailleurs, *L. pneumophila* détourne la machinerie de prénylation de l'hôte pour ancrer l'effecteur LegG1 à la surface de la LCV. L'activité GEF de cet effecteur active la petite GTPase RAN (RAS-related nuclear protein) et la protéine partenaire RANBP1 (RAN binding protein) à la surface de la LCV, ce qui promeut la polymérisation et la stabilisation des microtubules (**Figure 16**) (Rothmeier *et al.*, 2013 ; Hilbi *et al.*, 2014). Le déplacement de la LCV le long des microtubules participerait à son éloignement de la membrane plasmique et son rapprochement du RE (Rothmeier *et al.*, 2013 ; Hilbi *et al.*, 2014). Au contraire, la phosphocholination de RAB1 et de RAB35 par l'effecteur AnkX limiterait le transport vésiculaire sur les microtubules afin d'empêcher la fusion entre la LCV et les endosomes tardifs (cf. 1.4.3.b.) (Pan *et al.*, 2008b) (**Figure 16**). Bien qu'aucun mécanisme ne soit décrit, les activités de ces effecteurs suggèrent que *L. pneumophila* contrôle le cytosquelette d'actine et de microtubule en fonction de ses besoins au cours du cycle infectieux.

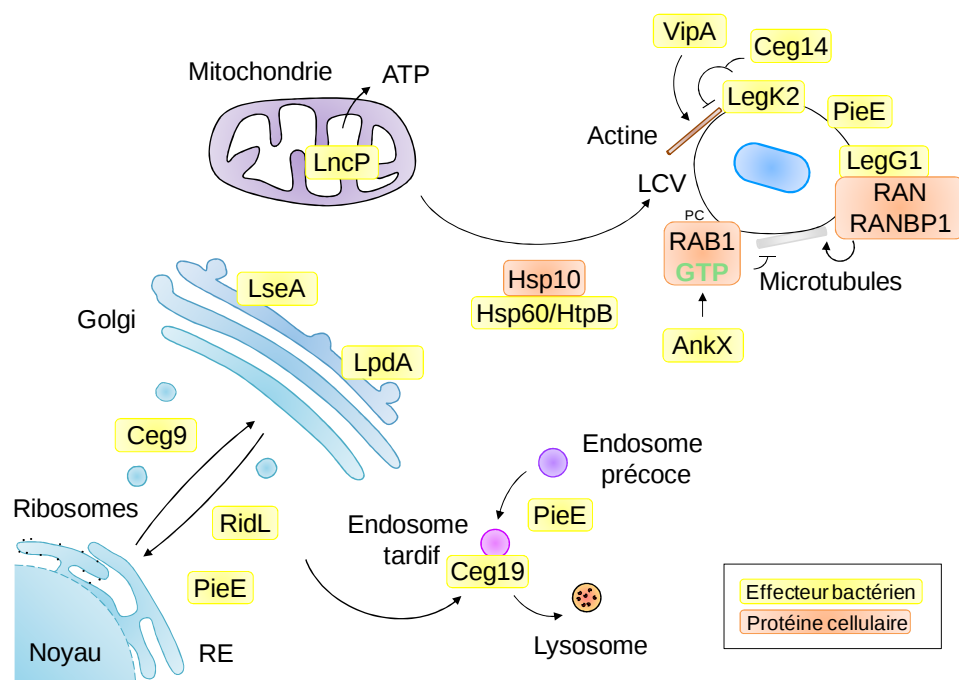


Figure 16 : Perturbation de la voie de sécrétion, des mitochondries et du cytosquelette par les effecteurs de *L. pneumophila*

L'effecteur Ceg9 perturbe le trafic vésiculaire entre le RE et le Golgi tandis que RidL désorganise le trafic rétrograde. L'effecteur LpdA perturbe l'intégrité du Golgi et l'effecteur LseA aurait un rôle dans les événements de fusion du Golgi. L'effecteur Ceg19 localisé au niveau des endosomes tardifs participerait au transport entre le Golgi et les endosomes tardifs ou les lysosomes. De façon plus globale, l'effecteur PieE aurait un rôle dans le trafic vésiculaire. Au niveau des mitochondries, l'effecteur LncP permettrait le relargage d'ATP et la chaperonne Hsp60/HtpB favoriserait le recrutement des mitochondries en interagissant avec Hsp10. Par ailleurs, les effecteurs LegK2 et Ceg14 seraient impliqués dans l'inhibition de la polymérisation de l'actine tandis que l'effecteur VipA favoriserait cette polymérisation. Au niveau du cytosquelette de microtubule, LegG1 en interagissant avec la petite GTPase RAN et RANBP1 favorise la polymérisation des microtubules tandis que la phosphocholination de RAB1 inhiberait le transport sur les microtubules.

4.4.b. Modulation de l'expression des gènes de l'hôte

L. pneumophila module l'expression de certains gènes de la cellule hôte en contrôlant la transcription au niveau épigénétique ou en agissant sur la traduction. L'effecteur RomA (regulator of methylation) de la souche *L. pneumophila* Paris est une méthyltransférase qui est retrouvée dans le noyau de la cellule hôte. Cet effecteur tri-méthyle la lysine 14 de l'histone H3, ce qui remplace l'acétylation de ce résidu et réprime l'expression des gènes cellulaires, notamment impliqués dans l'immunité innée (Rolando *et al.*, 2013). L'homologue de l'effecteur RomA chez la souche *L. pneumophila* Philadelphia-1 est l'effecteur LegAS4, une méthyltransférase localisée dans le nucléole qui méthyle la lysine 4 de l'histone H3, ce qui stimule la transcription de l'ADN ribosomique (Li *et al.*, 2013). L'effecteur LegS4 pourrait ainsi participer à l'apport de ribosomes au niveau de la LCV, même si aucun mécanisme n'est identifié (Li *et al.*, 2013 ; Son *et al.*, 2015). Actuellement, la différence observée entre ces deux effecteurs homologues qui présentent 96% d'identité n'est pas expliquée (Price et Kwaik, 2013).

Les effecteurs Lgt1 (Legionella glucosyltransferase) et SidI inhibent la traduction de la cellule hôte en interagissant avec le facteur d'élongation cellulaire EEF1A (eukaryotic translation elongation factor) (Belyi *et al.*, 2006 ; Shen *et al.*, 2009). L'effecteur Lgt1 est une glucosyltransférase qui bloque la traduction en glycosylant la sérine 53 de cette protéine cellulaire (Belyi *et al.*, 2006 ; Lü *et al.*, 2010). L'activité de cet effecteur est optimale à des temps tardifs d'infection, ce qui suggère un rôle dans la mort cellulaire et la sortie des bactéries dans le milieu extérieur (Belyi *et al.*, 2008). Les effecteurs Lgt2 et Lgt3 sont deux glucosyltransférases homologues à l'effecteur Lgt1, mais Lgt3 interviendrait pendant les étapes précoces de l'infection bactérienne (Belyi *et al.*, 2008). D'autre part, les effecteurs Lgt1 et Lgt2 participent à l'inhibition de la réponse aux protéines non conformées (UPR, unfolding protein response) activée par la cellule hôte suite à la détection d'un stress du RE (Treacy-Abarca et Mukherjee, 2015). Le mécanisme impliqué dans l'interaction entre SidI et les facteurs d'élongation cellulaire EEF1A et EEF1By ou le lien entre l'effecteur SidL et l'inhibition de la traduction cellulaire n'est pas déterminé (Shen *et al.*, 2009 ; Fontana *et al.*, 2011). Néanmoins, l'ensemble de ces effecteurs induisent un défaut de traduction de la cellule hôte qui serait lié à la diminution de l'inhibiteur IκB (inhibitor of κB), ce qui activerait la

voie NF- κ B (nuclear factor- κ B) et augmenterait notamment l'expression de gènes pro-inflammatoires (Fontana *et al.*, 2011). La capacité de *L. pneumophila* à induire d'une part la diminution de l'expression des gènes de l'immunité innée et d'autre part l'augmentation de l'expression de gènes pro-inflammatoires, montre que cette bactérie manipule la cellule hôte en fonction de ses besoins au cours du cycle intracellulaire.

4.4.c. Exploitation de la machinerie de l'ubiquitination de l'hôte

La manipulation de la machinerie de l'ubiquitination de l'hôte permet à *L. pneumophila* de réguler l'activité de certains effecteurs et de récupérer des nutriments. Les effecteurs LubX (Legionella U-box protein), également appelé LegU2 et GobX (Golgi-localized U-box E3 ligase) ont une activité E3 ubiquitine ligase (Lin *et al.*, 2015 ; Quaille *et al.*, 2015). L'effecteur LubX est un méta-effecteur, c'est-à-dire un effecteur qui régule la fonction d'un autre effecteur dans la cellule hôte. Ce méta-effecteur poly-ubiquitine l'effecteur SidH qui est ensuite dégradé par le protéasome, ce qui permet la régulation temporelle de cet effecteur (Kubori *et al.*, 2010) (**Figure 17a**). L'effecteur LubX induit également la poly-ubiquitination de la protéine cellulaire CLK1 (Cdc2-like kinase) impliquée dans l'épissage génétique, ce qui pourrait moduler l'expression de certains gènes de l'hôte (Kubori *et al.*, 2008). Le rôle de l'effecteur GobX n'est pas connu, mais suite à l'exploitation de la palmitoylation de la cellule hôte, cet effecteur est ancré au niveau du Golgi où il pourrait ubiquitiner différents substrats (Lin *et al.*, 2015).

Le domaine boîte-F (F-box) de plusieurs effecteurs permet leur interaction avec le complexe SCF (SKP (S-phase kinase-associated protein)-Cullin (selecting cellular proteins for ubiquitin-mediated proteasomal degradation)-E-box) qui a une activité E3 ubiquitine ligase. L'effecteur LegU1 interagit avec la protéine cellulaire SKP1 au sein de ce complexe, ce qui ubiquitine la chaperonne cellulaire BAT3 (HLA-B-associated transcript) et augmenterait la résistance de la cellule hôte au stress du RE engendré par la bactérie (Ensminger et Isberg, 2010) (**Figure 17a**). Les effecteurs Lpg2160, AnkB, également nommé LegAU13 et LicA (lipopolysaccharide core) peuvent également former un complexe avec SKP1, ce qui permettrait d'ubiquitiner et de réguler d'autres substrats (Al-Khodori *et al.*, 2008 ; Price *et al.*, 2009 ; Ensminger et Isberg, 2010). Dès le contact entre *L. pneumophila* et la cellule hôte, les machineries de farnésylation et d'ubiquitination sont recrutées sur la membrane plasmique (Bruckert *et al.*, 2014). La bactérie détourne la machinerie de farnésylation et notamment la protéine cellulaire RCE1 (RAS converting CAAX endopeptidase) afin d'ancrer l'effecteur AnkB à la surface de la LCV (Price *et al.*, 2010) (**Figure 17b**). Le recrutement de cet effecteur permet son interaction avec le complexe SCF et l'ubiquitination sur la lysine 48 de nombreuses protéines présentes à la surface de la LCV (Bruckert *et al.*, 2014) (**Figure 17b**). La bactérie détournerait alors le protéasome de l'hôte afin de générer des acides aminés qui seraient internalisés dans la LCV et permettraient la

croissance de la bactérie (Price *et al.*, 2011 ; Bruckert et Abu Kwaik, 2015) (**Figure 17b**). L'effecteur AnkB peut être poly-ubiquitiné par l'ubiquitine ligase E3 cellulaire TRIM21 (tripartite motif-containing protein) sur la lysine 11, ce qui n'affecte pas la stabilité de l'effecteur même si le rôle de cette ubiquitination n'est pas déterminé (Bruckert et Abu Kwaik, 2016). L'effecteur AnkB pourrait également interagir avec la protéine cellulaire ParvinB, ce qui diminue l'ubiquitination de cette protéine impliquée dans la dynamique du cytosquelette d'actine et la survie cellulaire (Lomma *et al.*, 2010).

La sécrétion des effecteurs de la famille SidE, c'est-à-dire SdeA, SdeB, SdeC et SidE est dépendante de la chaperonne bactérienne IcmS (Bardill *et al.*, 2005). Cette famille d'effecteurs, et notamment SdeA, est impliquée dans l'ubiquitination de nombreuses petites GTPases associées avec le RE et la LCV, dont RAB1 et RAB33, sans que le rôle de cette modification post-traductionnelle ne soit élucidé (**Figure 17a**). De façon intéressante, l'effecteur SdeA est capable d'ubiquitiner RAB33 sans recruter les protéines cellulaires E1 et E2 (Qiu *et al.*, 2016). De plus, SdeA pourrait ajouter de l'ubiquitine ADP-ribosylée à son substrat, une nouvelle modification post-traductionnelle dont la fonction n'est pas encore expliquée (Qiu *et al.*, 2016) (**Figure 17a**). L'effecteur SdeA aurait donc plusieurs fonctions puisqu'il est également impliqué dans l'entrée de la bactérie dans les cellules hôtes ([cf. I.4.1.](#)) (Chang *et al.*, 2005). Il est à noter que les effecteurs de la famille SidE ont un domaine dé-ubiquitinase qui leur permettrait de contrôler la balance ubiquitination/dé-ubiquitination promue par la bactérie (Sheedlo *et al.*, 2015). Le gène codant l'effecteur SidJ est localisé à proximité des gènes codant les effecteurs de la famille SidE sur le génome bactérien et est exprimé de façon constitutive et constante pendant la phase de croissance de la bactérie (Liu et Luo, 2007). Bien qu'aucun mécanisme ne soit connu, SidJ est un méta-effecteur qui participe à l'élimination des effecteurs de la famille SidE à la LCV, contrôlant ainsi la régulation temporelle de ces effecteurs (Bardill *et al.*, 2005 ; Jeong *et al.*, 2015) (**Figure 17a**). L'effecteur SidC et son homologue SdcA (SidC paralogue) sont localisés au niveau de la LCV où ils lient le PI4P (Weber *et al.*, 2006 ; Ragaz *et al.*, 2008). Ces deux effecteurs ubiquitinent RAB1 grâce à une activité de type ubiquitine ligase. Bien que le rôle de ces effecteurs ne soit pas identifié, SidC et SdcA pourraient être impliqués dans la régulation de RAB1 à la LCV et le recrutement des vésicules dérivées du RE à la LCV (Ragaz *et al.*, 2008 ; Horenkamp *et al.*, 2014 ; Hsu *et al.*, 2014) (**Figure 17a**).

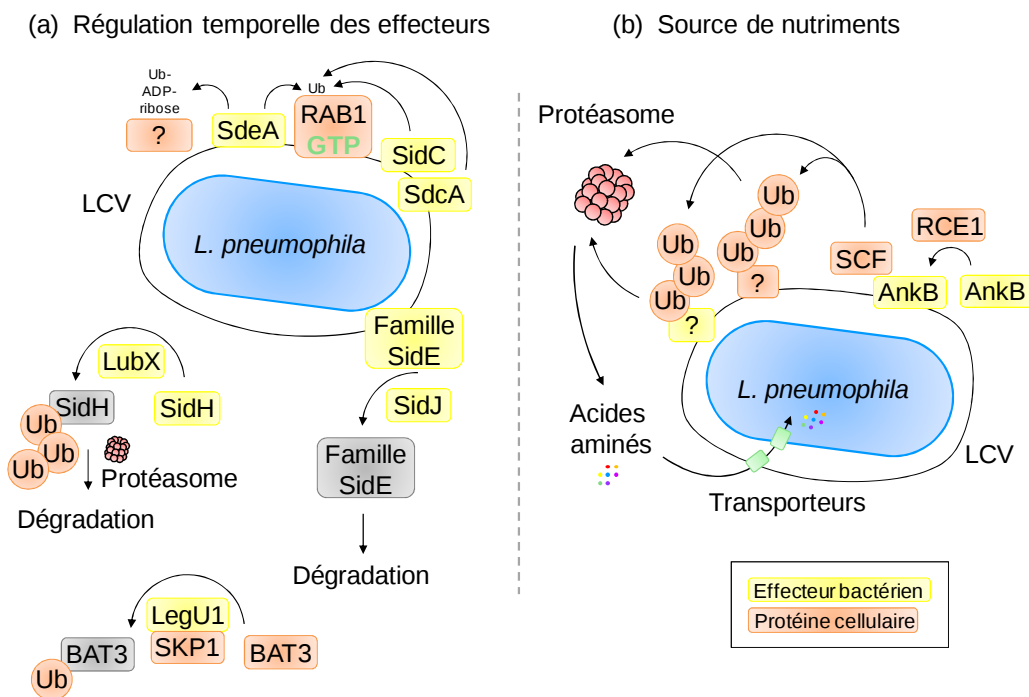


Figure 17 : Détournement de la machinerie d'ubiquitination de l'hôte par les effecteurs de *L. pneumophila*

(a) Le méta-effacteur LubX a une activité E3 ubiquitine ligase qui permet l'ubiquitination de l'effecteur SidH et sa dégradation par le protéasome. L'effecteur LegU1 en interagissant avec la protéine cellulaire SKP1 du complexe SCF ubiquitine la chaperonne cellulaire BAT3, ce qui limiterait le stress du RE. La famille d'effecteurs SidE et notamment SdeA peut induire l'ubiquitination de nombreuses petites GTPases dont RAB1 ainsi que l'ubiquitine ADP-ribosylation de substrats non déterminés. SidC et SdcA sont deux autres effecteurs capables d'ubiquitiner RAB1. SidJ est un méta-effacteur qui conduit à la dégradation des effecteurs de la famille SidE sans que le mécanisme ne soit élucidé. **(b)** La machinerie de farnésylation de l'hôte et notamment RCE1 permet l'ancrage d'AnkB à la LCV. Cet effecteur interagit avec le complexe SCF et induit l'ubiquitination de nombreuses protéines à la surface de la LCV. En détournant le protéasome, *L. pneumophila* récupérerait des acides aminés pour sa croissance.

4.5. Transitions de phases

L. pneumophila est une bactérie qui adopte un cycle de vie biphasique. Lorsque la bactérie est libre dans l'environnement, infecte une cellule hôte et forme sa vacuole répliquative, elle est sous la forme dite transmissive. Ensuite, une transition de phase permet à la bactérie de se multiplier activement à l'intérieur de la vacuole, c'est la phase dite répliquative (Swanson *et al.*, 2002). Bien que les mécanismes impliqués dans la transition entre la phase transmissive et la phase répliquative soient mal connus, une modification notoire est la tolérance de la bactérie à l'acidification (**Figure 18**). En effet, à des temps précoces, la bactérie inhibe l'acidification de la LCV ainsi que la fusion avec des lysosomes tandis qu'à des temps plus tardifs où la bactérie commence à se répliquer, la LCV s'acidifie et acquiert des protéases lysosomales (Sturgill-Koszycki et Swanson, 2000). Cette interaction avec la voie de dégradation endocytaire permettrait à la bactérie d'obtenir des nutriments et l'énergie nécessaire à la répllication bactérienne, ainsi que de la membrane

pour la LCV grandissante (Sturgill-Koszycki et Swanson, 2000). L'autophagie peut également être une source de nutriments ou de membranes pour la bactérie et l'interaction entre *L. pneumophila* et cette voie cellulaire fait l'objet d'une troisième partie introductive de ce manuscrit. La phase répliative correspond, par ailleurs, à la stimulation de l'expression des gènes impliqués dans les voies métaboliques, énergétiques ainsi que ceux impliqués dans la division cellulaire (Brüggemann *et al.*, 2006b).

La carence en nutriments comme des acides aminés ou des acides gras serait un signal permettant à la bactérie d'acquérir de nouveau les caractéristiques de sa forme transmissive (Byrne et Swanson, 1998 ; Swanson *et al.*, 2002 ; Dalebroux *et al.*, 2009) (**Figure 18**). La détection du quorum (quorum sensing), qui permet à la bactérie d'adapter sa physiologie à la densité de la population bactérienne, serait également impliquée dans cette transition de phase (Tiaden *et al.*, 2007 ; Kessler *et al.*, 2013). Les principales caractéristiques de ce changement sont la stimulation des gènes codant les protéines impliquées dans l'adhésion et l'entrée de la bactérie ainsi que les effecteurs sécrétés par le SST4 Dot/Icm et le flagelle (Brüggemann *et al.*, 2006b) (**Figure 18**). Il est important de souligner que des différences entre des souches de *L. pneumophila* existent au regard des transitions de phases. Par exemple, après 14 heures d'infection, l'expression de RpoS (RNA (ribonucleic acid) polymerase sigma S), impliqué dans le contrôle de la transcription de gènes en réponse à de nombreux stress, est inhibée pour la souche Paris et stimulée pour les souches Philadelphia-1 et Lens (Brüggemann *et al.*, 2006b).

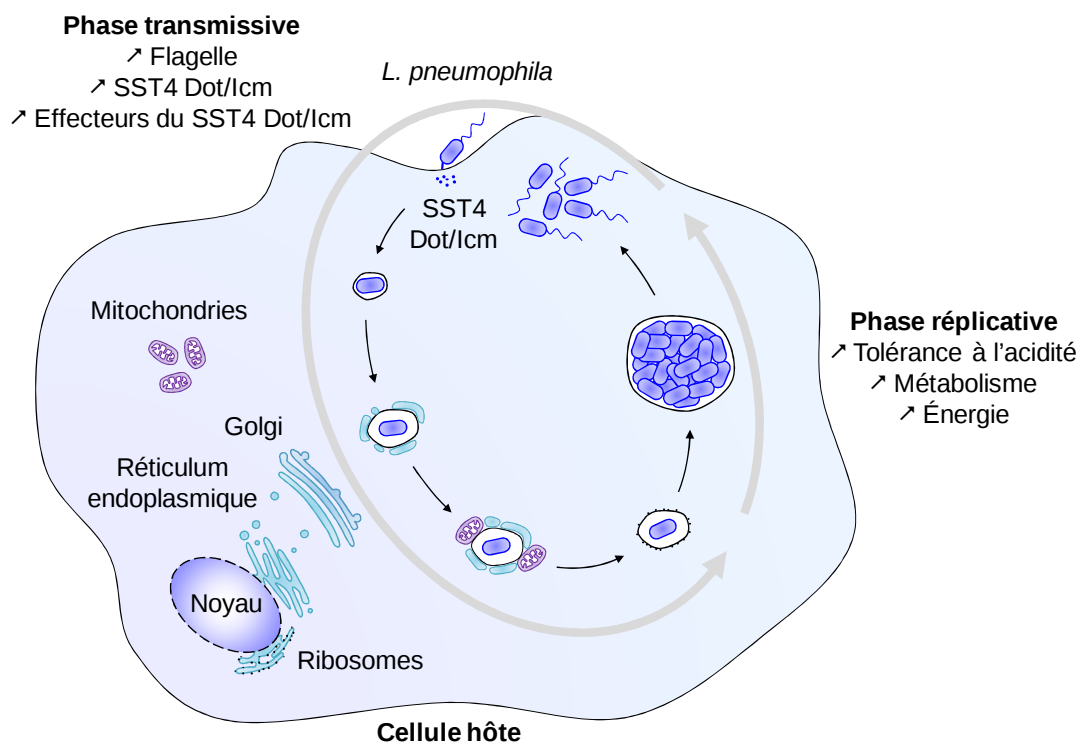


Figure 18 : Cycle biphasique de *L. pneumophila*

La phase transmissive s'étend de la forme planctonique de *L. pneumophila* jusqu'à sa réplication dans des cellules hôtes. La transition vers la phase répliquative se caractérise, entre autre, par la tolérance à l'acidification et la stimulation des gènes impliqués dans les voies métaboliques et énergétiques. Une fois répliquée, la bactérie acquiert les caractéristiques de la phase transmissive dont l'acquisition du flagelle, la stimulation des gènes codant le SST4 Dot/Icm et les effecteurs du SST4 Dot/Icm.

4.6. Régulation de la mort cellulaire et sortie des bactéries

L. pneumophila contrôle tout au long de son cycle infectieux la mort de la cellule hôte afin de conserver sa niche de réplication puis de s'échapper dans l'environnement. A des temps précoces d'infection, *L. pneumophila* induit l'activation de la caspase-3 (cysteinyl-aspartate-cleaving protease), mais le déclenchement de l'apoptose est retardé (Molmeret *et al.*, 2004 ; Abu-Zant *et al.*, 2005). L'effecteur VipD, participant à l'échappement de la voie endocytaire (cf. 1.4.3.c.), déstabilise les membranes de la mitochondrie par son activité phospholipase, ce qui aboutit au relargage du cytochrome c et à l'activation de la caspase-3 (Zhu *et al.*, 2013). De plus, d'autres effecteurs comme Lpg0716, Ceg18, Lem12 et LegS2 participeraient à l'activation de cette caspase. Bien que le rôle de LegS2 soit mal connu, cette sphingosine-1-phosphate lyase est recrutée au niveau des mitochondries (Degtyar *et al.*, 2009) et pourrait participer à l'activation de l'apoptose (Zhu *et al.*, 2013), à la modulation de la voie NF- κ B (Khweek *et al.*, 2016) ou à l'autophagie (Rolando *et al.*, 2016). L'inhibition de l'apoptose cellulaire par la bactérie est notamment due à l'activation de la voie NF- κ B (Losick et Isberg, 2006 ; Abu-Zant *et al.*, 2007 ; Bartfeld *et al.*, 2009). Les effecteurs Lgt1, Lgt2, Lgt3, SidI et SidL qui induisent un défaut de traduction (cf. 1.4.4.b.) (Fontana *et al.*, 2011), l'effecteur LegK1 qui mime la protéine kinase cellulaire IKK (I κ B kinase) et l'effecteur LnaB (Legionella NF- κ B activator) activent cette voie (Ge *et al.*, 2009 ; Losick *et al.*, 2010). De plus, l'effecteur SidF impliqué dans l'accumulation de PI4P à la LCV (cf. 1.4.3.a.), inhibe l'apoptose en interagissant avec BNIP3 (BCL2 (B-cell lymphoma 2)/adenovirus E1B 19kDa (kilodalton) interacting protein) et BCL-RAMBO, deux protéines pro-apoptotiques (Banga *et al.*, 2007).

Certains mutants bactériens ont été identifiés pour leur incapacité à s'échapper des cellules hôtes (Alli *et al.*, 2000). Il a été proposé que *L. pneumophila* induirait des pores grâce au SST4 Dot/Icm ou à des protéines sécrétées par le SST4 Dot/Icm qui perturberaient l'intégrité de la LCV puis de la membrane plasmique afin de permettre la sortie de la cellule hôte (Molmeret et Kwaik, 2002 ; Molmeret *et al.*, 2002). Ensuite, il a été mis en avant que ces pores n'étaient pas impliqués dans l'échappement des bactéries dans le cytosol et que la LCV se rompait probablement à cause du grand nombre de bactéries à l'intérieur (Molmeret *et al.*, 2010). Néanmoins, *L. pneumophila* contrôle finement la LCV grâce à l'effecteur SdhA (succinate dehydrogenase) responsable de l'intégrité de la LCV au contraire de l'effecteur PlaA (phospholipase) qui perturbe la LCV (Laguna *et al.*, 2006 ; Creasey et Isberg, 2012). Par ailleurs, la formation de pores au niveau de la membrane plasmique par le

SST4 Dot/Icm ou des effecteurs sécrétés par le SST4 Dot/Icm favorise la mort de type apoptotique des cellules hôtes (Zink *et al.*, 2002). En fin de cycle intracellulaire, *L. pneumophila* pourrait dé-réprimer l'apoptose puis former des pores qui seraient un signal à l'induction de la mort cellulaire par cette voie.

L'utilisation de modèles murins a mis en évidence que la cellule reconnaît divers PAMP (pathogen-associated molecular pattern) associés à *L. pneumophila*, ce qui induit une mort pyroptotique. La pyroptose est une mort cellulaire de type inflammatoire avec en particulier le relargage de cytokines telle que l'interleukine 1 β . Au niveau des récepteurs de surface, le peptidoglycane et le LPS sont reconnus par le TLR2 (Toll-like receptor) (Lettinga *et al.*, 2002 ; Girard *et al.*, 2003 ; Akamine *et al.*, 2005 ; Fuse *et al.*, 2007 ; Shim *et al.*, 2009) tandis que la flagelline est détectée par le TLR5 (Molofsky, 2006 ; Ren *et al.*, 2006). D'autres récepteurs intracellulaires sont impliqués dans la reconnaissance de la flagelline et des acides nucléiques bactériens (Zamboni *et al.*, 2006 ; Pereira *et al.*, 2011 ; Case *et al.*, 2013 ; Cunha et Zamboni, 2014 ; Cerqueira *et al.*, 2015). Même s'il n'est pas à exclure que la bactérie puisse être détectée par la cellule hôte une fois qu'elle sort de sa vacuole, il est possible que la bactérie module cette réponse cellulaire afin d'induire une mort de type apoptotique qui n'est pas inflammatoire. Actuellement, peu d'études existent sur la relation entre *L. pneumophila* et l'immunité innée de la cellule humaine néanmoins, les récepteurs humains NAIP (neuronal apoptosis inhibitory protein) et IPAF (ice protease-activating factor) auraient un rôle dans le cycle infectieux de *L. pneumophila* (Vinzing *et al.*, 2008).

En plus des mécanismes de mort cellulaire par l'induction de la lyse cellulaire, de l'apoptose ou de la pyroptose, la sortie des bactéries pourrait se faire suite à la fusion entre la LCV et la membrane plasmique. Même si aucun mécanisme n'est identifié, les effecteurs bactériens LepA (*Legionella* effector protein) et LepB présentent des similarités avec les protéines SNARE cellulaires et pourraient permettre la fusion entre la LCV et la membrane plasmique des amibes *Acanthamoeba castellanii* et *Dictyostelium discoideum* (Chen *et al.*, 2004). Par ailleurs, l'étude des amibes *Acanthamoeba castellanii* et *Acanthamoeba polyphaga* a mis en évidence que ces amibes relarguent des vésicules contenant des bactéries dans l'environnement qui sont très infectieuses (Berk *et al.*, 1998). Des études complémentaires sont nécessaires afin de mieux comprendre quelles sont les stratégies employées par les bactéries pour sortir de leurs cellules hôtes.

5. Synthèse

L. pneumophila est une bactérie ubiquitaire des environnements hydro-telluriques qui résiste aux stress de l'environnement et se multiplie grâce à une interaction étroite avec les amibes. Cette bactérie a développé un répertoire d'environ 300 effecteurs sécrétés par son

SST4 Dot/Icm qui lui permet de survivre et de se multiplier au sein de différents genres et espèces d'amibes. La similarité entre les amibes et les macrophages humains rend possible l'infection humaine, suite à l'inhalation de gouttelettes d'eau contaminées, qui se caractérise par le développement d'une pneumonie sévère. De nombreuses études ont identifié la façon dont *L. pneumophila* interagit avec les amibes ou les cellules humaines, en particulier de nombreux facteurs de virulence ont été déterminés comme participant à l'inhibition des voies de dégradation cellulaire, à la biogenèse d'une vacuole répliquative et à la multiplication de la bactérie. Des mécanismes restent encore à être découverts afin de comprendre la variabilité et le rôle de l'ensemble de ces effecteurs dans le cycle de vie de *L. pneumophila*. La diversité du répertoire d'effecteur, provenant probablement d'une pression de sélection constante de l'environnement et des amibes sur *L. pneumophila*, aboutit à une évolution rapide de la bactérie, et potentiellement des hôtes, rendant difficile l'identification de chacun des acteurs moléculaires.

II. Les bactéries intracellulaires et l'autophagie

Les épithéliums sont des barrières naturelles de défense contre les agents pathogènes qui isolent l'organisme du milieu extérieur. La peau recouvre la surface externe du corps et est infranchissable par les micro-organismes sauf lorsqu'elle est lésée par une plaie ou une piqûre. Les muqueuses, plus faciles à franchir de par leur structure, recouvrent la surface interne de l'organisme et sont généralement le site d'entrée des agents pathogènes. Les cellules épithéliales des muqueuses sécrètent un mucus qui limite l'adhésion des bactéries pathogènes. De plus, la présence de lysozyme dans les larmes et la salive, d'un pH acide dans l'estomac, d'enzymes digestives dans le tractus gastro-intestinal ainsi que la sécrétion de peptides antimicrobiens, constituent la barrière chimique des muqueuses. La flore commensale en étant en compétition avec les bactéries pathogènes pour les nutriments et les sites d'attachement, participe à la barrière biologique des muqueuses. Au point d'entrée des micro-organismes les cellules de l'immunité innée, notamment les macrophages, détectent les envahisseurs et les dégradent. Cela conduit à une réponse inflammatoire permettant le recrutement d'autres facteurs antibactériens comme le complément ou les neutrophiles. Si l'ensemble de ces mécanismes ne suffisent pas à dégrader l'agent pathogène alors l'immunité adaptative est mise en place (Janeway *et al.*, 2001).

Les bactéries pathogènes ont développé une variété de mécanismes leur permettant d'accéder et de traverser les cellules épithéliales des muqueuses (Ribet et Cossart, 2015). De plus, la réplication intracellulaire au sein de cellules épithéliales ou de macrophages permet aux bactéries d'échapper à la dégradation par le système immunitaire. Cependant, la survie intracellulaire est limitée car les cellules ont mis en place des stratégies de défenses. Une fois phagocytée ou internalisée, la bactérie se retrouve dans un phagosome qui suit la voie de dégradation endocytaire. Le phagosome s'acidifie puis fusionne avec les lysosomes, ce qui forme un phagolysosome où l'acidité et la délivrance d'enzymes spécifiques aboutissent à la dégradation de la bactérie internalisée. Pour palier à cette voie de dégradation, certaines bactéries se sont adaptées et sont capables d'inhiber l'acidification du phagosome, de se répliquer dans une vacuole acide ou de s'échapper dans le cytosol (Flannagan *et al.*, 2009). Au sein du cytosol, il existe également des défenses immunitaires telles que des peptides antimicrobiens, des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS, reactive oxygen species) ou de l'azote (RNS, reactive nitrogen species). De plus, malgré leur localisation intracellulaire, les bactéries pathogènes peuvent être reconnues et dégradées par la voie de l'immunité autonome des cellules, l'autophagie (Kim *et al.*, 2010 ; Fredlund et Enninga, 2014 ; Kaufmann et Dorhoi, 2016).

1. L'autophagie

L'autophagie, du grec *autos* « soi-même » et *phagein* « manger » est un mot inventé en 1963 à l'occasion du « Ciba Foundation Symposium on Lysosomes » (Klionsky, 2008). Ce terme désigne le processus par lequel la cellule dégrade et recycle ses propres composants à l'aide des lysosomes. De façon intéressante, cette voie de dégradation est également impliquée comme mécanisme de défense dans l'élimination des agents pathogènes qui envahissent le cytosol (Orvedahl et Levine, 2009). Ainsi, l'autophagie a un rôle dans l'homéostasie cellulaire et dans l'immunité autonome des cellules. Cette voie est conservée dans toutes les cellules eucaryotes, allant des unicellulaires, comme les levures, aux être vivants complexes, comme les mammifères (Otto *et al.*, 2003a ; Pollack *et al.*, 2009 ; Yoshimoto *et al.*, 2010 ; Duszenko *et al.*, 2011 ; Reggiori et Klionsky, 2013). Chez l'homme, la dérégulation de ce mécanisme est liée à des maladies telles que la maladie de Crohn, des cancers et des maladies neurodégénératives (Choi *et al.*, 2013). L'implication de l'autophagie dans de nombreuses maladies génétiques et infectieuses fait de cette voie une cible thérapeutique évidente pour le traitement des maladies humaines.

Il existe trois types d'autophagie dont la microautophagie, qui dégrade des protéines et/ou des organelles suite à l'invagination de la membrane des lysosomes (de Duve et Wattiaux, 1966) (**Figure 19a**). Le deuxième type d'autophagie délivre des protéines aux motifs KFERQ au sein des lysosomes par l'intermédiaire de protéines chaperonnes comme Hsc70 (heat shock cognate of the Hsp70 family) (**Figure 19b**) (Chiang *et al.*, 1989). La macroautophagie est caractérisée par la séquestration de protéines et/ou d'organelles dans une vacuole à double membrane qui fusionne ensuite avec le lysosome (**Figure 19c**). Dans ce manuscrit, il est uniquement question de la macroautophagie, nommée autophagie par souci de commodité.

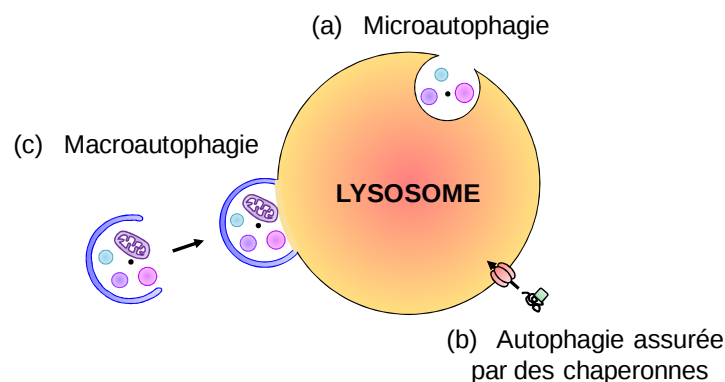


Figure 19 : Les différents types d'autophagie

(a) La microautophagie consiste en la dégradation d'éléments du cytosol suite à l'invagination du lysosome. (b) L'autophagie assurée par des chaperonnes permet l'entrée de protéines spécifiques dans les lysosomes. (c) La macroautophagie est liée à la séquestration d'éléments du cytosol dans une vacuole à double membrane qui fusionne ensuite avec le lysosome.

L'autophagie existe à l'état basal pour réguler l'homéostasie cellulaire et recycler les composants cytosoliques mais elle peut également être stimulée lors de carences nutritives ou lors d'infection par des agents pathogènes. L'autophagie peut être sélective ou non sélective vis-à-vis des substrats à dégrader, de ce fait il existe différentes nominations en fonction des éléments cellulaires pris en charge. Il se distingue, entre autre, la mitophagie (mitochondries), la pexophagie (peroxysomes), la ribophagie (ribosomes), la réticulophagie (RE), l'agrèphagie (agrégats protéiques) ou encore la lipophagie (gouttes de lipides) (Rogov *et al.*, 2014). La xénophagie, du grec xénos « étranger » est le terme utilisé lorsque l'autophagie cible des agents pathogènes qui envahissent la cellule hôte (Levine, 2005). De façon générale, l'autophagie débute par (i) une phase d'initiation due à la formation d'une membrane isolée, puis (ii) une phase d'élongation qui aboutit à un autophagosome à double membrane, et enfin (iii) des étapes de maturation qui conduisent à la détérioration des éléments séquestrés dans l'autolysosome (**Figure 20**).

Les gènes codant les protéines impliquées dans l'autophagie ont d'abord été identifiés chez la levure et se nomment ATG (autophagy). Il se distingue une trentaine de « gènes cœurs », ainsi appelés car l'inactivation de chacun d'entre eux conduit à l'inhibition de l'autophagie. D'autre part, une cinquantaine de gènes impliqués dans la régulation de cette voie ont été décrits. L'analyse moléculaire de l'autophagie a été très étudiée chez la levure puis initiée dans les cellules de mammifères (Glick *et al.*, 2010). Dans ce manuscrit seule l'autophagie des cellules de mammifère est décrite. Une vue globale de la mécanistique de cette voie est tout d'abord proposée sous forme d'un schéma puis chacun des éléments sont détaillés.

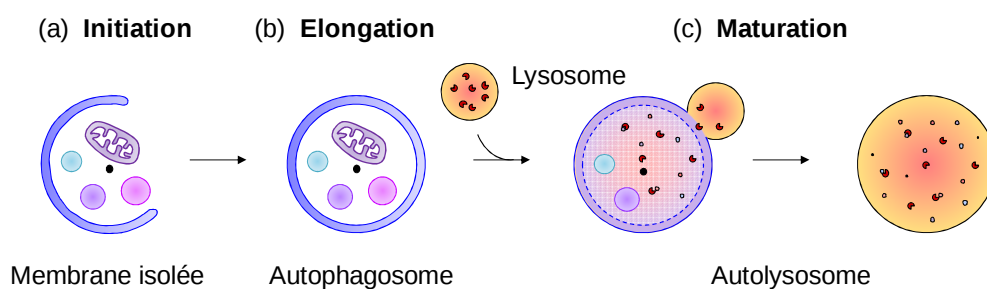


Figure 20 : Déroulement de l'autophagie

L'autophagie débute par **(a)** une étape d'initiation où la membrane isolée se forme autour des éléments à séquestrer. **(b)** Ensuite cette membrane s'allonge et fusionne, ce qui produit une vacuole à double membrane. **(c)** Enfin l'autophagosome mature et fusionne avec le lysosome, ce qui conduit à la dégradation des éléments séquestrés.

1.1. Vue globale de l'autophagie

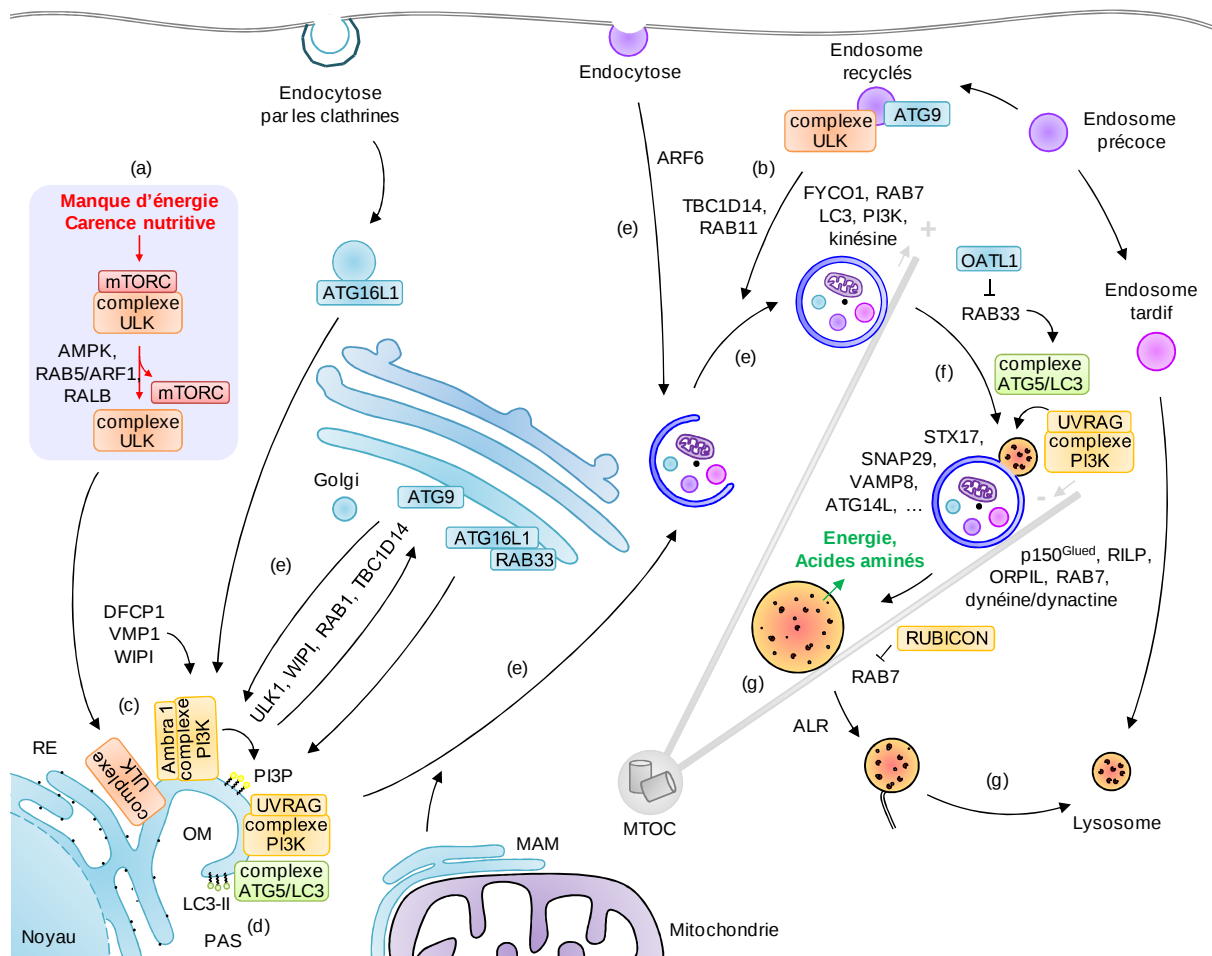


Figure 21 : Schéma global de l'autophagie

(a) Un manque d'énergie ou une carence nutritive conduit à l'activation du complexe ULK (uncoordinated-51-like kinase) par inhibition du complexe mTORC (mammalian target of rapamycin complex ou mechanistic target of rapamycin complex). **(b)** De plus, l'inhibition de TBC1D14 et l'activation de RAB11 permettent la relocalisation du complexe ULK des endosomes recyclés à l'omégasome (OM) au sein du PAS (phagosome asssembly site ou preautophagosomal structure) localisé dans le RE. **(c)** Le complexe ULK active le complexe PI3K (phosphoinositide 3-kinase), ce qui conduit à la formation de PI3P, un signal assurant le recrutement d'autres protéines impliquées dans la formation du phagophore. Les protéines UVRAG (ultraviolet radiation resistance-associated gene) et BIF1 (Bax-interacting factor1) associées au complexe PI3K induiraient une courbure dans la membrane du phagophore et l'enrichissement en PI3P. **(d)** Ensuite, deux réactions de type conjugaison d'ubiquitine forment la LC3-II (MAP-LC3, microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3) ancrée dans le phagophore. **(e)** Le phagophore s'allonge et acquiert des membranes provenant de la membrane plasmique, des endosomes, du Golgi ou des membranes associées aux mitochondries (MAM) jusqu'à former un autophagosome à double membrane. **(f)** Les autophagosomes se déplacent le long des microtubules, dans le (+) grâce à la kinésine et dans le sens (-) par l'intermédiaire de la dynactine/dynéine. La protéine OATL1 (ornithine amino-transferase-like protein) lie la LC3-II et inhibe RAB33, ce qui inhiberait le recrutement du complexe ATG5. De plus, le complexe PI3K avec UVRAG et la protéine DRAM (damage-regulated autophagy modulator) facilitent la fusion avec les lysosomes. La STX17 recrutée sur les autophagosomes forme un complexe avec SNAP29, ce qui permet la fusion avec les lysosomes avec VAMP8 et ATG14L. **(g)** Les composés présents dans l'autolysosome sont dégradés et relargués dans le cytosol. L'augmentation de nutriments dans le cytosol permet alors le recyclage des lysosomes autophagiques (ALR, autophagic lysosome reformation). La séquestration d'UVRAG par RUBICON inhibe RAB7, ce qui participerait à l'ALR où les autolysosomes sont recyclés en lysosomes en passant par des vacuoles possédant de longs tubules.

1.2. Initiation

L'autophagie débute par la formation d'un phagophore, encore appelé membrane isolée. Bien que l'origine de cette membrane ne soit pas élucidée, il est admis qu'elle provient d'un sous-domaine du RE appelé omégasome au niveau du PAS (phagophore assembly site ou preautophagosomal structure). Cependant, la mitochondrie, la membrane plasmique où les endosomes recyclés sont impliqués dans la biogenèse de la membrane isolée et dans son élongation (Hailey *et al.*, 2010 ; Ravikumar *et al.*, 2010 ; Knævelsrud *et al.*, 2013).

L'autophagie au niveau basal n'est que peu ou pas sélective tandis que l'autophagie induite après une carence nutritive, un manque d'énergie ou l'invasion d'un agent pathogène est sélective et se fait par l'intermédiaire de protéines réceptrices et adaptatrices (Xu *et al.*, 2015). Un récepteur autophagique est capable de lier les éléments à dégrader marqués d'ubiquitine, grâce à un domaine de liaison à l'ubiquitine (UBD, Ub-binding domain). De plus, il se fixe aux protéines de la famille LC3 (MAP-LC3, microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3) présentes sur la membrane du phagophore, par l'intermédiaire d'une région particulière (LIR, LC3-interacting region). Les interactions entre les cibles à dégrader, le récepteur autophagique et le phagophore conduisent à leur séquestration dans un autophagosome. Les protéines adaptatrices quant à elles, servent de point d'ancrage à la machinerie autophagique et peuvent, par exemple, la stimuler par des phosphorylations (Xu *et al.*, 2015). Le premier récepteur autophagique découvert a été P62/SQSTM1 (sequestosome) qui est impliqué dans la reconnaissance des agrégats protéiques éliminés par agréphagie, puis NBR1 (neighbor of BRCA (breast cancer)) a été identifié (Pankiv *et al.*, 2007 ; Kirkin *et al.*, 2009) (**Figure 22a**). Par la suite, les rôles des récepteurs autophagiques NDP52 (nuclear dot protein 52 kDa) et OPTN (optineurin, optic neuropathy-inducing) ainsi que des adaptateurs TBK1 (tank-binding kinase) et NAP1 (NCK (non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein)-associated protein) ont été décrits dans la xénophagie (Thurston *et al.*, 2009 ; Wild, *et al.*, 2011) (**Figure 22b**). Depuis, d'autres protéines ont été identifiées comme récepteurs et adaptateurs de l'autophagie sélective conférant différentes spécificités à l'autophagie (Xu *et al.*, 2015).

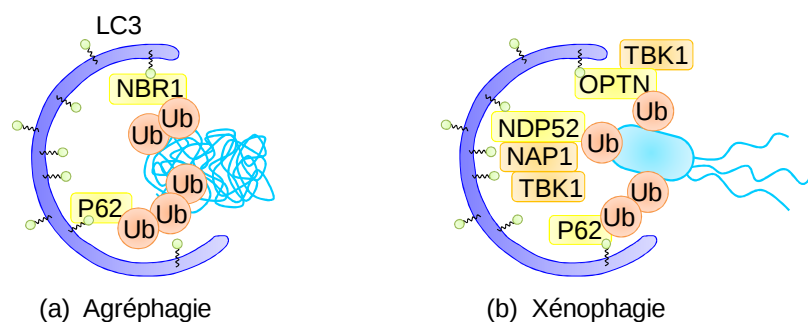


Figure 22 : Les récepteurs et adaptateurs autophagiques

(a) Les agrégats protéiques sont décorés d'ubiquitine et reconnus par les récepteurs autophagiques NBR1 ou P62, ce qui conduit à leur dégradation par autophagie. (b) Les bactéries présentes dans le cytosol sont également couvertes d'ubiquitine, puis reconnues par les récepteurs autophagiques P62, NDP52 et OPTN et les adaptateurs TBK1 ou NAP1. Cette reconnaissance conduit à la dégradation des bactéries par xénophagie.

Le régulateur négatif majeur de l'autophagie est le complexe mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex ou mechanistic target of rapamycin complex), appelé mTORC ci-après, dont la sérine thréonine kinase mTOR est le composant essentiel. Ce complexe est un senseur cellulaire de la présence de nutriments, de ressources énergétiques ainsi que de l'état de stress cellulaire. En présence de nutriments comme des acides aminés, des glucides ou des lipides, ainsi que de facteurs de croissance ou d'énergie, le complexe mTORC réprime l'autophagie en recrutant et en induisant des phosphorylations inhibitrices sur le complexe ULK (uncoordinated-51-like kinase). Plusieurs stimuli tels qu'un manque d'énergie ou une carence nutritive sont à l'origine d'une induction de l'autophagie (Gallagher et al., 2016). Un manque d'énergie dans la cellule se traduit par une consommation accrue de l'ATP et une augmentation de la quantité d'AMP (adénosine monophosphate). Cela active la kinase AMPK (AMP-activated protein kinase) qui inhibe le complexe mTORC par des phosphorylations inhibitrices et active le complexe ULK par des phosphorylations activatrices (Kim et al., 2011) (**Figure 23a**). Une carence nutritive en d'acide aminé réprime mTORC par les petites GTPases RAB5 et ARF1 (Li et al., 2010) (**Figure 23b**). D'autre part, RALB (Ras like proto-oncogene), une autre petite GTPase est également activée, ce qui permet de relocaliser l'exocyste au niveau du PAS. L'exocyste est un complexe protéique initialement impliqué dans l'ancrage des vésicules à la membrane plasmique qui est une plateforme d'assemblage pour les complexes ULK et PI3K (phosphoinositide 3-kinase) (**Figure 23c**). Etant donné la localisation initiale de ce transporteur, il est possible que ce dernier participe aux mouvements membranaires entre la membrane plasmique et les autophagosomes (Bodemann et al., 2011). D'autre part, le complexe mTORC n'est pas le seul inhibiteur de l'autophagie puisque la protéine TBC1D14 séquestre et inactive le complexe ULK au niveau des endosomes recyclés. En conditions de carence nutritive, RAB11 est activée et TBC1D14 inhibé et relocalisé au niveau du Golgi, ce qui permet l'apport du complexe ULK et de membranes des endosomes recyclés jusqu'au phagophore (Longatti et al., 2012).

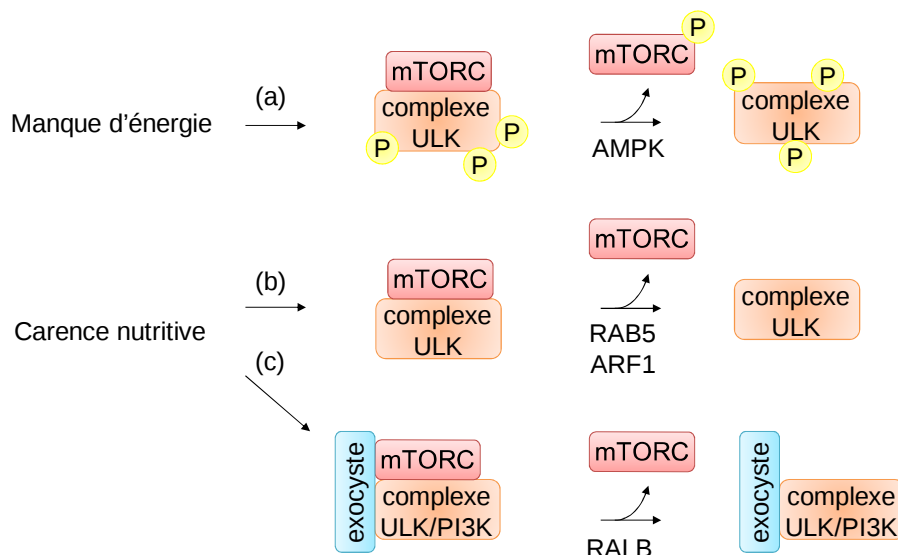


Figure 23 : Activation de l'autophagie par inhibition du complexe mTORC

(a) Un manque d'énergie conduit à l'activation de l'AMPK qui inhibe le complexe mTORC et active le complexe ULK en induisant des phosphorylations particulières. **(b)** Une carence nutritive réprime mTORC par les petites GTPases RAB5 ou ARF1. **(c)** De plus, la petite GTPase RALB inhibe mTORC, ce qui permet l'activation des complexes ULK et PI3K au niveau de l'exocyste.

L'élément clé de l'initiation de l'autophagie est l'enrichissement d'une membrane en PI3P grâce aux complexes ULK et PI3K, ce qui permet le recrutement de protéines spécifiques amenant à la formation d'un phagophore. Le complexe ULK est formé de la protéine kinase ULK1 et des protéines ATG13, FIP200 (focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kDa) et ATG101 (**Figure 24a**). L'activation de ce complexe passe par (i) la déphosphorylation des phosphorylations inhibitrices induites par mTORC et (ii) des phosphorylations activatrices induites par ULK1 telles que l'autophosphorylation ainsi que la phosphorylation d'ATG13 et de FIP200 (Jung *et al.*, 2009) (**Figure 24a**). Les protéines ATG101 et FIP200 stabilisent le complexe ULK et ATG101 facilite, en plus, la phosphorylation d'ATG13 (Hara *et al.*, 2008 ; Mercer *et al.*, 2009). Une fois activé, ATG13 interagit avec l'adaptateur ATG14L, ce qui rapproche spatialement le complexe PI3K. Ce complexe est constitué de la PI3KC3 (PI3K de classe III encore appelée VPS34) et des protéines p150, ATG14L, BECLIN1 et AMBRA1 (activating molecule in beclin1-regulated autophagy) (**Figure 24b**). Suite à l'interaction entre ATG13 et le complexe PI3K, la protéine AMBRA1 est phosphorylée par ULK1, ce qui augmente le recrutement de ce complexe au niveau du PAS (Di Bartolomeo *et al.*, 2010). Ensuite, ULK1 phosphoryle BECLIN1, activant la protéine kinase PI3KC3 qui est stabilisée par la protéine p150 et produit du PI3P à partir du PI disponible dans la cellule (Russell *et al.*, 2013) (**Figure 24b**). Le complexe PI3K peut se trouver sous différentes formes lui conférant différentes spécificités : le complexe PI3KC3/p150-BECLIN1-ATG14L-AMBRA1 et le complexe PI3KC3/p150-BECLIN1-UVRAG-BIF1. Tandis que le complexe PI3KC3/p150-BECLIN1-ATG14L-AMBRA1 permet d'enrichir

l'omégasome en PI3P, la présence d'UVRAG (ultraviolet radiation resistance-associated gene) et de BIF1 (Bax-interacting factor) induirait une courbure dans le phagophore. De plus, la protéine UVRAG stimule l'activité de la PI3KC3 et donc la production de PI3P (Takahashi *et al.*, 2007 ; Zhong *et al.*, 2009).

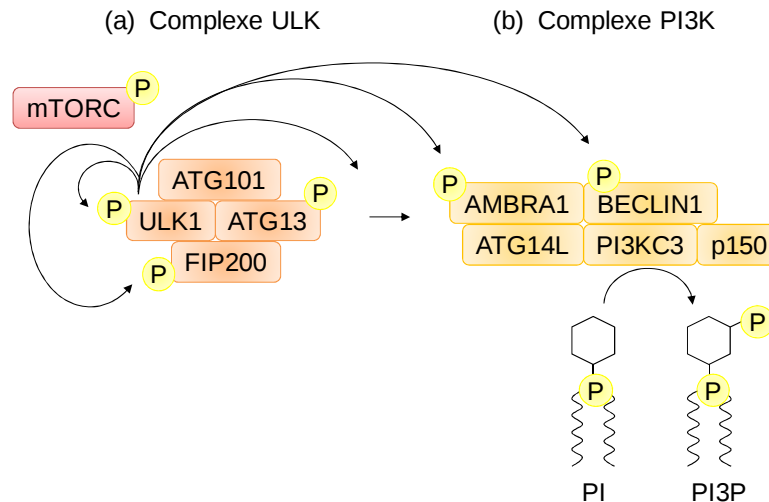


Figure 24 : Les complexes d'initiation de l'autophagie

(a) Le complexe ULK est formé des protéines ATG101, ULK1, ATG13 et FIP200. L'inhibition de mTORC par phosphorylation active la kinase ULK1 qui stimule le complexe ULK grâce à des phosphorylations spécifiques. **(b)** Le complexe ULK active à son tour le complexe PI3K formé des protéines AMBRA1, BECLIN1, ATG14L, PI3KC3 et p150. C'est la kinase PI3KC3 qui promeut la formation de PI3P.

L'enrichissement en PI3P est un signal lipidique au niveau du PAS pour le recrutement d'autres protéines assurant la formation du phagophore. Ainsi, les protéines DFCP1 (double EYVE domain-containing protein), WIPI (WD-repeat protein interacting with phosphoinositides) et VMP1 (vacuole membrane protein) sont recrutées au niveau des omégasomes (Proikas-Cezanne *et al.*, 2007 ; Axe *et al.*, 2008). L'activation de ces protéines est nécessaire à la formation de l'omégasome et permet le recrutement d'autres protéines ATG impliquées dans la lipidação de la LC3 et la clôture de la vacuole à double membrane. La protéine VMP1 dissocie notamment BECLIN1 de BECLIN2 afin que BECLIN1 puisse être engagé dans le complexe PI3K (Molejon *et al.*, 2013).

1.3. Elongation

Une fois les complexes d'initiation mis en place et le phagophore formé, la LC3 cytosolique (LC3-I) est couplée à la PE (phosphatidylethanolamine) (LC3-II) afin d'être ancrée dans la membrane du phagophore. L'enrichissement en LC3-II est un signal qui participerait à l'élongation et à la clôture des autophagosomes (Weidberg *et al.*, 2011). La lipidação de la LC3 se fait grâce à deux réactions successives de type conjugaison d'ubiquitine, qui aboutissent à la formation du complexe ATG5 et à la LC3-II. Au niveau du

PAS, ATG12 est activé par ATG7 (enzyme de type E1), transféré à ATG10 (enzyme de type E2) et conjugué à ATG5. Ensuite, le conjugué ATG12-ATG5 recrute et forme un complexe avec ATG16L1 (**Figure 25a**). Par ailleurs, la pro-LC3 est relocalisée au niveau du PAS et clivée sous forme LC3-I par la protéase ATG4B. Ensuite la LC3-I est activée par ATG7, transférée à ATG3 (enzyme de type E2) et conjuguée à la PE grâce au complexe ATG5 précédemment formé (**Figure 25b**) (Otomo et al., 2013). La petite GTPase RAB33B, localisée au niveau du Golgi, régulerait la formation de l'autophagosome par l'intermédiaire d'ATG16L1 en stimulant la production de LC3-II (Itoh et al., 2008).

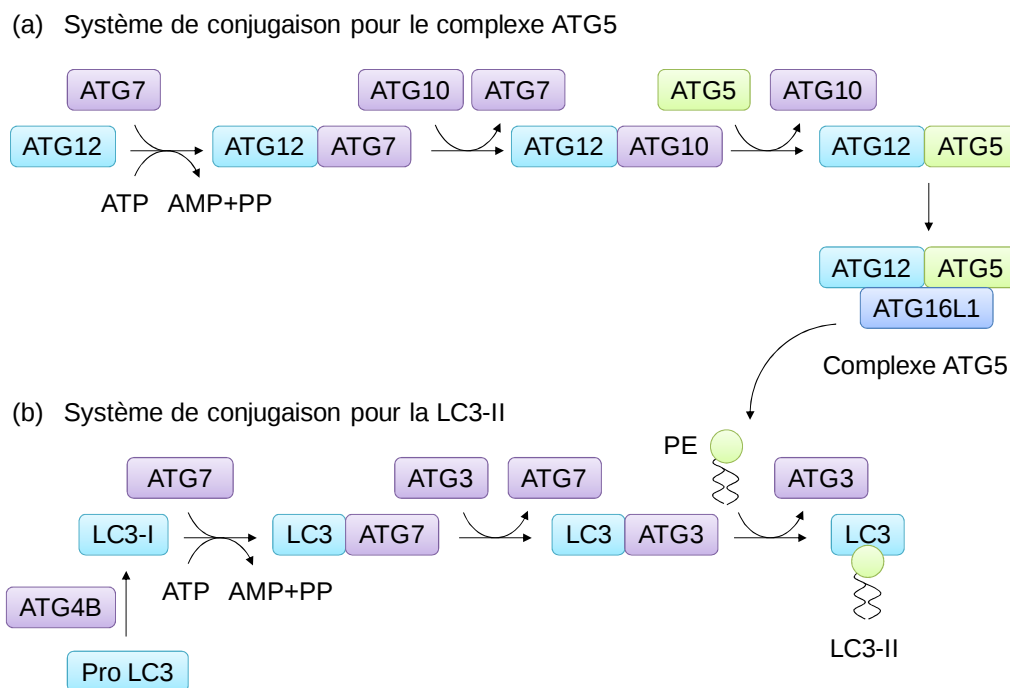


Figure 25 : Systèmes de conjugaison de type ubiquitine impliqués dans la formation de LC3-II

(a) Le premier système de conjugaison permet l'interaction des protéines ATG12, ATG7, ATG10 afin de former le complexe protéique ATG12-ATG5-ATG16L1. (b) Le second système de conjugaison fait intervenir les protéines ATG7, LC3-I, ATG3 et le lipide PE pour former la LC3-II.

Le phagophore naissant au niveau du RE récupère des membranes pour s'agrandir qui proviennent de la mitochondrie, de la membrane plasmique où des endosomes recyclés (Hailey et al., 2010 ; Ravikumar et al., 2010 ; Knævelsrud et al., 2013). Ainsi, le phagophore qui prend place au niveau du RE acquiert des vésicules ATG16L1 positives provenant de la membrane plasmique, suite à l'endocytose dépendante des clathrines (Ravikumar et al., 2010). De plus, la petite GTPase ARF6 active la PI4P5K (phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase) qui produit du PI(4,5)P₂ au niveau de la membrane plasmique, ce qui apporterait de la membrane issue de l'endocytose au phagophore (Moreau et al., 2012). Certaines petites GTPase comme SAR1 (secretion associated ras-superfamily gene) et RAB1,

impliquées dans le trafic entre le RE et le Golgi, auraient un rôle dans la formation de l'autophagosome (Carlos Martín Zoppino *et al.*, 2010).

D'autre part, ATG9, qui est la seule protéine de la famille ATG transmembranaire, est essentielle à la formation des phagophores, même si son rôle n'est pas identifié (Orsi *et al.*, 2012). Cette protéine se déplace entre le PAS et les sites périphériques, ce qui apporterait des lipides nécessaires à l'élongation du phagophore et participerait au contrôle de la taille de l'autophagosome (Orsi *et al.*, 2012). La protéine TBC1D14, responsable de la séquestration d'ULK (cf. II.1.2.), serait également impliquée dans l'inhibition d'ATG9. En condition de carence nutritive TBC1D14 est relocalisée au Golgi, ce qui libérerait ATG9 et permettrait l'apport de membranes au phagophore (Longatti *et al.*, 2012). D'autres protéines comme le complexe ULK, WIPI et RAB1 contrôlent les mouvements d'ATG9 (Young, 2006; Webber et Tooze, 2010; Winslow *et al.*, 2010). De plus, VMP1 décrite comme activant BECLIN1 (cf. II.1.2.), est une autre protéine transmembranaire qui apporterait des lipides au niveau du PAS (Longatti et Tooze, 2009).

Grâce aux divers apports de membrane, le phagophore s'agrandit puis les protéines ATG2 et WIPI participeraient à la clôture de l'autophagosome. Avant que cette vacuole ne se referme, les protéines ATG se dissocient et il ne reste plus que la LC3-II à leur surface. Cette vacuole à double membrane est ainsi riche en LC3-II sur la face cytosolique et sur la face interne (Velikkakath *et al.*, 2012).

1.4. Maturation

Les autophagosomes nouvellement formés se déplacent le long des microtubules dans les deux directions : le sens (+) vers la membrane plasmique et le sens (-) vers le centre organisateur des microtubules (MTOC, microtubule organizing center). Les déplacements dans le sens (+) se font grâce à la protéine adaptatrice FYCO1 (FYVE et coiled-to-coil domain containing protein) qui lie la LC3-II et le PI3P, présents à la surface de l'autophagosome, ainsi que RAB7 et la kinésine. Le rôle de ces déplacements n'est pas décrit mais il est possible qu'ils permettent l'acquisition de membranes (Pankiv *et al.*, 2010). Les déplacements dans le sens (-) ont lieu par la protéine adaptatrice p150^{Glued} qui lie les protéines RILP (RAB-interacting lysosomal protein) et ORPL1 (oxysterol-binding protein-related protein) présentes sur l'autophagosome ainsi que RAB7 et le complexe dynéine/dynactine (Johansson *et al.*, 2007). Une fois formés de façon aléatoire dans le cytosol, les autophagosomes sont transportés le long des microtubules vers le MTOC où les lysosomes sont habituellement concentrés (Fass *et al.*, 2006). Le rapprochement des autophagosomes avec les lysosomes permet leur fusion et la formation d'autolysosomes. La protéine OATL1 (ornithine amino-transferase-like protein) lie la LC3-II à la surface des autophagosomes et inactive RAB33B, ce qui empêcherait l'ancrage du complexe ATG5 afin que l'autophagosome puisse fusionner avec les lysosomes (Itoh *et al.*, 2011). D'autres

protéines comme ESCRT (endosomal sorting complexes required for transport) ou DRAM (damage-regulated autophagy modulator) ainsi que le complexe c-VPS-RAB7-UVRAG et PI3KC3/p150-BECLIN1-UVRAG réguleraient positivement cette fusion (Crichton et al., 2006 ; Liang et al., 2008 ; Rusten et Stenmark, 2009 ; Zhong et al., 2009).

Les événements de fusion membranaire se font généralement par les complexes SNARE formés des sous-unités Qa, Qb et Qc présentes à la surface d'une des membranes à fusionner et de la protéine R-SNARE présente sur l'autre membrane à fusionner. Ici, les protéines impliquées sont la STX17 (Qa) et SNAP29 (synaptosome associated protein 29kDa) (Qb, c) au niveau des autophagosomes ainsi que VAMP8 (vesicle-associated membrane protein) (R-SNARE) au niveau des lysosomes (Itakura et al., 2012) (**Figure 26a**). La STX17 peut également interagir avec les protéines du complexe HOPS (homotypic fusion et protein sorting) pour induire la fusion entre les autophagosomes et les lysosomes (Jiang et al., 2014). Même si aucun mécanisme n'est identifié, la STX17 serait recrutée uniquement sur les autophagosomes afin d'éviter leur fusion précoce avec les lysosomes (Itakura et al., 2012). La protéine ATG14L, qui participe aussi à l'initiation de l'autophagie (cf. II.1.2), favorise cette fusion en modulant le complexe STX17-SNAP29-VAMP8 (**Figure 26b**) (Diao et al., 2015). Les différentes activités d'ATG14L proviendraient de la conformation de cette protéine organisée en monomère dans le complexe PI3K et oligomérisée pour interagir avec les protéines SNARE.

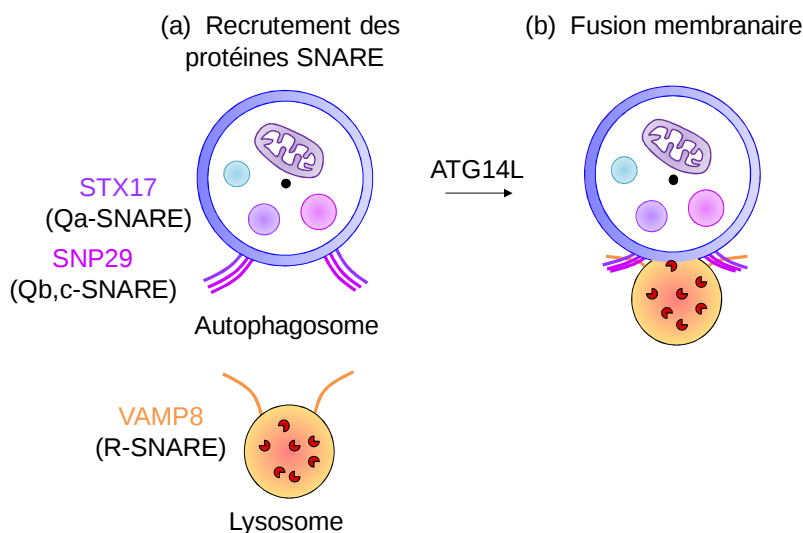


Figure 26 : Fusion membranaire entre l'autophagosome et le lysosome

La fusion entre la membrane de l'autophagosome et celle du lysosome passe par **(a)** le recrutement des protéines SNARE STX17, SNAP29 et VAMP8 puis **(b)** grâce à ATG14L, le lysosome fusionne avec l'autophagosome.

Une fois les autolysosomes formés, les hydrolases lysosomales, les cathepsines et les lipases dégradent les composés séquestrés dans la vacuole ainsi que la membrane interne. Les cathepsines détruisent également la LC3-II présente sur la face interne de l'ancien autophagosome tandis que le recyclage de la protéine LC3-II présente sur la face cytosolique de la vacuole a été réalisé par la protéase ATG4B par délipidation. Les ATPases lysosomales font chuter le pH intravacuolaire, ce qui fait partie du processus dégradatif. Les perméases de la membrane lysosomale permettraient notamment de relarguer des acides aminés dans le cytosol de la cellule hôte, qui pourront être utilisés pour synthétiser de nouvelles protéines. L'augmentation du niveau de nutriments réactive le complexe mTORC et active la restauration des lysosomes autophagiques (ALR, autophagic lysosome reformation). La protéine RUBICON (Run domain becclin1-interacting et cysteine-rich domain-containing protein) séquestre UVRAG du complexe c-VPS-RAB7-UVRAG, ce qui bloque l'activation de RAB7 (Sun *et al.*, 2010). Cette interaction participerait au recyclage des lysosomes autophagiques qui semble avoir lieu sur des vacuoles où RAB7 n'est plus présent. Ce recyclage passe par la formation de longs tubules sur les autolysosomes puis ces vacuoles subissent des étapes de maturation qui s'achèvent par la formation de nouveaux lysosomes (Yu *et al.*, 2010).

2. Les bactéries intracellulaires et l'autophagie

L'autophagie est une voie de l'immunité autonome des cellules eucaryotes permettant la dégradation des micro-organismes qui envahissent le cytosol comme les virus, les parasites ou les bactéries. La xénophagie a été décrite pour la première fois en 1984 par Y. Rikihisa qui a observé qu'une infection par la bactérie *Rickettsia tsutsugamushi* induit la formation d'autophagosomes remplis de granules de glycogène qui mûrissent en autolysosomes et contiennent des bactéries dégradées (Rikihisa, 1984). Bien que l'autophagie permette d'éliminer les micro-organismes, certains d'entre eux ont mis en place des stratégies pour inhiber ou détourner cette voie cellulaire à leur avantage. Plus particulièrement, l'autophagie peut être utilisée comme une source de membranes et/ou de nutriments à n'importe quel moment du cycle intracellulaire. L'autophagie est impliquée dans de nombreuses interactions entre les bactéries et l'hôte, qu'elles soient parasitaires ou endosymbiotiques. Il est traité dans ce manuscrit plusieurs exemples représentatifs des relations existant entre les bactéries et l'autophagie cellulaire comme la bactérie endosymbiotique *Sodalis pierantonius* qui est dégradée par l'autophagie de son hôte. D'autres exemples sont évoqués, en particulier les bactéries pathogènes capables d'inhiber ou de détourner l'autophagie cellulaire telle que les bactéries à Gram positif *Streptococcus pyogenes* et *Listeria monocytogenes*, ainsi que les bactéries à Gram négatif *Shigella*

flexneri, *Brucella abortus*, *Coxiella burnetii* et *Salmonella* Typhimurium. Dans cette partie, le manuscrit est organisé comme suit avec (i) une introduction rapide de chaque bactérie avec une description du cycle intracellulaire, (ii) le détail de ce qui est connu concernant l'interaction de cette bactérie avec l'autophagie et (iii) un schéma qui résume ces interactions.

2.1. *Sodalis pierantonius*, une bactérie endosymbiotique dégradée par autophagie

Sodalis pierantonius est une bactérie endosymbiotique du charançon du blé, un arthropode ravageur des stocks de céréales à l'origine de lourdes pertes économiques. Cette bactérie à Gram négatif se localise au sein de cellules spécifiques appelées bactériocytes qui forment un organe particulier nommé bactériome. L'interaction mutualiste entre les deux partenaires est finement régulée afin que l'hôte puisse contrôler la charge bactérienne dans son organisme (Anselme *et al.*, 2008). La quantité de bactéries varie en fonction du cycle de développement de l'insecte. Ainsi, tandis que les bactéries présentes au niveau des bactériomes de la muqueuse intestinale prolifèrent lorsque l'insecte est jeune, la quantité de bactérie décroît drastiquement lorsque l'insecte devient adulte. Au contraire, le bactériome ovarien persiste et permet la transmission à la descendance (Vigneron *et al.*, 2014). Dans cet exemple, l'autophagie permet à l'hôte de dégrader et de contrôler la quantité de *S. pierantonius*, qui n'échappe pas à ce mécanisme.

S. pierantonius apporte à l'insecte plusieurs composés comme des acides aminés (Wicker et Nardon, 1982) et des vitamines (Wicher, 1983) qui facilitent notamment la capacité des insectes à voler (Grenier *et al.*, 1994) et à former leur cuticule (Vigneron *et al.*, 2014). Lorsque les insectes sont jeunes, les bactéries présentes dans les bactériomes de la muqueuse intestinale se répliquent (**Figure 27a**), ce qui serait à l'origine d'une augmentation de la concentration en phénylalanine (**Figure 27b**). Cet acide aminé, que l'insecte est incapable de produire, est ensuite métabolisé par ce dernier en dihydroxyphénylalanine, un composé essentiel à la formation de sa cuticule. Une fois la cuticule formée, des signaux encore non identifiés permettent à l'insecte de moduler localement la concentration bactérienne en induisant l'apoptose et l'autophagie dans les bactériomes de la muqueuse intestinale (Vigneron *et al.*, 2014) (**Figure 27c**). Ainsi, *S. pierantonius* est dégradée par l'autophagie de son hôte, ce qui permet de diminuer la quantité de bactéries et par apoptose, ce qui détruit la niche de réplication de la bactérie.

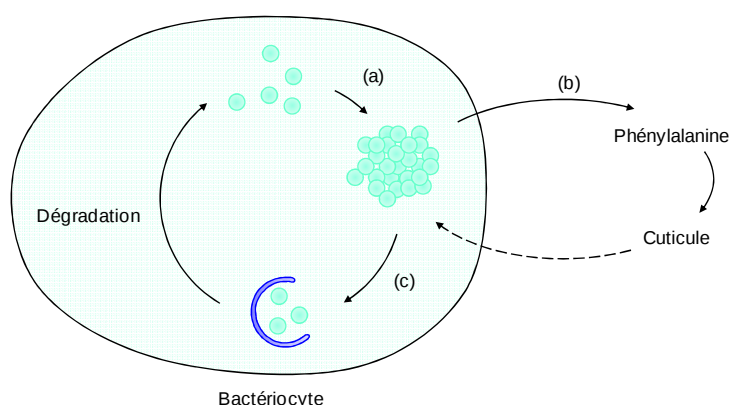


Figure 27 : Rôle de l'autophagie dans le cycle de vie intracellulaire de *Sodalis pierantonius*

(a) *S. pierantonius* est présente au sein de bactériocytes de la muqueuse intestinale où elle se réplique lorsque son hôte est jeune. (b) Cela permet d'apporter de la phénylalanine à son hôte, essentielle à la formation de la cuticule. (c) Une fois la cuticule formée, l'autophagie cellulaire est responsable de la dégradation d'une partie des bactéries au sein des bactériocytes.

2.2. *Streptococcus pyogenes*, une bactérie dégradée par autophagie mais également capable de l'inhiber

Streptococcus pyogenes, encore appelé streptocoque du groupe A (GAS, group A *Streptococcus*), est responsable de plusieurs types d'infections chez l'homme allant de l'angine au syndrome de choc toxique streptococcique. Ce coque à chaînette à Gram positif a longtemps été considéré comme extracellulaire cependant, il est maintenant clair qu'il traverse de nombreuses muqueuses humaines pour envahir des cellules épithéliales (Rohde et Cleary, 2016). Le destin des GAS intracellulaires dépend à la fois de la souche et de la cellule hôte. Ainsi, ces bactéries peuvent être dégradées, survivre ou se répliquer. De ce fait, dans certaines conditions, les GAS peuvent être dégradés par autophagie tandis que dans d'autres conditions, ils peuvent l'inhiber ou la détourner pour en bénéficier.

Une fois entrée dans des cellules épithéliales humaines (HeLa), la souche M6 de GAS se retrouve dans une vacuole ayant les caractéristiques des endosomes (**Figure 28a**). La bactérie s'échappe ensuite de cet endosome puis se retrouve dans le cytosol grâce à la toxine bactérienne SLO (streptolysine O), transloquée par le système Sec, qui crée des pores dans la vacuole contenant la bactérie (Nakagawa *et al.*, 2004) (**Figure 28a**). Les GAS sont marqués dans le cytosol par l'ubiquitine et le récepteur autophagique NDP52 (Thurston *et al.*, 2009) (**Figure 28a**). Cela induit la formation d'une vacuole similaire aux autophagosomes (GcAv, GAS-containing autophagosome-like vacuoles) qui est positive pour les marqueurs autophagiques LC3 et ATG5 (Nakagawa *et al.*, 2004 ; Yamaguchi *et al.*, 2009) (**Figure 28a**). Par ailleurs, l'infection à GAS est liée à une stimulation de l'autophagie à la fois dans des cellules épithéliales humaines (HeLa) et dans des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF, mouse embryonic fibroblast) (Nakagawa *et al.*, 2004) (**Figure 28a**). De plus, l'utilisation de fibroblastes embryonnaires de souris déficients pour

l'autophagie a montré que la formation des GcAv est dépendante de l'autophagie cellulaire puisque ces structures ne sont plus présentes dans ce type de cellules (Nakagawa *et al.*, 2004). Finalement, l'étude du destin des GcAv indique qu'elles acquièrent les caractéristiques des autolysosomes et que cela aboutit à la dégradation des bactéries même si le mécanisme semble retardé (Nakagawa *et al.*, 2004) (**Figure 28a**). De façon plus générale, l'étude de la réplication bactérienne des souches M1, M4, M6, M12, M49 dans des pneumocytes humains (A549) a révélé qu'aucune de ces souches n'est capable de se multiplier. Néanmoins, l'inhibition de l'autophagie dans ces cellules induit la réplication de la souche M49 suggérant que l'autophagie est bien à l'origine de l'élimination des bactéries (Lu *et al.*, 2015). De nombreuses petites GTPases ont été identifiées comme nécessaires à la formation des GcAv et à la dégradation de la bactérie par autophagie (**Figure 28a**). Ainsi RAB5 et RAB7, en plus d'être impliqués dans l'entrée de la bactérie, ont un rôle dans la formation et la fusion des endosomes contenant la bactérie (Yamaguchi *et al.*, 2009 ; Sakurai *et al.*, 2010). De plus, RAB7 participe à la fusion des endosomes contenant la bactérie et des GcAv avec les lysosomes (Sakurai *et al.*, 2010). Tandis que RAB23 est impliqué dans la formation des GcAv par un mécanisme non élucidé (Nozawa *et al.*, 2012), RAB17 permet la formation des GcAv par l'apport de membrane du RE (Haobam *et al.*, 2014). RAB9A induit à la fois l'augmentation de la taille des GcAv par leur fusion homotypique et la fusion des GcAv avec les lysosomes (Nozawa *et al.*, 2012).

Bien qu'il ait été démontré que l'autophagie est responsable de l'élimination des GAS et en particulier de la souche M6 dans des cellules épithéliales (HeLa, A549), des études ont montré des données différentes dans d'autres types cellulaires. Dans des cellules épithéliales (HeLa), la présence de la toxine SLO et l'échappement des bactéries dans le cytosol est lié à une survie diminuée de la souche M6 ou M3 de GAS. La présence de cette toxine promeut l'augmentation du recrutement de la LC3 au niveau des bactéries, ce qui conduit à leur dégradation par autophagie (Sakurai *et al.*, 2010 ; O'Seaghdha et Wessels, 2013). Au contraire, dans des kératinocytes oropharyngés primaires immortalisés (OKP7), la présence de la SLO est liée à une survie améliorée de ces deux souches. Une fois dans le cytosol de ces cellules, les bactéries sont ubiquitinées, acquièrent le marqueur autophagique LC3 puis le marqueur lysosomal LAMP1 (Thurston *et al.*, 2009 ; O'Seaghdha et Wessels, 2013). Cependant, le flux autophagique et notamment la fusion avec les lysosomes est retardé grâce à la protéine bactérienne NADase (NAD (nicotinamide adenine dinucleotide) glycohydrolase), ce qui prolonge la survie des bactéries (O'Seaghdha et Wessels, 2013). Cette protéine est transloquée par le système sec, traverse la membrane de la vacuole grâce aux pores formés par la SLO puis le mécanisme d'action de cette protéine envers l'autophagie reste à être identifié (O'Seaghdha et Wessels, 2013). Enfin, la reconnaissance des membranes endommagées issues de la vacuole contenant la souche M3 stimule l'autophagie et recrute la galectine-8. Cela participerait à la séquestration au sein

d'autophagosomes de bactéries libres dans le cytosol ou de bactéries dans des membranes endommagées (O'Seaghdha et Wessels, 2013). Ainsi, dans des kératinocytes oropharyngés (OKP7) l'autophagie ne serait pas à l'origine de l'élimination des bactéries mais leur permettrait de survivre un peu plus longtemps.

Les cellules endothéliales humaines (HMEC-1, human microvesicular endothelial cell line) sont permissives à la réplication des souches M1, M4, M6, M12 et M49 de GAS (Lu *et al.*, 2015). En particulier, la souche M49 est internalisée dans un endosome dont elle s'échappe grâce à la SLO (**Figure 28b**). Ensuite, les bactéries dans le cytosol sont internalisées dans un autophagosome positif pour le marqueur autophagique LC3, qui acquiert le marqueur lysosomal LAMP1 (**Figure 28b**). Néanmoins, le flux autophagique et notamment l'acidification de l'autolysosome est inhibée, ce qui permet la réplication bactérienne (Lu *et al.*, 2015). Même si les facteurs bactériens responsables de l'inhibition de l'acidification n'ont pas été identifiés, il est possible que les pores formés par la SLO permettent le passage des protons (Lu *et al.*, 2015) (**Figure 28b**). De plus, la NADase bactérienne pourrait, comme c'est le cas dans les kératinocytes oropharyngés (OKP7), participer à l'inhibition du flux autophagique en retardant la fusion des lysosomes avec les autophagosomes (O'Seaghdha et Wessels, 2013) (**Figure 28b**). L'inhibition de l'acidification est essentielle à la réplication des bactéries car l'acidification modifie l'expression de facteurs de virulence bactériens tels que la SLO et la NADase (Lu *et al.*, 2015). Les cellules endothéliales humaines (HMEC-1) ne sont pas les seules à être permissives à la réplication des GAS. En effet, les macrophages dérivés de monocytes humains (THP-1) permettent également la réplication de la souche M1 qui aurait le même destin que la souche M49 dans les cellules endothéliales (Bastiat-Sempe *et al.*, 2014) (**Figure 28b**).

Enfin, le destin des GAS intracellulaires n'est pas seulement distinct en fonction des cellules hôtes, il peut aussi être différent selon la souche bactérienne. C'est en particulier le cas de la souche M6 et de la souche responsable d'infections actuelles M1T1 dans des cellules épithéliales humaines du larynx (Hep-2). Les bactéries pénètrent dans les cellules hôtes où elles se retrouvent au sein d'un endosome dont elles s'échappent pour se répliquer dans le cytosol (Barnett *et al.*, 2013) (**Figure 28c**). Tandis que la souche M6 est éliminée par l'autophagie cellulaire la souche M1T1 inhibe cette voie et se réplique dans ces cellules hôtes (Barnett *et al.*, 2013) (**Figure 28d, e**). Plus particulièrement, la souche M1T1 empêche la reconnaissance de la bactérie cytosolique par l'ubiquitine, les récepteurs autophagiques NDP52, P62/SQSTM1 et NBR1 ainsi que le marqueur autophagique LC3 (Barnett *et al.*, 2013) (**Figure 28e**). Même si aucun mécanisme n'a été découvert, c'est grâce à la protéine bactérienne de surface SpeB (streptococcal pyrogenic exotoxin), et probablement à son activité protéase à cystéine, que cette souche échappe à l'autophagie cellulaire (**Figure 28e**). En effet, cette protéine exprimée à partir d'un plasmide dans la souche M6 permet à cette dernière d'inhiber l'autophagie cellulaire et de se répliquer. Parallèlement, la délétion

de cette protéine dans la souche M1T1 limite la réplication bactérienne (Barnett *et al.*, 2013). De façon cohérente, la souche M12 qui exprime la protéine SpeB, se réplique dans ces cellules tandis que la souche M4 dépourvue de cette protéine, ne se réplique pas. Comme les souches M1T1 et M12 sont responsables d'infections actuelles, l'acquisition de cette protéine bactérienne pourrait résulter de l'adaptation des bactéries (Barnett *et al.*, 2013).

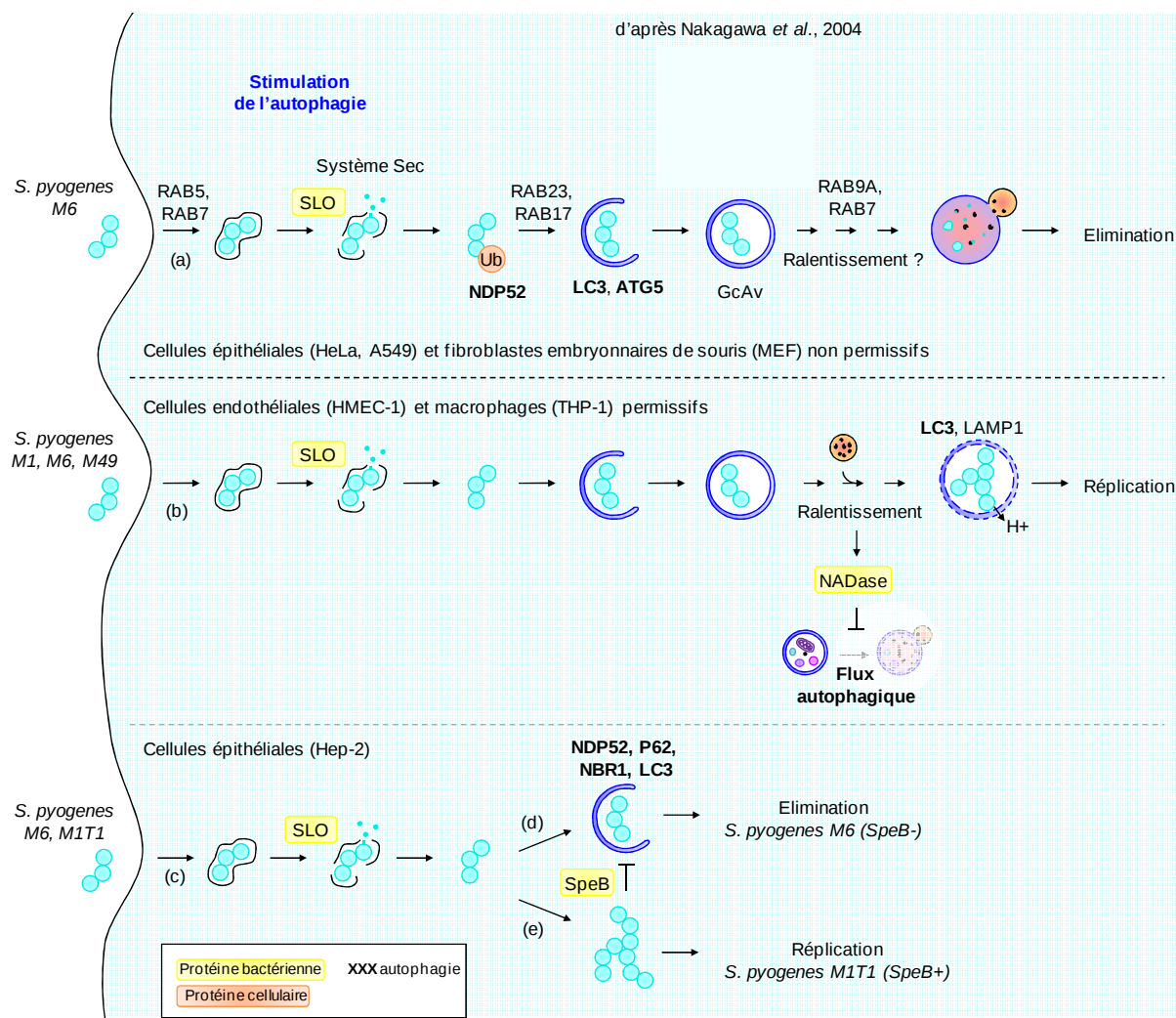


Figure 28 : Rôle de l'autophagie dans le cycle de vie intracellulaire de *Streptococcus pyogenes*

Suite à son entrée dans les cellules hôtes, GAS se retrouve dans une vacuole de laquelle il s'échappe grâce à l'activité de la protéine bactérienne SLO, transloquée par le système Sec. **(a)** Dans des cellules non permissives, l'infection par la souche M6 de GAS stimule l'autophagie et la bactérie cytosolique est reconnue par l'ubiquitine, NDP52, ATG5 et la LC3, ce qui forme une GcAv qui suit les étapes de maturation des autophagosomes. Même si le mécanisme semble ralenti, les GcAv fusionnent avec les lysosomes, ce qui conduit à la dégradation des bactéries. De nombreuses petites RAB GTPases comme RAB5, 7, 9A, 17 et 23 sont impliquées dans le destin des bactéries. **(b)** Dans des cellules endothéliales et des macrophages permissifs, les souches M1, M6 et M49 de GAS inhibent le flux autophagique grâce à la protéine bactérienne NADase. De plus l'acidification de la GcAv est limitée probablement par la formation de pores par la SLO. Les bactéries peuvent alors se répliquer. **(c)** Dans les cellules épithéliales permissives, la souche M6 est dégradée par l'autophagie suite à la reconnaissance de la bactérie par l'ubiquitine, NDP52, P62, NBR1 et la LC3. La souche M1T1 inhibe cette reconnaissance par la machinerie autophagique grâce à la protéine bactérienne SpeB puis se réplique.

2.3. Exemples de bactéries qui inhibent l'autophagie

2.3.a. *Shigella flexneri*

Shigella flexneri est responsable de la dysenterie bacillaire chez l'homme, une maladie diarrhéique sévère endémique dans les pays en développement. Ce bacille à Gram négatif infecte à la fois des cellules phagocytaires et non phagocytaires. La virulence de cette bactérie dépend notamment de son SST3 (système de sécrétion de type III), activé dès le contact avec la cellule hôte et par lequel une trentaine d'effecteurs bactériens peuvent être sécrétés (Ashida *et al.*, 2015). Ces effecteurs permettent à la bactérie d'interagir avec son hôte et sont essentiels tout au long du cycle de vie intracellulaire. L'entrée de *S. flexneri* dans les cellules épithéliales de la barrière intestinale se fait de façon active suite à l'injection d'effecteurs qui induisent la polymérisation d'actine et la formation de pseudopodes. La bactérie se retrouve alors dans un phagosome à simple membrane d'où elle s'échappe afin de se répliquer dans le cytosol. Ensuite, des effecteurs manipulent une nouvelle fois le cytosquelette d'actine afin de promouvoir l'acquisition d'une queue d'actine à un pôle bactérien qui rend la bactérie mobile et lui permet d'infecter les cellules avoisinantes. La propagation dans ces cellules engendre la formation d'une vacuole à double membrane autour de la bactérie dont elle s'échappe grâce à d'autres effecteurs, puis la bactérie se réplique de nouveau dans le cytosol de la cellule hôte et l'infection continue (Valencia-Gallardo *et al.*, 2015 ; Agaisse, 2016). L'interaction entre *S. flexneri* et l'autophagie a lieu tout au long du cycle intracellulaire, dès l'entrée de la bactérie jusqu'à la propagation de celle-ci dans une autre cellule. Même si la bactérie exprime des effecteurs capables d'inhiber cette voie cellulaire, une minorité des bactéries sont tout de même dégradées par l'autophagie.

Au niveau du site d'entrée de la bactérie, les senseurs cellulaires du peptidoglycane NOD1 (nucleotide oligomerization domain) et NOD2 recrutent ATG16L1 et la LC3, ce qui initie l'autophagie et conduit à la dégradation d'une partie des bactéries dès leur entrée (Travassos *et al.*, 2010) (**Figure 29a**). Néanmoins, cette interaction entre ATG16L1 et les récepteurs NOD1 et NOD2 régule également négativement cette voie de l'immunité innée afin de limiter la sécrétion de cytokines inflammatoires (Sorbara *et al.*, 2013). Une fois la bactérie entrée, les effecteurs bactériens IcsB et VirA sécrétés par le SST3 limitent le recrutement de la LC3 sur la vacuole contenant la bactérie (Campbell-Valois *et al.*, 2015) (**Figure 29b**). Par ailleurs, l'infection à *S. flexneri* provoque une stimulation de l'autophagie par l'inhibition de mTOR et l'induction d'une carence nutritive en acides aminés (Tattoli *et al.*, 2012a). Bien que la bactérie induise une diminution de la concentration cellulaire des acides aminés leucine et isoleucine, l'activation de l'autophagie par la voie de carence nutritive se fait également lorsque la bactérie endommage les membranes de sa vacuole grâce à des effecteurs bactériens (Tattoli *et al.*, 2012a). Afin d'être dégradées par l'autophagie, les vacuoles endommagées par la bactérie sont ubiquitinées et reconnues par le récepteur autophagique P62/SQSTM1 ainsi que la protéine LC3 (Dupont *et al.*, 2009) (**Figure 29c**). De

plus, la galectine-8 reconnaît les glycanes de l'hôte exposés à la surface de ces vacuoles endommagées, ce qui permet le recrutement du récepteur autophagique NDP52 et de la LC3, dirigeant également les vacuoles endommagées vers les autophagosomes (Thurston *et al.*, 2012) (**Figure 29c**). Bien qu'aucun mécanisme ne soit décrit, l'interaction entre l'effecteur IcsB et la protéine cellulaire TOCA1 (transducer of Cdc42-dependent actin assembly protein) limite le recrutement de NDP52 et de la LC3 (Baxt et Goldberg, 2014) (**Figure 29c**). Il est possible qu'une partie des vacuoles endommagées ciblées par la galectine-8 et l'autophagie soient réparées comme c'est le cas pour les vacuoles contenant *S. Typhimurium* (Thurston *et al.*, 2012 ; Kreibich *et al.*, 2015) ([cf. II.2.4.](#)). D'autre part, même si la stimulation de l'autophagie semble liée à la présence de membranes endommagées, il n'est pas à exclure que la bactérie libre dans le cytosol participe à cette activation.

Une fois que les bactéries se sont échappées de leur phagosome, elles se retrouvent dans le cytosol où elles peuvent se répliquer (**Figure 29d**). L'effecteur bactérien VirA permet alors à la bactérie d'inhiber l'autophagie cellulaire en inactivant RAB1, une petite GTPase impliquée dans le trafic du RE au Golgi qui aurait un rôle dans la formation de l'autophagosome (Dong *et al.*, 2012). Au moment de la réplication bactérienne, *S. flexneri* accumule à un pôle l'effecteur bactérien IcsA afin de promouvoir sa mobilité par la formation d'une queue d'actine (**Figure 29e**). Cependant, cet effecteur bactérien est reconnu par la protéine cellulaire de la machinerie autophagique ATG5 qui interagit avec les protéines TECPR1 (tectonin beta-propeller repeat containing) et WIPI2 afin de former un phagophore autour de la bactérie (Ogawa *et al.*, 2005 ; Ogawa *et al.*, 2011) (**Figure 29e**). De plus, des résidus d'ubiquitine ainsi que les récepteurs autophagiques p62/SQSTM1, NDP52 et la LC3 sont également recrutés au niveau du pôle bactérien (**Figure 29e**). Ces protéines localisent aussi avec la septine qui immobilise la bactérie en formant une cage, ce qui faciliterait la dégradation des bactéries par autophagie (Mostowy *et al.*, 2010, 2011) (**Figure 29e**). Pour déjouer ce mécanisme, la bactérie sécrète IcsB, un effecteur qui interagit avec IcsA et entre en compétition avec ATG5 car IcsB a une affinité plus forte pour IcsA qu'ATG5. L'effecteur IcsB camoufle ainsi la bactérie et évite sa reconnaissance par la machinerie autophagique (Ogawa *et al.*, 2005). Après s'être répliquée et avoir acquis sa queue d'actine, *S. flexneri* se propage de cellule en cellule (**Figure 29f**). En traversant les deux membranes plasmiques, celle de la cellule donneuse et celle de la cellule receveuse, la bactérie entre dans la cellule voisine au sein de deux membranes reconnues par la LC3. Les effecteurs bactériens IcsB et VirA facilitent l'échappement au recrutement de la LC3 sur la vacuole, ce qui permet à la bactérie de continuer son cycle de vie intracellulaire et de se propager (Campbell-Valois *et al.*, 2015) (**Figure 29f**).

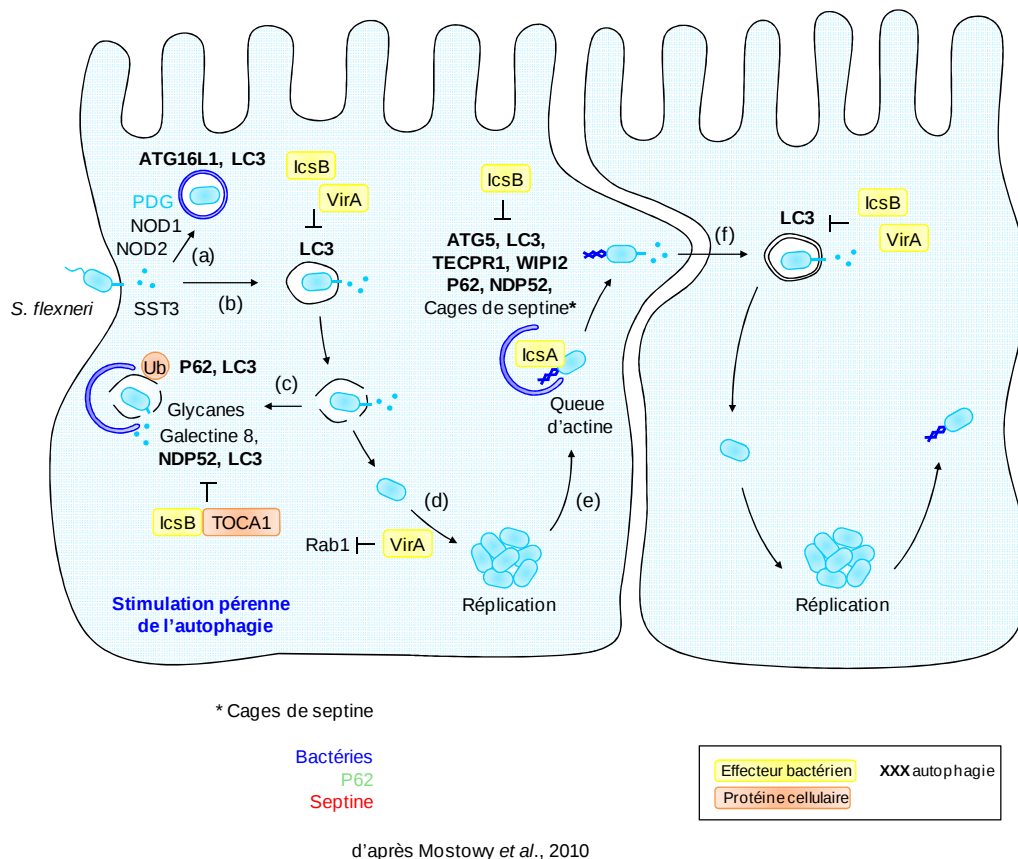


Figure 29 : Rôle de l'autophagie dans le cycle de vie intracellulaire de *Shigella flexneri*

Suite à l'infection de cellule par *S. flexneri*, l'autophagie cellulaire est stimulée. **(a)** Les senseurs NOD1 et NOD2 du PDG (peptidoglycane) induisent le recrutement d'ATG16L1 et de la LC3 à la surface de la bactérie, ce qui aboutit à la dégradation d'une partie des bactéries. **(b)** Les bactéries qui ne sont pas dégradées se retrouvent dans une vacuole dont la reconnaissance par la LC3 est inhibée par les effecteurs bactériens IcsB et VirA. **(c)** Ensuite la bactérie endommage la membrane de la vacuole qui peut être reconnue par l'ubiquitine, P62 et la LC3. De plus, la galectine-8, reconnaît les glycanes exposés à la surface de la vacuole et recrute NDP52 et LC3. Cela permet la réparation des vacuoles et/ou la dégradation d'une partie des bactéries. L'effecteur IcsB, en interagissant avec TOCA1 limite la reconnaissance des vacuoles endommagées par l'autophagie cellulaire. **(d)** Une fois dans le cytosol, l'effecteur bactérien VirA inhibe RAB1, ce qui limite la reconnaissance de la bactérie par l'autophagie, puis la bactérie se réplique. **(e)** L'acquisition à un pôle bactérien de l'effecteur IcsA permet la mobilité de la bactérie grâce à une queue d'actine mais promeut également le recrutement de divers acteurs de la réponse autophagique. Néanmoins, l'effecteur IcsB en interagissant avec IcsA camoufle la bactérie pour éviter sa dégradation par autophagie. **(f)** La bactérie se propage finalement dans une cellule voisine où elle se retrouve dans une vacuole à double membrane dont la reconnaissance par l'autophagie est inhibée par l'action des effecteurs bactériens IcsB et VirA.

2.3.b. *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes est à l'origine d'une zoonose nommée listériose qui est, par exemple, responsable de septicémies ou d'avortements chez la femme enceinte. Ce bacille à Gram positif infecte à la fois des cellules phagocytaires et non phagocytaires. La virulence de cette bactérie dépend en particulier de son système de translocation Sec par lequel de nombreuses protéines bactériennes peuvent être transloquées et interagir avec la cellule hôte. Les internalines bactériennes InlA (internaline) et InlB permettent à la bactérie de promouvoir son entrée en induisant une invagination de la membrane plasmique. Ensuite, la

bactérie réside dans un phagosome à simple membrane qui débute la voie de dégradation endocytaire et s'acidifie, ce qui est un signal lié à la sécrétion par la bactérie de deux Plc (phospholipases [C](#)) et de la toxine LLO (listériolysine [O](#)). Ces protéines perforent le phagosome permettant ainsi à la bactérie de s'échapper dans le cytosol. Une fois dans le cytosol, la bactérie manipule le cytosquelette d'actine, grâce à la protéine bactérienne ActA ([actin assembly-inducing protein](#)), afin de s'entourer d'actine. Ensuite, la bactérie se réplique puis l'actine est réorganisée sous forme d'une queue présente à un pôle bactérien, ce qui rend la bactérie mobile et lui permet d'infecter les cellules avoisinantes. La propagation de la bactérie engendre la formation d'une vacuole à double membrane dans les cellules nouvellement infectées dont la bactérie s'échappe grâce aux Plc et à la LLO, puis l'infection continue (Tilney et Portnoy, 1989 ; Camejo *et al.*, 2011). Même si l'autophagie cellulaire est responsable de la dégradation d'un tiers des bactéries, *L. monocytogenes* a développé des mécanismes pour inhiber cette voie cellulaire, en masquant notamment sa surface et en perturbant le flux autophagique.

L'entrée de la souche 10403S de *L. monocytogenes* dans les cellules s'accompagne de l'accumulation de DAG à la surface de la vacuole qui proviendrait de l'activité des Plc de la bactérie. La présence de DAG promeut l'activation des ROS, ce qui induit le recrutement de la LC3 au niveau de cette vacuole à simple membrane. Ce mécanisme de phagocytose associée à la LC3 (LAP, [LC3-associated phagocytosis](#)) a été décrit comme permettant de dégrader des agents pathogènes. Cependant, *L. monocytogenes* échappe à cette dégradation en mettant en place un mécanisme inconnu à ce jour, qui conduit à la formation de spacieux phagosomes (SLAP, [spacious Listeria-containing phagosomes](#)) qui seraient à l'origine d'infections persistantes (Lam *et al.*, 2013) (**Figure 30a**).

Par ailleurs, l'infection par la souche 10403S de *L. monocytogenes* induit une stimulation transitoire de l'autophagie dès l'échappement de la bactérie dans le cytosol, jusqu'au début de la réplication bactérienne (Tattoli *et al.*, 2013). Plus précisément, cette stimulation résulte de l'inhibition de mTOR et de l'activation de la voie de carence nutritive en acides aminés (Tattoli *et al.*, 2013). Même si les mécanismes mis en place ne sont pas identifiés, il est possible que les dommages membranaires de la vacuole contenant la bactérie participent à cette activation, comme cela a été observé pour *S. flexneri* (Tattoli *et al.*, 2012a) ([cf. II.2.3.a.](#)). De plus, certaines bactéries sont ciblées par la galectine-8 et les protéines impliquées dans la formation des phagophores DFCP1 et ATG16L1 (Thurston *et al.*, 2012 ; Tattoli *et al.*, 2013) (**Figure 30b**). Cependant, il n'est pas élucidé si ces protéines sont recrutées au niveau des bactéries libres dans le cytosol afin de les dégrader ou si elles se retrouvent au niveau de bactéries localisées au sein de vacuoles endommagées. Dans ce cas, la stimulation de l'autophagie pourrait conduire à la dégradation de ces vacuoles ou à leur réparation, comme c'est le cas pour les vacuoles endommagées contenant *S. Typhimurium* (Thurston *et al.*, 2012 ; Kreibich *et al.*, 2015) ([cf. II.2.4.](#)). Néanmoins, cette

stimulation de l'autophagie a pour conséquence de dégrader jusqu'à un tiers de la souche 10403S de *L. monocytogenes*, ce qui retarde la réplication bactérienne (Py *et al.*, 2007 ; Meyer-Morse *et al.*, 2010 ; Cemma *et al.*, 2015) (**Figure 30c**). De façon intéressante, la souche EGD-e (E.G.D. Murray, découverte de *L. monocytogenes*) de *L. monocytogenes* inhibe d'avantage l'autophagie cellulaire puisque moins de 10% des bactéries sont ciblées par la LC3 (Cemma *et al.*, 2015). Ces résultats suggèrent que la relation entre *L. monocytogenes* et l'autophagie de la cellule hôte est différente en fonction des souches étudiées.

A des temps plus tardifs d'infection, lorsque la bactérie commence à se répliquer, l'autophagie cellulaire retourne au niveau basal et moins de 10% des bactéries de la souche 10403S de *L. monocytogenes* sont dégradées par cette voie (Py *et al.*, 2007 ; Meyer-Morse *et al.*, 2010 ; Cemma *et al.*, 2015) (**Figure 30d**). De plus, à ce stade, la bactérie inhibe l'autophagie grâce à l'activité des Plc et de la protéine ActA (Birmingham *et al.*, 2007). En effet, les Plc limitent la reconnaissance des bactéries par le récepteur autophagique NDP52 et la LC3 en consommant le PI précurseur du PI3P essentiel à la formation des autophagosomes (Tattoli *et al.*, 2013) (**Figure 30e**). L'incapacité du phagophore à maturer, à cause de l'activité anti-autophagique des Plc, serait à l'origine de la formation de diverses granules dans le cytosol des cellules infectées (**Figure 30e**). Il existe des granules contenant la galectine-8, l'ubiquitine, le récepteur autophagique NDP52 ainsi que les protéines impliquées dans la formation du phagophore DFCP1, ATG16L1 et LC3, suggérant la présence de phagophores entourant des membranes endommagées (Tattoli *et al.*, 2013). D'autres types de granules formées avec de la LLO et des bactéries libres ou avec de la LLO, des protéines ubiquitinées et le récepteur autophagique P62/SQSTM1 sont également retrouvées (Viala *et al.*, 2008).

La délétion de la protéine bactérienne ActA dans les souches 10403S, EGD ou EGD-e de *L. monocytogenes* induit le recrutement de l'ubiquitine et du récepteur autophagique P62/SQSTM1 au niveau des bactéries libres dans le cytosol (Yoshikawa *et al.*, 2009 ; Cemma *et al.*, 2015) (**Figure 30f**). De plus, le récepteur autophagique NDP52 est également impliqué dans le cas de la souche EGD (Mostowy *et al.*, 2011). Néanmoins, toutes ces souches n'interagissent pas de la même manière avec l'autophagie. En effet, tandis que la délétion de la protéine ActA chez la souche EGD ou EGD-e aboutit au recrutement de la protéine LC3 (Yoshikawa *et al.*, 2009 ; Mostowy *et al.*, 2011), la souche 10403S inhibe ce recrutement (Cemma *et al.*, 2015). Cela suggère que cette souche a mis en place d'autres mécanismes pour inhiber l'autophagie cellulaire et que l'activité de la protéine ActA agit en amont de ce mécanisme (Cemma *et al.*, 2015). La protéine ActA recrute la machinerie de polymérisation de l'actine autour de la bactérie afin de masquer sa surface de la reconnaissance par les différents marqueurs de l'autophagie (Yoshikawa *et al.*, 2009) (**Figure 30f**). Ce recrutement est indépendant de la formation d'une queue d'actine, par la

protéine ActA, permettant à la bactérie d'être mobile, même si cela contribue probablement à l'échappement à la dégradation par l'autophagie (Yoshikawa *et al.*, 2009) (**Figure 30g**). De la même façon, la protéine bactérienne InlK recrute la protéine cellulaire MVP (major vault protein) afin de masquer la surface de la bactérie pour abolir sa reconnaissance par la machinerie de l'autophagie (Dortet *et al.*, 2011). Cette voie pourrait agir avant la protéine ActA afin de protéger la bactérie en attendant qu'elle recrute de l'actine pour masquer sa surface (Dortet *et al.*, 2011). Une fois de plus, il est possible que cette voie soit activée différemment en fonction des souches de *L. monocytogenes* étudiées car ce mécanisme a été montré chez la souche EGD-e mais n'a pas été identifié chez la souche 10403S (Cemma *et al.*, 2015).

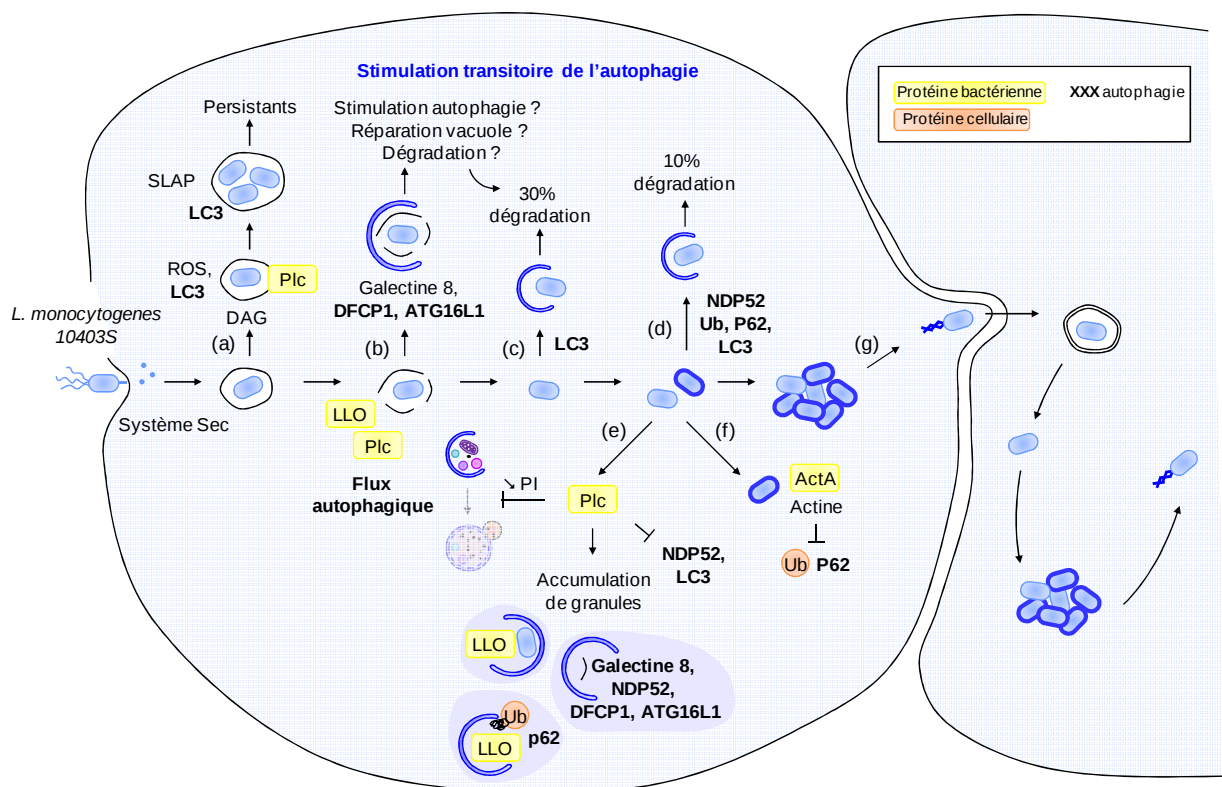


Figure 30 : Rôle de l'autophagie dans le cycle de vie intracellulaire de *Listeria monocytogenes*

Une fois entrée dans les cellules hôtes, *L. monocytogenes* se retrouve dans un phagosome. **(a)** Du DAG s'accumule sur cette vacuole, probablement à cause de l'activité des Plc bactériennes. Le DAG active les ROS, ce qui induit le recrutement de la LC3, ce qui induit le recrutement de la LC3 et la formation de persistants au sein de SLAP. **(b)** Les Plc et la LLO induisent la rupture des phagosomes contenant les bactéries, puis l'autophagie est induite de façon transitoire. Les bactéries au sein de membranes endommagées peuvent être reconnues par la galectine-8, DFCP1 et ATG16L1, ce qui conduit à leur réparation et/ou à leur dégradation. **(c)** De plus, une partie des bactéries libres dans le cytosol sont également dégradées par l'autophagie cellulaire. Ensuite, la bactérie se réplique et l'autophagie retourne au niveau basal, **(d)** lié à la dégradation d'une partie des bactéries. **(e)** Les Plc bactériennes limitent la reconnaissance des bactéries par NDP52 et LC3. De plus, elles inhibent la formation des autophagosomes en consommant le PI, ce qui conduirait à la formation de diverses granules. **(f)** La protéine bactérienne ActA limite la reconnaissance des bactéries libres dans le cytosol par l'ubiquitine et P62 en camouflant la bactérie. Enfin, **(g)** la bactérie acquiert une queue d'actine lui permettant de se propager aux cellules voisines.

2.4. *Salmonella Typhimurium*, une bactérie dégradée par autophagie mais également capable de la détourner

Salmonella Typhimurium (*Salmonella enterica* sérotype Typhimurium) est responsable de gastroentérites chez de nombreuses espèces et notamment chez l'homme. Ce bacille à Gram négatif infecte à la fois des cellules phagocytaires et non phagocytaires. L'entrée de cette bactérie dans les cellules hôtes se fait soit par phagocytose, soit de façon active par la bactérie grâce, entre autre, à son SST3-1. Une fois entrée, la bactérie se retrouve au sein d'un phagosome où elle réprime l'expression du SST3-1 au profit de l'activation du SST3-2 (**Figure 31a**). Le SST3-2, par lequel la bactérie peut sécréter une trentaine d'effecteurs, lui permet d'interagir avec la cellule hôte pour modifier le phagosome et résider dans une vacuole spécifique appelée SCV (*Salmonella*-containing vacuole), favorable à sa réplication. La SCV suit la voie de dégradation endocytaire en interagissant avec des endosomes précoces, des endosomes tardifs et des lysosomes (**Figure 31b**). Actuellement, l'interaction de la SCV avec les lysosomes est controversée puisque la SCV n'acquiert pas la totalité des marqueurs lysosomaux. Il est possible que l'interaction avec les lysosomes soit ralentie ou dépendante de la façon dont la bactérie entre dans les cellules hôtes (LaRock *et al.*, 2015). Une fois la SCV mature, la bactérie se réplique et l'infection continue. Une particularité de l'infection à *S. Typhimurium* est la formation de structures tubulaires membranaires, nommées SIF (pour *Salmonella*-induced filaments), qui proviennent de la SCV et se propagent le long des microtubules vers la membrane plasmique (**Figure 31b**). Bien que le rôle de ces structures ne soit pas déterminé, il est classiquement proposé que les SIF permettent de collecter des composants membranaires, des nutriments, de diluer les enzymes lysosomales ou de promouvoir la stabilité membranaire de la SCV (LaRock *et al.*, 2015). Il est de plus en plus clair qu'une population des bactéries intracellulaires s'échappent de la SCV et se retrouvent dans le cytosol (Knodler, 2015). Cet échappement est principalement lié à la formation de pores induits par le SST3-1 permettant l'entrée des bactéries dans les cellules hôtes. Il existe donc dans les cellules infectées, des bactéries au sein de SCV intactes ou endommagées ainsi que des bactéries libres dans le cytosol (**Figure 31**). Le destin de chacune de ces bactéries est différent, en particulier, le devenir des bactéries cytosoliques dépend du type de cellules hôtes. Ainsi dans des macrophages elles sont dégradées tandis que dans des cellules épithéliales elles prolifèrent efficacement jusqu'à dépasser la réplication des bactéries vacuolaires (Knodler, 2015). L'interaction entre *S. Typhimurium* et l'autophagie a beaucoup été étudiée et c'est notamment grâce à ce modèle d'infection que les récepteurs autophagiques impliqués dans la xénophagie ont été découverts. Néanmoins, même s'il est établi qu'une partie des bactéries dans des vacuoles endommagées ou libres dans le cytosol sont dégradées par cette voie, une étude récente montre que les bactéries pourraient détourner l'autophagie pour en profiter.

Après l'entrée de *S. Typhimurium* dans la cellule hôte, l'autophagie cellulaire est stimulée de façon transitoire tant que la bactérie exprime son SST3-1. Plus particulièrement, cette activation se fait à la fois par la délocalisation de mTOR et l'induction de la voie de carence nutritive en acides aminés. Le rôle de cette réponse n'est pas élucidé mais il est possible qu'elle soit liée à la présence de membranes endommagées par le SST3-1 (Tattoli *et al.*, 2012a, 2012b). L'activation de l'autophagie cellulaire cible jusqu'à 20% des bactéries vers l'autophagie (Birmingham *et al.*, 2006). L'ubiquitine ainsi que les récepteurs autophagiques P62/SQSTM1, NDP52 et la LC3 sont recrutés au niveau des bactéries (Thurston *et al.*, 2009 ; Zheng *et al.*, 2009) (**Figure 31e**). De plus, l'extinction de l'expression de ces récepteurs autophagiques ou de l'autophagie est liée à une meilleure réplication bactérienne suggérant que des bactéries sont dégradées par l'autophagie cellulaire (Birmingham *et al.*, 2006 ; Zheng *et al.*, 2009 ; Thurston *et al.*, 2009). Le DAG et les ROS sont également un signal permettant le recrutement de la LC3 au niveau de la bactérie (Huang *et al.*, 2009 ; Shahnazari *et al.*, 2010) (**Figure 31e**). Il est à noter que ces études ne permettent pas de déterminer si les bactéries ciblées par l'autophagie sont au sein de vacuoles intactes, endommagées ou si il s'agit de bactéries libres dans le cytosol.

Il a été montré que les bactéries au sein de vacuoles intactes peuvent être ciblées par l'autophagie et se retrouver dans une vacuole à multiples membranes (Kageyama *et al.*, 2011) (**Figure 31c**). Par ailleurs, le recrutement de l'ubiquitine et de la LC3 est dépendant du SST3-1 et donc probablement lié à des bactéries présentes dans des vacuoles endommagées ou libres dans le cytosol (Birmingham *et al.*, 2006) (**Figure 31c**). De plus, il a été mis en évidence que la galectine-8 s'accumule au niveau de la SCV, ce qui induit le recrutement du récepteur autophagique NDP52 et de la LC3 (Thurston *et al.*, 2012). La galectine-8 ne reconnaît pas directement la bactérie mais interagit spécifiquement avec les glycanes de l'hôte présents sur la membrane endommagée de la SCV. De plus, l'extinction de l'expression de cette galectine induit une prolifération accrue de la bactérie dans les cellules, ce qui suggère que ce mécanisme aboutit à la dégradation des bactéries dans les vacuoles endommagées (Thurston *et al.*, 2012) (**Figure 31d**). Cependant, le recrutement de la machinerie autophagique au niveau des bactéries dans des vacuoles endommagées permettrait également de les réparer (Kreibich *et al.*, 2015). Il est donc possible que lorsque la bactérie entre dans la cellule hôte grâce à son SST3-1 puis induit des dommages membranaires à sa vacuole, la stimulation de l'autophagie permette la réparation d'une partie de ces vacuoles où la bactérie pourra se répliquer (Tattoli *et al.*, 2012a, 2012b ; Kreibich *et al.*, 2015).

Dans les cellules épithéliales, certaines bactéries s'échappent des SCV endommagées et se retrouvent dans le cytosol où elles se répliquent (**Figure 31f**). Ces bactéries sont reconnues par l'ubiquitine, le récepteur autophagique OPTN, p62/SQSTM1 et la protéine LC3 (Wild, *et al.*, 2011 ; Yu *et al.*, 2014). L'extinction de l'expression du récepteur

autophagique OPTN est liée à une prolifération accrue des bactéries, suggérant que l'autophagie dégrade une partie de ces bactéries cytosoliques (Wild, *et al.*, 2011). Cependant, l'association des bactéries libres dans le cytosol avec le récepteur autophagique p62/SQSTM1 et la LC3 est corrélée avec la réplication de ces bactéries (Yu *et al.*, 2014) (**Figure 31f**). De plus, l'extinction de l'autophagie par inactivation du récepteur autophagique P62/SQSTM1, de la protéine LC3, ATG5 ou ATG16L1 diminue la réplication bactérienne, ce qui suggère que la bactérie profite de l'autophagie. La contradiction entre ces données de réplication (Yu *et al.*, 2014) et celles présentées plus haut (Birmingham *et al.*, 2006 ; Zheng *et al.*, 2009 ; Thurston *et al.*, 2009) n'est pas élucidée. Il est à noter que les bactéries sont considérées cytosoliques lorsqu'elles ne colocalisent pas avec le marqueur lysosomal LAMP1. Ainsi, il n'est pas à exclure que ces bactéries puissent se répliquer, par exemple, dans un autophagosome qui n'est pas positif pour ce marqueur lysosomal. Des expériences de microscopie électronique à transmission seraient nécessaires afin de définir la localisation précise de cette population de bactérie. D'autre part, à des temps plus tardifs d'infection, la quantité d'autophagosomes diminue, ce qui est corrélé avec la baisse de l'association du récepteur autophagique p62/SQSTM1 et de la LC3 avec les bactéries cytosoliques ainsi qu'à l'augmentation de la mort cellulaire par l'activation des caspases-1, 3 et 7. Cela permettrait la sortie des bactéries et la propagation de l'infection aux cellules environnantes (Yu *et al.*, 2014).

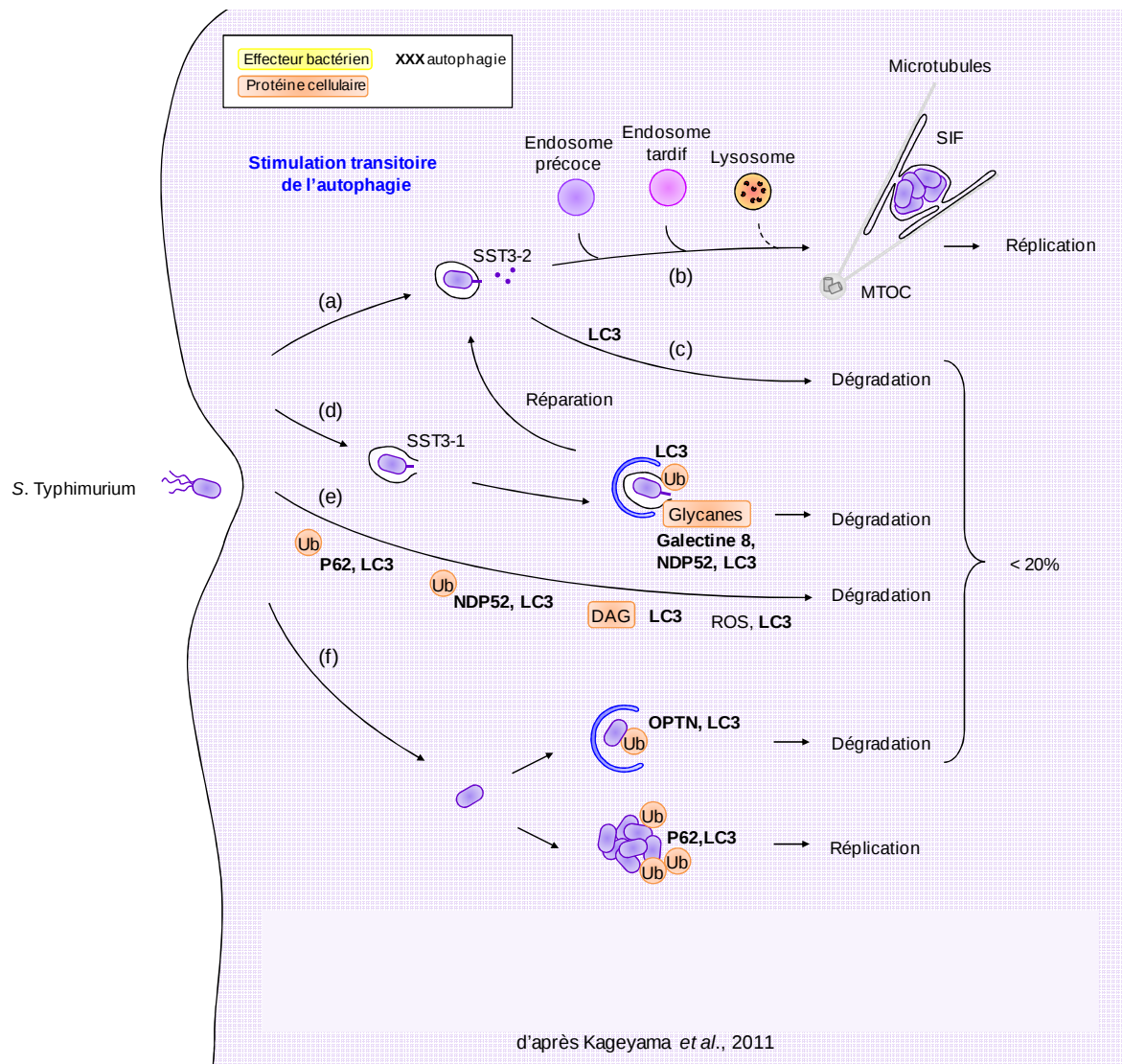


Figure 31 : Rôle de l'autophagie dans le cycle de vie intracellulaire de *Salmonella Typhimurium*

(a) Une fois entrée dans les cellules hôtes, *S. Typhimurium* réside dans une vacuole où elle sécrète des effecteurs par son SST3-2. (b) Après avoir suivi la voie de dégradation endocytique, la SCV forme des SIF le long des microtubules et la bactérie se réplique. (c) Une partie des bactéries au sein de vacuoles intactes peuvent être dégradées par autophagie. (d) De plus, la présence du SST3-1 est responsable de la stimulation transitoire de l'autophagie, probablement à cause de la formation de pores dans la SCV. Cela conduit au recrutement de l'ubiquitine, galectine-8, NDP52 et LC3, liés à la réparation des SCV et/ou à la dégradation des bactéries. (e) Les bactéries au sein de vacuoles intactes ou endommagées et les bactéries libres dans le cytosol peuvent être reconnues par l'autophagie afin d'être dégradées. (f) *S. Typhimurium* est capable, par l'intermédiaire des pores formés par le SST3-1 de s'échapper dans le cytosol où elle peut être reconnue par l'ubiquitine, OPTN et LC3 afin d'être dégradée. Cependant, une partie des bactéries est associée avec l'ubiquitine, P62 et LC3, ce qui promeut leur réplication.

2.5. Exemples de bactéries qui détournent l'autophagie

2.5.a. *Brucella abortus*

Les bactéries du genre *Brucella* sont responsables de la brucellose, une zoonose notamment à l'origine d'avortements chez les animaux d'élevage. Ce coque à Gram négatif infecte de nombreuses cellules hôtes dont les macrophages et les cellules dendritiques. Après avoir été internalisée, la bactérie réside dans une vacuole spécifique appelée BCV (*Brucella*-containing vacuole). Cette vacuole est nommée eBCV (endosomal *BCV*) car elle suit la voie dégradation endocytyque en interagissant avec les endosomes précoces, les endosomes tardifs puis partiellement avec les lysosomes (**Figure 32a**). La fusion de la eBCV avec les endosomes tardifs et les lysosomes permet l'expression du SST4 VirB par lequel une dizaine d'effecteurs sont sécrétés (von Bargen *et al.*, 2012). Grâce à ces effecteurs, la bactérie interagit avec le RE, ce qui modifie l'eBCV en rBCV (réplicative *BCV*), une vacuole permissive à la réplication bactérienne (**Figure 32b**). Bien qu'il soit admis que *Brucella* et notamment *B. abortus* utilise l'autophagie au cours de son cycle intracellulaire, le mécanisme mis en place n'est pas encore connu.

Il a tout d'abord été observé que *B. abortus* se retrouve au sein d'une vacuole à plusieurs membranes dans des cellules épithéliales humaines (HeLa). De plus, l'inhibition de l'autophagie par des drogues induit un défaut de la réplication bactérienne et de façon cohérente, la stimulation de l'autophagie, par induction d'une carence nutritive en acides aminés, favorise la réplication bactérienne. Ces données suggèrent que l'autophagie est importante pour le cycle intracellulaire et la réplication de la bactérie (Pizarro-Cerdá *et al.*, 1998). En effet, l'autophagie intervient de façon tardive dans le cycle intracellulaire de la bactérie. Ce sont les rBCV qui sont entourées par des phagophores, convertissant la rBCV en aBCV (autophagic *BCV*) (Qin *et al.*, 2008 ; Starr *et al.*, 2012) (**Figure 32c**). Il n'est pas encore déterminé si les bactéries continuent de se répliquer dans les aBCV ou si elles se répliquent uniquement dans les rBCV. Néanmoins, l'extinction de l'expression des protéines BECLIN1, ULK1 et ATG14L dans des cellules épithéliales humaines (HeLa) conduit à la diminution de la formation des aBCV sans altérer la réplication bactérienne. Par ailleurs, l'absence d'ATG5, ATG16L1, ATG7, ATG4B, et LC3 n'induit pas une diminution de la quantité des aBCV dans les cellules infectées. Même si l'autophagie ne semble pas essentielle à la réplication bactérienne, les protéines impliquées dans l'initiation de l'autophagie sont nécessaires à la formation des aBCV contrairement à celles utilisées dans les étapes d'élongation (Starr *et al.*, 2012 ; Hamer *et al.*, 2014). Enfin, l'étude de l'autophagie dans des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) a mis en évidence que *B. abortus* ne stimule pas l'autophagie cellulaire, ce qui suggère que les aBCV seraient générées à partir de phagophores préexistants (Hamer *et al.*, 2014). Il n'est pas à exclure que l'interaction entre les bactéries du genre *Brucella* et l'autophagie soit dépendante de l'espèce étudiée car l'inhibition de l'autophagie dans des fibroblastes embryonnaires de souris n'influence pas la

réplication de l'espèce *B. abortus* mais permettrait une meilleure réplication de l'espèce *B. melitensis*. Ainsi, pour cette espèce, l'autophagie pourrait être liée à la dégradation d'une partie des bactéries tandis que pour l'espèce *B. abortus*, l'autophagie aiderait à la sortie des bactéries ainsi qu'à leur propagation de cellule en cellule (Starr *et al.*, 2012 ; Ke *et al.*, 2015)

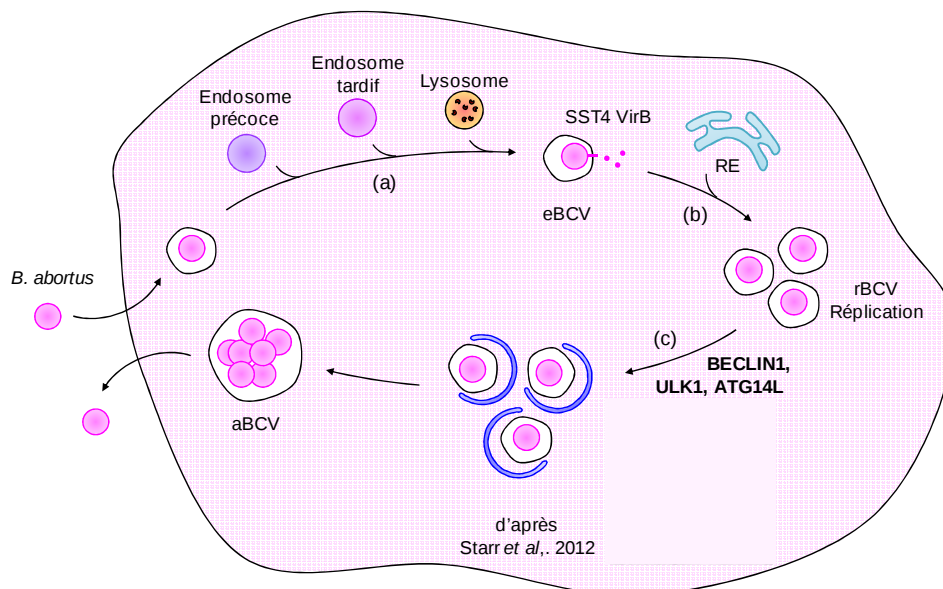


Figure 32 : Rôle de l'autophagie dans le cycle de vie intracellulaire de *Brucella abortus*

Suite à l'entrée de *B. abortus* dans les cellules hôtes, **(a)** la bactérie réside dans une vacuole spécifique (eBCV) qui interagit avec la voie de dégradation endocytaire. L'acidification de cette vacuole promeut l'expression du SST4 VirB dont les effecteurs sécrétés **(b)** permettent l'interaction avec le RE, formant ainsi la rBCV favorable à la réplication bactérienne. Ensuite, **(c)** les rBCV sont entourées par des phagophores ce qui conduit à la formation d'aBCV qui participeraient à la propagation de l'infection.

2.5.b. *Coxiella burnetii*

Coxiella burnetii est responsable de la fièvre Q, une zoonose émergente à l'origine d'avortements massifs en santé animale. Ce coccobacille pléomorphe à Gram négatif infecte un vaste répertoire d'hôtes et un grand nombre de cellules phagocytaires et non phagocytaires. Le cycle infectieux de cette bactérie est biphasique c'est-à-dire que la bactérie existe sous deux formes distinctes. La bactérie libre dans l'environnement est sous sa forme transmissible appelée « petits variants cellulaires » (SCV, small cell variant) et la transition de phase s'opère uniquement lorsque la bactérie se réplique. Elle acquiert alors sa forme répliquative nommée « large variant cellulaire » (LCV, large cell variant) qui lui permet de se répliquer massivement dans la cellule hôte (**Figure 33**). Après être entrée en contact avec la cellule, la bactérie promeut son entrée en induisant une invagination de la membrane plasmique. La bactérie réside ensuite dans un phagosome qui suit la voie de dégradation endocytaire et est appelé CCV (Coxiella-containing vacuole) ou PV (parasitophorous vacuole) (**Figure 33a**). *C. burnetii* n'inhibe pas la fusion de sa vacuole avec le lysosome, même si la maturation de sa vacuole est ralentie. L'environnement hostile du

phagolysosome est nécessaire à la bactérie et lui permet de se différencier en sa forme répliquative, de sécréter des effecteurs bactériens par son SST4 et de se répliquer jusqu'à occuper la quasi-totalité de la cellule. La réplication intracellulaire de cette bactérie est dépendante de son SST4, qui est homologue au SST4 Dot/Icm de *L. pneumophila* et par lequel au moins 130 effecteurs peuvent être sécrétés afin d'interagir avec la cellule hôte (van Schaik *et al.*, 2013 ; Moffatt *et al.*, 2015). *C. burnetii* stimule et bénéficie de l'autophagie de l'hôte, même si les mécanismes mis en jeu ne sont pas découverts.

Lorsque *C. burnetii* infecte des cellules, le marqueur autophagique LC3 est recruté sur la PV dès cinq minutes d'infection (Romano *et al.*, 2007). Après deux heures d'infection, ce marqueur autophagique est toujours présent sur la PV avec du PI3P, essentiel à la formation des autophagosomes et la protéine BECLIN1 impliquée dans l'initiation de l'autophagie (Vazquez et Colombo, 2010) (**Figure 33a**). La présence de ces protéines ayant un rôle dans la formation des phagophores suggèrent que la PV pourrait servir de plateforme à leur formation (Vazquez et Colombo, 2010). De plus, l'interaction précoce entre *C. burnetii* et l'autophagie serait liée au ralentissement de la maturation de la PV le long de la voie endocytaire (Romano *et al.*, 2007 ; Vazquez et Colombo, 2010). Le SST4 Dot/Icm n'est pas fonctionnel à ce moment du cycle infectieux, ce qui suggère qu'un autre mécanisme, impliquant probablement des protéines bactériennes sécrétés par le SST2 ou le SST1 restent à être identifiées (van Schaik *et al.*, 2013 ; Moffatt *et al.*, 2015). A des temps plus tardifs d'infection, la LC3 est recrutée au niveau de la PV, de façon dépendante du SST4 Dot/Icm et probablement suite à la stimulation de l'autophagie cellulaire induite par l'infection à *C. burnetii* (Berón *et al.*, 2002 ; Romano *et al.*, 2007 ; Vazquez et Colombo, 2010 ; Winchell *et al.*, 2014) (**Figure 33b**). De plus, la stimulation de l'autophagie par l'induction d'une carence nutritive ou le traitement d'une drogue est liée à un plus grand nombre de cellules infectées ainsi qu'à l'augmentation de la taille des PV, ce qui montre bien que l'autophagie est bénéfique à la bactérie (Gutierrez *et al.*, 2005). Il a récemment été mis en évidence que *C. burnetii* induit la fusion des autophagosomes avec la PV grâce à l'effecteur bactérien sécrété par le SST4 Dot/Icm Cig2, qui permet aussi la fusion homotypique des PV (Newton *et al.*, 2014 ; Winchell *et al.*, 2014) (**Figure 33b**). Les effecteurs bactériens CpeB et CpeL, sécrétés par le SST4 Dot/Icm, sont présents au niveau des autophagosomes et de la PV, cependant leur rôle dans l'interaction entre *C. burnetii* et l'autophagie n'est pas connu (Voth *et al.*, 2011; Maturana *et al.*, 2013). La fusion des autophagosomes avec la PV est probablement à l'origine d'apport de membranes pour agrandir la PV et/ou de nutriments nécessaires à la réplication bactérienne (Newton *et al.*, 2014).

III. *Legionella pneumophila* et l'autophagie de l'hôte

Legionella pneumophila est responsable d'une pneumonie sévère chez l'homme appelée légionellose. Ce bacille à Gram négatif infecte des amibes dans l'environnement et des cellules phagocytaires et non phagocytaires humaines de façon accidentelle. L'entrée de cette bactérie dans les cellules hôtes peut se faire par phagocytose ou de façon active par la bactérie. Elle se retrouve ensuite dans une vacuole spécifique appelée LCV (*Legionella*-containing vacuole) dont elle contrôle le destin grâce notamment aux effecteurs sécrétés par le SST4 Dot/Icm. Une particularité de cette bactérie est sa capacité à sécréter environ 300 effecteurs par ce système de sécrétion. La LCV mature interagit avec des vésicules dérivées du RE, des mitochondries et des ribosomes puis la bactérie se réplique fortement avant de sortir des cellules hôtes et d'en infecter de nouvelles. L'étude de l'interaction entre *L. pneumophila* et l'autophagie a été initiée en 2003 dans des amibes. Depuis, différents hôtes tels que des macrophages murins ou des cellules humaines ont été utilisés. Ces études ont généré des données contradictoires sur l'interaction entre *L. pneumophila* et l'autophagie et dans ce manuscrit différents modèles sont proposés qui montrent que la bactérie peut être dégradée par l'autophagie cellulaire mais serait également capable de l'inhiber ou de la détourner.

1. Interaction entre *L. pneumophila* et l'autophagie des amibes *Dictyostelium discoideum*

L'amibe *Dictyostelium discoideum* est un organisme modèle qui a été isolé en 1933 de feuilles en décomposition dans une forêt de feuillus des montagnes de Caroline du Nord (Raper, 1935) (**Figure 34**). Très rapidement après cette découverte, le suivi de la répllication des amibes en présence d'espèces bactériennes a été une des premières études réalisée (Raper, 1937). En effet, dans l'environnement l'amibe se nourrit de bactéries pour acquérir des nutriments nécessaires à son développement. Réciproquement, l'étude de l'interaction entre *L. pneumophila* et *D. discoideum* a été une des premières études utilisant cette amibe pour analyser la virulence d'agents pathogènes intracellulaires (Hägele *et al.*, 2000 ; Solomon *et al.*, 2000 ; Dallaire-Dufresne *et al.*, 2011). Ce modèle est d'autant plus pertinent que les amibes sont des hôtes naturels de cette bactérie pathogène.

(a)

(b)

Raper, 1935

Hägele *et al.*, 2000

Figure 34 : L'amibe *Dictyostelium discoideum*

(a) Amibe *D. discoideum* en phase myxamoebae observée par microscopie à un grossissement x250. **(b)** Cliché de microscopie électronique à transmission d'une amibe *D. discoideum* infectée par *L. pneumophila* après 48 heures d'infection. La barre de taille représente 1µm.

L'autophagie est nécessaire au développement normal de l'amibe *D. discoideum* et le mécanisme autophagique est conservé par rapport à celui des plantes, levures et cellules de mammifère (Otto *et al.*, 2003a). Différentes amibes délétées des gènes *ulk1* ou *beclin1*, essentiels dans la formation du phagophore, ainsi que des gènes *atg5*, *atg7* ou *lc3*, impliqués dans la formation de l'autophagosome, ont été construites. Le suivi de la réplication bactérienne dans ces différentes amibes infectées par la souche Philadelphia JR32 de *L. pneumophila* a révélé que l'absence de ces gènes n'induit pas de défaut de réplication après 2, 4, 6 et 8 jours d'infection (Otto *et al.*, 2003b). De plus, lors d'une infection d'amibes sauvages par la souche Philadelphia JR32, aucune bactérie ne localise avec le marqueur autophagique LC3 après 3, 30 heures ou 4 jours d'infection (Otto *et al.*, 2003b). Ces données suggèrent que l'autophagie cellulaire de l'amibe *D. discoideum* n'est pas sollicitée lors d'une infection à *L. pneumophila*.

Par ailleurs, la réponse transcriptionnelle globale de l'amibe *D. discoideum* à une infection par *L. pneumophila* a été caractérisée à l'aide de puces à ADN. Pour cela, des amibes ont été infectées avec la souche Philadelphia JR32 puis la réponse transcriptionnelle de l'hôte a été mesurée après 3, 6, 24 et 48 heures d'infection. Il a été mis en évidence qu'après 24 heures d'infection, l'expression des gènes *lc3* et *atg16* est diminuée d'un facteur 0,5 et 0,6 respectivement tandis que l'expression du gène *atg9* est stimulée d'un facteur 1,5 (Farbrother *et al.*, 2006). Suite à ces résultats, l'amibe délétée du gène *atg9* a été construite et la réplication bactérienne a été étudiée. Ces amibes ont une phagocytose altérée, ainsi, pour d'observer un nombre de bactéries similaire après 3 heures d'infection, les amibes sauvages et mutantes ont été infectées à deux MOI (multiplicity of infection) différentes par la souche *L. pneumophila* Corby (Tung *et al.*, 2010). Tandis qu'environ la moitié des bactéries internalisées sont dégradées dans les deux types d'amibes durant les 18 premières heures d'infection, d'avantage de bactéries semblent détruites dans les amibes

sauvages (**Figure 35a**). Après 18 heures d'infection, les bactéries non dégradées se multiplient au sein des deux types d'amibes mais la réplication bactérienne est plus importante dans les amibes déficientes pour *atg9* (Tung *et al.*, 2010) (**Figure 35a**). Ces données montrent que même si *L. pneumophila* inhibe l'autophagie en modulant l'expression des gènes *lc3* et *atg16*, cette voie cellulaire participe à la dégradation d'une partie des bactéries (Farbrother *et al.*, 2006 ; Tung *et al.*, 2010).

La réplication bactérienne d'une autre souche de *L. pneumophila* a également été suivie dans des amibes sauvages ou délétées pour *atg9* (Rolando *et al.*, 2016). Alors que la souche Corby se réplique dans les amibes sauvages, la souche Paris semble uniquement survivre voire être dégradée (**Figure 35b**). Ces résultats sont représentatifs de la variabilité génétique importante présente entre les souches de *L. pneumophila*, même au sein du séro groupe-1. Néanmoins, comme pour la souche Corby, la réplication bactérienne de la souche Paris est augmentée lorsque les amibes sont déficientes pour l'expression d'*atg9* (**Figure 35b**) (Rolando *et al.*, 2016). Il est à noter que dans cette étude, la même MOI a été utilisée pour l'infection des amibes sauvages et des amibes déficientes pour *atg9*, ce qui conduit probablement à une sous-estimation de la réplication bactérienne. L'autophagie de l'amibe *D. discoideum* aurait un rôle protecteur contre *L. pneumophila* et pourrait être plus efficace contre la souche Paris comparée à la souche Corby. Il est donc possible que l'interaction entre *L. pneumophila* et l'autophagie cellulaire soit différente en fonction de la souche étudiée.

(a)

(b)

d'après Tung *et al.*, 2010

d'après Rolando *et al.*, 2016

Figure 35 : Réplication de différentes souches de *L. pneumophila* dans des amibes *D. discoideum* sauvages ou déficientes pour *atg9*

(a) La réplication de la souche Corby de *L. pneumophila* a été mesurée dans des amibes sauvages infectées à une MOI de 1 et des amibes déficientes pour *atg9* infectées à une MOI de 8. (b) La réplication de la souche Paris a été suivie dans des amibes sauvages ou délétées d'*atg9* infectées à une MOI de 0,1.

L'analyse de l'interaction entre *L. pneumophila* et l'autophagie dans le modèle amibe oppose deux grandes hypothèses. La première étude aboutit à la conclusion que l'autophagie n'est pas impliquée dans le cycle intracellulaire de *L. pneumophila* (Otto *et al.*,

2003b). Les études suivantes proposent que l'autophagie permettrait la dégradation d'une partie des bactéries internalisées (Tung *et al.*, 2010 ; Rolando *et al.*, 2016). La différence entre ces études peut provenir de différents paramètres. Dans la première étude menée en 2003, l'interaction entre la bactérie et l'autophagie cellulaire n'est pas analysée avant deux jours d'infection, contrairement aux études suivantes. De plus, il n'est pas spécifié si les amibes déficientes pour les gènes *ULK1*, *beclin1*, *atg5*, *atg7*, *lc3* ont un défaut de phagocytose comme cela a été observé avec l'amibe délétée du gène *atg9*. Si c'est le cas, la réplication bactérienne serait plus importante dans les amibes mutantes que dans les amibes sauvages, ce qui serait cohérent avec un rôle protecteur de l'autophagie (**Figure 36**). Des expériences complémentaires sont nécessaires afin de déterminer plus précisément l'interaction entre *L. pneumophila* et l'autophagie de l'amibe *D. discoideum*. Il n'est pas à exclure que *L. pneumophila* puisse être dégradée par l'autophagie à un stade de son cycle intracellulaire et inhibe et/ou détourne cette voie pour acquérir des membranes ou des nutriments à un autre stade.

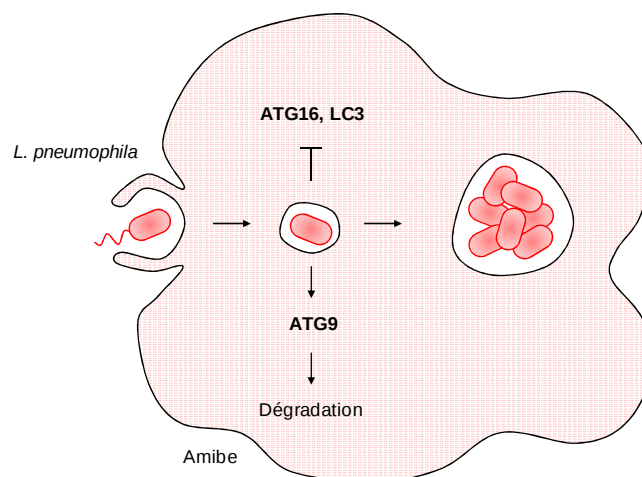


Figure 36 : Interaction entre *L. pneumophila* et l'autophagie des amibes

L'infection des amibes par *L. pneumophila* est liée à l'inhibition de l'expression des gènes *atg16* et *lc3* et la stimulation du gène *atg9*. Même si la bactérie se réplique dans cet hôte, une partie des bactéries semble dégradée par l'autophagie cellulaire.

2. Interaction entre *L. pneumophila* et l'autophagie des macrophages murins

Bien que *L. pneumophila* survive et se réplique dans des amibes ou des cellules humaines, elle ne survit pas dans tous les modèles de macrophages issus de lignées murines. Des macrophages murins primaires dérivés de moelle osseuse de différentes lignées murines ont été infectés par la souche Philadelphia Lp02 (**Figure 37**) (Wright *et al.*, 2003). Tandis que les macrophages dérivés de souris A/J sont permissifs à l'infection de *L. pneumophila*, les macrophages dérivés de souris C57BL/6J ne le sont pas (**Figure 37**). Cela s'explique par la présence de polymorphismes nucléotidiques au niveau du gène *naip5* de l'hôte qui induisent une expression de la protéine correspondante plus importante dans les souris C57BL/6J comparé aux souris A/J (Wright *et al.*, 2003). NAIP5 est un récepteur cellulaire de type NLR (NOD (nucleotide-binding oligomerization domain)-like receptors) qui reconnaît la flagelline bactérienne présente dans le cytosol d'une cellule infectée (Molofsky, 2006). Lorsque *L. pneumophila* entre dans un macrophage, elle se retrouve au sein d'un phagosome au travers duquel le SST4 Dot/Icm forme des pores afin d'injecter différents effecteurs bactériens interagissant avec la cellule hôte. La flagelline s'infiltrer par ces pores et est détectée par NAIP5 dans le cytosol, ce qui active l'inflammasome et aboutit (i) à la dégradation des bactéries par autophagie, (ii) au relargage de cytokines inflammatoires et/ou (iii) à la mort inflammatoire du macrophage par pyroptose (Molofsky, 2006). La mort de type pyroptotique empêche la réplication des bactéries en détruisant la niche bactérienne et stimule le système immunitaire (Molofsky, 2006). Afin d'étudier l'interaction entre *L. pneumophila* et l'autophagie cellulaire, des modèles murins restrictifs et permissifs à la réplication bactérienne ont été utilisés.

d'après Wright *et al.*, 2003

Figure 37 : Réplication de *L. pneumophila* dans des macrophages dérivés de différentes lignées murines

Des macrophages différenciés à partir de monocytes dérivés de moelle osseuse de différentes lignées de souris ont été infectés à une MOI de 0,02 par la souche Philadelphia Lp02 de *L. pneumophila*. La réplication de la bactérie a été mesurée au cours du temps.

2.1. Macrophages restrictifs dérivés de la lignée murine C57BL/6

2.1.a. Etude des mutants bactériens capables de se répliquer en macrophages restrictifs

Une des stratégies utilisées pour étudier la virulence de *L. pneumophila* est la recherche de mutants bactériens capables de se répliquer dans des macrophages restrictifs. Grâce à ce crible, les mutants bactériens dépourvus de la flagelline (Molofsky, 2006) et des effecteurs bactériens LegA9 (Khweek *et al.*, 2013) ou LegS2 (Khweek *et al.*, 2016 ; Rolando *et al.*, 2016) ont été découverts. La flagelline est un PAMP bactérien détecté par la cellule hôte qui conduit à la dégradation des bactéries, ce qui limite leur réplication (Molofsky, 2006).

L'effecteur LegA9 est responsable d'une meilleure ubiquitination au niveau de la LCV, ce qui dirige les bactéries vers l'autophagie (Khweek *et al.*, 2013). Les phagosomes contenant la souche Philadelphia JR32 sont donc reconnus par l'ubiquitine puis le récepteur autophagique P62/SQSTM1 et la protéine LC3 sont recrutés. Ensuite ce phagosome s'acidifie et les bactéries sont dégradées (Khweek *et al.*, 2013). Il est à noter que l'infection de macrophages restrictifs par la souche Philadelphia Lp02 induit transitoirement l'autophagie cellulaire pendant la première heure d'infection (Amer et Swanson, 2005). En effet, l'infection promeut l'apparition de vésicules positives pour les marqueurs autophagiques ATG7 et LC3 plus rapidement que la rapamycine qui stimule l'autophagie (Amer et Swanson, 2005) (cf. [Matériels et Méthodes, VI.2.](#)) (**Figure 38**). Après 2 heures d'infection de ces mêmes macrophages par la souche Philadelphia Lp02 ou JR32, l'autophagie cellulaire est au niveau basal (Amer et Swanson, 2005 ; Khweek *et al.*, 2013). Même si après 2 heures d'infection les bactéries sont dégradées grâce à des autophagosomes préexistants dans la cellule, il est possible que LegA9 en ubiquitinant la surface du phagosome stimule l'autophagie pendant la première heure d'infection. De plus, la présence de membranes endommagées par le SST4 Dot/Icm de *L. pneumophila* peut également participer à cette induction, comme cela a été démontré pour d'autres bactéries intracellulaires (Tattoli *et al.*, 2012a ; Tattoli *et al.*, 2012b ; Tattoli *et al.*, 2013) (cf. [II.2.3.a.](#), [II.2.3.b.](#), [II.2.4.](#)). D'autre part, la survie de la souche Philadelphia JR32 est améliorée lorsque les macrophages sont dépourvus des protéines cellulaires ATG5 ou P62/SQSTM1, ce qui est cohérent avec l'hypothèse selon laquelle une partie des bactéries sont dégradées par l'autophagie cellulaire (Khweek *et al.*, 2013).

(a)

(b)

d'après Amer et Swanson, 2005

Figure 38 : Acquisition de marqueurs autophagiques dans des macrophages dérivés de souris C57BL/6J infectés par *L. pneumophila* ou traités avec de la rapamycine

(a) L'acquisition des marqueurs autophagiques ATG7 et LC3 a été suivie par microscopie suite à une infection de macrophages dérivés de souris C57BL/6 par la souche Philadelphia Lp02 à une MOI inférieure à 5. **(b)** L'acquisition de ces mêmes marqueurs a été suivie suite au traitement de macrophages dérivés de souris C57BL/6 par de la rapamycine qui stimule l'autophagie.

La souche Philadelphia JR32 délétée de l'effecteur LegS2 est un autre exemple de mutant bactérien capable de se répliquer dans des macrophages dérivés de souris C57BL/6 (Khweek *et al.*, 2016). Bien qu'aucun lien avec l'autophagie n'ait été identifié dans cette étude, il a été décrit par ailleurs une activité anti-autophagique pour cet effecteur (Rolando *et al.*, 2016). Ainsi, l'effecteur LegS2 qui inhibe l'autophagie est délétère à la réplication bactérienne dans des macrophages restrictifs. Cela s'explique probablement car ces macrophages peuvent dégrader les bactéries soit par autophagie, soit en induisant leur mort pyroptotique. Les bactéries qui ne seraient pas dégradées par autophagie ne pourraient pas se répliquer suite à la perte de leur niche répliative. Comme il semble contre-intuitif que *L. pneumophila* garde dans son génome des effecteurs qui conduisent à sa dégradation, il est probable que LegA9 et LegS2 soient utiles dans d'autres hôtes de la bactérie. Par exemple, LegA9 en induisant l'ubiquitination de substrats à la surface de la LCV pourrait participer à l'absorption d'acides aminés par la bactérie (cf. 1.4.4.c.).

L'ensemble de ces données suggèrent qu'il existe dans les macrophages restrictifs une balance entre la dégradation de *L. pneumophila* par autophagie et la dégradation par pyroptose. Lors d'une infection de macrophages restrictifs par la souche Philadelphia Lp02, la quantité de macrophages pyroptotiques dépend de la quantité de bactéries intracellulaires et de la fonctionnalité de l'autophagie cellulaire (Byrne *et al.*, 2013). Après 2 heures d'infection, 10% des macrophages entrent en pyroptose lorsqu'ils sont infectés par une seule bactérie tandis que 30% de ces macrophages sont pyroptotiques lorsqu'ils contiennent au moins deux bactéries. Dans le cas où l'autophagie est inhibée, la mort cellulaire est plus importante puisque plus de la moitié des macrophages entrent en pyroptose. Un modèle a été proposé suggérant que lors d'une faible charge bactérienne, la flagelline active la voie NAIP5-NLRC4-caspase-1, ce qui stimule l'autophagie et dégrade les bactéries. Par contre,

lorsque la charge bactérienne est plus élevée, d'avantage de flagelline est reconnue par la voie NAIP5-NLRC4-caspase-1, conduisant ainsi à la mort cellulaire par pyroptose, ce qui empêche les bactéries de se répliquer (Byrne *et al.*, 2013).

2.1.b. Le cas de l'effecteur bactérien RavZ

L'utilisation de macrophages restrictifs dérivés de la lignée murine C57BL/6 a permis de déterminer la fonction de RavZ, le premier effecteur bactérien découvert comme capable d'inhiber l'autophagie cellulaire (Choy *et al.*, 2012). Plus particulièrement RavZ se fixe préférentiellement sur des membranes incurvées présentant du PI3P à leur surface, comme les phagophores ou les autophagosomes puis déconjugue la LC3-II (Horenkamp *et al.*, 2015). Cette protéase à cystéine hydrolyse la liaison entre la protéine LC3 et la PE de façon irréversible, contrairement à la protéase à cystéine cellulaire ATG4 dont l'action est réversible (Choy *et al.*, 2012). Pour étudier le rôle de cet effecteur, des bactéries déficientes pour la flagelline ont été utilisées, afin de pouvoir analyser la réplication bactérienne. Des macrophages restrictifs ont été traités avec de la bafilomycine, ce qui augmente le nombre d'autophagosomes dans les cellules par inhibition de leur maturation (cf. [Matériels et Méthodes, VI.2.](#)). L'infection de ces macrophages par la souche Philadelphia Lp02 diminue la quantité d'autophagosomes (Choy *et al.*, 2012). Ce phénotype est dépendant de l'effecteur RavZ puisqu'un mutant dépourvu de cet effecteur ne module pas l'autophagie. De façon cohérente, l'apport du gène *ravZ* sur un plasmide restaure l'inhibition du nombre d'autophagosomes (Horenkamp *et al.*, 2015). D'autres effecteurs seraient responsables de l'inhibition de l'autophagie car la souche Philadelphia Lp02 délétée du gène *ravZ* ne présente pas de défaut de réplication dans des macrophages dérivés de souris C57BL/6 (Choy *et al.*, 2012). De plus, les autophagosomes présents dans les cellules infectées par ce mutant ne sont pas recrutés au niveau de la LCV, ce qui suggère que d'autres effecteurs bactériens inhiberaient l'autophagie en empêchant le recrutement des autophagosomes à la LCV (Choy *et al.*, 2012).

2.1.c. Modèle d'interaction entre *L. pneumophila* et l'autophagie cellulaire des macrophages restrictifs

L'ensemble des études en macrophages non permissifs permettent l'élaboration d'un modèle selon lequel le SST4 Dot/Icm de *L. pneumophila* forme des pores dans la membrane de la LCV qui peuvent être reconnus par l'autophagie cellulaire. La flagelline qui s'infiltrer par ces pores est détectée dans le cytosol par le récepteur NAIP5, ce qui conduit à l'activation de l'inflammasome NLRP4, de la caspase-1 puis à la reconnaissance des bactéries par l'autophagie (**Figure 39a**). D'autre part, suite à l'activité de l'effecteur LegA9, les LCV sont ubiquitinées puis le récepteur autophagique P62/SQSTM1 et la protéine LC3 sont recrutés,

ce qui conduit ces vacuoles à la dégradation (**Figure 39a**). Même si *L. pneumophila* exprime des effecteurs bactériens, comme RavZ ou LegS2, qui inhibent l'autophagie, les bactéries seront quand même dégradées (**Figure 39b**). L'extinction de l'autophagie conduit en effet à la mort du macrophage par pyroptose suite à l'infection par *L. pneumophila*, ce qui détruit la niche bactérienne. De la même façon, lorsque la quantité de flagelline est trop importante, l'activation de l'inflammasome aboutit à la pyroptose des macrophages (**Figure 39c**).

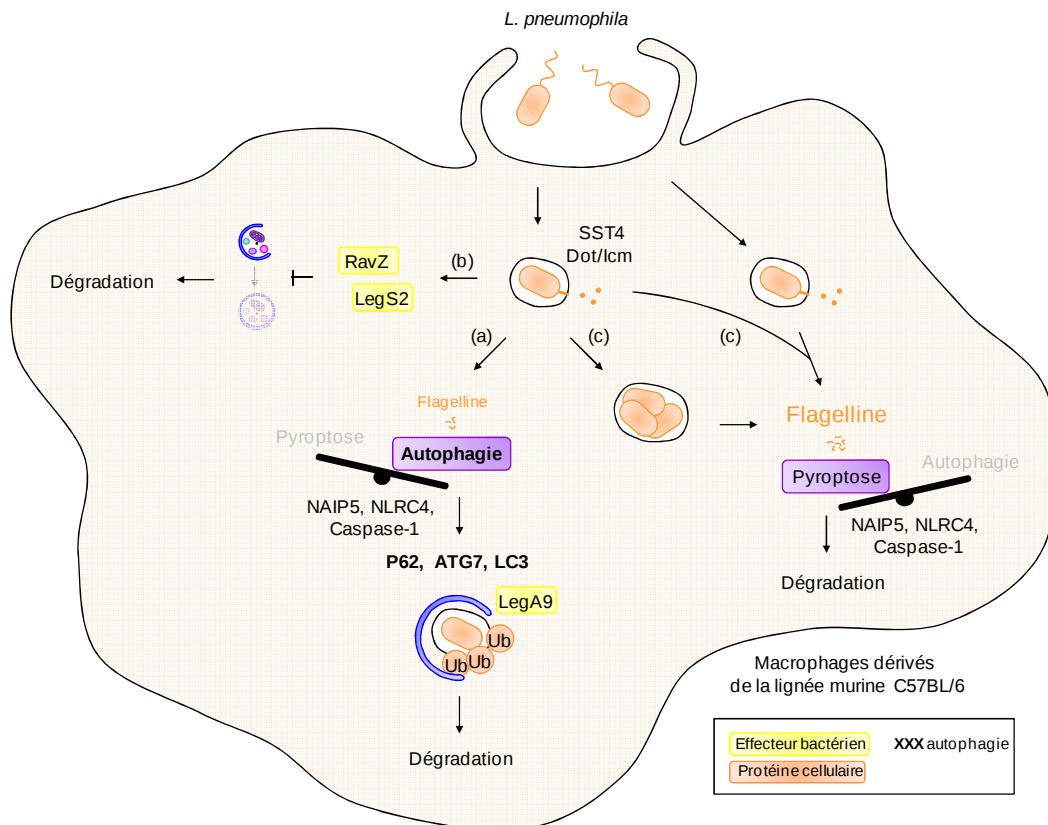


Figure 39 : Interaction entre *L. pneumophila* et l'autophagie des macrophages restrictifs dérivés de la lignée murine C57BL/6

(a) Suite à l'entrée de la bactérie dans la cellule, la flagelline est détectée dans le cytosol, ce qui active l'autophagie cellulaire et aboutit à la dégradation de la bactérie par autophagie. LegA9 en ubiquitinant la LCV pourrait participer à ce mécanisme. Les vacuoles contenant la bactérie sont marquées par l'ubiquitine, P62, ATG7 et la LC3. **(b)** Même si *L. pneumophila* a des effecteurs permettant d'inhiber l'autophagie cellulaire, l'induction de la pyroptose détruit la niche répliquative empêchant la répllication bactérienne. **(c)** Lorsque la bactérie se réplique ou que la quantité de bactérie internalisée est trop importante, la quantité de flagelline augmente, ce qui induit la pyroptose cellulaire, responsable de la destruction de la niche bactérienne.

2.2. Macrophages permissifs dérivés de la lignée murine A/J

Bien que les macrophages dérivés de souris A/J sont dits permissifs à la réplication bactérienne de *L. pneumophila*, toutes les souches ne se répliquent pas au sein de ces cellules. En effet, les souches Paris et Philadelphia-1 appartenant au sérogroupe-1 ainsi que la souche Tunder Bay du sérogroupe-6 survivent sans se répliquer dans ces macrophages (Zhu *et al.*, 2015) (**Figure 40**). Au contraire, la souche Philadelphia Lp02 se réplique dans ces macrophages murins, grâce à la présence d'un polymorphisme nucléotidique sur le gène *rpsL* codant une sous-unité ribosomique, qui diminue la cytotoxicité cellulaire due à l'infection par *L. pneumophila* (Zhu *et al.*, 2015) (**Figure 40**) (cf. 1.2.2).

d'après Zhu *et al.*, 2015

Figure 40 : Réplication de différentes souches de *L. pneumophila* dans des macrophages dérivés de souris A/J

Des macrophages dérivés de souris A/J ont été infectés par différentes souches de *L. pneumophila* à une MOI de 0,05 puis la réplication bactérienne a été suivie au cours du temps.

L'infection de macrophages dérivés de souris A/J par la souche Philadelphia Lp02 a mis en évidence la présence d'une double membrane autour de la bactérie après 26 heures d'infection (Swanson et Isberg, 1995) (**Figure 41a**). De plus, l'infection de ces macrophages a montré que les protéines de l'autophagie ATG7 et LC3 sont recrutées de façon ralentie au niveau de la LCV (Amer et Swanson, 2005) (**Figure 41b,c**). La stimulation de l'autophagie par l'induction d'une carence nutritive en acide aminés dans ces macrophages permet une meilleure réplication de la souche Philadelphia Lp02 d'un facteur 2 après 16 heures d'infection (Swanson et Isberg, 1995). Ces données proposent que *L. pneumophila* exploiterait l'autophagie de l'hôte pour établir sa niche répliative. Ainsi, dans ce type cellulaire, la bactérie pourrait bénéficier de membranes et/ou de nutriments issus de l'autophagie (Swanson et Isberg, 1995).

(a)

(b)

(c)

d'après Swanson et Isberg, 1995

d'après Amer et Swanson, 2005

Figure 41 : Acquisition de marqueurs autophagiques par *L. pneumophila* dans des macrophages dérivés de moelle osseuse de souris A/J

(a) Cliché de microscopie électronique à transmission montrant une double membrane autour de la souche Philadelphia Lp02 suite à une infection de macrophages dérivés de souris A/J à une MOI de 0,07 pendant 26 heures. L'acquisition des marqueurs autophagiques (b) ATG7 et (c) LC3 a été mesurée par microscopie après une infection de macrophages dérivés de souris A/J par la souche Lp02 à une MOI de 10 ou de 20.

La souche Philadelphia-1 se réplique dans des macrophages péritonéaux dérivés de souris A/J tandis qu'elle survit seulement en macrophages dérivés de moelle osseuse provenant de ces mêmes souris (Matsuda *et al.*, 2009 ; Zhu *et al.*, 2015). Cette divergence est probablement due à une différence au niveau des cellules hôtes. La stimulation de l'autophagie suite à l'induction d'une carence nutritive en acides aminés induit un défaut de la réplication de la souche Philadelphia-1 dans des macrophages péritonéaux dérivés de souris A/J (Matsuda *et al.*, 2009). Cependant, pour observer ce phénotype, la carence en acides aminés doit être maintenue durant les dix premières heures d'infection. En effet, l'induction de l'autophagie avant l'infection ou pendant les quatre premières heures d'infection n'influence pas la réplication bactérienne (Matsuda *et al.*, 2009). Ainsi, il est probable que ce ne soit pas la stimulation de l'autophagie mais la carence nutritive en elle-même qui soit délétère à la bactérie. D'autre part, lorsque l'autophagie cellulaire est éteinte dans des macrophages péritonéaux, la réplication bactérienne de la souche Philadelphia-1 est augmentée. L'autophagie serait donc à l'origine de la dégradation d'une partie des bactéries infectant des macrophages péritonéaux dérivés de souris A/J (Matsuda *et al.*, 2009).

Les études en macrophages dérivés de souris A/J conduisent à l'hypothèse que la bactérie réside dans un autophagosome et retarde l'acquisition des marqueurs autophagiques, probablement le temps de la transition de la bactérie en une forme répliquative, tolérant l'acidification (**Figure 42a**) (cf. 1.4.5.). Les études ne sont pas claires sur le rôle bénéfique ou néfaste de l'autophagie sur le destin de la bactérie. La stimulation de l'autophagie par une carence nutritive en acides aminés peut être favorable, neutre ou

néfaste envers la réplication bactérienne. A l'inverse, l'inhibition de l'autophagie induit une meilleure réplication bactérienne suggérant qu'une partie des bactéries sont dégradées par l'autophagie (**Figure 42b**). Ce modèle nécessite des expériences complémentaires afin de déterminer si l'interaction entre *L. pneumophila* et l'autophagie dans ce type de macrophages murins est à l'avantage ou au détriment de la bactérie. Il serait notamment intéressant de déterminer (i) quelle population bactérienne est dégradée par l'autophagie, (ii) si l'autophagie permet d'apporter des nutriments ou de la membrane à la bactérie, et/ou (iii) si l'autophagosome permet à la bactérie de se camoufler vis à vis de la voie de dégradation endocytaire, le temps de former une LCV mature.

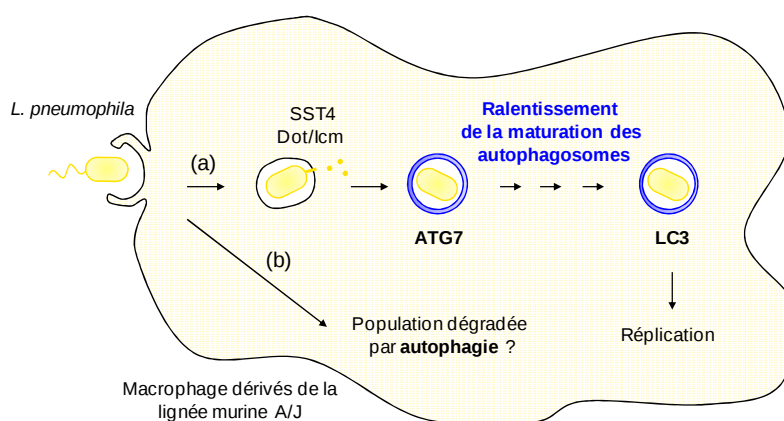


Figure 42 : Interaction entre *L. pneumophila* et l'autophagie des macrophages permissifs dérivés de la lignée murine A/J

(a) Suite à l'entrée de la bactérie dans la cellule, cette dernière est localisée dans une LCV où elle peut sécréter divers effecteurs par son SST4 Dot/Icm. Ensuite, la bactérie se retrouve dans une vacuole à double membrane dont la maturation semble ralentie. (b) Par ailleurs, une partie des bactéries semble dégradée par l'autophagie cellulaire.

3. Interaction entre *L. pneumophila* et l'autophagie des cellules humaines

L'utilisation de monocytes ou de macrophages dérivés de monocytes primaires provenant de sang humain est limitée dans le temps et leur manipulation génétique est complexe. Différentes lignées humaines telles que des monocytes (THP-1), des cellules épithéliales (HeLa) ou des cellules embryonnaires (HEK293, human embryonic kidney cell line) sont utilisées pour palier à ces limites. Les THP-1 sont une lignée monocyttaire provenant de monocytes du sang d'un enfant d'un an atteint d'une leucémie lymphoïde aiguë. Ces cellules sont différenciables en macrophages et sont très utilisées comme modèle de macrophages humains (Tsuchiya *et al.*, 1980). Les cellules HeLa proviennent de cellules cervicales du carcinome du col de l'utérus d'Henrietta Lacks, une femme de 31 ans. Ces cellules ont été les premières cellules humaines cultivées en 1951 et sont les cellules

humaines les plus utilisées en recherche. Elles ont notamment permis de mettre au point le vaccin contre la poliomyélite (Landry *et al.*, 2013). Les cellules HEK293 proviennent de cellules embryonnaires de rein d'un fœtus humain qui ont été transformées en laboratoire grâce à des fragments d'ADN de l'adénovirus de type 5 en 1973. Ces cellules sont particulièrement utilisées car elles ont un très bon taux de transfection et de production de protéines. Le « T » des cellules HEK293T signifie que ces cellules, dérivées des HEK293, expriment la protéine Large T du virus SV40 (*simian virus*) qui permet de répliquer un grand nombre de copies des vecteurs transfectés lorsqu'ils ont une origine de réplication SV40 (Thomas et Smart, 2005).

Après 1 heure d'infection de monocytes primaires dérivés de sang humain par la souche Philadelphia-1, la bactérie se retrouve dans une vacuole à double membrane qui serait un autophagosome (Horwitz, 1983a) (**Figure 43a**). La même structure est observée autour de la souche Philadelphia Lp02 après 7 heures d'infection dans ces mêmes cellules (Swanson et Isberg, 1995) (**Figure 43b**). Ces résultats suggèrent que *L. pneumophila* transite au sein d'un autophagosome pendant les premières heures de l'infection. Il est possible que la formation d'un autophagosome autour de la bactérie provienne de l'activité de l'effecteur bactérien LegA9. En effet, comme il l'a été discuté précédemment ([cf. III.2.1.a.](#)), cet effecteur est responsable d'une meilleure ubiquitination de la LCV qui permet le recrutement de divers acteurs de l'autophagie cellulaire. La souche Philadelphia JR32 délétée de l'effecteur LegA9 se réplique mieux que la souche sauvage dans des macrophages primaires dérivés de monocytes humains ou dans des macrophages dérivés d'une lignée humaine (THP-1). Ainsi, l'autophagie serait délétère à la bactérie et participerait à la dégradation d'une partie des bactéries (Khweek *et al.*, 2013).

(a)

(b)

d'après Horwitz, 1983

d'après Swanson et Isberg, 1995

Figure 43 : *L. pneumophila* au sein d'une vacuole à double membrane dans des monocytes primaires humains

Cliché de microscopie électronique à transmission illustrant une double membrane autour **(a)** de la souche Philadelphia-1 après 1 heure d'infection dans des monocytes primaires dérivés de sang humain ou **(b)** de la souche Philadelphia Lp02 après 7 heures d'infection dans ces mêmes cellules. L'astérisque présente un grossissement de la double membrane.

Des macrophages dérivés de monocytes humains (THP-1) ont été traités avec de la bafilomycine, ce qui augmente le nombre d'autophagosomes car la maturation de ces derniers est inhibée, puis infectés par la souche Paris. Après 8 ou 20 heures d'infection, le nombre de cellules présentant plus de 5 autophagosomes est réduit d'un facteur 2 par rapport aux cellules non infectées. Ainsi, la bactérie exprime un ou des effecteurs qui inhibent l'autophagie cellulaire (Rolando *et al.*, 2016). LegS2 est un effecteur bactérien présentant des homologies de séquence avec la sphingosine-1-phosphate lyase cellulaire. Ces deux protéines hydrolysent la sphingosine-1-phosphate, ce qui met fin aux sphingolipides essentiels à de nombreuses voies cellulaires dont l'apoptose et l'autophagie (Young *et al.*, 2013 ; Rolando *et al.*, 2016). LegS2 inhibe l'autophagie cellulaire lorsqu'il est exprimé de façon ectopique dans des cellules embryonnaires humaines (HEK293T) et le mutant de la souche Paris délété du gène *legS2* ne module pas l'autophagie dans des macrophages dérivés de monocytes humains (THP-1) traités à la bafilomycine (Rolando *et al.*, 2016). Néanmoins, ce mutant ne présente pas de défaut d'inhibition de l'autophagie en absence de bafilomycine. De plus, ce mutant n'a pas de défaut de réplication par rapport à la souche sauvage en macrophages dérivés de monocytes humains (THP-1), ce qui suggère que d'autres effecteurs bactériens sont impliqués dans l'inhibition de l'autophagie cellulaire (Rolando *et al.*, 2016). Bien que LegS2 semble avoir une activité anti-autophagique (Rolando *et al.*, 2016), il est possible que cet effecteur participe également à la mort cellulaire par apoptose (Zhu *et al.*, 2013) ou à la modulation de la voie NF- κ B (Khweek *et al.*, 2016). Par ailleurs, l'activité anti-autophagique de l'effecteur bactérien RavZ, discuté précédemment ([cf. III.2.1.b.](#)) a également été démontré en cellules embryonnaires humaines (HEK293).

Bien qu'il soit établi que *L. pneumophila* interagit avec l'autophagie dans des cellules humaines, il n'est pas élucidé si cette interaction est au bénéfice ou au détriment de la bactérie. Néanmoins, un modèle peut être proposé selon lequel *L. pneumophila* réside transitoirement dans un autophagosome peut être grâce à l'effecteur LegA9 qui permet une meilleure ubiquitination de la LCV et le recrutement d'autophagosomes (**Figure 44a**). *L. pneumophila* exprime également des effecteurs comme LegS2 et RavZ dont l'activité conduit à l'inhibition de l'autophagie cellulaire mais leur rôle dans le cycle intracellulaire de *L. pneumophila* n'est pas déterminé (**Figure 44b**).

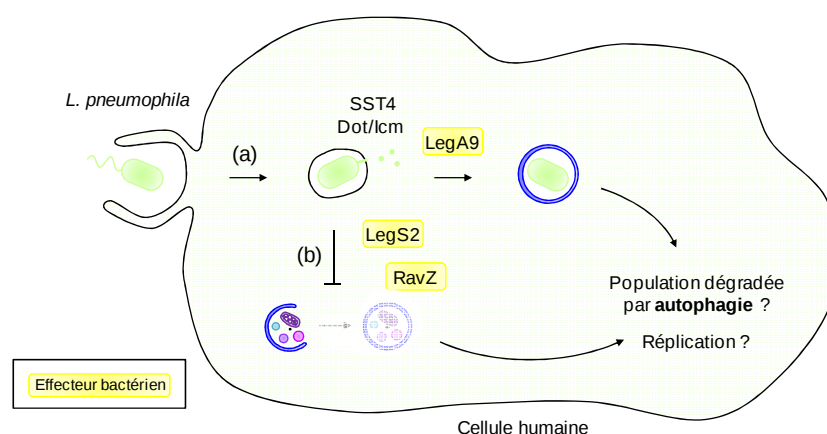


Figure 44 : Interaction entre *L. pneumophila* et l'autophagie de cellules humaines

(a) La bactérie entrée dans des cellules humaines, réside dans une LCV où elle sécrète des effecteurs par son SST4 Dot/Icm. L'effecteur bactérien LegA9 pourrait stimuler l'ubiquitination de la LCV, permettant à la bactérie de localiser au sein d'une vacuole à double membrane. **(b)** Par ailleurs, les effecteurs LegS2 et RavZ inhibent l'autophagie cellulaire. L'interaction entre *L. pneumophila* et l'autophagie peut conduire à la dégradation d'une partie des bactéries ou à leur réplication.

4. Synthèse

De nombreuses études ont permis de démontrer que *L. pneumophila* interagit avec l'autophagie de son hôte. Néanmoins, il n'est pas clairement défini si cette relation est bénéfique ou délétère à la bactérie. Peu de connaissances existent sur la relation entre *L. pneumophila* et l'autophagie des amibes. Aucune étude comparative sur plusieurs genres ou espèces d'amibes, dans lesquelles *L. pneumophila* se multiplie, n'a été menée. Pourtant, il est admis que le répertoire d'effecteurs sécrétés par le SST4 Dot/Icm de la bactérie permet sa multiplication dans une variété d'amibes qui constitue la pression de sélection majeure exercée sur la bactérie.

L'utilisation de différents modèles de cellules murines et humaines a permis l'identification de la fonction de trois effecteurs bactériens. LegA9 induit l'ubiquitination de la LCV, ce qui favoriserait la reconnaissance de la LCV par l'autophagie cellulaire. RavZ inhibe la formation des autophagosomes en déconjugant la LC3 de la PE, ce qui empêche le recrutement de cette protéine au niveau du phagophore. LegS2 hydrolyse la sphingosine-1-phosphate, ce qui limite l'autophagie cellulaire. Actuellement, aucune donnée ne permet de déterminer à quel moment agissent ces effecteurs dans le cycle infectieux de *L. pneumophila*. De plus, il est probable que d'autres effecteurs bactériens interviennent de façon directe ou indirecte dans la modulation de l'autophagie par *L. pneumophila*. Il est à noter également que les effecteurs identifiés à ce jour ne sont pas tous conservés entre les différentes souches du sérotype-1 de *L. pneumophila* (**Tableau 2**), ce qui pourrait être lié à une certaine spécificité de la bactérie pour des hôtes naturels différents.

Souche <i>L. pneumophila</i> Effecteur	Philadelphia-1	Paris	Lens	Corby	Alcoy	130b
LegS2	Lpg2176	Lpp2128	LpL2102	Lpc1635	Lpa3118	Lpw23561
LegA9	Lpg0402	-	-	-	-	-
RavZ	Lpg1683	-	-	Lpc1114	Lpa2431	-

d'après Gomez-Valero *et al.*, 2011b

Tableau 2 : Conservation des effecteurs interagissant avec l'autophagie au sein de différentes souches appartenant au sérotype-1 de *L. pneumophila*

5. Objectifs

Le but général de ma thèse est de contribuer à une meilleure connaissance de la relation entre *L. pneumophila* et l'autophagie de la cellule hôte. Dans un premier temps, un modèle de cellules épithéliales humaines a été utilisé afin de suivre l'autophagie cellulaire au cours d'une infection par différentes souches du sérotype-1 de *L. pneumophila*. Ces expériences ont mis en évidence que la relation entre *L. pneumophila* et l'autophagie est différente en fonction des souches utilisées. Plus précisément, une infection par la souche Paris ou la souche Lens induit une stimulation globale de l'autophagie dans les cellules hôtes tandis qu'une infection par la souche Philadelphia-1 n'a pas d'effet significatif sur le niveau basal de l'autophagie cellulaire. La variation génétique au sein des souches du sérotype-1 de *L. pneumophila* est importante puisqu'environ 10% de gènes sont spécifiques à chaque souche. Cette variabilité concerne en particulier des gènes codant des effecteurs sécrétés par le SST4 Dot/Icm, parmi lesquels ceux identifiés pour leur capacité à interagir avec l'autophagie cellulaire. Ainsi, l'effecteur RavZ, connu pour inhiber directement l'autophagie cellulaire, est présent dans la souche Philadelphia-1 et absent dans les souches Paris ou Lens. Cette étude montre que la stimulation de l'autophagie par la souche Paris est liée à l'absence de l'effecteur RavZ dans cette souche. De plus, le niveau d'autophagie atteint par la souche Paris est bénéfique à sa multiplication intracellulaire dans ce modèle cellulaire. Une analyse phylogénétique propose que le gène *ravZ* acquis ancestralement a été perdu au cours de l'évolution des souches de *L. pneumophila*. L'ensemble de ces travaux présentés sous la forme d'un article scientifique illustrent au travers de la relation de *L. pneumophila* à l'autophagie de l'hôte que la variabilité du répertoire d'effecteurs sécrétés par le SST4 Dot/Icm pourrait résulter d'une adaptation de la bactérie à la vie intracellulaire dans différentes cellules hôtes.

Le second objectif de ma thèse est d'identifier le rôle d'éventuels nouveaux effecteurs sécrétés par le SST4 Dot/Icm de *L. pneumophila* qui participeraient à l'interaction entre *L. pneumophila* et l'autophagie cellulaire. Une approche originale a été développée, basée sur

la comparaison des effecteurs sécrétés par le SST4 Dot/Icm de *L. pneumophila* et *C. burnetii*, une bactérie appartenant à l'ordre des *Legionellales*. *C. burnetii* est responsable d'une zoonose émergente appelée fièvre Q et détourne l'autophagie de l'hôte à son bénéfice (cf. II.2.5.b). Cette bactérie est phylogénétiquement proche de *L. pneumophila* (Maurin et Raoult, 1999). De plus, les deux bactéries partagent (i) la capacité de se multiplier dans un hôte commun, les amibes, (ii) un cycle de vie biphasique avec une forme transmissible et une forme répllicative, (iii) un SST4 Dot/Icm homologue et (iv) un cycle d'infection intracellulaire similaire dont la virulence dépend des effecteurs sécrétés par le SST4 Dot/Icm (Sexton et Vogel, 2002 ; Moffatt *et al.*, 2015). En effet, *C. burnetii* est capable, tout comme *L. pneumophila*, de sécréter un grand nombre d'effecteurs par son SST4 Dot/Icm dont 130 sont connus à ce jour (Moffatt *et al.*, 2015). Etant donné l'ensemble de ces similarités et le fait que les deux bactéries semblent bénéficier de l'autophagie, une hypothèse a été émise, proposant que ces deux bactéries interagissent avec l'autophagie de la cellule hôte grâce à des effecteurs communs. Une analyse bioinformatique a identifié les effecteurs sécrétés par le SST4 Dot/Icm conservés entre ces deux bactéries. Les mutants délétés des gènes correspondant à ces différents effecteurs ont été construits chez *L. pneumophila*. Leur phénotype n'a pas permis de révéler un rôle important de ces effecteurs dans la relation entre *L. pneumophila* et l'autophagie. Néanmoins, ce travail a mis en lumière la dynamique évolutive des gènes codant les effecteurs sécrétés par le SST4 Dot/Icm au sein de l'ordre des *Legionellales*, comme cela a été illustré pour l'espèce *L. pneumophila* dans la première partie de ma thèse.

Résultats

I. Etude de l'interaction entre *L. pneumophila* et l'autophagie de l'hôte

Effector repertoire defines autophagy modulation by *L. pneumophila* strains

Virginie Lelogeais¹, Sophie Jarraud^{1,2}, Mathias Faure¹, Fabrice Vavre³, Patricia Doublet¹

¹ CIRI, International Center for Infectiology Research, Université Lyon 1, INSERM U1111, CNRS UMR5308, ENS-Lyon, Lyon, France

² French National Reference Center of *Legionella*, Institut des agents infectieux, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

³ Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, Université de Lyon, Université Claude Bernard, CNRS, UMR 5558, 69622 Villeurbanne, France

Corresponding author:

Patricia Doublet, PhD, CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, INSERM U1111, CNRS UMR5308, Université Lyon 1, ENS-Lyon, 10 Rue Raphaël Dubois, 69622 Villeurbanne Cedex ; patricia.doublet @univ-lyon1.fr ; 33 (0)4 72 44 81 05

Abstract

While autophagy can participate to elimination of pathogens, some of them subvert it in order to evade or even hijack it to their own interest. In *Legionella pneumophila*, different effectors either facilitate or block the autophagic process, suggesting that the bacterium participates to the fine-tuning of this pathway. However, the costs and benefits associated with autophagy modulation on bacterial replication are not entirely clear. We show here that *L. pneumophila* strains differ in their ability to induce autophagy in host cells, despite autophagy is beneficial for bacterial replication. We additionally demonstrate that the effector RavZ, which inhibits autophagy and is only present in a subset of strains, is deleterious for the bacterium in this host cell context. This study sheds light on the potential factors driving the evolution of effector repertoire in *L. pneumophila* regarding autophagy modulation.

Introduction

Legionella pneumophila is the causative agent of Legionnaires' disease, a severe pneumonia (1). This intracellular bacterium can replicate in both amoeba in the environment (2) and, because they are physiologically similar to amoeba, human alveolar macrophages (3). In lung human infection, pulmonary alveolar epithelial cells are also an alternative replication site for *L. pneumophila* (4). Bacterial replication in these different host cells depends on a Dot/Icm Type IV Secretion System (T4SS) (5,6). This T4SS allows the secretion of around 300 effectors that interact with many cellular component allowing the creation of a specific replicative niche called the *Legionella*-containing vacuole (LCV) (7). *L. pneumophila* effectors also interact with organelles such as the endoplasmic reticulum, ribosomes or mitochondria or cellular pathways like autophagy to avoid degradation by the endocytic pathway (7).

Autophagy is a cytosolic conserved pathway in eukaryotes that begins by the formation of a double membrane phagophore surrounding elements that need to be degraded. This phagophore elongates until the formation of the autophagosome, a double membrane vacuole which then matures with lysosome fusion allowing the degradation of the sequestered elements (8). This cellular pathway is involved in the regulation of cellular homeostasis, but also in cell autonomous immunity through the degradation of pathogens that invade the cytosol of host cells. However, some pathogens are able to evade and even hijack autophagy that is then used as a membrane and/or nutrient source (9).

The relationship between *L. pneumophila* and autophagy is not entirely resolved even though a global picture is emerging suggesting that *Legionella* could both participate to the targeting of the LCV to autophagosomes and delay the maturation of autophagosome into autolysosome (9). Different effectors have been identified for these different functions. Notably, the effector LegA9 promotes the recognition of the LCV by autophagy (10). Surprisingly, knocking out of LegA9 however limits the degradation of *Legionella* by autophagy in non permissive C57BL/6 mouse macrophages (10), but on the opposite, inhibition of autophagy in permissive A/J mouse macrophages reduces *Legionella* survival (11). These results highlight that *L. pneumophila* can be degraded by autophagy despite requiring it, and that some effectors may be deleterious for bacterial replication in certain circumstances. Two other effectors participate on the opposite in the limitation of autophagic process. RavZ irreversibly deconjugates LC3-phosphatidylethanolamine (PE) (LC3-II), which prevents the accumulation of LC3-II on phagophores and autophagosomes (12,13). LpSpl encoded by *legs2* gene is a sphingosine-1-phosphate lyase that also participates to the inhibition of autophagy through a modulation of sphingosine levels in infected cells (14).

This global scenario should however be taken with caution. The possibility that the interaction between autophagy and *Legionella* may highly depend on the host cell and/or the bacterial strains, is indeed very probable given the genetic diversity of both protagonists

involved in the interaction. In particular, *L. pneumophila* strains exhibit extensive genetic variation (15,16). Seven to eleven percent of genes are indeed specific to each strain (15), owing notably to specific repertoires of T4SS secreted effectors. Interestingly, some of the identified effector affecting autophagy are only present in a subset of strains, notably RavZ (17).

In a preliminary study, we evidenced that *L. pneumophila* Paris strain infection induced strong autophagy stimulation in human epithelial HeLa cells and that this stimulation of autophagy was beneficial for bacterial replication. Given this surprising result and because this strain does not contain the RavZ gene, we further investigated whether different strains of *L. pneumophila* behave similarly in this cell context. Our results highly suggest that autophagy stimulation is globally beneficial for *L. pneumophila* in HeLa cells and that the effector RavZ may be deleterious for bacterial replication in this context. These results might explain the evolutionary history of this effector regarding its presence/absence in *Legionella* genomes.

Results

***L. pneumophila* Paris infection induces host cell autophagy to the benefit of bacterial intracellular replication**

To assess the impact of *L. pneumophila* Paris infection on host cell autophagy, GFP-LC3 expressing HeLa cells were infected at a MOI of 10 by a mCherry expressing wild-type Paris strain or its $\Delta dotA$ derivative mutant, an avirulent strain without functional Dot/Icm T4SS. Four hours post-infection, i.e. immediately after bacteria entry (18), GFP-LC3 dots representative of autophagosomes, were visualized by imaging flow cytometry, as previously described (19) (**Fig. 1A**). When numbered on 200 live infected cells, GFP-LC3 labeled autophagosomes were 1.5 times more numerous in cells infected with wild-type *L. pneumophila* Paris strain than in non-infected cells or in cells infected by $\Delta dotA$ mutant strain (**Fig 1B**). This autophagosomes quantity was similar to that found in cells treated for 4h with 100nM of rapamycin, a drug known to strongly stimulate autophagy (20) (**Fig. 1C**). Host cell autophagy was also assessed by quantifying GFP-LC3-II present on autophagosomes by conventional flow cytometry, as previously described (21). Consistently, GFP-LC3-II quantity was at least 2 times higher in cells infected with wild type *L. pneumophila* Paris strain, or rapamycin treated cells than in cells infected with $\Delta dotA$ mutant (**Fig. 1D**), or non-treated cells (**Fig. 1E**). Finally, host cell autophagy was monitored by quantifying by western blot the LC3-I/II ratio, i.e. the ratio between the diffuse cytosolic form LC3-I and the autophagosome-anchored form LC3-II. HeLa cells were infected for 4h at a MOI of 25 with wild-type *L. pneumophila* Paris strain or $\Delta dotA$ mutant. Cells infected with wild-type Paris strain displayed a decreased LC3-I/LC3-II ratio of 0.6 when compared to that of non-infected cells or cells infected with the $\Delta dotA$ mutant (ratio of 1 and 1.1, respectively), which reveals an accumulation of autophagosome-anchored LC3, as observed in rapamycin treated cells (ratio of 0.4) (**Fig. 1F**). All together, these data show that *L. pneumophila* Paris infection induces the accumulation of autophagosomes in HeLa cells.

To decipher whether the accumulation of autophagosomes was due to the overall stimulation of the autophagic flux or to the inhibition of maturation steps of the autophagosomes to autolysosomes, the long-lived protein P62, which is known to be degraded by autophagy, was quantified by western-blot in host cells (**Fig. 1F**). P62 level in cells infected with wild-type *L. pneumophila* Paris strain is strongly decreased compared to cells infected with the $\Delta dotA$ mutant or to non-infected cells, as observed in rapamycin treated cells. These results suggest that autophagosomes rise during *L. pneumophila* Paris infection results from the stimulation of autophagy rather than the inhibition of autophagosomes maturation. Importantly, this stimulation is dependent on the Dot/Icm T4SS.

To establish whether host cell autophagy is detrimental or beneficial for bacterial replication, HeLa cells were treated with rapamycin, then infected at a MOI of 10 with *L. pneumophila* Paris strain, or with $\Delta dotA$ mutant, and finally colony forming units (CFU) were quantified 4h and 48h post-infection. As expected, the avirulent $\Delta dotA$ mutant showed a significant replicative default when compared to the wild-type Paris strain (**Fig. 1G**). However, autophagy stimulation by rapamycin treatment did not impact the wild-type strain replication in host cells, thus suggesting that autophagy is not detrimental for bacterial replication. Intracellular bacteria replication was also monitored in HeLa cells treated with ATG5 siRNA that results in efficient silencing of the expression of ATG5 protein involved in autophagy initiation (**Fig. S1**) (22). siRNA transfected cells were infected at a MOI of 10 with *L. pneumophila* Paris strain and CFU, quantified at 4h and 48h post-infection, revealed that *L. pneumophila* Paris strain replicate less efficiently in cells silenced for ATG5 (**Fig. 1H**). Together these data support that *L. pneumophila* Paris rather than being degraded by host cell autophagy benefits from this cellular pathway to intracellularly replicate.

Autophagy modulation by *L. pneumophila* is strain-specific

To decipher the relationship between host cell autophagy and other *L. pneumophila* strains, GFP-LC3 expressing HeLa cells were infected for 4h at a MOI of 10 with the mCherry expressing American *L. pneumophila* Philadelphia-1 strain or the French *L. pneumophila* Lens strain. Representative images from imaging flow cytometry suggest that autophagosomes number is higher in HeLa cells infected by wild-type *L. pneumophila* Paris and Lens strains than in cells infected by Philadelphia-1 strain, a $\Delta dotA$ mutant or in non-infected cells (**Fig. 2A**). Numeration of autophagosomes on 200 live infected cells confirmed that cells infected by wild-type *L. pneumophila* Paris and Lens strain displayed 2 times more autophagosomes than cells infected with *L. pneumophila* Philadelphia-1, $\Delta dotA$ mutant or non-infected cells (**Fig. 2B**). These data highlight that while infection by *L. pneumophila* Paris and Lens strains induces host cell autophagy, *L. pneumophila* Philadelphia-1 infection does not impact significantly the level of host cell autophagy.

To check whether the strain-dependent relationship between *L. pneumophila* and cell autophagy was not due to different kinetic modulations of this host cell pathway, autophagosome-linked GFP-LC3-II was monitored by using flow cytometry at 2h, 4h and 6h post-infection (**Fig. 2C**). Consistently with the kinetics of bacteria entry in HeLa cells, all infected cells showed basal level of autophagosomes at 2h post-infection. At 4h and 6h post-infection, both *L. pneumophila* Paris and Lens strains displayed 2 times more autophagosomes than non infected cells or cells infected by a $\Delta dotA$ mutant. By contrast, the number of autophagosomes in cells infected by *L. pneumophila* Philadelphia-1 strain was not significantly higher than the basal level of cells either non-infected or infected by a $\Delta dotA$

mutant. Together, these data demonstrate that host cell autophagy modulation by *L. pneumophila* depends in the bacterial strain.

Host cell autophagy is beneficial for *L. pneumophila* strains replication.

Given the different relationship between *L. pneumophila* strains and the host cell autophagy, we addressed the question of the impact of autophagy on bacterial strains replication. First, GFP-LC3 expressing HeLa cells were treated with rapamycin to stimulate autophagy (**Fig. 1F**) previously being infected with mCherry expressing *L. pneumophila* Paris, Lens or Philadelphia-1 strains at a MOI of 10. Bacterial replication (**Fig. 3A**) and autophagy (**Fig. S2A**) were assessed in live infected cells at 16h post-infection by measuring the mCherry labeled bacteria fluorescence and the GFP-LC3-II labeled dots by flow cytometry. Importantly, none of the *L. pneumophila* strain displayed impaired replication in rapamycin treated cells (**Fig. 3A**), while autophagy was increased by both infection and rapamycin treatment (**Fig. S2A**). If significant, *L. pneumophila* Paris and Lens strains seem even to replicate slightly more efficiently than in non-treated cells (**Fig. 3A**). These data was confirmed by monitoring bacterial replication with plate assays in rapamycin treated HeLa cells at 24, 48 and 72h post-infection. Rapamycin treatment did not impact the bacterial replication of any strain (**Fig. 3B, C, D**). Taken together these data suggest that host cell autophagy is not detrimental for bacterial replication in HeLa cells.

Then, GFP-LC3 expressing HeLa cells were treated with silencing RNA against ATG5, involved in autophagy initiation and linked with inhibition of both autophagosomes and autolysosomes (22) or STX17, necessary to autophagosomes/lysosomes fusion related to an accumulation of autophagosomes (23) (**Fig. S1**). Transfected cells were then infected with *L. pneumophila* Paris, Lens or Philadelphia-1 strains at a MOI of 10. Bacterial replication (**Fig. 3E**) and autophagy (**Fig. S2B**) were monitored in live infected cells at 16h post-infection by flow cytometry targeting mCherry and GFP-LC3-II fluorescence, respectively. The three *L. pneumophila* strains displayed less efficient replication in cells in which autophagy initiation was efficiently silenced by siATG5 (**Fig. 3E**). To confirm these results, HeLa cells were treated with silencing RNA and infected by *L. pneumophila* Paris, Lens or Philadelphia-1 strains at a MOI of 10, then bacterial replication was monitored by plate assay at 24, 28 and 72h post-infection. *L. pneumophila* Paris showed impaired replication when cells were silenced for both ATG5 or STX17, i.e. in cells without autolysosomes (**Fig. 3F**). Autolysosomes and efficient degradative autophagy might bring nutrients to *L. pneumophila* Paris to replicate. *L. pneumophila* Philadelphia-1 strain displayed reduced replication in cells silenced for ATG5, which results in less autophagosomes but not in cells silenced for STX17, which results in accumulation of autophagosomes (**Fig. 3G**). This result could suggest that autophagosomes might bring membranes to the LCV of *L. pneumophila* Philadelphia-1 for optimal replication. *L. pneumophila* Lens showed a slight delay in replication when cells were

silenced for both ATG5 or STX17, i.e. in cells without autolysosomes (**Fig. 3H**). Like *L. pneumophila* Paris strain, Lens strain seems to use autophagy and nutrients from autolysosomes for optimal replication.

All together, these data highlight that despite the relationship between host cell autophagy and *L. pneumophila* various strains could be opposite, such as Paris infection increases host cell autophagy while Philadelphia-1 tends to restrain this pathway, a fine-tuned level of autophagy remains beneficial for bacterial replication.

Autophagy modulation by *L. pneumophila* is dependent of the effector repertoire

Strain dependent induction of the host cell autophagy could be due to strain dependent host cell response to *L. pneumophila* infection. However, the host cell autophagy induction by *L. pneumophila* Paris strain was clearly Dot/Icm SST4 dependent, and we hypothesized that strain dependent autophagy induction could result from the high variability of the Dot/Icm effector repertoire between the *L. pneumophila* strains (16). For instance, RavZ, which is an effector that deconjugates the LC3-II from to the phagophore membrane PE and thus restrains autophagy (12,13), is encoded by Philadelphia-1 strain but is not synthesized neither by Paris strain nor by Lens strain, due to the absence of the corresponding gene in their genomes. To check our hypothesis, we infected GFP-LC3 expressing HeLa cells for 4h at a MOI of 10 by a *L. pneumophila* Paris strain that expresses *ravZ* gene from Philadelphia-1 on a plasmid, that we named pRavZ (**Fig. 4A**). Quantification of autophagosomes by GFP-LC3-II measurement through flow cytometry revealed that cells infected with *L. pneumophila* Paris transformed with the empty plasmid pXDC50, displayed, as described above, a high level of autophagy whereas cells infected with *L. pneumophila* Paris expressing *ravZ* showed a basal autophagosomes level.

To determine if the presence of RavZ had an impact on bacterial replication, HeLa cells were infected with wild-type *L. pneumophila* Paris or *L. pneumophila* Paris expressing RavZ, at a MOI of 10, and intracellular CFU were numbered at 24 h, 48, and 72h (**Fig 4B**). RavZ expression from pRavZ plasmid induces a significant replicative default of *L. pneumophila* Paris at 48 and 72h post-infection compared to wild-type *L. pneumophila* Paris, thus suggesting that the Dot/Icm effector RavZ is deleterious for *L. pneumophila* in the Paris strain genetic background.

Cells treatment by rapamycin before infection did not restore bacterial replication at 16h post-infection (**Fig. 4C**), which suggests that RavZ is able to inhibit autophagy induced by rapamycin treatment. Consistently, GFP-LC3-II quantification by flow cytometry at 16h post-infection showed that cells infected by *L. pneumophila* Paris expressing RavZ displayed a basal autophagosomes level, in the absence or the presence of rapamycin, when compared to the huge number of autophagosomes induced by infection by Paris strain (**Fig. 4D**). These experiments demonstrate that expression of RavZ is detrimental for *L.*

pneumophila Paris replication in HeLa cells and this replicative default is related to an impaired relationship of this strain with host cell autophagy.

To further support that an impaired host cell autophagy causes a replicative default of *L. pneumophila* Paris strain, HeLa cells were treated with silencing RNA against ATG5 before being infected with *L. pneumophila* Paris expressing or not RavZ at a MOI of 10. Both bacteria numbering by plate assays performed at 24h, 48h and 72h (**Fig 4E**) and intracellular bacteria assessment by flow cytometry at 16h post-infection (**Fig 4F**) showed that the replication of *L. pneumophila* Paris expressing RavZ is significantly decreased when compared to the wild-type Paris strain. More precisely, the replication rate of the RavZ expressing strain in control siRNA transfected cells is similar to the one of the Paris strain in siATG5 transfected cells (**Fig 4E**) , i.e. in cells in which autophagy is significantly decreased (**Fig 4G**).

Taken together, these data demonstrate that (i) by contrast with *L. pneumophila* Philadelphia-1, *L. pneumophila* Paris infection induces host cell autophagy, (ii) this phenotypic difference is due to the absence on the Paris strain genome of the gene encoding the T4SS effector RavZ, (iii) RavZ is detrimental to *L. pneumophila* Paris intracellular replication in HeLa cells, which suggests that each *L. pneumophila* strain evolved separately to acquire a specific effectors repertoire for fine-tuning host-cell autophagy in order to efficiently replicate.

RavZ is often lost in *Legionella* genomes

Our results together with results from the literature suggest that RavZ can thus be either beneficial or detrimental for *L. pneumophila* replication depending on the cellular context, which could explain why RavZ is only present in a subset of *L. pneumophila* strains. In order to get a larger view on the evolutionary history of this gene, and notably on its presence or absence within genomes, homologs of RavZ were searched in all complete genomes (tblastn against Refseq_genomic). RavZ homologs were not detected outside of the *Legionella* genus. In *Legionella*, RavZ was only found in a few species: *L. pneumophila*, *L. longbeachae*, *L. sanctuaris* and *L. sainthelensi*, the last three forming a clear monophyletic group. The phylogeny of RavZ globally follows the phylogeny of *Legionella* species (**Fig. 5A**), with some exceptions occurring within *L. pneumophila* that could reflect recent recombination or horizontal gene transfer events. In addition, branch lengths of the RavZ tree were highly correlated with those of the tree based on the concatenation of 78 orthologous genes as used in Burstein *et al.* (2015) (23). This pattern is compatible with an ancestral presence of RavZ in this group of species followed by vertical transmission of RavZ and at least 6 independent losses in various lineages (**Fig. 5B**).

When focusing on *L. pneumophila*, RavZ was detected in 42% (209/495) of the *L. pneumophila* genomes available in Refseq_genomic. Presence/absence patterns correlate

with MCG groups as defined in Qin *et al.* (2016) (16), with RavZ present in MCGG 2, 4, 7 and 8, and absent from MCGG 1, 3, 5, 6 and 9 (**Fig. 5C**). Interestingly, divergent sequences were identified in some MCGG, like for ATCC33823 in MCGG2 indicating recent replacement of RavZ. In any case, this pattern clearly demonstrates recurrent losses of RavZ within *L. pneumophila*. Assuming ancestral presence of RavZ as suggested by our previous analysis, at least 5 independent losses have occurred during the recent diversification of *L. pneumophila*. This result reinforces the idea that environmental conditions, and notably variation in the natural hosts infected by the different strains can select a different set of effectors, and notably for manipulation of autophagy. This result calls for a clearer identification of the natural hosts of the *L. pneumophila* strains and for a deeper analysis of host specificity of these strains.

Discussion

Here, we propose that *L. pneumophila* strains could impact differently on cellular autophagy in order to replicate in host cells. *L. pneumophila* Paris infection strongly induces autophagy right after infection, and this induction lasts and becomes even higher when the bacteria actively replicates. By contrast, the Philadelphia-1 strain does not significantly impact on the host cell autophagy level at early time of infection, and its effect is moderate, if significant, when it replicates, as previously described (12,13). Importantly, whatever the bacterial strain and its effect on autophagy, this host cell pathway is beneficial for intracellular bacterial replication in the particular HeLa cells used here, as demonstrated by drug cells treatment and autophagy-targeting siRNA. One still has to identify the precise role of host cell autophagy in the intracellular bacterial replication, in particular to decipher whether autophagosomes could provide the bacteria with membranes to enlarge the replicative vacuole or whether functional autolysosomes could feed the bacteria with useful degradative elements. Whatever this role, *L. pneumophila* seems to fine-tune host autophagy to reach an optimal autophagy level appropriate for bacterial replication, that might depend on both the bacterial strain and the host cell (24). Indeed, preliminary experiments showed that strong stimulation of HeLa cells autophagy with both bafilomycin and rapamycin results in the inhibition of host autophagy by *L. pneumophila* Paris strain rather than in the stimulation that we described above (data not shown), as previously described (14).

Strikingly, the difference observed in the relationship between host cell autophagy and the Paris and Philadelphia-1 *L. pneumophila* strains relies on one Dot/Icm effector, RavZ. RavZ which is known to irreversibly deconjugate LC3-PE, and thus to inhibit autophagy, is present in *L. pneumophila* Philadelphia-1 strain and absent in *L. pneumophila* Paris. We demonstrated that RavZ is sufficient to reduce the autophagosomes level in Paris infected cells. Consistently with the beneficial effect of a relatively high level of host cell autophagy for the Paris strain, expression of *ravZ* gene also results in a replicative defect of the French strain. Thus, RavZ could be considered as deleterious for *L. pneumophila* Paris strain in this specific host cells. In accordance with this result and on the basis of a phylogenetic study, we propose that the *ravZ* gene was ancestrally present in numerous *L. pneumophila* strains and often lost during the recent diversification of *L. pneumophila*. We propose that this might reflect various selective pressures to maintain this gene that could differ according to the natural hosts in which these various strains are replicating in nature.

This work supports the idea that each *L. pneumophila* strain evolved under specific selection regimes. In particular, the T4SS effectors repertoire, which is poorly conserved (23), could result from the selective pressure demanded by various natural hosts infected by the different strains. Through the example of the interaction between *L. pneumophila* and host cell autophagy, we highlight here that this specific evolution could result in diverse and fine-tuned relationship between *L. pneumophila* strains and their incidental hosts that are the

human cells. It calls for precise investigations on the variation in the autophagic process (i.e. the basal level of autophagy) between different amoebas and on the specificity of *L. pneumophila* infection in these various hosts.

Materials and Methods

Bacterial strains

L. pneumophila Paris (25,26) and Lens (25,27) strains were provided by the *Legionella* Reference National Center (CNR), Lyon, France. *L. pneumophila* Philadelphia-1 (Phila1) strain (1,28) was kindly provided by X. Charpentier, International Center for Infectiology Research (CIRI), Lyon, France. Philadelphia-1 strain used in this study had 5 single-nucleotide polymorphisms compared to sequenced genome (NC_002942.5): G688274A, T816562G, GT820457/58CG, del1355972T. All *L. pneumophila* strains were grown on charcoal yeast extract (CYE) (29) agar plates or cultured aerobically in N-(2-acetamido)-2-aminoethanesulfonic acid (ACES) yeast extract (AYE) broth containing: 0.3g/L iron (III) pyrophosphate (Sigma), 0.5g/L cystein (Roth), 10g/L ACES (Roth) and 12g/L yeast extract (Becton Dickinson). The pH was adjusted to 6.9 with KOH (Roth) and AYE was 0.2µm filtered. If necessary, 5µg/mL of chloramphenicol (Roth) and/or 2mM of isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (Roth) were added. 5-alpha *E. coli* strain (NEB) was grown aerobically in Luria Bertani (Becton Dickinson) agar plates or broth. If necessary, 20µg/mL of chloramphenicol were added. All *L. pneumophila* and *E. coli* strains were incubated at 37°C.

Cloning

mCherry labeled *L. pneumophila* were obtained by transforming the bacteria with the pXDC50 plasmid that expresses the *mCherry* gene under the control of a Ptac inducible promoter (gift from X. Charpentier, CIRI, Lyon, France). *ravZ* gene was amplified from Philadelphia-1 genome using forward 5'-CAGAATTCATGAAAGGCAAGTTAACAGGT-3' and reverse 5'-CACCATATGTATATCTCCTATTTTACCTTAATGCCACC-3' primers with the PrimeSTAR Max (Takara) polymerase. The amplicon was digested by EcoRI and NdeI enzymes (NEB) and then ligated into the same sites of pXDC50 by using a T4 DNA ligase (Fermentas), thus resulting in a *ravZ* gene expression upstream of *mCherry* gene, both under control of the Ptac promoter. *L. pneumophila* Paris strain was transformed by electroporation with the resulting construct, named pRavZ. All strains used in this study were checked for axenic replication and mCherry fluorescence emission (**Fig. S3**).

Cell culture

Human epithelial HeLa cell line and GFP-LC3 stable expressing HeLa cell line were given by Mathias Faure from the CIRI, Lyon, France (30). HeLa cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco) containing 10% of heat-inactivated Foetal Bovin Serum (FBS) (Gibco) with 100units/mL of penicillin and 100µg/mL of streptomycin. These both cell lines were incubated at 37°C in 5% CO₂ atmosphere and used from passages 5 to 15.

Cell treatment

When indicated, cells were treated with 100nM of rapamycin (Invivogen). In a case of an infection, these drugs were added to the cell culture in the same time than bacteria. These drugs were maintained in cell culture during all the experiment.

Transient siRNA transfection

Cells were transfected with control siRNA (siCTRL) (D-001810-10), siRNA targeting ATG5 (siATG5) (L-004374-00) or Syntaxin 17 (siSTX17) (L-020965-01). Each siRNA was a pool of 4 single siRNA that target the same gene except for siCTRL that did not target any gene (Dharmacon, ON-TARGETplus SMARTpool series). Cells were seeded at a density of $1,5 \cdot 10^5$ cells in 6 well-plates in optiMEM medium (Gibco) complemented with 10% FBS, 2mM L-glutamine (Gibco), 0.1mM non-essential amino acids (Gibco), 1mM sodium pyruvate (Gibco) and 0,1g/L sodium bicarbonate (Sigma) 24h before transfection. Lipofectamine RNAiMAX (Life) was diluted 50 fold in optiMEM medium and added to 100pmol of siRNA also 50 fold diluted in optiMEM. After 20 minutes of incubation at room temperature, the mix was inoculated on cells. One day post-transfection, cells were harvested with trypsin 0,05% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Gibco) and seeded at needed density. Two days post-transfection proteins level expression were checked by western-blot.

Infection

L. pneumophila were grown on CYE agar plates during 3 days at 37°C. To prepare bacteria before infection, there were spotted on CYE plates during 24h at 37°C. After, bacteria were inoculated in AYE broth and cultured aerobically during 24h at 37°C. When needed, for induction of mCherry fluorescence and/or RavZ, bacteria with pXDC50 or pRavZ plasmid were incubated with 5µg/mL of chloramphenicol and 2mM of IPTG. For infection, bacteria were diluted in DMEM containing 10% of FBS and added at a chosen multiplicity of infection (MOI). To synchronized bacterial uptake, a centrifugation during 10 minutes at 500g was performed.

Plate assay

To monitor bacterial replication by plate assay, HeLa cells were infected with non-expressing mCherry bacteria at a MOI of 10. In the case of the analysis of RavZ introduction in *L. pneumophila* Paris strain, mCherry expressing bacteria were used at a MOI of 10. After 4h of infection, cells were washed 3 times with phosphate buffered saline (PBS) (Gibco) and incubated in DMEM with 5% FBS. At indicated time, cells were lysed 10 minutes using 0,1% saponin and *L. pneumophila* were diluted and plated on CYE plates using EasySpiral plater (Interscience).

Flow Cytometry

Flow cytometry (19) allows quantitative characterization of thousands single cells by assessing a combination of fluorescence features. GFP-LC3 expressing HeLa cells were used for both autophagy and replication experiment. For infected cells analysis, mCherry expressing bacteria were used at a MOI of 10. After indicated time post-infection, non adherent cells were harvested with trypsinized adherent cells. Cells were stained with fixable viability dye (eBioscience). Then, cells were permeabilized during 5 minutes with 0,05% of saponin (Sigma) on ice and fixed 20 minutes with 2% paraformaldehyde (Sigma). To monitor autophagy regarding the quantity of autophagosomes, GFP median fluorescence intensity (medFI) of permeabilized cells was measured. In control experiment with cells treated during 4h with rapamycin each cross represents the ratio of GFP-LC3-II medFI of live treated cells divided by the GFP-LC3-II medFI of live non-treated cells. In control experiment with cells treated during 48h with siRNA, data represents the ratio of GFP-LC3-II medFI of live treated cells divided by the GFP-LC3-II medFI of live siCTRL treated cells. When cells were infected with or without treatment, each cross represents the ratio of GFP-LC3-II medFI of live infected treated or non-treated cells divided by the GFP-LC3-II medFI of live non-infected and non-treated cells. To monitor bacterial replication, mCherry mean fluorescence intensity was analysed. Each point represents the ratio of mCherry mean fluorescence intensity of live infected cells divided by the mCherry mean fluorescence intensity of live infected control cells. Data were acquired using LSRII cytometer (Becton Dickinson), Diva software (Becton Dickinson) and analyzed with Cytobank software (31).

Image-based Flow Cytometry

Image-based flow cytometry (21) allows quantitative image analysis of random hundreds single cells by monitoring many fluorescence patterns. GFP-LC3 expressing HeLa cells were used to monitor autophagy by counting autophagosomes. For infected cells analysis, mCherry expressing bacteria were used at a MOI of 10. Cells were prepared as conventional flow cytometry. Cells were recorded with x40 magnification with activated Extended Depth of Field (EDF) for autophagosomes count accuracy. For representative images, cells were recorded without EDF. Images analyses were performed with spot count feature and 200 random positives cells were analyzed for each independent experiment. For median fluorescence intensity analysis each cross represents the ratio of GFP-LC3-II median fluorescence intensity of live treated cells divided by the GFP-LC3-II median fluorescence intensity of live non-treated cells. Data were acquired using ImageStreamX MarkII (Millipore), Inspire software (Millipore) and analyzed with IDEAS software (Millipore).

Western blot

To monitor LC3 and P62 quantity in infected cells, HeLa cells were used with non-expressing mCherry bacteria at a MOI of 25. The correct silencing by siRNA was checked on both HeLa and HeLa expressing GFP-LC3 whereas drugs effect was analysed only on HeLa cells. To lyse cells, cells were harvested and incubated during 20 minutes at 4°C in lysis buffer containing 0,5% Nonidet-P40 (NP40) (USB) and proteases cocktail (Sigma) in PBS. Then proteins were extracted with a centrifugation at 4°C at 14 000g during 20 minutes and Laemmli buffer was added. In all western-blot experiment, actin was used as a loading control. For LC3 and P62 analysis, proteins were loaded in 14% SDS PAGE and transferred to PVDF membranes (Thermo). Then, LC3 was detected using rabbit anti-LC3 primary antibody (Sigma) and goat anti rabbit HRP-conjugated secondary antibody (Sigma). P62 was detected using mouse anti-P62 primary antibody (Santacruz) and goat anti mouse HRP-conjugated secondary antibody (Sigma). Actin was detected using rabbit anti-actin primary antibody (Sigma) and goat anti rabbit HRP-conjugated secondary antibody (Sigma). All these antibodies were diluted in PBS with 0,1% Tween 20 (Roth) and 5% BSA (Roth). For checking efficiency of siRNA transfection, after 48h post-transfection, proteins were loaded in 12% SDS PAGE and transferred to PVDF membranes (Thermo). ATG5 was detected using rabbit anti-ATG5 primary antibody (Sigma) and goat anti-rabbit HRP-conjugated secondary antibody. STX17 was detected using rabbit anti-STX17 primary antibody (Sigma) and goat anti-rabbit HRP-conjugated secondary antibody. Actin was detected using rabbit anti-actin primary antibody and goat anti rabbit HRP-conjugated secondary antibody. All these antibodies were diluted in PBS with 0,25% Tween 20 and 5% BSA.

Phylogenetic and statistical analyses

Phylogenetic trees were constructed using PhyML using a maximum likelihood method and a GTR model of substitution. Default parameters were used. R software (version 3.2.3) (R Core Team, 2015) was used for all statistical analyses (<https://www.R-project.org>). Data were analyzed by linear models. Normality and homoscedasticity were checked graphically for each fitted model. F statistics were given for global effects of factors and a Tukey's test was used for side-by-side comparisons.

References

1. Fraser DW, Tsai TR, Orenstein W, Parkin WE, Beecham HJ, Sharrar RG, *et al.* Legionnaires' Disease: Description of an Epidemic of Pneumonia. *N. Engl. J. Med.*, dec 1977;297(22): 1189-97.
2. Rowbotham TJ. Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J. Clin. Pathol.*, 1980; 33(12): 1179–1183.
3. Chandler FW, Blackmon JA, Hicklin MD, Cole RM, Callaway CS. Ultrastructure of the Agent of Legionnaires' Disease in the Human Lung. *Am. J. Clin. Pathol.*, jan 1979; 71(1): 43-50.
4. Mody CH, Paine R, Shahrabadi MS, Simon RH, Pearlman E, Eisenstein BI, *et al.* *Legionella pneumophila* replicates within rat alveolar epithelial cells. *J. Infect. Dis.*, 1993; 167(5): 1138–1145.
5. Vogel JP, Andrews HL, Wong KN, Isberg RR. Conjugative Transfer by the Virulence System of *Legionella pneumophila*. *Science*. feb 1998; 279: 873–875.
6. Segal G, Purcell M, Shuman HA. Host cell killing and bacterial conjugation require overlapping sets of genes within a 22-kb region of the *Legionella pneumophila* genome. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1998; 95(4): 1669–1674.
7. Finsel I, Hilbi H. Formation of a pathogen vacuole according to *Legionella pneumophila* : how to kill one bird with many stones: *Legionella* pathogen vacuole formation. *Cell Microbiol.*, apr 2015.
8. Ktistakis NT, Tooze SA. Digesting the Expanding Mechanisms of Autophagy. *Trends Cell. Biol.*, apr 2016.
9. Escoll P, Rolando M, Buchrieser C. Modulation of Host Autophagy during Bacterial Infection: Sabotaging Host Munitions for Pathogen Nutrition. *Front. Immunol.*, mar 2016.
10. Khweek AA, Caution K, Akhter A, Abdulrahman BA, Tazi M, Hassan H, *et al.* A bacterial protein promotes the recognition of the *Legionella pneumophila* vacuole by autophagy. *Eur. J. Immunol.*, 2013; 43(5): 1333–1344.
11. Amer AO, Swanson MS. Autophagy is an immediate macrophage response to *Legionella pneumophila*. *Cell. Microbiol.*, jun 2005; 7(6):765-78.
12. Choy A, Dancourt J, Mugo B, O'Connor TJ, Isberg RR, Melia TJ, *et al.* The *Legionella* Effector RavZ Inhibits Host Autophagy Through Irreversible Atg8 Deconjugation. *Science*. 25 oct 2012; 338(6110): 1072-6.
13. Horenkamp FA, Kauffman KJ, Kohler LJ, Sherwood RK, Krueger KP, Shteyn V, *et al.* The *Legionella* Anti-autophagy Effector RavZ Targets the Autophagosome via PI3P- and Curvature-Sensing Motifs. *Dev. Cell.*, sept 2015; 34(5): 569-76.
14. Rolando M, Escoll P, Nora T, Botti J, Boitez V, Bedia C, *et al.* *Legionella pneumophila* S1P-lyase targets host sphingolipid metabolism and restrains autophagy. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2016.
15. Gomez-Valero L, Buchrieser C. Genome Dynamics in : The Basis of Versatility and Adaptation to Intracellular Replication. *Cold. Spring. Harb. Perspect. Med.*, jun 2013; 3(6).
16. Qin T, Zhang W, Liu W, Zhou H, Ren H, Shao Z, *et al.* Population structure and minimum core genome typing of *Legionella pneumophila*. *Sci. Rep.*, 18 feb 2016.
17. Gomez-Valero L, Rusniok C, Cazalet C, Buchrieser C. Comparative and Functional Genomics of *Legionella* Identified Eukaryotic Like Proteins as Key Players in Host-Pathogen Interactions. *Front. Microbiol.*, 2011
18. Gao L-Y, Kwai YA. Apoptosis in macrophages and alveolar epithelial cells during early stages of infection by *Legionella pneumophila* and its role in cytopathogenicity. *Infect. Immun.*, 1999; 67(2): 862–870.
19. Shvets E, Fass E, Elazar Z. Utilizing flow cytometry to monitor autophagy in living mammalian cells. *Autophagy*. jul 2008; 4(5): 621-8.

20. Heitman J, Movva NR, Hall MN. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science*. aug 1991; 253(5022): 905-9.
21. Heung Kyu Lee, Jennifer M. Lund, Balaji Ramanathan, Noboru Mizushima, Akiko Iwasak. Autophagy-Dependent Viral Recognition by Plasmacytoid Dendritic Cells. *Science*. mar 2007; 315(5817): 1398-401.
22. Mizushima N, Yamamoto A, Hatano M, Kobayashi Y, Kabeya Y, Suzuki K, *et al*. Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J. Cell. Biol.*, feb 2001; 152(4): 657-68.
23. Burstein D, Amaro F, Zusman T, Lifshitz Z, Cohen O, Gilbert JA, *et al*. Genomic analysis of 38 *Legionella* species identifies large and diverse effector repertoires. *Nat. Genet.*, janv 2016; 48(2): 167-75.
24. Schmid D, Pypaert M, Münz C. Antigen-Loading Compartments for Major Histocompatibility Complex Class II Molecules Continuously Receive Input from Autophagosomes. *Immunity*. jan 2007; 26(1): 79-92.
25. Cazalet C, Rusniok C, Brüggemann H, Zidane N, Magnier A, Ma L, *et al*. Evidence in the *Legionella pneumophila* genome for exploitation of host cell functions and high genome plasticity. *Nat. Genet.*, nov 2004; 36(11): 1165-73.
26. Cazalet C, Jarraud S, Ghavi-Helm Y, Kunst F, Glaser P, Etienne J, *et al*. Multigenome analysis identifies a worldwide distributed epidemic *Legionella pneumophila* clone that emerged within a highly diverse species. *Genome Res.*, feb 2008; 18(3): 431-41.
27. Nguyen TMN, Illef D, Jarraud S, Rouil L, Campese C, Che D, *et al*. A community-wide outbreak of legionnaires disease linked to industrial cooling towers—how far can contaminated aerosols spread? *J. Infect. Dis.*, 2006; 193(1): 102–111.
28. Chien M, Morozova I, Shi S, Sheng H, Chen J, Gomez SM, *et al*. The Genomic Sequence of the Accidental Pathogen *Legionella pneumophila*. *Science*. sept 2004; 305(5692): 1966-8.
29. Feeley JC, Gibson RJ, Gorman GW, Langford NC, Rasheed JK, Mackel DC, *et al*. Charcoal-yeast extract agar: primary isolation medium for *Legionella pneumophila*. *J. Clin. Microbiol.*, 1979; 10(4): 437–441.
30. Verlhac P, Grégoire IP, Azocar O, Petkova DS, Baguet J, Viret C, *et al*. Autophagy Receptor NDP52 Regulates Pathogen-Containing Autophagosome Maturation. *Cell. Host Microbe*. apr 2015; 17(4): 515-25.
31. Kotecha N, Krutzik PO, Irish JM. Web-Based Analysis and Publication of Flow Cytometry Experiments. In: Robinson JP, Darzynkiewicz Z, Dobrucki J, Hyun WC, Nolan JP, Orfao A, *et al*. *Current Protocols in Cytometry*. jul 2010

Acknowledgments

We thank X. Charpentier (CIRI) for providing Philadelphia-1 strain and pXDC50 plasmid. We also thank S. Dussurgey (AniRA-Cytométrie en Flux-UMS3444) for assistance. V. Lelogeais and this work was supported by the LABEX ECOFECT (ANR-11-LABX-0048) of Université de Lyon, within the program "Investissements d'Avenir" (ANR-11-IDEX-0007) operated by the French National Research Agency (ANR). This work was also funded by the Centre National de la Recherche Scientifique (UMR 5308), the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (U1111) and the Université Lyon 1.

Figure legend and figures

Figure 1. *L. pneumophila* Paris infection induces host cell autophagy to the benefit of bacterial intracellular replication

(A-E) HeLa cells were infected during 4h by *L. pneumophila* Paris or $\Delta dotA$ mutant. For drugs experiments, cells were treated by rapamycin during 4h. **(A)** Representative images of cells where green dots are GFP-LC3-II autophagosomes and red dots are mCherry expressing bacteria. **(B, C)** Autophagosomes were numerated by spot counting and median from one experiment is represented. Similar results were obtained from two independent experiments. Asterisks indicate significant differences from basal level **(B)** (F-statistic : 68, DF : 2, p-value : $< 2.10^{-16}$) **(C)** (F-statistic : 61, DF : 1, p-value : 6.10^{-14}). **(D, E)** Quantification of GFP-LC3-II was monitored by GFP median fluorescence intensity measurement. Data are normalized with the basal level of autophagy (dashed line) from non-infected cells. Data represent three independent experiments and asterisks indicate significant differences from basal level **(D)** (F-statistic : 45, DF : 2, p-value : $1.8.10^{-3}$) **(E)** (F-statistic : 1276, DF : 1, p-value : 8.10^{-4}). **(F left)** HeLa cells were infected during 4h at a MOI of 25 by *L. pneumophila* Paris or $\Delta dotA$ mutant. **(F right)** HeLa cells were treated with rapamycin during 4h. Cells were lysed for western blot. HeLa cells were **(G)** non-treated (red) or treated with rapamycin (gold), **(H)** siCTRL (blue) or siATG5 (cyan) and infected by *L. pneumophila* Paris or $\Delta dotA$ mutant (green). At 4 and 48h post-infection, intracellular and extracellular bacteria were plated and numerated. Data represent one experiment realized in triplicates and asterisks indicate significant differences **(G)** F-statistic : 62, DF : 2, p-value : 2.10^{-6} , **(H)** F-statistic : 47 DF : 1, p-value : 5.10^{-4}).

Figure 1. *L. pneumophila* Paris infection induces host cell autophagy to the benefit of bacterial intracellular replication

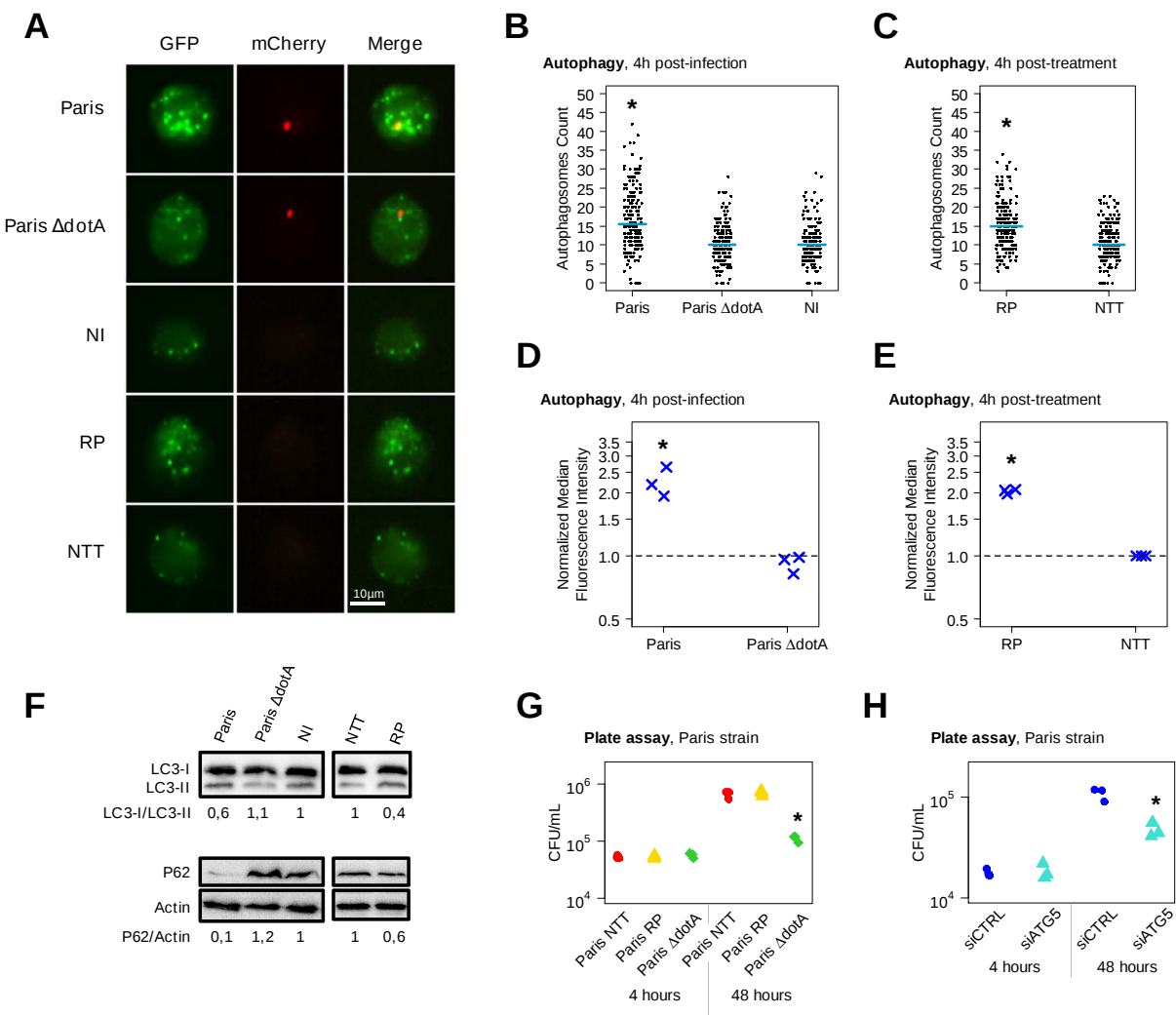


Figure 2. Autophagy modulation by *L. pneumophila* is strain-specific

HeLa cells were infected during **(A, B)** 4h or **(C)** indicated time by wild-type *L. pneumophila* Paris, $\Delta dotA$ mutant, Phila1 or Lens strain. **(A)** Representative images of cells where green dots are GFP-LC3-II autophagosomes and red dots are mCherry expressing bacteria. **(B)** Autophagosomes were numerated by spot counting and median from one experiment are represented. Similar results were obtained from two independent experiments. Asterisks indicate significant differences from basal level (F-statistic: 81, DF: 4, p-value: $< 2.10^{-16}$). **(C)** Quantification of GFP-LC3-II was monitored by GFP median fluorescence intensity measurement. Data are normalized with the basal level of autophagy (dashed line) from non-infected cells. Data represent three independent experiments and asterisks indicate significant differences from basal level (F-statistic : 21, DF : 4, p-value : $1.3.10^{-08}$).

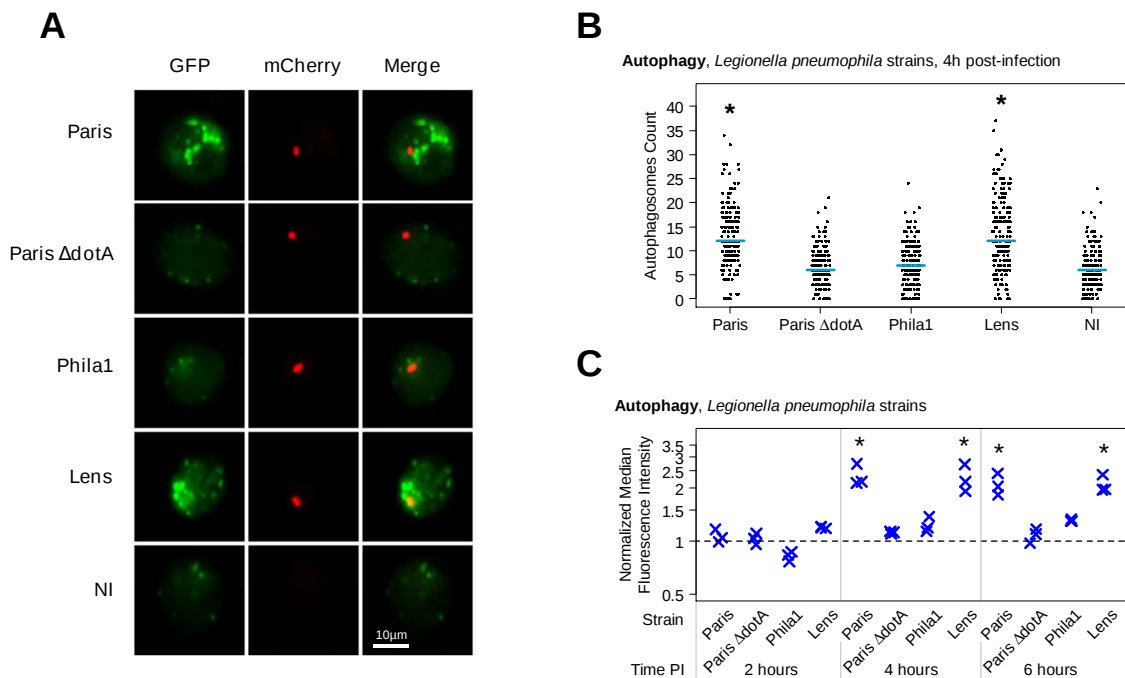


Figure 3. Host cell autophagy is beneficial for *L. pneumophila* strains replication

(A-D) HeLa cells were treated by rapamycin (gold) or non-treated (red) and infected during 16h by *L. pneumophila* **(A, B)** Paris, **(A, C)** Phila1 or **(A, D)** Lens strain. **(A)** Intracellular replication was measured with mCherry mean fluorescence intensity from three independent experiments. Data are normalized by the bacterial replication in non-treated cells and asterisks indicate significant differences (F-statistic: 21, DF: 1, p-value: $9.6 \cdot 10^{-4}$). At 4, 24, 48 and 72h post-infection, intracellular and extracellular bacteria were plated and numerated. Data represent mean + standard deviation (SD) of three independent experiments and asterisks indicate significant differences **((B)** F-statistic : 11, DF : 2, p-value : $3 \cdot 10^{-4}$, **(C)** F-statistic : 0.002 , DF : 1, p-value : 0.97, **(D)** F-statistic : 0.012, DF : 1, p-value : 0.91). **(E-H)** HeLa cells were treated by siCTRL (blue), siATG5 (cyan) or siSTX17 (purple) and infected during 16h by *L. pneumophila* **(E, F)** Paris, **(E, G)** Phila1 or **(E, H)** Lens strain. **(E)** Intracellular replication was measured with mCherry mean fluorescence intensity from three independent experiments. Data are normalized by the bacterial replication in siCTRL treated cells (F-statistic: 44, DF: 2, p-value: $3 \cdot 10^{-07}$). At 4, 24, 48 and 72h post-infection, intracellular and extracellular bacteria were plated and numerated. Data represent mean + SD of three independent experiments and asterisks indicate significant differences **((F)** F-statistic : 17, DF : 2, p-value : $1.7 \cdot 10^{-05}$, **(G)** F-statistic : 6, DF : 2, p-value : $7 \cdot 10^{-3}$, **(H)** F-statistic : 2.01, DF : 2, p-value : 0.15).

Figure 3. Host cell autophagy is beneficial for *L. pneumophila* strains replication

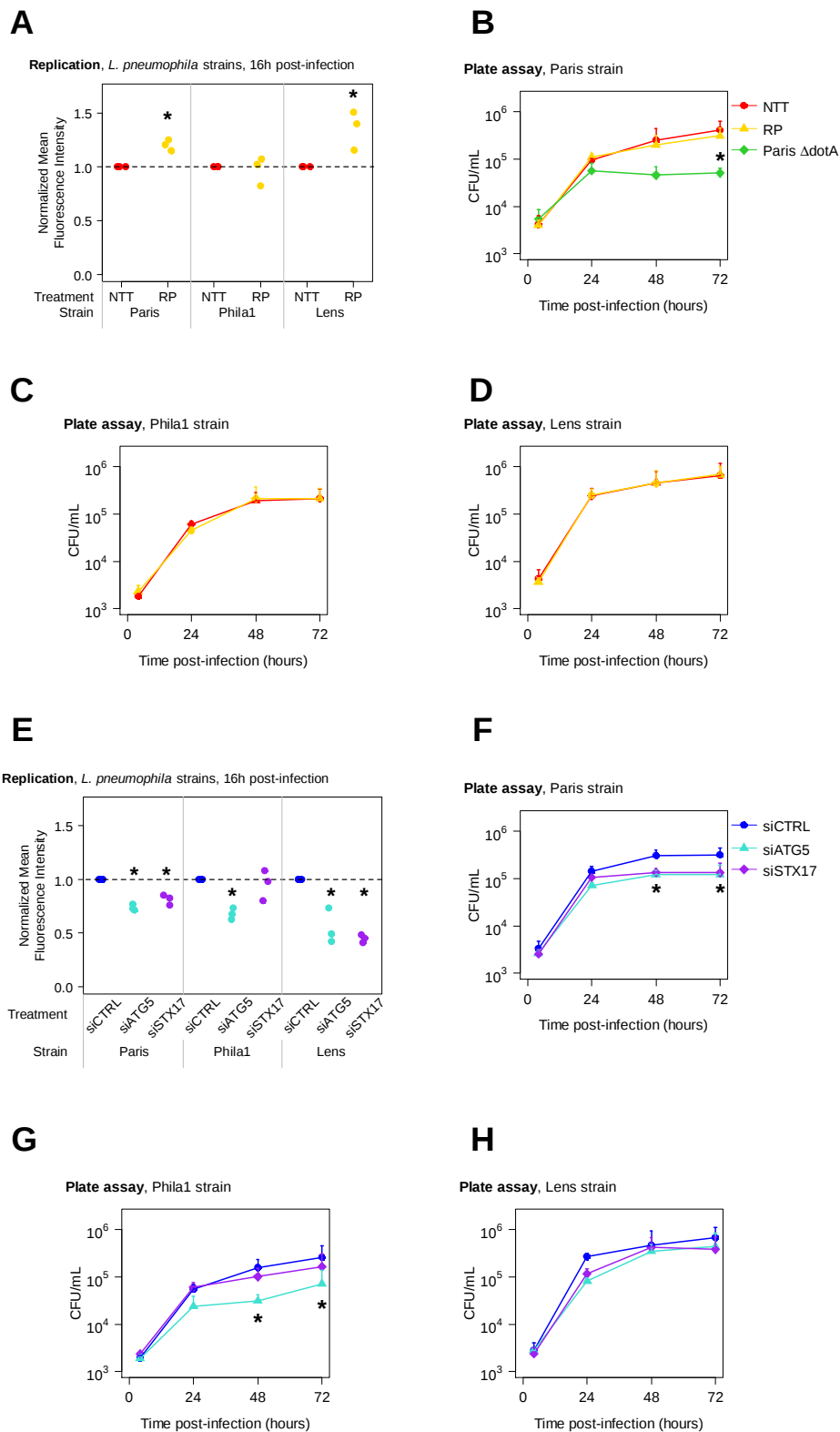


Figure 4. Autophagy modulation by *L. pneumophila* is dependent of the effector repertoire

(A) HeLa cells were infected during 4h with wild-type *L. pneumophila* Paris, Paris expressing RavZ or Phila1. Quantification of GFP-LC3-II was monitored by GFP median fluorescence intensity measurement. Data are normalized with the basal level of autophagy (dashed line) from non-infected cells. Data represent three independent experiments and asterisks indicate significant differences from basal level (F-statistic : 18, DF : 2, p-value : 0.01). HeLa cells were **(B, C, D)** non-treated (red) or treated with rapamycin (gold), **(E, F, G)** siCTRL (blue) or siATG5 (cyan) and infected with wild-type *L. pneumophila* Paris or Paris expressing RavZ. **(B, E)** At 4, 24, 48 and 72h post-infection, intracellular and extracellular bacteria were plated and numerated. Data represent mean + SD of three independent experiments and asterisks indicate significant differences (**(B)** Treatment : F-statistic: 4.10^{-3} , DF : 1, p-value : 0.95 ; Strain : F-statistic : 76, DF : 1, p-value : $1.4.10^{-10}$, **(E)** Treatment : F-statistic : 16, DF : 1, p-value : 3.10^{-4} ; Strain : F-statistic : 28, DF : 1, p-value: 6.10^{-06}). **(C, F)** Intracellular replication was mesured with mCherry mean fluorescence intensity from three independent experiments. Data are normalized by the bacterial replication in **(C)** non-treated or **(F)** siCTRL treated cells (**(C)** Treatment : F-statistic: 27, DF: 1, p-value : $2.1.10^{-3}$; Strain : F-statistic : 285 , DF: 1, p-value : $2.8.10^{-06}$, **(F)** Treatment : F-statistic: 22, DF: 1, p-value : 2.10^{-3} ; Strain : F-statistic : 94, DF : 1, p-value : $2.6.10^{-05}$). **(D, G)** Quantification of GFP-LC3-II was monitored by GFP median fluorescence intensity measurement. Data are normalized with the basal level of autophagy (dashed line) from non-infected cells. Data represent three independent experiments and asterisks indicate significant differences from basal level (**(D)** Treatment : F-statistic : 3.1, DF : 1, p-value : 0.11 ; Strain : F-statistic : 63, DF : 2, p-value : $2.1.10^{-06}$, **(G)** Treatment : F-statistic : 49, DF : 1, p-value : $3.8.10^{-5}$; Strain : F-statistic : 43, DF: 2, p-value : $1.2.10^{-05}$).

Figure 4. Autophagy modulation by *L. pneumophila* is dependent of the effector repertoire

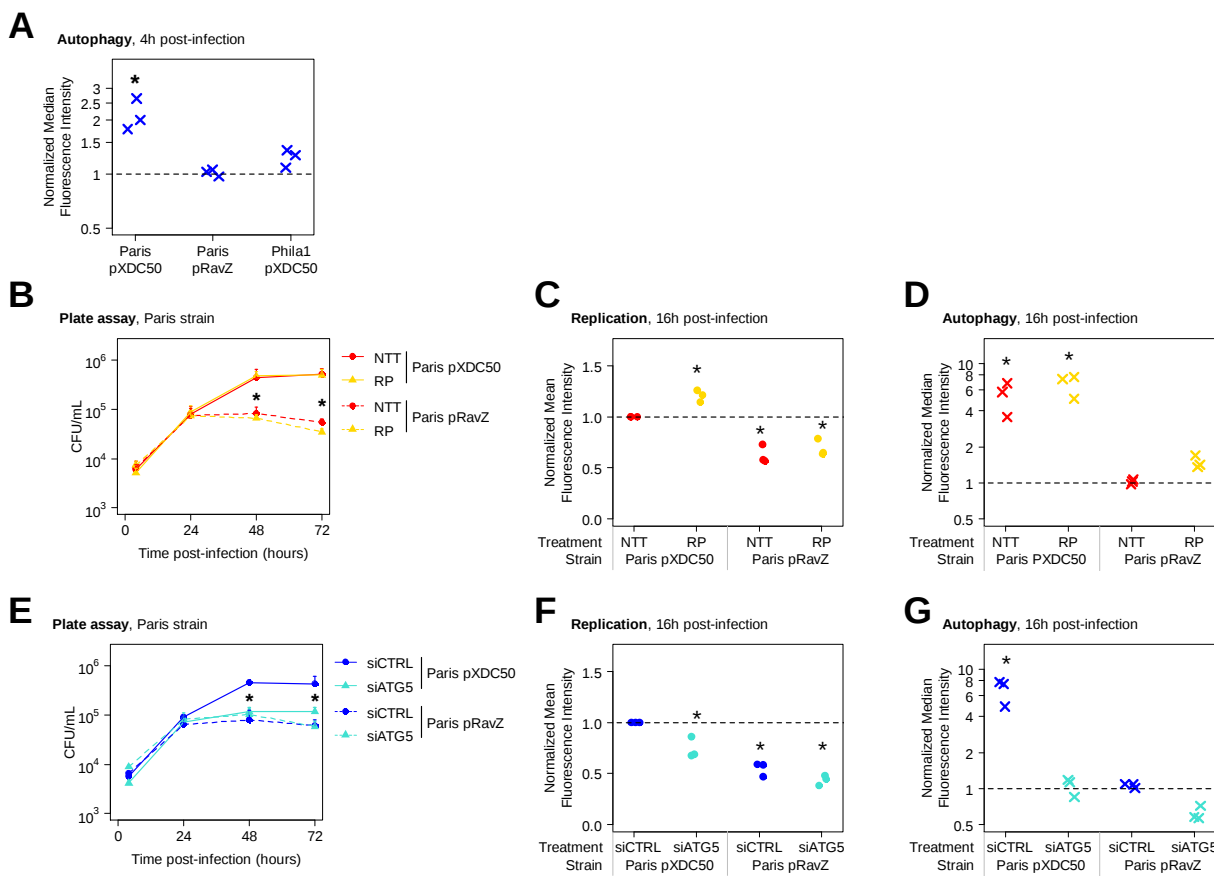
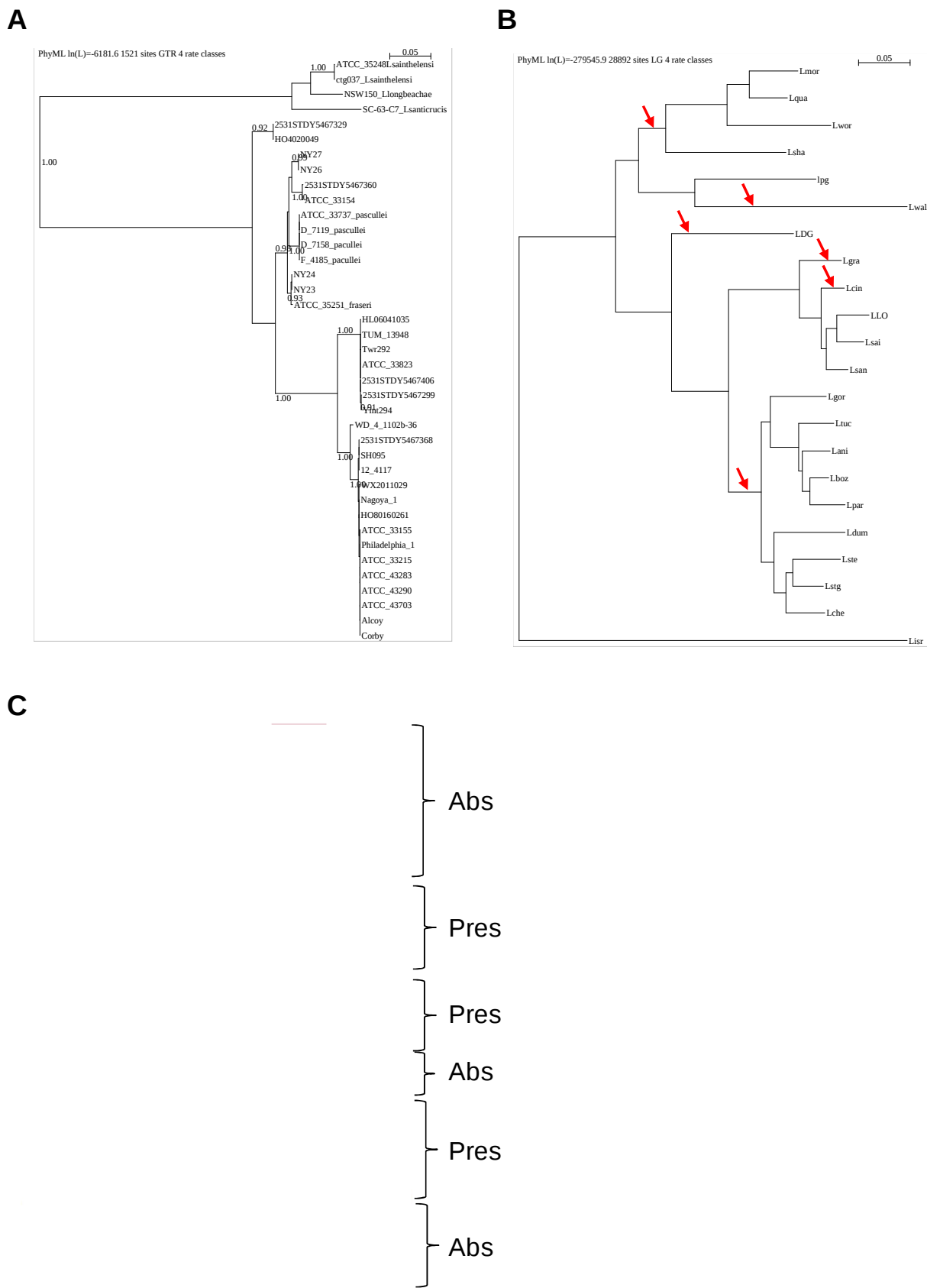


Figure 5. RavZ is often lost in *Legionella* genomes

(A) ML tree of RavZ homologs. Only a subset of homologous sequences identified are represented in the tree for clarity, the missing sequences being part of the group of sequences that include the one present in the *L. pneumophila* Philadelphia 1 strain. **(B)** ML tree of *Legionella* species based on the concatenation of 78 conserved genes. Red arrows indicate putative loss events of RavZ. **(C)** Presence/absence pattern of RavZ in MCG groups of *L. pneumophila*. The phylogenetic tree is from the S2 figure of Qin *et al.* 2016. Red arrows represent putative losses.

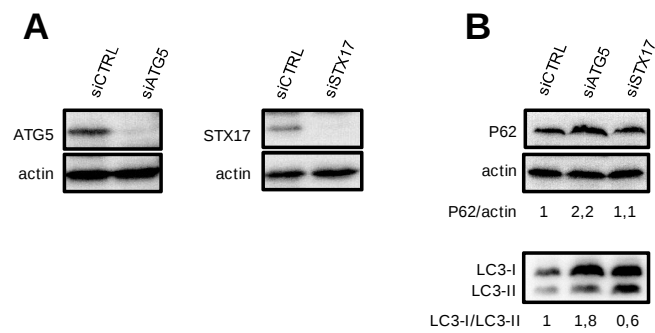
Figure 5. RavZ is often lost in *Legionella* genomes



Supplementary data

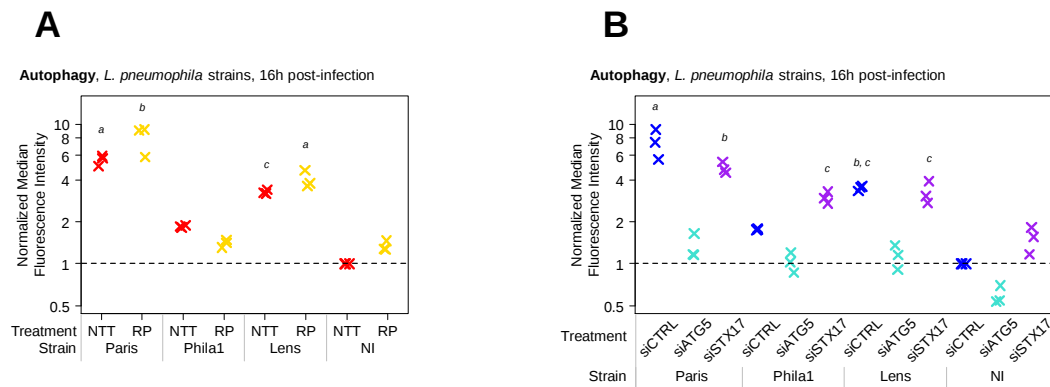
Supplemental Figure S1. Autophagy modulation by cells treatments

HeLa cells were treated with rapamycin during 4h or siCTRL, siATG5 or siSTX17 during 48h. Cells were lysed for western blot using specific antibodies for **(A)** ATG5, STX17 and actin or **(B)** P62, LC3-I/II and actin.



Supplemental Figure S2. Autophagy measurement during bacterial replication

(A) HeLa cells were treated by rapamycin (gold) or non-treated (red) and infected during 16h with *L. pneumophila* Paris, Phila1 or Lens strain. Quantification of GFP-LC3-II was monitored by GFP median fluorescence intensity measurement. Data are normalized with the basal level of autophagy (dashed line) from non-infected cells. Data represent three independent experiments and asterisks indicate significant differences from basal level (Treatment : F-statistic: 7.8, DF : 1, p-value : 0.014 ; Strain : F-statistic : 85, DF : 3, p-value : $3.1 \cdot 10^{-09}$). **(B)** HeLa cells were treated by siCTRL (blue), siATG5 (cyan) or siSTX17 (purple) and infected during 16h with *L. pneumophila* Paris, Phila1 or Lens strain. Quantification of GFP-LC3-II was monitored by GFP median fluorescence intensity. Data are normalized with the basal level of autophagy (dashed line) from non-infected cells. Data represent three independent experiments and asterisks indicate significant differences from basal level (Treatment : F-statistic : 63, DF : 2, p-value : $7.4 \cdot 10^{-10}$; Strain : F-statistic : 61, F : 3, p-value : $8,0 \cdot 10^{-11}$).

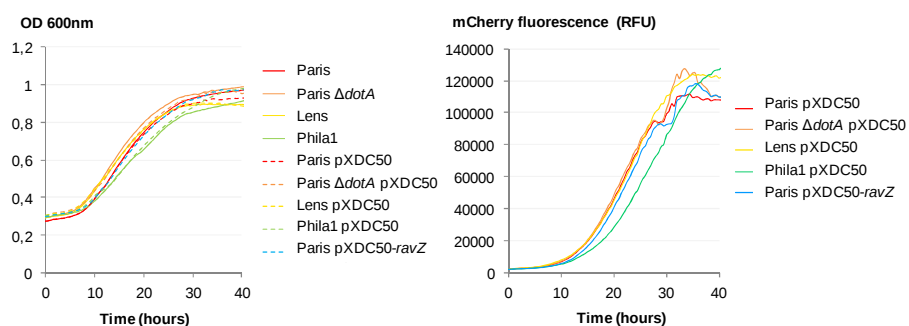


Regarding autophagosomes level (**Fig. S2A**) measured by GFP-LC3-II quantification by flow cytometry, cells infected by wild-type *L. pneumophila* Paris strain had huge autophagosomes level compared to non-infected cells. This autophagosomes quantification seems to be slightly higher when rapamycin is added. This very high autophagosome fold change could be explained by an inhibition of the maturation steps of autophagy (11) because autophagy chemically-induced only had a fold change of 2 (**Fig. 1D, S2A**). Rapamycin stimulation at 16h post infection was under a fold change of 2 probably because there was some degradation. Furthermore, cells infected with *L. pneumophila* Philadelphia-1 (**Fig. S2A**) had small autophagosomes stimulation of around 2 fold in both treated and non-treated cells compared to non-infected cells. Finally, *L. pneumophila* Lens infected cells (**Fig. S2A**) showed an autophagosomes fold change of around 4 compare to non-treated cells. These data suggest that autophagosomes level is different dependent of the involved strain. *L. pneumophila* Paris infected cells had high autophagosomes level, *L. pneumophila* Lens infected cells showed a moderate autophagosomes level compare to slightly level in *L. pneumophila* Philadelphia-1 infected cells or basal level in non-infected cells.

Regarding autophagosomes level (**Fig. S2B**) measured by GFP-LC3-II quantification by flow cytometry and as expected, cells treated with siCTRL and infected by *L. pneumophila* Paris presented huge autophagosomes level. As previously, cells infected with *L. pneumophila* Lens had slightly lower autophagosomes and cells infected with *L. pneumophila* Philadelphia-1 had limited autophagosomes stimulation compare to non-infected cells. Cells treated with siATG5 cells showed impaired autophagosomes level related with bacterial replicative default recorded in flow cytometry experiments (**Fig. S2B**). As expected, GFP-LC3-II quantification by flow cytometry of siSTX17 treated cells showed an autophagosomes accumulation, related with impaired *L. pneumophila* Paris and Lens replication. Surprisingly, *L. pneumophila* Philadelphia-1 had a normal replication when STX17 is silenced.

Supplemental Figure S3. Control of axenic growth and mCherry fluorescence of used strains

Strains used in this study were checked for axenic growth and mCherry fluorescence in AYE medium thanks to a plate reader.



II. Etude des effecteurs conservés entre *L. pneumophila* et *C. burnetii*

1. Histoire évolutive

Une étude bioinformatique, menée en collaboration avec Guy Perrière du LBBE (laboratoire de biométrie et de bioologie évolutive), a permis d'identifier des homologues sécrétés par les SST4 Dot/Icm de *L. pneumophila* et de *C. burnetii* pour 8 effecteurs (**Tableau 3**). Pour cela, les séquences protéiques homologues aux 300 effecteurs sécrétés par le SST4 Dot/Icm de la souche *L. pneumophila* Paris (Gomez-Valero *et al.*, 2011b) ont été recherchées dans la banque de données protéique non redondante de Genbank grâce au logiciel Blast (basic local alignment search tool). Le critère d'homologie principalement utilisé pour ce crible est une valeur *e* (*e*xpect) inférieure à 10^{-10} . Suite à cette étude, les arbres phylogénétiques de chacun des effecteurs ont été construits par l'approche du maximum de vraisemblance puis leur histoire évolutive a été analysée.

<i>L. pneumophila</i> Paris	<i>C. burnetii</i> Dugway	% de recouvrement	Valeur <i>e</i>	% d'identité
Lpp0327 (SdeA)	CbuD_0866	96%	6.10^{-29}	27%
Lpp0750 (AnkX)	CbuD_0382	49%	1.10^{-16}	27%
Lpp1682	CbuD_1164	28%	1.10^{-15}	30%
Lpp2058	CbuD_0382	93%	9.10^{-18}	27%
Lpp2174 (LpnE)	CbuD_1234	94%	2.10^{-32}	38%
Lpp2248 (AnkH)	CbuD_1380	96%	8.10^{-120}	42%
Lpp2308	CbuD_0395	99%	3.10^{-42}	47%
Lpp2615	CbuD_1656	52%	1.10^{-20}	30%

Tableau 3 : Effecteurs conservés entre *L. pneumophila* et *C. burnetii*

Le premier résultat frappant est que le répertoire d'effecteurs entre *L. pneumophila* et *C. burnetii* est peu conservé avec l'identification d'homologues pour seulement 8 effecteurs. Cela suggère que le génome, et notamment le génome accessoire de ces deux bactéries est très dynamique. De plus, la plupart des gènes codant des effecteurs communs conservés entre ces bactéries ont été acquis de façon indépendante. Pour les effecteurs Lpp0750 (AnkX), Lpp1682 et Lpp2615, l'homologie est limitée à des domaines particuliers suggérant des réarrangements de domaines (**Figures 46, 47, 52**). De plus, dans le cas de Lpp0750 (AnkX) cette acquisition se serait probablement faite depuis un hôte eucaryote qui pourrait être l'amibe, réservoir principal de *L. pneumophila* (**Figure 46**). Concernant l'effecteur Lpp1682, des événements de duplication auraient eu lieu ancestralement dans le genre

Legionella et auraient été suivis de pertes dans certaines espèces bactériennes, y compris au niveau l'espèce *L. pneumophila* (**Figure 47**).

Les effecteurs Lpp0327 (SdeA), Lpp2058, Lpp2174 (LpnE), Lpp2248 (AnkH) et Lpp2308 sont homologues au niveau de l'ensemble de leur séquence avec un pourcentage de recouvrement de plus de 90% (**Tableau 3**). Les effecteurs AnkH (Lpp2248) et Lpp2308 semblent avoir été présents dans l'ancêtre commun entre *L. pneumophila* et *C. burnetii* (**Figure 50, 51**) tandis que l'effecteur Lpp2058 aurait été acquis indépendamment par les deux bactéries (**Figure 48**). Concernant les effecteurs Lpp2174 (LpnE) et Lpp0327 (SdeA) plusieurs homologues sont présents dont certains chez l'ancêtre commun et d'autres acquis de façon indépendante. En effet, un homologue de l'effecteur Lpp0327 (SdeA) aurait été acquis ancestralement puis perdu dans la plupart des souches de l'espèce *L. pneumophila*. En parallèle, cet effecteur aurait été acquis de façon secondaire par l'espèce *L. pneumophila* et subit des évènements de duplication (**Figure 45**). De la même manière, un homologue de l'effecteur LpnE (Lpp2174) aurait été acquis chez l'ancêtre, et d'autres homologues acquis de façon indépendante une fois dans le génome de *C. burnetii* et plusieurs fois (dont Lpp2174) dans celui de *L. pneumophila* avec de possibles duplications (**Figure 49**).

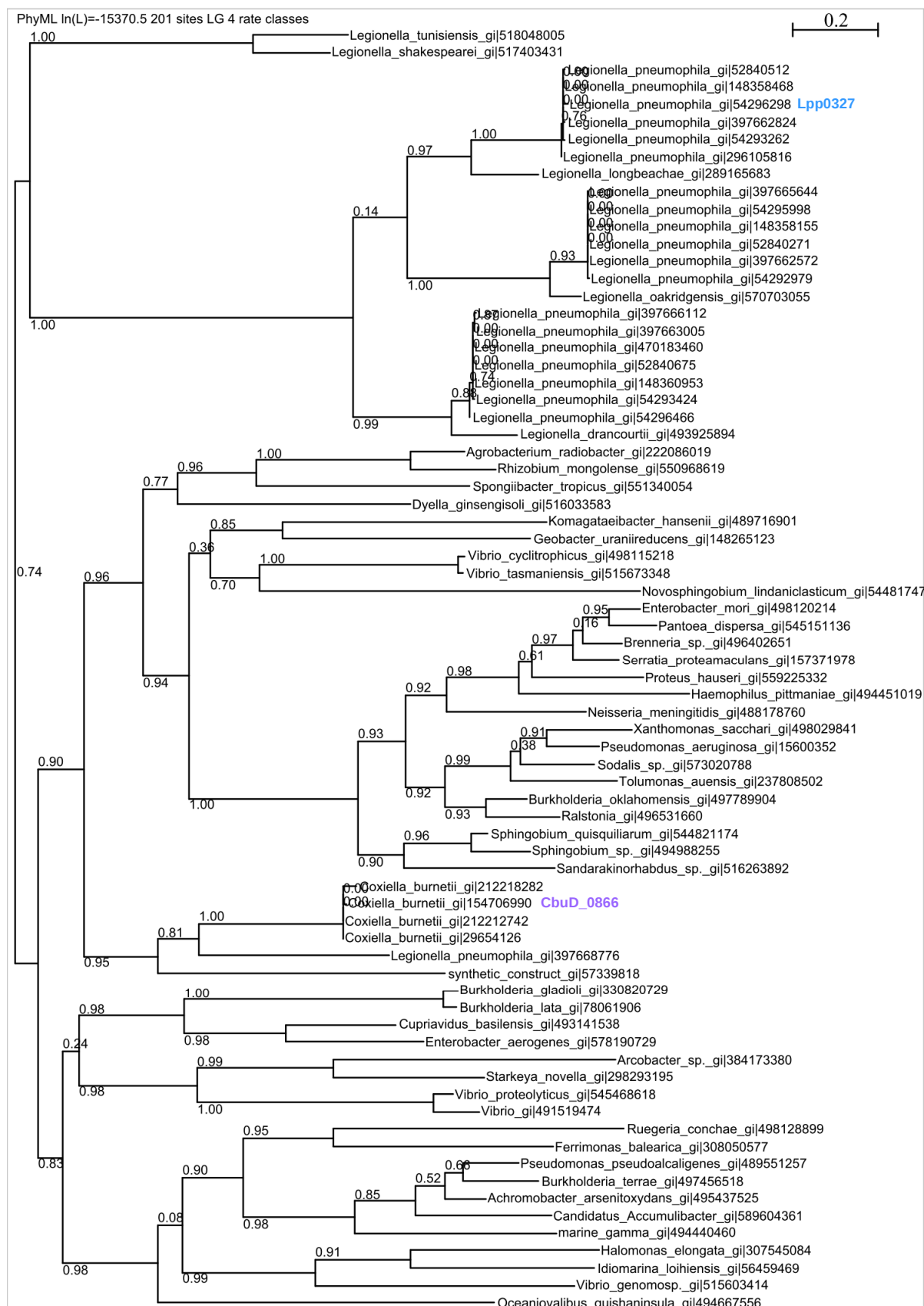


Figure 45 : Arbre phylogénétique de l'effecteur Lpp0327 (SdeA)

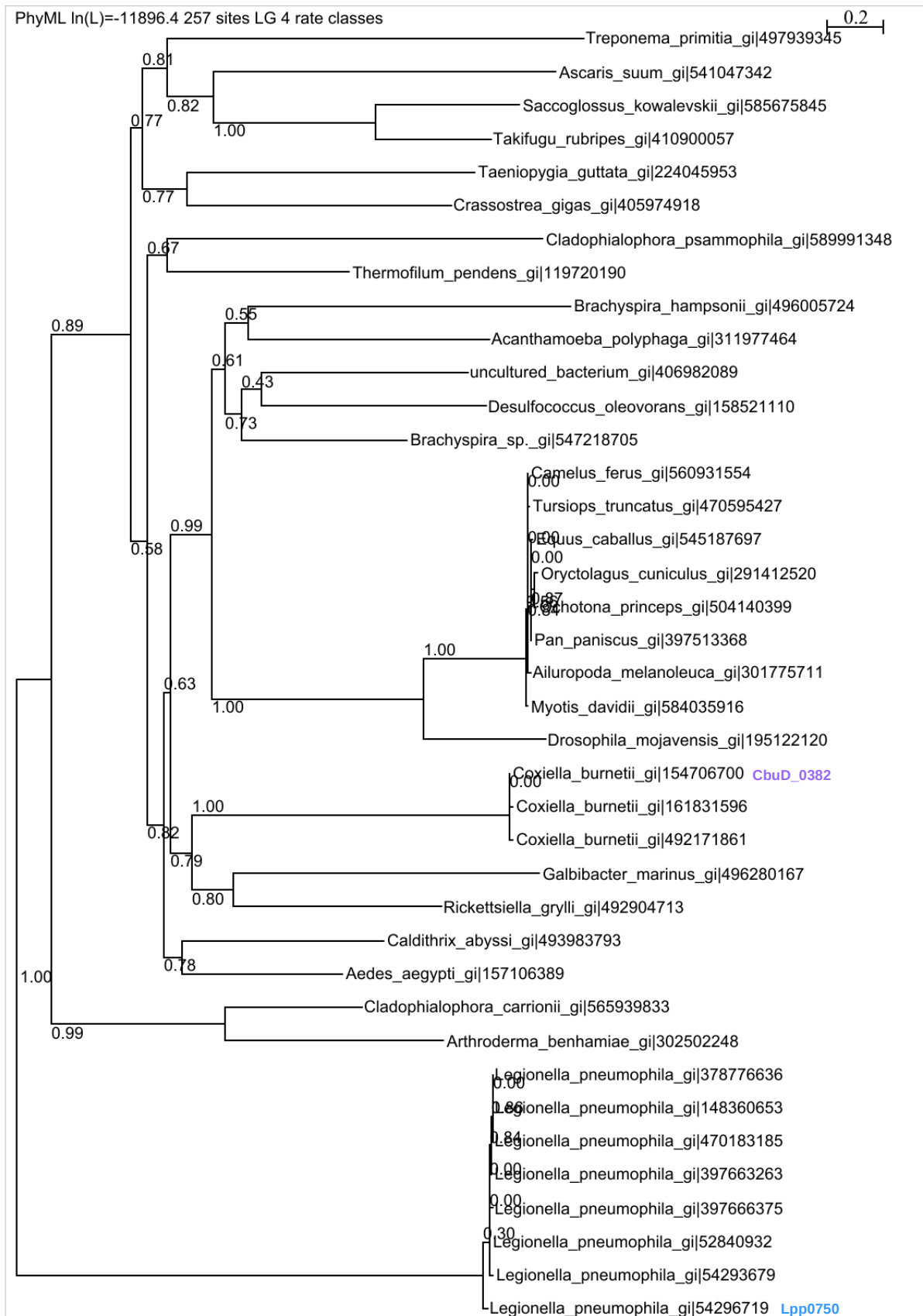


Figure 46 : Arbre phylogénétique de l'effecteur Lpp0750 (AnkX)



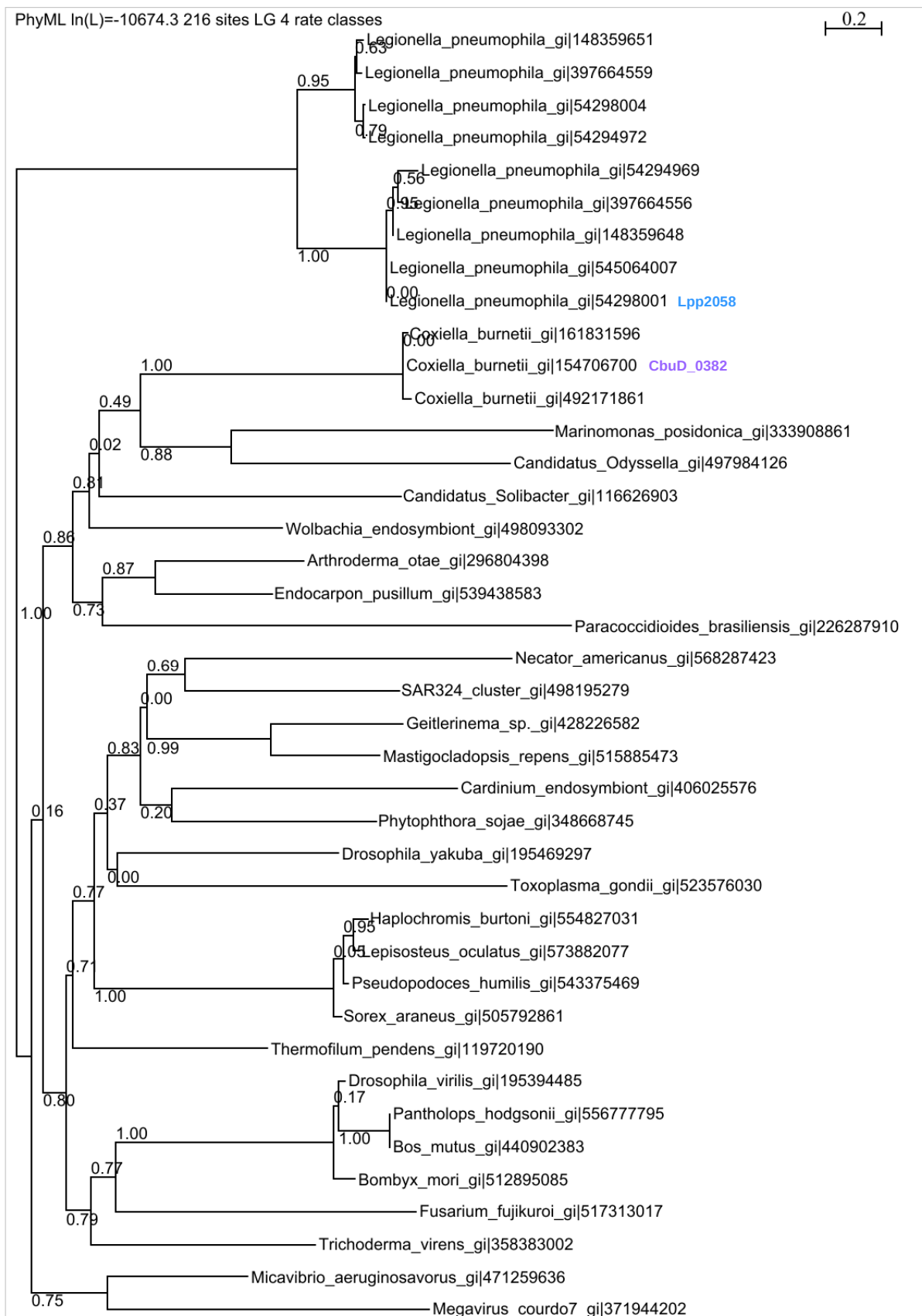


Figure 48 : Arbre phylogénétique de l'effecteur Lpp2058

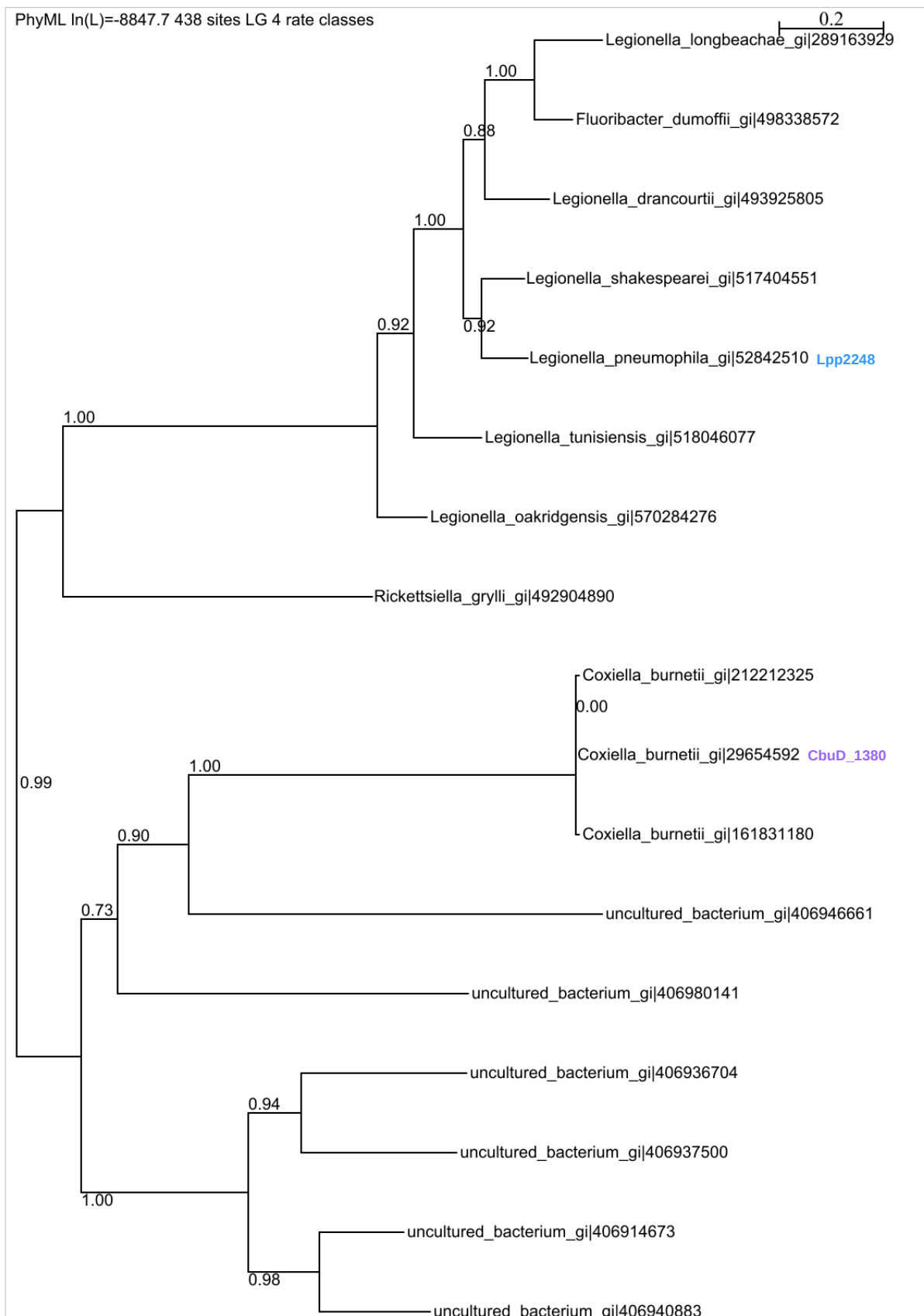


Figure 50 : Arbre phylogénétique de l'effecteur Lpp2248 (AnkH)

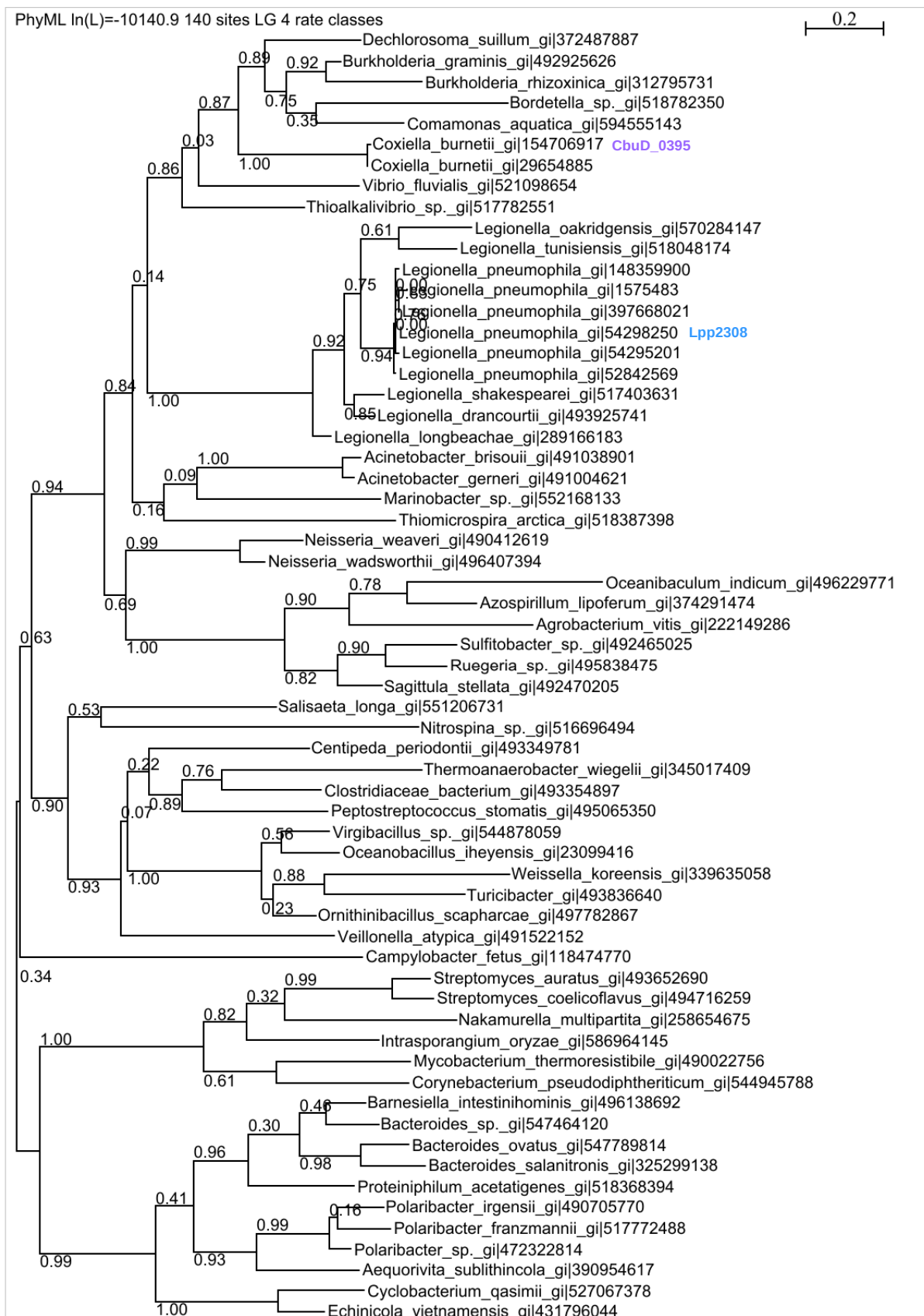


Figure 51 : Arbre phylogénétique de l'effecteur Lpp2308

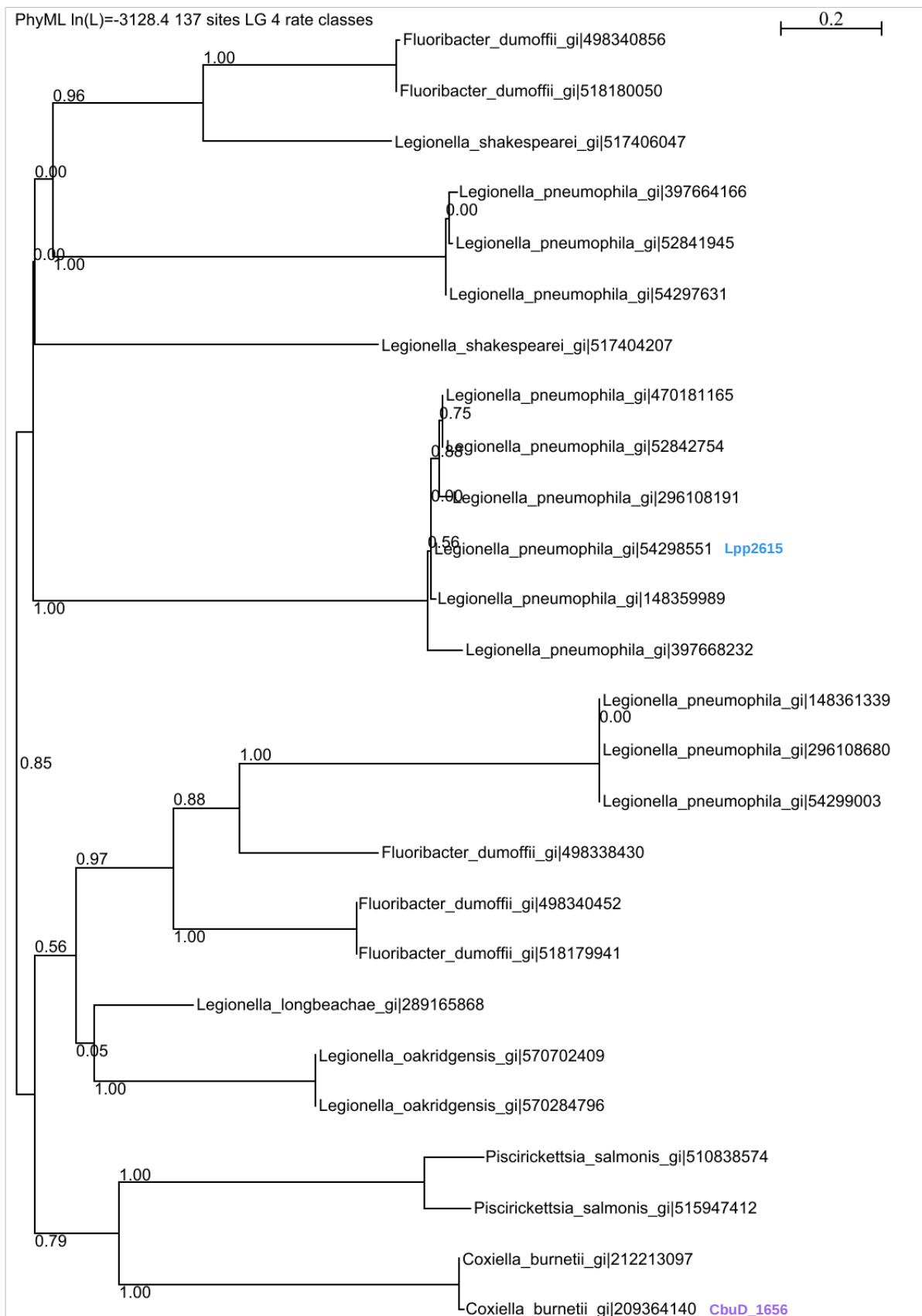


Figure 52 : Arbre phylogénétique de l'effecteur Lpp2615

2. Analyses biologiques

Six mutants bactériens des effecteurs communs entre *L. pneumophila* et *C. burnetii* ont été construits chez la souche *L. pneumophila* Paris puis leur capacité à induire une stimulation de l'autophagie a été mesurée. En parallèle, leur capacité répliquative a été testée dans des cellules épithéliales humaines, des macrophages humains et des amibes *A. castellanii*. Les mutants $\Delta lpp0750$ et $\Delta lpp2308$ n'ont pas pu être générés, probablement à cause d'effets polaires lors de la délétion de ces gènes dans la souche Paris de *L. pneumophila*. Afin de mener ces expériences basées sur l'émission de fluorescence mCherry des souches utilisées, la réplication bactérienne en milieu axénique ainsi que l'émission de fluorescence mCherry de l'ensemble des mutants construits ont été préalablement vérifiées (**Figure 53**).

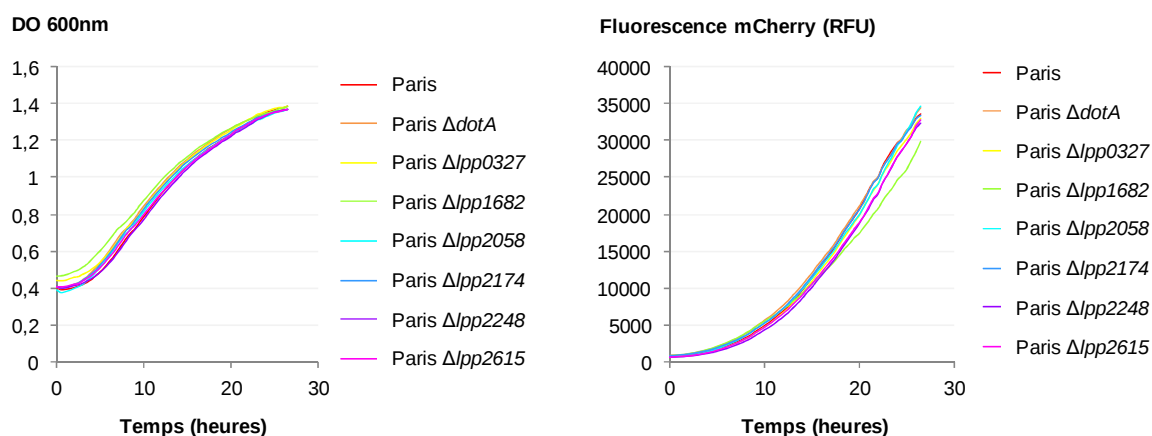


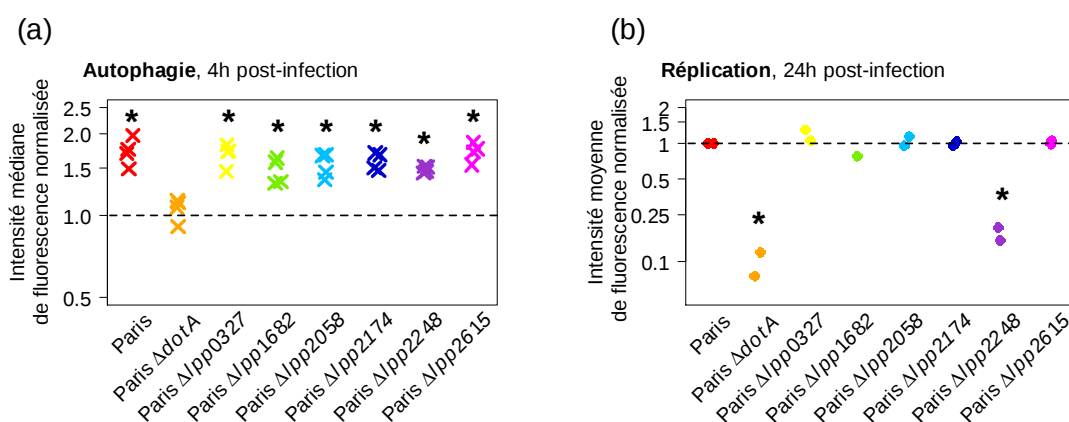
Figure 53 : Contrôle de la croissance axénique et de l'émission de fluorescence mCherry des mutants construits chez la souche *L. pneumophila* Paris utilisés dans cette étude

Chaque mutant construit dans la souche *L. pneumophila* Paris a été mis en culture dans de l'AYE supplémenté de chloramphénicol et d'IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) afin d'induire l'expression de la mCherry. La réplication en milieu axénique ainsi que l'émission de fluorescence mCherry ont été suivies au cours du temps et comparées à la souche sauvage.

Des cellules épithéliales humaines HeLa stablement transfectées avec une fusion GFP (green fluorescent protein)-LC3 ont été infectées à une MOI de 1 pendant 4 heures puis la quantité d'autophagosomes a été suivie par cytométrie de flux (**Figure 54a**). Comme précédemment observé (cf. I.), l'infection de ce modèle cellulaire par la souche Paris induit une stimulation de la quantité d'autophagosomes d'un facteur 1.5 voire 2 (**Figure 54a**). Utilisé comme contrôle, une infection avec le mutant $\Delta dotA$ n'induit pas de modulation du nombre d'autophagosomes qui est donc au niveau basal, comme dans des cellules non infectées (**Figure 54a**). Chacune des infections avec les six mutants testés induit une stimulation de l'autophagie comparable à celle observée pour la souche sauvage (**Figure**

54a). Ainsi, aucun de ces effecteurs bactériens ne semble impliqué dans la modulation de l'autophagie de la cellule hôte.

Afin de caractériser d'avantage les phénotypes de ces différents mutants, la réplication bactérienne a été suivie par cytométrie de flux dans des cellules HeLa infectées à une MOI de 10 (**Figure 54b**). En comparant la réplication bactérienne après 24 heures d'infection de chacun des mutants avec la souche sauvage, seul le mutant $\Delta lpp2248$ (*ankH*) semble avoir un défaut de réplication (**Figure 54b**). L'étude de l'entrée des bactéries après 4 heures d'infection a révélé qu'aucune souche ne montre de défaut d'entrée dans ces cellules (**Figure 54c**). Il a été démontré dans la littérature que l'effecteur Lpp2174 (LpnE) est impliqué dans l'entrée de la bactérie au sein de pneumocytes humains (A549) (Newton *et al.*, 2007). Cette différence de phénotype peut provenir d'une différence entre les cellules hôtes ou entre les souches bactériennes 130b et Paris utilisées. Néanmoins, l'étude de la cytotoxicité induite après 24 heures d'infection dans des cellules HeLa met en évidence que l'infection par le mutant $\Delta lpp2248$ (*ankH*) est liée à une diminution de la cytotoxicité, cohérent avec le défaut de réplication observé (**Figure 54d**). Ces données complètent les résultats de la littérature qui montrent des défauts de réplication pour ce mutant dans des amibes et des macrophages humains (Habyarimana *et al.*, 2008). Le mutant $\Delta lpp0327$ (*sdeA*) semble également être légèrement moins cytotoxique (**Figure 54d**). Cela suggère un rôle putatif de cet effecteur dans la mort cellulaire induite par la bactérie pour sortir et se propager à l'extérieur de la cellule hôte. Cet effecteur aurait plusieurs fonctions puisqu'il est également impliqué dans l'adhésion des bactéries au sein de pneumocytes humains (A549) (Chang *et al.*, 2005) et dans l'ubiquitination de GTPases RAB (Qiu *et al.*, 2016). La différence de phénotype observée au niveau de l'entrée du mutant $\Delta lpp0327$ (*sdeA*) dans des cellules épithéliales humaine (HeLa) comparé à des pneumocytes humains (A549) peut provenir de différences entre ces cellules hôtes ou entre les souches bactériennes utilisées.



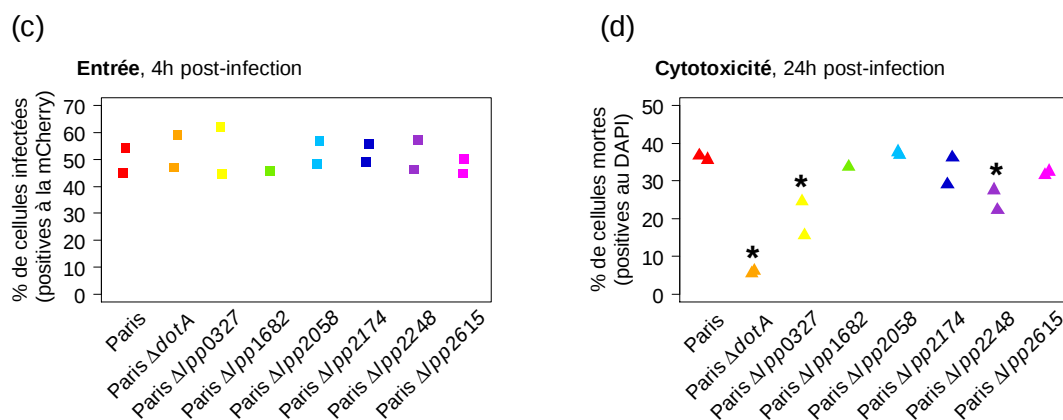


Figure 54 : Caractérisation des mutants de *L. pneumophila* dans des cellules épithéliales humaines HeLa

(a, c) Des cellules épithéliales humaines HeLa GFP-LC3 ont été infectées par différents mutants de *L. pneumophila*. (a) La quantité d'autophagosomes a été suivie par cytométrie de flux (statistique F : 20, ddl (degrés de liberté) : 7, valeur p : $6.5.10^{-9}$). Les résultats sont normalisés par la quantité d'autophagosomes présents dans des cellules non infectées (tirets). Chaque croix représente des milliers de cellules d'intérêt et les données représentent quatre expériences indépendantes. (c) L'entrée des bactéries a été mesurée par cytométrie de flux grâce à la quantification des cellules positives pour le marqueur fluorescent mCherry (statistique F : 0.35, ddl : 7, valeur p : 0.9). Chaque carré représente une expérience indépendante. (b, d) Des cellules épithéliales humaines HeLa ont été infectées par différents mutants de *L. pneumophila* puis la réplication intracellulaire (b) a été suivie par cytométrie de flux (statistique F : 44, ddl : 7, valeur p : $9.6.10^{-5}$). Les résultats sont normalisés par rapport à la réplication de la souche sauvage (tiret). Chaque point représente des milliers de cellules d'intérêt et représentent des expériences indépendantes. (d) La cytotoxicité a été suivie par cytométrie de flux en quantifiant l'incorporation de DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole) par les cellules (statistique F : 17, ddl : 7, valeur p : $1.5.10^{-3}$). Chaque triangle représente des expériences indépendantes.

Pour aller plus loin, la réplication de ces différents mutants a été suivie dans d'autres hôtes de *L. pneumophila* tels que les amibes *A. castellanii* et les macrophages dérivés de la lignée de monocytes humains U937. Des amibes *A. castellanii* ont été infectées avec les différents mutants à une MOI de 10 puis la réplication bactérienne a été suivie au cours du temps par mesure de l'émission de fluorescence mCherry grâce à un lecteur de plaque (**Figure 55a**). La réplication de la souche sauvage commence aux alentours de 30 heures après l'infection et atteint son maximum après 35 heures de réplication. Le mutant $\Delta dotA$ est utilisé comme contrôle d'une souche incapable de se répliquer dans ces cellules. Seuls les mutants $\Delta lpp0327$ (*sdeA*) et $\Delta lpp2248$ (*ankH*) semblent avoir un défaut de réplication intracellulaire dans cet hôte, qui se traduit par un retard d'au minimum 5 heures (**Figure 55a**). Ces résultats confirment les données de la littérature concernant le rôle des effecteurs Lpp0327 (*SdeA*) et Lpp2248 (*AnkH*) dans la réplication intracellulaire au sein des amibes. Plus particulièrement, ce crible montre que l'effecteur Lpp0327 (*SdeA*) favorise la réplication de *L. pneumophila* dans les amibes *A. castellanii* en plus des amibes *D. discoideum* (Qiu et al., 2016). De même, ces résultats mettent en évidence que l'effecteur AnkH facilite la réplication dans les amibes *A. castellanii* en plus des amibes *A. polyphaga* et *Hartmannella vermiformis* (Habyarimana et al., 2008). Il est à noter que le mutant $\Delta lpp2248$ (*ankH*) construit chez la souche Philadelphia JR32 de *L. pneumophila* ne présente par défaut de

réplication au sein des amibes *A. castellanii*, ce qui vient probablement de différences entre les souches Philadelphia JR32 et Paris (de Felipe *et al.*, 2005). Par ailleurs, il a été montré que la bactérie délétée de l'effecteur Lpp2174 (LpnE) a un léger défaut de réplication dans les amibes *A. castellanii* (Newton *et al.*, 2007). Cette différence de phénotype peut être expliquée par une différence au niveau des souches utilisées, 130b et Paris.

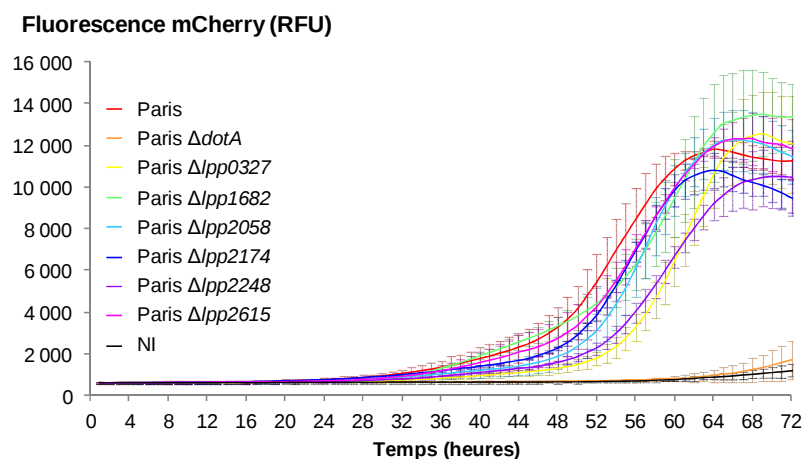


Figure 55 : Crible de la réplication intracellulaire des mutants de *L. pneumophila* dans les amibes *A. castellanii*

Les amibes *A. castellanii* ont été infectées par différents mutants de *L. pneumophila*. La réplication intracellulaire de ces mutants a été suivie par acquisition de l'émission de fluorescence mCherry (RFU, relative fluorescence unit) toutes les heures. Les courbes représentent la moyenne de fluorescence obtenue dans deux ou trois puits pour une expérience. La moyenne est représentée entourée de la valeur de l'écart-type. NI = non infectées.

Des macrophages dérivés d'une lignée de monocytes humains U937, ont été infectés avec les différents mutants à une MOI de 10 (**Figure 56b**). La souche sauvage de *L. pneumophila* débute sa réplication intracellulaire à partir de 16 heures d'infection et se réplique pendant 60 heures. Le mutant $\Delta dotA$ utilisé comme contrôle ne se réplique pas dans ces cellules. Le mutant $\Delta lpp2248$ (*ankH*) montre un retard de réplication intracellulaire d'approximativement 10 heures dans ces cellules et il est possible que les mutants $\Delta lpp1682$, $\Delta lpp2174$ (*lpnE*) et $\Delta lpp2615$ aient également un retard de réplication, plus léger, aux alentours de 5 heures. De plus, il n'est pas à exclure que le mutant $\Delta lpp2058$ se réplique mieux dans ce type de cellules hôtes (**Figure 56b**). Ce crible confirme le rôle de l'effecteur Lpp2248 (AnkH) dans la réplication intracellulaire de *L. pneumophila* au sein de macrophages humains, qui avait été observé en utilisant des macrophages primaires dérivés de sang humain (Habyarimana *et al.*, 2008). Cet effecteur commun entre *L. pneumophila* et *C. burnetii* qui a été acquis ancestralement et qui est conservé dans les génomes est nécessaire à la réplication optimale de *L. pneumophila* dans des cellules humaines (HeLa, macrophages primaires, U937), des amibes (*A. castellanii*, *A. polyphaga*, *H. vermiformis*) et le protozoaire *Tetrahymena pyriformis* (Habyarimana *et al.*, 2008). Le rôle de l'effecteur

AnkH qui ne semble pas impliqué dans l'entrée de la bactérie, le recrutement du RE à la LCV, l'échappement de la LCV à la fusion lysosomale (Habyarimana *et al.*, 2008 ; Habyarimana *et al.*, 2010) ou même la manipulation de l'autophagie, reste à être découvert. D'autre part, les résultats obtenus pour l'effecteur bactérien Lpp2174 (LpnE) valident les données de la littérature qui montrent que le mutant délété pour cet effecteur présente un défaut de réplication dans une autre lignée de macrophages humains (THP-1) (Newton *et al.*, 2007). Concernant l'effecteur Lpp0327 (SdeA), ces données confortent les données de la littérature qui démontrent que la délétion de cet effecteur n'induit pas de défaut de réplication dans des macrophages U937 (Chang *et al.*, 2005). L'effecteur Lpp0327 (SdeA) conservé par *L. pneumophila* et *C. burnetii* a des paralogues issus d'une duplication de gènes. L'évolution différente de chacun des paralogues peut conduire à de la redondance fonctionnelle ou à l'acquisition de nouvelles fonctions. D'autres effecteurs communs ont plusieurs homologues qui ont été identifiés lors de ce crible. Dans cette étude, un seul homologue a été testé et il serait intéressant d'invalider chacun des différents homologues, voire de réaliser des invalidations multiples pour tester l'hypothèse de la redondance fonctionnelle entre ces différents homologues.

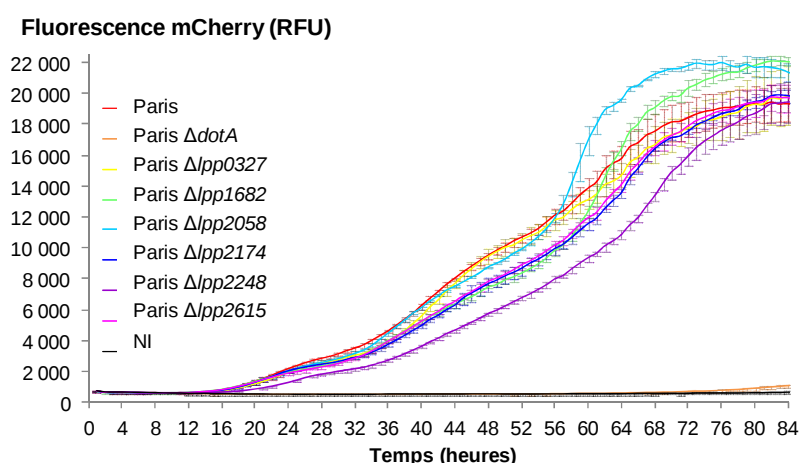


Figure 56 : Crible de la réplication intracellulaire des mutants de *L. pneumophila* dans les macrophages dérivés de la lignée monocyttaire U937

Les macrophages dérivés de la lignée U937 de monocytes humains ont été infectés par différents mutants de *L. pneumophila*. La réplication intracellulaire de ces mutants a été suivie par acquisition de l'émission de fluorescence mCherry (RFU, relative fluorescence unit) toutes les heures. Les courbes représentent la moyenne de fluorescence obtenue dans deux ou trois puits pour une expérience. La moyenne est représentée entourée de la valeur de l'écart-type. NI = non infectées.

Discussion et conclusions

L'analyse de l'interaction entre *L. pneumophila* et l'autophagie cellulaire menée dans cette étude met en évidence que les souches du sérotype-1 *L. pneumophila* Paris, Lens et Philadelphia-1 modulent différemment cette voie cellulaire. Dans notre modèle de cellules épithéliales humaines, l'autophagie est induite après 4 heures d'infection par les souches Paris ou Lens, tandis qu'elle reste à un niveau basal après une infection par la souche Philadelphia-1. Cette stimulation précoce de l'autophagie est globale et n'est pas liée à l'inhibition des étapes de maturation des autophagosomes. A des temps plus tardifs d'infection où les bactéries se répliquent, l'infection par toutes les souches testées induit une stimulation de l'autophagie. Néanmoins, le nombre d'autophagosomes par cellules infectées est beaucoup plus élevé lors d'une infection par les souches Paris ou Lens comparé à une infection par la souche Philadelphia-1. Il faudrait déterminer si l'augmentation du nombre d'autophagosomes à ce temps d'infection est liée à une stimulation globale de l'autophagie ou à une inhibition des étapes de maturation. Pour cela, la quantité de la protéine P62 et le ratio des formes protéiques LC3-I/LC3-II peuvent être mesurés par western-blot. De plus, les autophagosomes et autolysosomes peuvent être énumérés par cytométrie d'image (Pugsley, 2016).

Bien que cette relation à l'autophagie soit dépendante des souches de *L. pneumophila*, cette voie cellulaire est bénéfique à la réplication de l'ensemble des souches testé dans cette étude. En effet, l'induction de l'autophagie par la rapamycine n'est pas néfaste à la réplication bactérienne des souches Paris, Lens et Philadelphia-1 dans notre modèle cellulaire. De façon cohérente, l'extinction de cette voie cellulaire est au contraire délétère à la multiplication intracellulaire de ces mêmes souches. Plus précisément, l'absence d'autophagosomes et d'autolysosomes par extinction de l'autophagie ou l'absence d'autolysosomes suite à l'inhibition de la maturation des autophagosomes, induit un défaut de réplication de la souche Paris et un retard de réplication de la souche Lens. Une hypothèse peut être émise qui suggère que les autolysosomes formés par la stimulation massive de l'autophagie cellulaire seraient une source, pour les souches Paris et Lens, de nutriments favorables à la réplication bactérienne (**Figure 60**). Afin de vérifier cette hypothèse, l'expression des senseurs métaboliques bactériens RelA ou SpoT pourrait être suivie au cours du temps dans des cellules sauvages ou déficientes pour différentes étapes de l'autophagie. Concernant la souche Philadelphia-1, l'extinction globale de l'autophagie induit un défaut de réplication tandis que l'inhibition de la maturation des autophagosomes n'influence pas la réplication bactérienne. Cette souche utiliserait donc préférentiellement les autophagosomes comme une source de membranes pour une réplication bactérienne optimale (**Figure 60**). Pour confirmer cette hypothèse, il faudrait établir par microscopie confocale et/ou électronique à transmission si les autophagosomes fusionnent avec la LCV. De plus, en suivant l'acquisition de marqueurs spécifiques, le recrutement sur la LCV des

autophagosomes ou d'autres membranes et la taille des LCV pourraient être mesurés dans des cellules sauvages et déficientes pour l'autophagie.

L'induction de l'autophagie cellulaire au cours de l'infection par la souche Paris ou Lens de *L. pneumophila* peut être promue par la bactérie ou être la conséquence de la détection d'éléments bactériens par la cellule hôte. Cette étude montre que l'induction de l'autophagie par la souche Paris est dépendante du SST4 Dot/Icm. Cette stimulation serait donc due au SST4 Dot/Icm ou à des effecteurs sécrétés par le SST4 Dot/Icm. Il est en effet possible que le SST4 Dot/Icm forme des pores dans la membrane de la LCV qui induisent l'autophagie cellulaire par l'inhibition de mTOR et activation de la voie de carence nutritive en acides aminés, comme dans le cas de *S. flexneri*, *L. monocytogenes* et *S. Typhimurium* (cf. [introduction II.2.3.a](#), [II.2.3.b](#), [II.2.4](#)) (Tattoli *et al.*, 2012a ; Tattoli *et al.*, 2012b ; Tattoli *et al.*, 2013). Dans un premier temps, l'autophagie basale suffirait à détecter les membranes endommagées, puis les dommages devenant trop importants, ils seraient à l'origine de la stimulation de l'autophagie. Cette induction pourrait participer à la réparation des LCV qui ont des membranes endommagées, comme observé dans le cas de *S. Typhimurium* (Kreibich *et al.*, 2015). Afin de vérifier cette hypothèse, il faudrait étudier au cours des premières heures d'infection (i) la concentration cytosolique de la cellule hôte en acides aminés, notamment en leucine et isoleucine dont la concentration est déterminante pour l'inhibition de mTOR (Avruch *et al.*, 2009), (ii) la relocalisation cytosolique de l'inhibiteur mTOR qui est associée à l'induction de l'autophagie (Sancak *et al.*, 2010 ; Tattoli *et al.*, 2012a), (iii) l'expression des gènes et des protéines cellulaires impliquées dans l'induction d'une carence nutritive, comme GCN2 (general control nonderepressible), une protéine kinase senseur stimulée lors d'une carence en acides aminés qui participe à l'induction de l'autophagie (Tattoli *et al.*, 2012a ; Castilho *et al.*, 2014) ainsi que (iv) l'exposition des glycanes à la surface de membranes endommagées détectés par la galectine-8 cellulaire, ce qui conduit au recrutement d'autophagosomes (Kreibich *et al.*, 2015).

Une autre possibilité est qu'un effecteur bactérien conservé entre les souches Paris et Lens stimule l'autophagie cellulaire. Néanmoins, au regard des effecteurs sécrétés par les trois souches du séroroupe-1 utilisées dans cette étude, aucun n'est spécifique aux souches Paris et Lens (**Figure 57**).

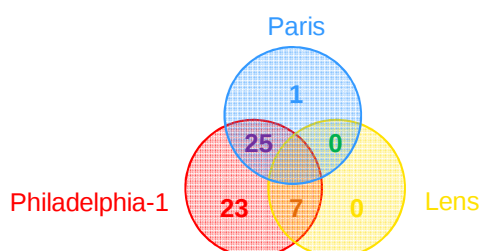


Figure 57 : Répartition des effecteurs sécrétés par le SST4 Dot/Icm

Chaque cercle représente un génome avec une couleur associée. Les nombres représentent les effecteurs sécrétés par le SST4 Dot/Icm. Les nombres uniques à chaque cercle correspondent à des effecteurs spécifiques à chaque génome et les nombres au croisement de plusieurs cercles, aux effecteurs partagés par deux génomes. Ce graphique est basé sur la liste des effecteurs publiée par Gomez-Valero *et al.*, 2011b.

Seul l'effecteur Lpp2486 est spécifique à la souche Paris et l'analyse du mutant $\Delta lpp2486$, construit dans cette souche, montre que ce mutant se comporte comme la souche sauvage en stimulant l'autophagie après 4 heures d'infection. Cet effecteur n'est donc pas impliqué dans l'induction de l'autophagie (**Figure 58**).

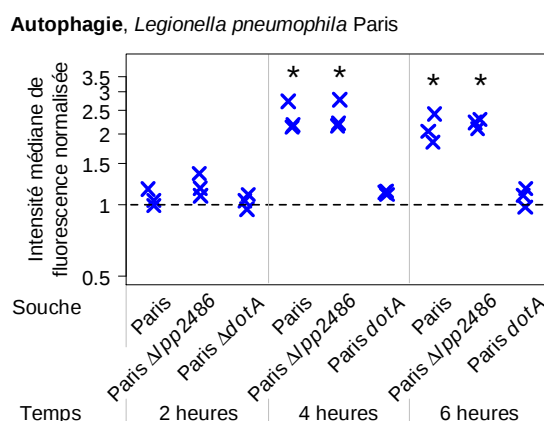


Figure 58 : L'effecteur Lpp2286 de *L. pneumophila* Paris n'est pas impliqué dans la modulation de l'autophagie

Des cellules épithéliales humaines HeLa GFP-LC3 ont été infectées par différents mutants de *L. pneumophila*. La quantité d'autophagosomes a été suivie par cytométrie de flux. Les résultats sont normalisés par la quantité d'autophagosomes présents dans des cellules non infectées (tirets). Chaque croix représente des milliers de cellules d'intérêt et les données représentent trois expériences indépendantes (statistique F : 11, ddl : 3, valeur p : $3.7 \cdot 10^{-5}$).

Il n'est pas à exclure qu'un ou des effecteurs communs aux souches Paris, Lens et Philadelphia-1 soient responsables de l'induction de l'autophagie cellulaire mais que dans le cas de la souche Philadelphia-1, un autre effecteur contrecarre cet effet. Pour identifier de nouveaux effecteurs capables de stimuler l'autophagie, une stratégie originale basée sur la comparaison des bactéries *L. pneumophila* et *C. burnetii* a été mise en place. Cette analyse vise à identifier les effecteurs communs sécrétés par les SST4 Dot/Icm de ces deux bactéries phylogénétiquement proches, qui partagent de nombreuses similarités, en particulier la capacité de moduler l'autophagie à leur avantage. Seulement 8 effecteurs homologues ont été identifiés, ce qui montre que le répertoire d'effecteurs entre *L. pneumophila* et *C. burnetii* est peu conservé. Parmi ces effecteurs certains sont composés de domaines communs tandis que d'autres partagent l'ensemble de leur séquence. De plus, ces effecteurs peuvent être des orthologues, des paralogues ou avoir à la fois été présents chez l'ancêtre puis acquis de façon indépendante. Malheureusement l'étude des mutants de chacun de ces homologues construits chez la souche *L. pneumophila* Paris a mis en évidence qu'aucun d'entre eux n'est impliqué dans la stimulation de l'autophagie.

Enfin, la différence observée entre les souches Paris, Lens et Philadelphia-1 dans leur relation à l'autophagie cellulaire pourrait être due à la présence/absence d'un ou de plusieurs effecteurs capables d'inhiber l'autophagie stimulée suite à l'infection par *L. pneumophila*. Cette hypothèse a été démontrée en observant que l'effecteur RavZ, spécifique de la souche Philadelphia-1, est capable quand il est exprimé par la souche Paris, de contrecarrer la stimulation de l'autophagie associée à l'infection par cette souche. Cette inhibition de l'autophagie par l'effecteur RavZ induit un défaut de réplication de la souche Paris, ce qui met en évidence que cet effecteur est délétère pour cette souche dans ce contexte cellulaire. Les résultats obtenus dans cette étude suggèrent donc que les souches de *L. pneumophila* modulent l'autophagie à un niveau optimal, grâce à un répertoire d'effecteurs particulier, qui leur permet de se développer efficacement dans les cellules hôtes. Il serait intéressant d'étudier la dynamique de sécrétion de l'effecteur RavZ au cours d'une infection de notre modèle cellulaire par la souche Philadelphia-1 afin de déterminer à quel moment du cycle infectieux cet effecteur joue un rôle. De même, l'étude d'un mutant Δ ravZ de la souche Philadelphia-1 permettrait d'établir si l'absence de cet effecteur est liée à la stimulation de l'autophagie et si ce phénotype est délétère à la réplication de la souche Philadelphia-1. De façon plus générale, il serait intéressant d'étudier si les différences mises en évidence dans ces travaux entre les souches de *L. pneumophila* et l'autophagie des cellules épithéliales sont conservées au cours de l'infection de macrophages ou de neutrophiles qui présentent des niveaux d'autophagie différents (Schmid et al., 2007). Des expériences préliminaires ont été réalisées au cours de cette étude sur des cellules épithéliales qui accumulent un grand nombre d'autophagosomes sous l'effet combiné de la bafilomycine et de la rapamycine. Dans ce contexte cellulaire, l'infection par *L. pneumophila* Paris n'induit plus de stimulation de l'autophagie mais au contraire inhibe cette voie cellulaire (**Figure 59**), comme précédemment observé (Rolando et al., 2016). Plus précisément, le nombre d'autophagosomes est réduit à la même quantité que lorsque l'infection par la bactérie stimule l'autophagie basale dans des cellules non traitées (**Figure 59**).

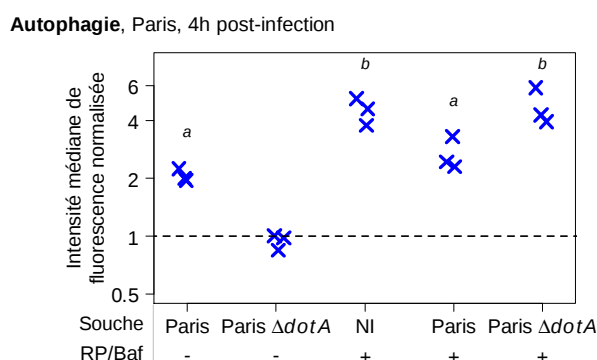


Figure 59 : *L. pneumophila* module l'autophagie cellulaire à un niveau optimal

Des cellules épithéliales humaines HeLa GFP-LC3 ont été traitées avec de la rapamycine et de la bafilomycine et ont été infectées pendant 4 heures avec *L. pneumophila* Paris ou le mutant $\Delta dotA$. La quantité d'autophagosomes a été suivie par cytométrie de flux. Les résultats sont normalisés par la quantité d'autophagosomes présents dans des cellules non traitées et non infectées (tirets). Chaque croix représente des milliers de cellules d'intérêt et les données représentent trois expériences indépendantes (statistique F : 32, ddl : 2, valeur p : $5.4 \cdot 10^{-05}$).

Les différences observées entre les souches de *L. pneumophila* Paris, Lens et Philadelphia-1 sont donc en partie dues à la présence/absence d'un effecteur du SST4 Dot/Icm, RavZ. L'analyse phylogénétique menée dans cette étude suggère la présence ancestrale du gène *ravZ* au sein du genre *Legionella* puis la perte de ce gène, y compris au cours de la diversification récente des souches de l'espèce *L. pneumophila*. Cette étude révèle donc une forte dynamique évolutive du répertoire d'effecteurs, dont les effecteurs impliqués dans la relation à l'autophagie, au sein du genre *Legionella*. Cette étude conforte une étude récente menée sur 38 espèces du genre *Legionella* qui montre la conservation de seulement 7 effecteurs communs (Burstein *et al.*, 2016).

D'autres part, nos travaux mettent en évidence que peu d'effecteurs sont conservés au sein de l'ordre des *Legionellales*. En effet, seulement 8 effecteurs sont homologues entre *L. pneumophila* et *C. burnetii*, connues comme étant phylogénétiquement proches et qui partagent un cycle intracellulaire similaire, incluant le détournement à leur profit de l'autophagie. Il est possible que la majorité des effecteurs sécrétés par le SST4 Dot/Icm de ces deux bactéries n'aient pas été présents ancestralement mais aient été acquis sous l'effet d'une pression sélective qui a conduit à une convergence de leurs fonctions. Une autre possibilité est que les outils moléculaires permettant à ces bactéries de moduler l'autophagie des cellules hôtes ne soient pas liés à des effecteurs sécrétés par le SST4 Dot/Icm, mais qu'il s'agisse d'éléments bactériens qui diffusent par les pores formés par le SST4 Dot/Icm. En particulier, la flagelline pourrait être détectée par des récepteurs de l'immunité innée de la cellule et contribuer à la modulation de l'autophagie de manière indirecte (Byrne *et al.*, 2013). Cette hypothèse est d'autant plus vraisemblable que des bactéries similaires à *Coxiella* (*Coxiella*-like) dont le SST4 Dot/Icm n'est pas fonctionnel en terme de sécrétion d'effecteurs se retrouvent dans des vacuoles répliquatives similaires à des autophagosomes (Lalzar *et al.*, 2014). Ces bactéries ont établi une relation mutualiste nutritionnelle avec leurs hôtes tiques auxquels elles fournissent des vitamines B absentes de leur régime hématophage. Transmises de mère à descendants, elles infectent les tiques de manière permanente et non pathogène. Des études larges de génomique comparative, incluant la diversité des *Legionellales* et de leur mode vie, pourraient permettre de révéler les mécanismes en jeu dans le cycle intracellulaire de ces bactéries.

L'évolution rapide du répertoire d'effecteurs sécrétés par le SST4 Dot/Icm mis en évidence à la fois au sein des *Legionellales* et de *L. pneumophila* suggère une forte pression de sélection notamment de la part des hôtes environnementaux, les amibes, sur l'évolution

de *L. pneumophila*. De nombreuses études visent à caractériser la fonctionnalité des effecteurs au sein d'hôtes mammifères afin de comprendre la pathogénie de cette bactérie. Il faut toutefois garder à l'esprit que ces hôtes sont accidentels et ne reflètent pas les pressions sélectives exercées sur la bactérie dans l'environnement, ce qui peut conduire à une réplication sous-optimale de *L. pneumophila* dans ces différents types cellulaires. Les résultats obtenus durant cette étude, comme les données d'études récentes (Burstein *et al.*, 2016 ; Qin *et al.*, 2016) qui révèlent cette dynamique évolutive, suggèrent qu'il est nécessaire pour comprendre le rôle de chacun de ces effecteurs d'étudier l'interaction entre *L. pneumophila* et son hôte naturel, l'amibe. Il sera même probablement essentiel, pour intégrer la complexité de la relation que *L. pneumophila* entretient avec ses hôtes, d'étudier cette interaction entre différentes espèces de *Legionella* et différents genres d'amibes et d'évaluer le degré de spécificité de la relation. Même si l'autophagie est une voie cellulaire conservée et que la similarité entre les amibes et les macrophages humains conduit à l'infection humaine par *L. pneumophila*, cette analyse permettrait probablement de comprendre l'émergence de nouveaux clones bactériens et de déterminer les facteurs sélectifs à leur origine.

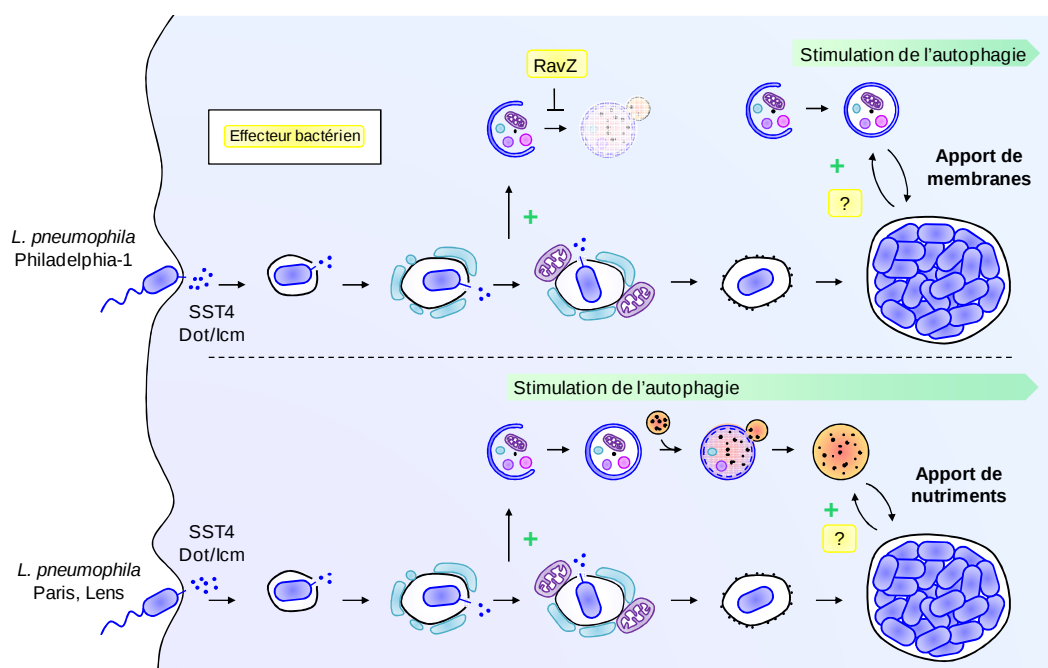


Figure 60 : Modèle d'interaction entre différentes souches de *L. pneumophila* et l'autophagie cellulaire de cellules épithéliales humaines

Suite à l'entrée de *L. pneumophila* dans des cellules épithéliales humaines, la bactérie se retrouve dans une vacuole qu'elle perforerait à cause de son SST4 Dot/Icm. La présence de membranes endommagées induirait l'autophagie cellulaire qui serait inhibée par la souche Philadelphia-1 peut être grâce à l'effecteur RavZ et utilisée par les souches Paris et Lens. Lorsque la réplication bactérienne a lieu, la souche Philadelphia-1 utiliserait les membranes des autophagosomes pour la LCV grandissante probablement par l'intermédiaire d'un ou de plusieurs effecteurs capables de stimuler l'autophagie. Au contraire, les souches Paris et Lens utiliseraient les nutriments apportés par les autolysosomes suite à l'induction de l'autophagie par des effecteurs non identifiés et la fusion des autolysosomes avec les LCV.

Matériels et Méthodes

I. Culture des bactéries

1. Souches d'*Escherichia coli*

Les souches d'*E. coli* utilisées dans cette étude (**Tableau 4**) sont stockées au congélateur à -20°C et à -80°C dans du LB (Luria-Bertani) (Roth, X964.3) et 15% de glycérol (Roth, 3783). Les bactéries sorties du congélateur sont cultivées sur boîtes LB contenant 20g/L d'agar (Roth, 5210.4) puis sont incubées à 37°C sur la nuit. La culture liquide des bactéries est effectuée en LB en aérobie à 37°C, sous agitation à 200rpm (rotations par minute) sur la nuit. La supplémentation des milieux solides ou liquides en chloramphénicol (Roth, 3886.3) est de 20µg/mL.

Souche	Génotype	Référence
Dérivé de DH5α	<i>fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>	New England Biolabs (C2987H)
Dérivé de DH5α pXDC50	Dérivé de DH5α transformé avec le plasmide pXDC50	Cette étude
Dérivé de DH5α pXDC50-ravZ	Dérivé de DH5α transformé avec le plasmide pXDC50-ravZ	Cette étude

Tableau 4 : Souches d'*Escherichia coli* utilisées dans cette étude

2. Souches de *Legionella pneumophila*

Les souches de *L. pneumophila* utilisées (**Tableau 5**) sont stockées au congélateur à -20°C et à -80°C dans des cryotubes à billes (TS/80-MX). Les bactéries sorties du congélateur sont cultivées sur boîtes CYE (charcoal yeast extract agar) contenant : 10g/L d'ACES (acide N-(2-acetamido)-2-aminoethanesulfonique) (Roth, 9138.2), 10g/L d'extrait de levure (Merck, 1.03753.0500), 15g/L d'agar (Roth, 5210.4) et 2g/L de charbon (Sigma, C9157) en eau (Roth, 3478.4), ajusté à un pH de 6,9 grâce à de l'hydroxyde de potassium (Roth, 0995.2) puis stérilisé par autoclave 20 minutes à 120°C et supplémenté par 0,4g/L de L-cystéine (Roth, 1693.2) et 0,25g/L de nitrate de fer (Sigma, 216828). Les bactéries sont mises en culture à 37°C pendant 3 jours, voire 5 jours.

En milieu liquide, les bactéries se développent en AYE (ACES-buffered yeast extract) contenant : 0.3g/L de fer pyrophosphate (Sigma, P6526), 0.1g de cystéine (Roth, 1693), 10g d'ACES (Roth, 9138.2) et 12g d'extrait de levure (BD, 212750) en eau, ajusté à un pH de 6,9 grâce à de l'hydroxyde de sodium et stérilisé par filtration à 0,2µm. Les bactéries sont mises en culture à 37°C, en aérobie et sous agitation à 200rpm pendant le temps nécessaire, entre 1 et 3 jours.

La supplémentation des milieux solides en chloramphénicol est de 5µg/mL, en IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) (Roth, 2316.4) de 0,5mM et en kanamycine (Roth,

T832.3) de 15µg/mL. Concernant les milieux liquides, la supplémentation en chloramphénicol est de 5µg/mL et en IPTG de 2mM.

Souche	Génotype	Référence
Paris	Souche clinique	Xavier Charpentier
Paris pXDC50	Paris transformée avec le plasmide pXDC50	Laboratoire
Paris pxDC50-ravZ	Paris transformée avec le plasmide pXDC50-ravZ	Cette étude
Paris ΔdotA	Paris dotA::kan FRT	Laboratoire
Paris ΔdotA pXDC50	Paris dotA::kan FRT transformée avec le plasmide pXDC50	Laboratoire
Philadelphia-1 (Phila1)	Souche clinique	Xavier Charpentier
Phila1 pXDC50	Phila1 transformée avec le plasmide pXDC50	Cette étude
Lens	Souche clinique	Centre national de référence des Legionelles
Lens pXDC50	Lens transformée avec le plasmide pXDC50	Laboratoire
Paris Δlpp0327 pXDC50	Paris Δ lpp0327 transformée avec le plasmide pXDC50	Cette étude
Paris Δlpp1682 pXDC50	Paris Δ lpp1682 transformée avec le plasmide pXDC50	Cette étude
Paris Δlpp2058 pXDC50	Paris Δ lpp2058 transformée avec le plasmide pXDC50	Cette étude
Paris Δlpp2174 pXDC50	Paris Δ lpp2174 transformée avec le plasmide pXDC50	Cette étude
Paris Δlpp2248 pXDC50	Paris Δ lpp2248 transformée avec le plasmide pXDC50	Cette étude
Paris Δlpp2615 pXDC50	Paris Δ lpp2615 transformée avec le plasmide pXDC50	Cette étude

Tableau 5 : Souches de *Legionella pneumophila* utilisées dans cette étude

II. Plasmides

Le plasmide PXDC50 (**Figure 61**) a été construit par Xavier Charpentier à partir du plasmide pMMB207C dérivé du plasmide RSF1010 (Fürste *et al.*, 1986 ; Morales *et al.*, 1991 ; Segal et Shuman, 1997; Segal *et al.*, 1998 ; Chen *et al.*, 2004 ; Charpentier *et al.*, 2009). Ce plasmide contient une origine de réplcation (oriV) ainsi que les gènes impliqués dans la réplcation du plasmide comme *repA* (réplcation). Le transfert de ce plasmide par conjugaison est assuré par l'origine de transfert (oriT) ainsi que les gènes impliqués dans la mobilisation du plasmide. La protéine MobA (mobilisation) est non fonctionnelle, ce qui diminue légèrement la capacité de conjugaison de ce plasmide mais limite la cytotoxicité accrue envers les macrophages, induite par des souches portant le plasmide avec la protéine MobA fonctionnelle (Segal et Shuman, 1998). Le gène codant la résistance à l'antibiotique chloramphénicol est utilisé comme gène de sélection. La mCherry, une protéine fluorescente qui émet une fluorescence rouge (excitation : 587nm, émission : 610nm) est sous contrôle du promoteur inductible Ptaq (promoter derived from trp and lac promoters). L'inhibiteur LacI (operon lactose inhibitor) se fixe sur la séquence *lacO* (operon lactose operator), ce qui empêche l'expression de la mCherry. En présence d'IPTG LacI change de conformation, ce qui libère la séquence de l'opérateur et conduit à la production d'ARNm (ARN messenger) de la mCherry puis à la production de la protéine, grâce à un RBS (ribosomal binding site). Les séquences *rrnB* (16S ribosomal RNA (ribonucleic acid)) et *rrnB2* sont des terminateurs de la transcription.

Le plasmide pXDC50-ravZ est construit à partir du plasmide pXDC50 auquel le gène *ravZ* de la souche Philadelphia-1 est ajouté en amont du gène codant la mCherry.

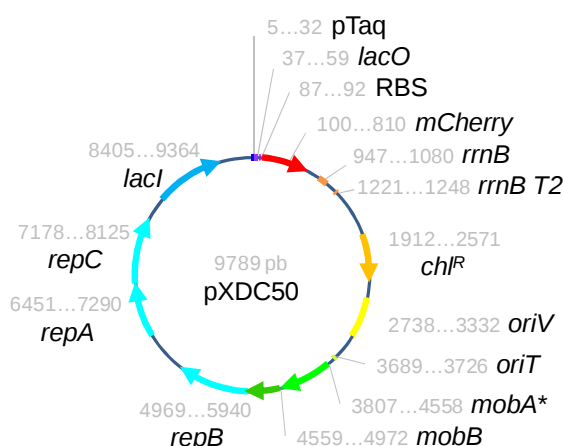


Figure 61 : Représentation graphique du plasmide pXDC50

Le plasmide PXDC50 fait 9789pb (paires de bases) et permet l'expression de la protéine fluorescence mCherry suite à l'induction de son expression par ajout d'IPTG.

III. Clonage

1. Extraction de l'ADN génomique de *L. pneumophila*

Après une culture de 3 jours à 37°C de *L. pneumophila* sur boîte CYE, l'équivalent d'une œuse de 10µL de colonies bactériennes est prélevée et les bactéries sont dissoutes dans 1,5mL de tampon NTE composé de : 100mM de NaCl (Roth, 3957.1), 20mM de Tris (trishydroxyméthylaminométhane) (Roth, 5429.3) et 1mM d'EDTA (éthylène diamine tétraacétique) (Euromedex, EU0007-B) en eau, ajusté à pH 7,4 avec de l'acide chlorhydrique (Roth, 9277.1). Après une centrifugation de 10 minutes à 10 000g, le culot bactérien est repris dans 780µL de tampon NTE puis 20µL de SDS 10% en eau (sodium dodécyl sulfate) (Euromedex 1012.D) ainsi que 2µL de protéinase K (20mg/mL) (Thermo EO0491) sont ajoutés pour lyser les bactéries. Ce mélange est incubé pendant 1 heure à 37°C sous agitation. Pour dégrader les ARN, le mixte est incubé 1 heure supplémentaire avec 1µL de ribonucléase (RNase) à 100mg/mL (Qiagen, 19101). Ensuite, pour extraire les protéines, 800µL de la phase inférieure d'un mélange de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25 : 24 : 1) (Roth, A156.2) sont ajoutés aux bactéries lysées. Le mixte est mélangé quelques minutes jusqu'à obtenir une émulsion puis centrifugé 5 minutes à 10 000g jusqu'à obtenir deux phases séparées et à l'interface un précipité blanc correspondant aux protéines. La phase aqueuse supérieure contenant les acides nucléiques est prélevée et pour éliminer les traces de phénol et de protéines restantes, 700µL d'un mélange de chloroforme (Roth 6340.1)/alcool isoamylique (Prolabo 20798.295) (24 : 1) sont ajoutés. Le mix est mélangé quelques minutes jusqu'à obtenir une émulsion puis centrifugé 5 minutes à 10 000g jusqu'à obtenir deux phases séparées. La phase aqueuse supérieure contenant l'ADN est prélevée et est précipitée avec 1,4mL d'éthanol absolu froid (AnalaR NORMAPUR, 20821.310) ainsi que 72µL de la solution suivante : 5M d'acétate de potassium (Roth, T874.2) et 11.5% d'acide acétique glacial (Roth, 3738.1). L'ADN chromosomique apparaît alors comme une méduse qui est pêchée avec un fil de platine avant d'être séchée à la flamme et dissoute dans 100µL d'eau ultra-pure.

2. Construction de la souche *L. pneumophila* Paris pXDC50-ravZ

2.1. Construction du plasmide pXDC50-ravZ

Le gène *ravZ* est amplifié à partir de l'ADN génomique de *L. pneumophila* Philadelphia-1 par PCR (polymerase chain reaction). Pour cela, l'ADN polymérase PrimeSTAR Max (Takara, TAKR045A) est utilisée en suivant les instructions du fournisseur avec des amorces spécifiques permettant l'amplification du gène ainsi que sa digestion enzymatique (**Tableau 6**). Une fois le gène *ravZ* isolé et amplifié, il a été déposé sur gel

d'agarose 1% (Roth, 6352.4) dissous dans du tampon TAE (tris-acetate-EDTA) contenant : 40mM de Tris et 1mM d'EDTA ajusté à pH 7.8 avec de l'acide acétique et supplémenté avec du SybrGreen (Invitrogen, S33102). Cet agent intercalant de l'ADN permet de visualiser l'ADN sous lampe à UV afin de vérifier la taille du fragment obtenu. Le gel d'agarose est mis à migrer dans du tampon TAE puis, suite à la révélation de ce gel, la bande correspondant à l'ADN d'intérêt est extraite et purifiée selon les recommandations du fournisseur grâce au kit de purification Qiagen (28706). En parallèle, la souche d'*E. coli* dérivée de DH5α contenant le plasmide pXDC50 est mise en culture dans du LB supplémenté de 20μg/mL de chloramphénicol, puis l'ADN plasmidique est extrait grâce au kit d'extraction de Macherey Nagel (740588), conformément aux indications du fournisseur.

Le fragment PCR ainsi que le plasmide sont digérés par les enzymes de restrictions EcoRI-HF (NEB, R3101) et NdeI (NEB, R01115) en suivant les instructions du fournisseur. La taille des fragments est vérifiée et ces derniers sont purifiés sur gel d'agarose 1%. Ensuite, une ligation est réalisée grâce à un mix contenant 5 fois plus d'insert que de vecteur et l'ADN ligase T4 (Fermentas, EL0016). Cette ligation et la transformation des souches d'*E. coli* dérivées de DH5α avec le produit de ligation sont réalisées selon les directives du fournisseur. Les bactéries recombinantes sont sélectionnées sur boîte LB supplémenté de 20μg/mL de chloramphénicol. La présence du plasmide recombinant est vérifiée par extraction plasmidique puis PCR avec l'ADN polymérase DreamTaq (Thermo, K1082) en utilisant une amorce sur le gène *ravZ* et une amorce sur le plasmide pXDC50 (**Tableau 6**). Pour terminer, la séquence du plasmide pXDC50-*ravZ* est vérifiée par séquençage en utilisant des amorces spécifiques (**Tableau 6**).

Matrice	Nom	Séquence
ravZ	Sens ravZ	ACCAG AATTC ATGAAAGGCAAGTTAACAGGT
	Anti-sens ravZ	CAC CATATG TATATCTCCTATTTTACCTTAATGCCACC
pXDC50	Sens	GCTGTTGACAATTAATCATCG
	Anti-sens	ACCGTTAACAGAACCTCC

Tableau 6 : Liste 1 des amorces utilisées dans cette étude

Sur ces amorces, les caractères en gras représentent les sites de restrictions. Les acides nucléiques présents en amont ont permis l'ancrage des enzymes de restriction pour une digestion efficace.

2.2. Transformation de *L. pneumophila* par électroporation

Après une culture de 3 jours à 37°C sur boîte CYE de *L. pneumophila*, l'équivalent d'une œuse de 10μL de colonies bactériennes est prélevée et les bactéries sont dissoutes dans 1mL d'eau ultra-pure froide. Après 4 lavages successifs par centrifugation de 10 minutes à 6 000g à 4°C, les bactéries sont reprises dans 200μL d'eau ultra-pure froide auxquels sont ajoutés 200μL de glycérol 20% froid. L'équivalent de 500ng de plasmide est

ajouté aux bactéries froides puis les bactéries sont électroporées à 100Ω, 25μF et 2,4kV. Ensuite, les bactéries transformées sont mises en culture d'expression environ 6 heures dans 2mL d'AYE à 37°C sous agitation et oxygénation afin de permettre l'expression du gène de sélection. Pour finir, les bactéries transformées sont étalées sur boîte CYE supplémenté de 5μg/mL de chloramphénicol, ce qui permet la sélection des transformants. La présence du plasmide incorporé est vérifiée par PCR avec l'ADN polymérase DreamTaq et des amorces spécifiques (**Tableau 6**) puis les colonies positives sont mises en culture afin de vérifier l'absence d'un défaut de croissance et d'émission de fluorescence mCherry.

3. Construction des mutants chez *L. pneumophila*

3.1. Construction des cassettes de recombinaison homologue

La construction des mutants propres chez *L. pneumophila* consiste en la préparation d'une première cassette de RH (recombinaison homologue) qui est introduite dans les bactéries puis extraite grâce à une seconde cassette de RH (**Figure 62**). La cassette RH1 est construite par assemblage de la région amont du gène d'intérêt, d'une cassette MazF et de la région aval du gène. Les régions amont et aval correspondent aux zones d'homologies qui permettent la recombinaison homologue. La cassette MazF comporte le gène *lacI*, le gène *mazF* sous contrôle du promoteur Ptac et la résistance à la kanamycine. La cassette RH2 comporte uniquement les régions amont et aval du gène d'intérêt.

Chaque fragment d'ADN est amplifié en utilisant l'ADN polymérase PrimeSTAR Max conformément aux recommandations du fournisseur. Les régions amont sont amplifiées à partir de l'ADN chromosomique de la souche Paris avec le couple d'amorces P1/P2 pour la cassette RH1 et le couple d'amorces P1/P5 pour cassette RH2. Les régions aval quant à elles sont amplifiées avec le couple d'amorces P3/P4 pour la cassette RH1 et avec le couple d'amorces P6/P4 pour la cassette RH2 (**Tableau 7**). La cassette MazF provient de l'amplification du plasmide pGEM-MazF fournit par Xavier Charpentier. Chaque fragment d'ADN est déposé sur gel d'agarose 1% afin de vérifier sa taille puis est purifié sur gel avec le kit Quiagen, selon les instructions du fournisseur. Ensuite, deux PCR supplémentaires permettent de réaliser les deux cassettes de recombinaison. La taille de ces cassettes est vérifiée sur gel d'agarose 1% puis elles sont purifiées.

Génome bactérien

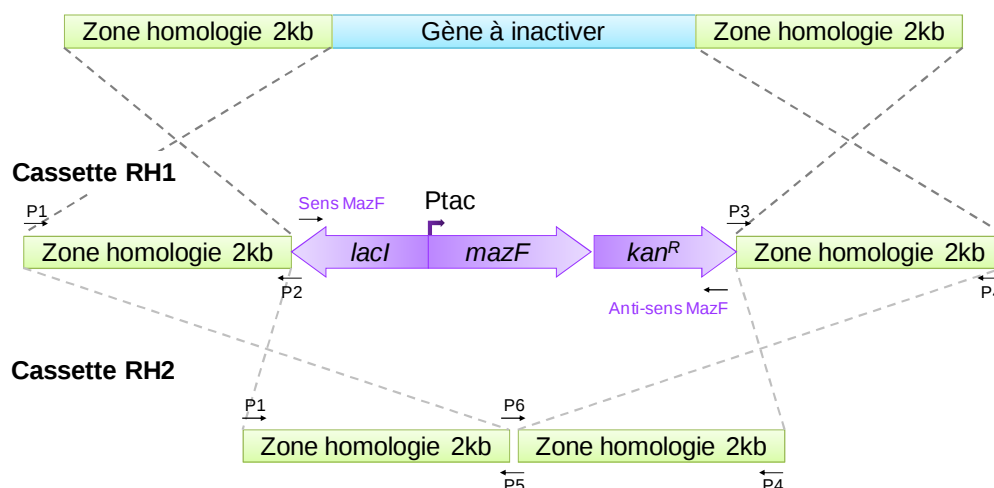


Figure 62 : Stratégie de clonage des mutants chez *L. pneumophila*

Mutant	Nom	Séquence
Paris $\Delta pp0327$	P1	CCATGCTTGAAGCCAGTATTT
	P2	GGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCG CAGCTTTAGGTTTGTCACTCAT
	P3	GGGTTTGCTCGGGTCGGTGGCATATG TATATCCATACTCATTAA
	P4	AACCCATACGGATCCCGAG
	P5	TTAATGAGTATGGATATA CAGCTTTAGGTTTGTCACTCAT
	P6	ATGAGTGACAAACCTAAAGCTG TATATCCATACTCATTAA
Paris $\Delta pp1682$	P1	TGATTTTTTACAAGAGAGTAGTG
	P2	GGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCG ACCTGAATAACGAACTGGCAT
	P3	GGGTTTGCTCGGGTCGGTGGCATATG CTCTACTGCATTTGCCATTAA
	P4	GCTCTTTTAGTGCTACAAAAA
	P5	TTAAATGGCAAATGCAGTAGAAG ACCTGAATAACGAACTGGCAT
	P6	ATGCCAGTTTCGTTATTCAGGT CTCTACTGCATTTGCCATTAA
Paris $\Delta pp2058$	P1	TATCCGGACTGGCAAAAGAT
	P2	GGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCG TTAAGTATTTTGCTAAATGACAT
	P3	GGGTTTGCTCGGGTCGGTGGCATATG AAATACCCACATCCCTTTTAA
	P4	GAATCCTTCTTGTCATCGTAG
	P5	TTAAAAGGGATGTGGGGTATTT TTAAGTATTTTGCTAAATGACAT
	P6	ATGTCATTTAGCAAAATCAGTAA AAATACCCACATCCCTTTTAA
Paris $\Delta pp2174$	P1	TAGTGAAGTGCAGG
	P2	GGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCG AGAGATAAAATATATTTTTCAT
	P3	GGGTTTGCTCGGGTCGGTGGCATATG GATAATTACAAGGCCAAAAAATAA
	P4	TCGCTCAAATGTCGATTCC
	P5	TTATTTTGGCCTTGTAATTATC AGAGATAAAATATATTTTTCAT
	P6	ATGAAAAAATATATTTTATCTCT GATAATTACAAGGCCAAAAAATAA

Paris Δpp2248	P1	AAGCAGGAATTGTACTTGACTA
	P2	GGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCG GATAATATCATTTGCAATACTCAT
	P3	GGGTTTGCTCGGGTCGGTGGCATATG CTGTTGCGACAGGCCTATAA
	P4	GAACAAGTTGGAATGAAGAGTC
	P5	TTATAGGCCTGTCGCAACAG GATAATATCATTTGCAATACTCAT
	P6	ATGAGTATTGCAAATGATATTATC CTGTTGCGACAGGCCTATAA
Paris Δpp2615	P1	AGTCTAATATTCTCAATTTAACCG
	P2	GGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCG AGGACTTAACTGTTATGCTCAT
	P3	GGGTTTGCTCGGGTCGGTGGCATATG GGTTTCAAGATCTCTAAAATTATAA
	P4	CTTGACACAATGGAACGTTGC
	P5	TTATAATTTAGAGATCTTGAAACC AGGACTTAACTGTTATGCTCAT
	P6	ATGAGCATAACAGTTAAGTCC TGGTTTCAAGATCTCTAAAATTATAA
MazF	Sens	CGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCC GCTTCCAGTCGGGAAACCTG
	Anti sens	CATATGCCACCGACCCGAGCAAACC CGAAGAAGTTGTCCATATTGGCCAC

Tableau 7 : Liste 2 des amorces utilisées dans cette étude

3.2. Transformation par compétence naturelle

Après une culture de 3 jours à 37°C sur boîte CYE de *L. pneumophila*, les bactéries sont étalées sous forme de disque sur une nouvelle boîte CYE pendant 24 heures supplémentaires à 37°C. Les bactéries sont ensuiteensemencées dans 2mL d'AYE à une DO (densité optique) de 0,1 avec 500ng d'ADN puis mises en culture à 37°C sous agitation, et oxygénation. La sécrétion d'un pigment marron est le signal que les bactéries ont atteint la phase stationnaire de croissance. Elles sont alors étalées sur le milieu de sélection adapté.

Suite à l'incorporation de la cassette RH1, les colonies sont résistantes à la kanamycine et sensibles à l'IPTG. En effet, en présence d'IPTG l'inhibiteur LacI est réprimé et la toxine MazF est exprimée et tue les bactéries (Zhang *et al.*, 2003). Cette double sélection permet de différencier les bactéries d'intérêt des bactéries qui acquièrent spontanément la résistance à la kanamycine. Ces bactéries sont donc étalées sur boîte CYE supplémenté de 15µg/mL de kanamycine puis les clones positifs sont striés sur une nouvelle boîte CYE kanamycine et une boîte CYE supplémenté de 0.5M d'IPTG. La présence de la cassette est vérifiée par PCR, en utilisant l'ADN polymérase DreamTaq. Après la transformation avec la cassette RH2, les mutants propres sont sensibles à la kanamycine et résistantes à l'IPTG. Ces bactéries sont donc étalées sur boîte CYE supplémenté de 0.5M d'IPTG puis les clones positifs sont striés sur une nouvelle boîte CYE IPTG et une boîte CYE supplémenté de 15µg/mL de kanamycine. Etant donné que ce profil est le même que celui de la souche initiale, l'absence du gène d'intérêt est vérifié par PCR.

4. Contrôle des souches construites et utilisées dans cette étude

Afin de vérifier que les différentes souches de *L. pneumophila* utilisées dans cette étude n'ont pas de défaut de croissance en milieu axénique ou de défaut au niveau de l'expression de la mCherry, les souches sont mises en culture 3 jours à 37°C sur boîte CYE, supplémenté si nécessaire. Ensuite, les bactéries sont étalées sous forme de disque sur une nouvelle boîte CYE, supplémenté si nécessaire, pendant 24 heures supplémentaires à 37°C. Finalement, les bactéries sont inoculées à une DO de 0,1 dans de l'AYE seul pour les souches ne portant pas de plasmide et dans de l'AYE supplémenté de 5µg/mL de chloramphénicol et de 2mM d'IPTG pour les souches portant le plasmide pXDC50 ou pXDC50-*ravZ*. Les bactéries sont mises en culture dans un lecteur de plaque (TECAN, Infinite 200pro) dans une plaque 96 puits à bords noirs et à fonds transparents (Greiner bio-one, 655090), ce qui limite la diffusion de la fluorescence. Les bactéries sont incubées à 37°C avec une agitation latérale et orbitale de 30 secondes chacune suivie d'une lecture de la DO et de la fluorescence toutes les demi-heures pendant 30 à 40 heures.

IV. Entretien des cellules eucaryotes

Dans cette étude, la lignée de cellules épithéliales humaines HeLa, des macrophages dérivés de la lignée de monocytes humains U937 ainsi que des amibes *A. castellanii* sont utilisés (**Tableau 8**).

Nom de la lignée cellulaire	Type cellulaire	Référence
HeLa	Cellules cervicales du carcinome du col de l'utérus d'Henrietta Lacks, une femme noire de 31ans	CelluloNet
HeLa GFP-LC3	Lignée transfectée stable exprimant une fusion du gène LC3 avec la GFP	Mathias Faure
U937	Monocytes humain issus d'un lymphome histiocytaire d'un homme caucasien de 37 ans	ATCC (CRL-1593.2)
<i>Acantamoeba castellanii</i>	Isolat environnemental	Pierre Pernin

Tableau 8 : Liste des cellules eucaryotes utilisées dans cette étude

1. Cellules épithéliales HeLa et monocytes U937 humains

Les cellules épithéliales HeLa et les monocytes U937 sont congelés à l'azote dans du SVF (sérum de veau fœtal) (Gibco, 10270-106) contenant 10% de DMSO (diméthyl sulfoxyde) (AppliChem, A3672).

Le maintien des lignées de cellules épithéliales HeLa se fait en DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) (Gibco, 41966) supplémenté de 10% de SVF ainsi que de 100 unités/mL de pénicilline et 100µg/mL de streptomycine. Les cellules sont incubées à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO₂ et sont utilisées entre les passages 5 et 15. Le passage de ces cellules adhérentes est réalisé en éliminant le surnageant puis en lavant les cellules avec du PBS (phosphate buffered saline) (Gibco, 14190). Les cellules sont ensuite décollées grâce à de la trypsine-EDTA 0.05% (Gibco, 253004) qui agit à 37°C pendant 5 minutes. Après avoir été reprises dans du milieu de culture dont le SVF inhibe l'activité de la trypsine, les cellules sont centrifugées 3 minutes à 300g. Le culot de cellules est repris à la concentration adéquate dans du milieu de culture cellulaire. Lorsque les cellules sont utilisées pour une expérience, elles sont énumérées sur une cellule de Malassez après dilution au 1/2 dans du bleu trypan (Gibco, 15250061) puis les cellules sont diluées dans du milieu de culture ne contenant pas d'antibiotiques. Le bleu trypan pénètre dans les cellules mortes dont la membrane est perméabilisée, elles apparaissent alors en bleu lors du comptage. Les cellules mortes non adhérentes étant normalement éliminées lors du lavage au PBS, il n'est pas nécessaire d'énumérer les cellules lors de l'entretien de la lignée.

L'entretien de la lignée monocyttaire U937 a lieu en RPMI 1640 (Roswell park memorial institute medium) (Gibco, 61870) supplémenté de 10% de SVF, 100 unités/mL de

pénicilline et 100µg/mL de streptomycine. Les cellules sont incubées à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO₂ et sont utilisées entre les passages 5 et 15. Le passage de ces cellules non adhérentes se fait en énumérant les cellules sur une cellule de Malassez après dilution au 1/2 dans du bleu trypan, puis les cellules sont diluées dans du milieu de culture cellulaire. La lignée U937 n'étant pas adhérente, les cellules mortes ne sont pas éliminées lors des passages cellulaires, il est donc important de les exclure. Pour plaquer et différencier ces monocytes en macrophages, les cellules sont centrifugées 3 minutes à 300g puis reprises et ensemencées dans du RPMI supplémenté de 10% de SVF et de 50ng/mL de PMA (phorbol 12-myristate 13-acétate) (Sigma P8139) pendant 3 jours à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO₂.

2. Amibes *Acanthamoeba castellanii*

Les amibes *A. castellanii* sont congelées au -80°C en PYG (peptone yeast glucose) contenant : 20g/L de protéose peptone (Difco 211684), 1g/L d'extrait de levure, 16mM de MgSO₄, 7H₂O (Roth, P027.2), 0.4mM de CaCl₂ (Acros, 423525000), 3.4mM de citrate de sodium (Roth, 3580.1), 0.05mM de (NH₄)₂Fe(SO₄)₂, 6H₂O (Sigma, F3754), 2.5mM de Na₂HPO₄, 2H₂O (Euromedex, 1309), 2.5mM de KH₂PO₄ (Roth, 3904) et 0.1M de glucose (Euromedex UG3050) en eau, ajusté à un pH de 6,5 grâce à de l'hydroxyde de potassium et supplémenté de 10% de DMSO, 100 unités/mL de pénicilline et 100µg/mL de streptomycine (Gibco, 15140122).

Le maintien des amibes *A. castellanii* se fait en PYG supplémenté de 100 unités/mL de pénicilline et de 100µg/mL de streptomycine et les amibes sont incubées à 30°C. Les amibes utilisées pour les infections sont mises en culture pendant 4 jours, de sorte à induire une carence nutritive. Ces cellules sont ensuite décollées grâce à une incubation de 10 minutes à 4°C, puis centrifugées 3 minutes à 300g. Après avoir été énumérées suite à une dilution au 1/2 dans du bleu trypan et à l'aide une cellule de Malassez, les amibes sont plaquées à la concentration nécessaire dans du PY correspondant à du PYG sans glucose.

V. Protocoles d'infection

1. De cellules épithéliales HeLa par *L. pneumophila*

Les bactéries sorties du congélateur sont étalées sur boîte CYE, supplémenté si nécessaire, puis les bactéries sont incubées 3 jours à 37°C. Ensuite les boîtes sont stockées à température ambiante. L'avant veille de l'infection, les bactéries sont étalées sous forme de disque sur une nouvelle boîte CYE, supplémenté si nécessaire, pendant 24 heures à 37°C. La veille l'infection, les bactéries sontensemencées dans 2mL d'AYE seul, si les bactéries ne contiennent pas de plasmide et dans 2mL d'AYE supplémenté de 5µg/mL de chloramphénicol et de 2mM d'IPTG, si les bactéries contiennent le plasmide pXDC50 ou pXDC50-*ravZ*. Les bactéries sontensemencées à une DO de 0,1 puis mise en culture pendant 24 heures à 37°C sous agitation dans un tube permettant l'oxygénation des bactéries. Les cellules HeLa quant à elles, sont déposées dans des puits d'une plaque de culture cellulaire à la concentration nécessaire. Le jour de l'infection les bactéries sont diluées dans du milieu de culture cellulaire, supplémenté si besoin, pour infecter les cellules à la MOI adéquate. Une fois les bactéries ajoutées aux cellules, les cellules sont centrifugées 10 minutes à 500g pour synchroniser l'infection. Le temps zéro de l'infection est considéré à la sortie de la centrifugation où les cellules infectées sont mises à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO₂. Lorsque des lavages sont effectués, la supplémentation de 5µg/mL de chloramphénicol et de 2mM d'IPTG est maintenue si les bactéries utilisées portent le plasmide pXDC50 ou pXDC50-*ravZ*. Toutes les expériences de cette étude sont réalisées à une MOI de 10, sauf lorsque l'autophagie est suivie par western-blot où la MOI utilisée est de 25 pour palier au faible pourcentage d'infection.

2. De monocytes U937 différenciés en macrophages par *L. pneumophila*

Les bactéries portant le plasmide pXDC50 sorties du congélateur sont étalées sur boîte CYE supplémenté de 5µg/mL de chloramphénicol et incubées 3 jours à 37°C. Les boîtes sont ensuite stockées à température ambiante. Trois jours avant l'infection, les monocytes U937 sontensemencés dans une plaque de culture cellulaire à la concentration adéquate dans du milieu de culture cellulaire contenant 10% de SVF et 50ng/mL de PMA. Les cellules sont ensuite incubées à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO₂. Deux jours avant l'infection, les bactéries sont étalées sous forme de disque sur une boîte CYE supplémenté de 5µg/mL de chloramphénicol. La veille de l'infection, les bactéries sontensemencées dans 2mL d'AYE contenant 5µg/mL de chloramphénicol et 2mM d'IPTG à une DO de 0,1 puis mises en culture pendant 24 heures à 37°C sous agitation et oxygénation. Le

jour de l'infection, les cellules sont lavées une fois avec du PBS puis les bactéries, diluées dans du milieu de culture cellulaire supplémenté de 5µg/mL de chloramphénicol et de 2mM d'IPTG, sont ajoutées afin d'infecter les macrophages à une MOI de 10. Après une centrifugation d'infection de 10 minutes à 500g les cellules infectées sont incubées à 37°C dans une atmosphère contenant 5% CO₂.

3. D'amibes *Acanthamoeba castellanii* par *L. pneumophila*

Les bactéries portant le plasmide pXDC50 sorties du congélateur sont étalées sur boîte CYE supplémenté avec 5µg/mL de chloramphénicol et incubées 3 jours à 37°C. Ensuite les boîtes sont stockées à température ambiante. La veille de l'infection, les bactéries sont étalées sous forme de disque sur une nouvelle boîte CYE supplémenté de 5µg/mL de chloramphénicol et de 0.5mM d'IPTG et mises en culture pendant 24 heures à 37°C. Le jour de l'infection, les amibes sont décollées et plaquées à la concentration nécessaire dans une plaque de culture cellulaire dans du PY. Les amibes sont incubées à 30°C pendant 3 heures, ce qui permet leur adhésion à la plaque de culture. Une fois les amibes adhérentes, les bactéries sont diluées afin d'infecter les cellules à une MOI de 10 dans du PY spécial contenant : 16mM de MgSO₄, 7H₂O, 0.4mM de CaCl₂, 3.4mM de citrate de sodium, 0.05mM de (NH₄)₂Fe(SO₄)₂, 6H₂O, 2.5mM de Na₂HPO₄, 2H₂O et 2.5mM de KH₂PO₄ en eau, ajusté à un pH de 6,5 grâce à de l'hydroxyde de potassium et supplémenté de 5µg/mL de chloramphénicol et de 2mM d'IPTG. Les cellules sont lavées une fois avec du PY spécial puis les bactéries sont ajoutées aux cellules et une centrifugation de 10 minutes à 500g est réalisée pour synchroniser l'infection. Les cellules infectées sont incubées à 30°C.

VI. Analyse de l'autophagie cellulaire

1. Modulation de l'autophagie par des siARN

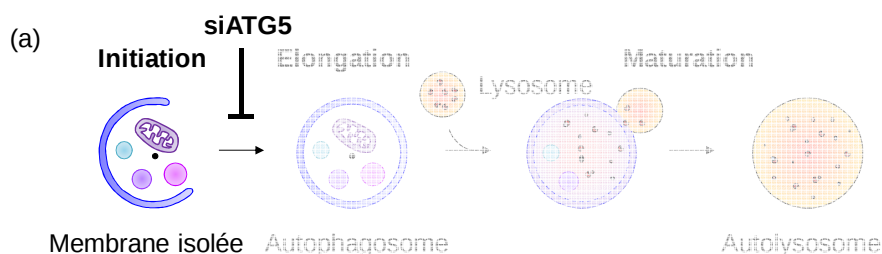
1.1. Fonction des siARN

Afin de moduler l'autophagie des cellules eucaryotes, les cellules HeLa sont transfectées de façon transitoire avec différents siARN (**Tableau 9**).

Nom	Séquence	Référence
siATG5	GGCAUUAUCCAAUUGGUUU	Dharmacon (L-004374-00-0005)
	GCAGAACCAUACUAAUUGC	
	UGACAGAUUUGACCAGUUU	
	ACAAAGAUGUGCUUCGAGA	
siSTX17	CGAUCCAAUAUCCGAGAAA	Dharmacon (L020965-01-0005)
	UAUCAAUGCAGGACGUACA	
	CCUUAGAAGCGGACUUAU	
	GACUGUUGGUGGAGCAUUU	
siCTRL	UGGUUUACAUGUCGACUAA	Dharmacon (D-001810-10-05)
	UGGUUUACAUGUUGUGUGA	
	UGGUUUACAUGUUUUCUGA	
	UGGUUUACAUGUUUCCUA	

Tableau 9 : Séquences des siARN utilisés dans cette étude

Le siCTRL est un contrôle qui est utilisé pour toutes les expériences de transfection. Le siATG5 inhibe la formation d'autophagosomes car la protéine ATG5 est impliquée dans le complexe d'élongation (Mizushima *et al.*, 2001) (**Figure 63a**). Le siSTX17 quant à lui inhibe les étapes de maturation car la STX17 est impliquée au niveau de la fusion entre les autophagosomes et les lysosomes, il y aura donc une accumulation d'autophagosomes dans la cellule (Itakura *et al.*, 2012) (**Figure 63b**).



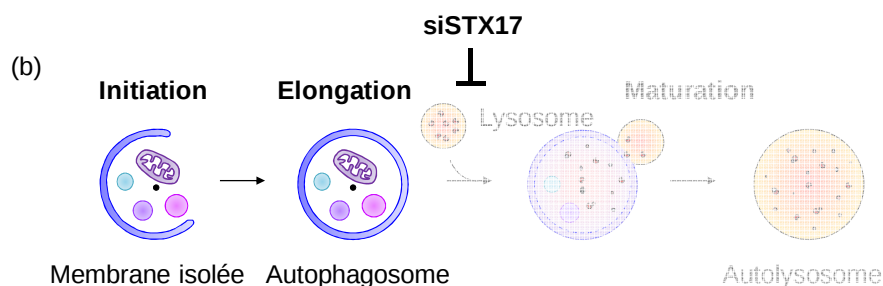


Figure 63 : Effet des siATG5 et siSTX17 sur l'autophagie

1.2. Transfection des cellules HeLa

La veille de la transfection, les cellules HeLa sont mises en culture à une densité de 150 000 cellules par puit de plaque 6 puits dans 2,5mL d'OptiMEM (Gibco, 31985) supplémenté avec : 10% de SVF, 2mM de L-glutamine (Gibco, 25030081), 0.1mM d'acide aminés non essentiels (glycine, alanine, asparagine, acide aspartique, glutamate, proline et sérine) (Gibco, 11140035), 1mM de pyruvate de sodium (Gibco, 11360039), 0.1g/L de bicarbonate de sodium (Sigma S8761) ainsi que 100 unités/mL de pénicilline et 100µg/mL de streptomycine. Les cellules sont incubées pendant 24 heures à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO₂. Le jour de la transfection, un mix contenant 5µL de siARN (100pmol) dilués dans 245µL d'OptiMEM est réalisé en parallèle d'un autre mix formé de 5µL de lipofectamine RNAi Max (Life, 13778075) également dilué dans 245µL d'OptiMEM. Après 5 minutes d'incubation à température ambiante, le mix contenant la lipofectamine est ajouté à celui contenant les siARN pendant 20 minutes d'incubation supplémentaire à température ambiante. Les 500µL de mix sont ensuite ajoutés aux cellules reprises la veille dans 2,5mL d'OptiMEM. Après 24 heures d'incubation à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO₂, les cellules sont récoltées puis plaquées à la concentration nécessaire dans du milieu de culture cellulaire. Le lendemain, 48 heures après la transfection, une partie des cellules est analysée par WB (western-blot) pour vérifier l'extinction de l'expression de la protéine ciblée.

1.3. Vérification de l'efficacité de transfection

1.3.a. Lyse des cellules

Environ 1 million de cellules adhérentes sont récoltées, centrifugées 3 minutes à 500g, reprises dans du PBS et centrifugées de nouveau. Le culot est repris dans 40µL de tampon de lyse contenant : 0,5% NP40 (Nonidet P-40) (USB) et un cocktail d'anti-protéases (10,4mM d'AEBSF, 0,8µM d'aprotinin, 4µM de Bestatin, 14µM d'E-64, 20µM de leupeptin et 15µM de pepstatin A) (Sigma, P8340) en PBS. Les cellules sont incubées 20 minutes à 4°C dans le tampon de lyse puis sont centrifugées 20 minutes à 14 000g à 4°C, ce qui permet de

culoter les débris membranaires. Le surnageant contenant les protéines est ajouté à 10µL de Laemmli 5X contenant : 0.3M de Tris, 10% de SDS, 50% de glycérol (Roth, 3783.1), 0.25% de bleu de bromophénol (Sigma B8630) et 2% de β-mercaptoéthanol (Serva, 28625) en eau, ajusté à pH 6,8. Les échantillons sont stockés à -20°C le temps de l'analyse.

1.3.b. Analyse des protéines ATG5 et STX17 par western-blot

Après avoir été chauffés 5 minutes à 95°C, 15µL des échantillons sont déposés sur un gel SDS PAGE à 12% d'acrylamide contenant : 12% d'acrylamide/bisacrylamide (Roth, 3029.1), 0.2M de Tris pH 8.8, 0.05% de SDS, 0.05% d'ammonium persulfate (Roth, 9592.3) et 0.05% de TEMED (tétraméthyléthylènediamine) (Roth, 2367.3) en eau. Ce gel migre pendant environ 1 heure à 150V (Biorad) dans du tampon de migration contenant : 25mM de Tris, 192mM de glycine (Roth, 0079.4) et 0,1% de SDS en eau. Le transfert semi-sec des protéines est réalisé en déposant (i) 3 papiers Whatmann imbibés de tampon de transfert Bjerrum Schafer Nielsen contenant : 39mM de glycine, 48mM de Tris, 0.375% de SDS et 20% d'éthanol en eau, (ii) la membrane PVDF (polyvinylidene difluoride) (Thermo, 88520) préalablement trempée dans de l'éthanol puis du tampon de transfert, (iii) le gel SDS PAGE et (iv) 3 autres papiers Whatmann imbibés de tampon de transfert. Le transfert est réalisé en 30 minutes à voltage constant de 25V et ampérage compris entre 0,1 et 0,3A (Biorad). Après le transfert, la membrane PVDF est lavée une fois dans du PBS contenant 0,25% de Tween 20 (Roth, 9127.1) pendant 15 minutes sous agitation. La membrane est ensuite saturée pendant 1 heure à température ambiante sous agitation dans du PBS contenant 0,25% de Tween 20 et 5% de BSA (bovin serum albumine) (Roth, T844.3). La membrane est incubée sur la nuit à 4°C sous agitation avec les anticorps primaires dilués dans du PBS contenant 0,25% de Tween 20, 5% de BSA et 0.05% d'azide de sodium (Prolabo). L'azide de sodium préserve les anticorps de la contamination tandis que la BSA les protège lors des cycles de congélation/décongélation. L'anticorps de lapin anti-ATG5 (Sigma, A0856) est dilué au 1000^{ième} et mélangé avec l'anticorps de lapin anti-actine (Sigma, A2066) dilué au 5000^{ième}. L'anticorps de lapin anti-STX17 (Sigma, HPA001204) est dilué au 500^{ième} avec l'anticorps de lapin anti-actine. Après l'incubation avec les anticorps primaires, la membrane est lavée 4 fois dans du PBS contenant 0.25% de Tween 20 pendant 15 minutes. La membrane est ensuite incubée 2 heures à température ambiante sous agitation avec l'anticorps secondaire de chèvre anti-lapin couplé à la HRP (Sigma, A0545) qui est dilué au 5000^{ième} dans du PBS contenant 0.25% de Tween 20 et 5% de BSA. Pour finir, la membrane est de nouveau lavée 4 fois dans du PBS contenant 0.25% de Tween 20 pendant 15 minutes puis la révélation est réalisée par chimioluminescence selon les recommandations du fournisseur (Thermo, 34077).

2. Modulation de l'autophagie par des drogues

Afin de moduler l'autophagie cellulaire, différentes drogues sont utilisées dans cette étude. La rapamycine (Invivogen, trlr-rap), induit une stimulation de l'autophagie en interagissant avec mTORC, le principal répresseur de cette voie (Heitman *et al.*, 1991) (**Figure 64**). Pour toutes les expériences nécessitant de la rapamycine, cette drogue est ajoutée à une concentration de 100nM sur les cellules et gardée tout le long des expériences.

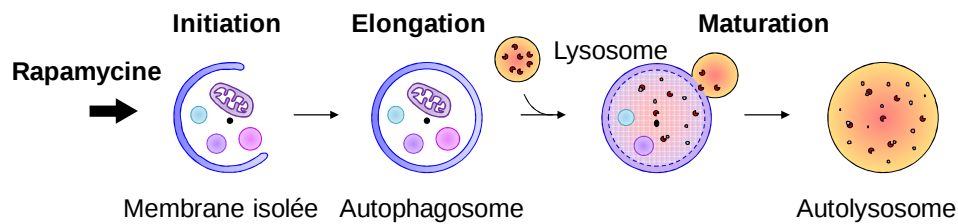


Figure 64 : Effet de la rapamycine sur l'autophagie

La bafilomycine (Invivogen, trlr-baf1) inhibe l'acidification des lysosomes rendant ainsi inactif les enzymes lysosomales en empêchant la rotation de la v-ATPase. De plus, cette drogue inhibe la fusion entre les autophagosomes et les lysosomes en interagissant avec la Ca^{2+} -ATPase SERCA (sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase) au niveau du RE. C'est la diminution de calcium disponible dans le cytosol qui serait à l'origine de l'inhibition de la fusion entre les autophagosomes et les lysosomes (Mauvezin *et al.*, 2015). Cette drogue inhibe donc la maturation des autophagosomes qui, par conséquent, s'accumulent dans la cellule (**Figure 65**). La bafilomycine est utilisée à une concentration de 100nM pendant au maximum 4 heures car cette drogue est cytotoxique. Pour les expériences nécessitant plus de 4 heures d'incubation, des siARN anti-STX17 sont utilisés.

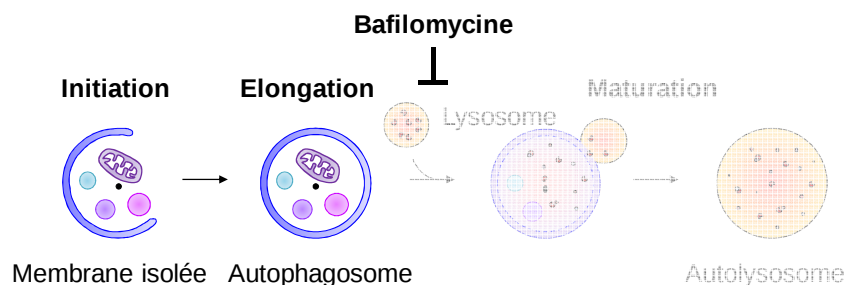


Figure 65 : Effet de la bafilomycine sur l'autophagie

3. Suivi de l'autophagie par cytométrie en flux et cytométrie d'image

Ces techniques permettent de caractériser quantitativement des milliers de cellules d'intérêt à l'aide de marqueurs fluorescents (Lee *et al.*, 2007 ; Shvets *et al.*, 2008). De plus, la cytométrie d'image permet d'analyser les images de ces cellules, comme en microscopie. Dans cette étude, la cytométrie conventionnelle est utilisée pour (i) quantifier l'entrée des bactéries dans les cellules hôtes, (ii) étudier la cytotoxicité, (iii) énumérer de façon relative les autophagosomes (**Figure 66**) et (iv) suivre la réplication intracellulaire. La cytométrie d'image permet de dénombrer précisément la quantité d'autophagosomes et d'illustrer certaines conditions.

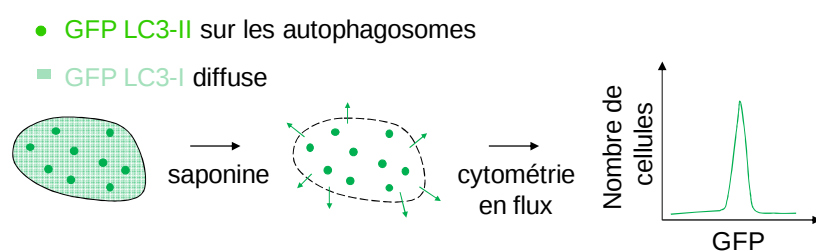


Figure 66 : Analyse des autophagosomes par cytométrie en flux

Les cellules exprimant de façon stable la fusion GFP-LC3 présentent de la LC3-I diffuse dans le cytosol et de la LC3-II ancrée aux autophagosomes. Pour éliminer la LC3-I diffuse, les cellules ont été perméabilisées avec de la saponine. Ces cellules ont ensuite été analysées par cytométrie en flux.

Cent milles cellules HeLa GFP-LC3 sont mises en culture la veille de l'analyse dans des puits de plaque 24 puits dans 500µL de milieu de culture cellulaire. Si l'analyse est réalisée en parallèle de la réplication bactérienne, seulement 50 000 cellules sont plaquées. Le jour de l'analyse, les cellules adhérentes sont récupérées. Comme les cellules HeLa se décolle suite à l'internalisation de *L. pneumophila*, dans le cas d'une infection, le surnageant d'infection ainsi que les cellules adhérentes sont récupérées. Après une centrifugation de 3 minutes à 500g, l'équivalent de 200 000 cellules sont incubées 20 minutes à 4°C dans 100µL de FVD (fixable viability dye) 780 (eBioscience, 65-0865) dilué au 1000^{ième} dans du PBS. Ce marqueur de viabilité cellulaire lie les groupements amines des protéines à la surface et à l'intérieur des cellules. Les cellules mortes sont ainsi marquées plus fortement que les cellules vivantes. Une fois l'incubation avec le marqueur de viabilité terminée, les cellules sont centrifugées 3 minutes à 500g puis incubées dans 500µL de saponine 0,05% diluée en PBS pendant 5 minutes à 4°C. Cette étape perméabilise les cellules afin d'éliminer la LC3-I diffuse dans le cytosol de la cellule. Ainsi, seul le marquage de la LC3-II couplée aux autophagosomes est mesuré par la suite. Après cette étape d'incubation, 1mL de PBS froid est ajouté puis les cellules sont de nouveau centrifugées

avant d'être reprises dans 180µL de paraformaldéhyde 2% (Sigma, P6148) et incubées 20 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière. Cette étape fixe les cellules qui sont ensuite analysées sur le cytomètre LSRII (Becton Dickinson) avec le logiciel Diva (Becton Dickinson). Les données sont par la suite analysées grâce au logiciel Cytobank (Kotecha et al., 2010). La quantité d'autophagosomes est corrélée à la mesure de la médiane de fluorescence GFP acquise sur des milliers de cellules d'intérêt. Les résultats sont présentés sous forme de ratio par rapport à la quantité d'autophagosomes basale mesurée dans la condition contrôle. La condition contrôle correspond à des cellules non traitées, transfectées avec un siCTRL et/ou non infectées. Dans le cas des cellules infectées, la fluorescence mCherry émise par les bactéries exprimant le plasmide pXDC50 ou pXDC50-ravZ permet de discriminer les cellules infectées des cellules non infectées.

Le protocole de préparation des échantillons en cytométrie d'image est identique à celui de cytométrie conventionnelle sauf que 2 millions de cellules sont utilisées pour chaque condition et les volumes sont ajustés en conséquent. De plus, une dernière centrifugation de 3 minutes à 500g supplémentaire permet de reprendre les 2 millions de cellules fixées dans 40µL de PBS. L'analyse des échantillons est réalisée sur l'ImageStreamX Mark II (Millipore) avec le logiciel Inspire (Millipore). Les clichés sont enregistrés en utilisant un grossissement de 40x en activant l'EDF (extended depth of field) pour l'analyse d'image et sans activer l'EDF pour les images utilisées en illustration. Deux cents cellules d'intérêt sont analysées pour chacune des conditions en utilisant le comptage de points (spot count feature) du logiciel IDEAS (Millipore).

4. Suivi de l'autophagie par western-blot

Afin de suivre le flux autophagique dans les cellules, la protéine P62 et les protéines LC3-I/II sont suivies par WB. La protéine à longue durée de vie P62 est dégradée par l'autophagie, ainsi la quantité de cette protéine est corrélée à l'efficacité de cette voie cellulaire. L'accumulation de P62 signifie que la cellule ne dégrade plus cette protéine et donc que l'autophagie est réprimée ou que les étapes de maturations sont inhibées. Au contraire, une faible quantité de P62 est liée à une induction de l'autophagie. D'autre part, la LC3 est une protéine impliquée dans la formation des autophagosomes qui existe sous la forme LC3-I, diffuse dans le cytosol et la forme LC3-II, ancrée au niveau des autophagosomes. La quantité de ces deux formes est liée au nombre d'autophagosomes présents dans la cellule. L'inhibition de l'autophagie se caractérise par l'augmentation de LC3-I et la diminution de LC3-II. A l'inverse, l'accumulation d'autophagosomes suite la stimulation de l'autophagie ou à la répression du flux autophagique, est liée à la baisse de LC3-I et l'augmentation de LC3-II. L'analyse combinée de la quantité des protéines P62,

LC3-I et LC3-II permet de déterminer si l'autophagie cellulaire est inhibée, stimulée ou si le flux autophagique est altéré suite à l'inhibition des étapes de maturations (**Tableau 10**).

<i>Phénotype</i>	<i>Quantité de P62</i>	<i>Ratio LC3-I/LC3-II</i>
Autophagie globalement stimulée	↘	↘
Flux autophagique inhibé	↗	↘
Autophagie globalement inhibée	↗	↗

Tableau 10 : Interprétation du niveau d'autophagie en fonction de la quantité des protéines P62, LC3-I et LC3-II

La veille de l'analyse, 500 000 cellules sont déposées dans des puits de plaque 6 puits dans 2mL de milieu de culture cellulaire. Dans le cas d'une infection, les cellules sont infectées à une MOI de 25 (cf. V.1), ce qui permet d'avoir plus de la moitié des cellules infectées. Comme les souches Lens et Philadelphia-1 infectent moins bien les cellules, cette expérience est réalisée uniquement avec la souche Paris. Le jour de l'analyse, les cellules adhérentes sont récoltées et dans le cas d'une infection, étant donné que les cellules HeLa infectées par *L. pneumophila* se décollent suite à l'internalisation de la bactérie, le surnageant et les cellules adhérentes sont récoltés. Les cellules sont lysées (cf. VI.1.3.a) puis les protéines sont déposées sur un gel SDS PAGE à 14% et transférées sur une membrane PVDF. Cette membrane est particulièrement adaptée au transfert de la forme lipidée de la LC3 car elle est plus hydrophobe qu'une membrane en nitrocellulose. Après le transfert, la membrane est traitée comme précédemment (cf. VI.3.1.b.) sauf que la concentration de Tween 20 est de 0.1%. L'anticorps primaire de souris anti-P62 (Santacruz, sc-28359) est dilué au 500^{ième} avec l'anticorps de lapin anti-actine dilué au 5000^{ième} tandis que l'anticorps de lapin anti-LC3 (Sigma, L7543) est dilué au 1000^{ième}. Trois lavages de 15 minutes sont effectués après l'incubation avec les anticorps primaires. Afin de révéler les protéines P62 et actine, la membrane est incubée avec un anticorps secondaire de chèvre anti-souris couplé à la HRP (Sigma, A0168) dilué au 5000^{ième} mélangé avec un anticorps secondaire de chèvre anti-lapin couplé à la HRP également dilué au 5000^{ième}. La protéine LC3 est révélée avec un anticorps secondaire de chèvre anti-lapin couplé à la HRP dilué au 5000^{ième}. Trois lavages de 15 minutes sont effectués avant la révélation de la membrane.

VII. Analyse de la réplication bactérienne

1. Par comptage de colonies

Cette technique permet de mesurer la réplication bactérienne globale. Comme *L. pneumophila* ne se réplique pas en milieu de culture cellulaire, la réplication est mesurée en comptant les bactéries présentes à l'intérieur des cellules et les bactéries qui sont sorties à l'extérieur des cellules hôtes après s'être répliquées (**Figure 67**).

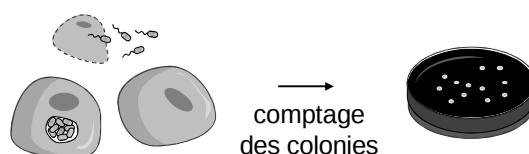


Figure 67 : Analyse de la réplication bactérienne par comptage de colonies

La veille de l'infection, 20 000 cellules HeLa sontensemencées dans des puits de plaque 24 puits. Après 4 heures d'infection à une MOI de 10 ([cf. V.1](#)), les cellules sont lavées 3 fois avec du PBS pour éliminer les bactéries extracellulaires et incubées dans 500µL de milieu de culture contenant 5% de SVF puis mises à 37°C avec 5% de CO₂. Cela permet de limiter la croissance des cellules sans induire de carence nutritive en acide aminé qui stimulerait de façon artefactuelle l'autophagie. Dans le cas du temps 4 heures, 1mL de saponine (Sigma, 84510) à 0,1% diluée en eau est ajouté au lieu du milieu de culture cellulaire, puis les cellules sont incubées pendant 10 minutes à température ambiante. Pour les autres temps d'infection, après 24, 48 et 72 heures d'infection, 500µL de saponine à 0,2% diluée en eau sont ajoutés aux 500µL de milieu de culture. La saponine perméabilise les membranes des cellules eucaryotes sans modifier l'intégrité des membranes bactériennes. Le surnageant contenant les bactéries intracellulaires est dilué dans du PBS et étalé grâce à un étaleur dilueur (Interscience, easy spiral) sur des boîtes BCYE (buffered CYE) commerciales (Oxoid, PO5072A). Ces boîtes BCYE sont ensuite incubées à 37°C et les bactéries sont dénombrées à l'aide d'un scanner (Interscience, Scan500).

2. Par cytométrie en flux

Dans cette étude, la cytométrie en flux a été utilisée pour (i) quantifier l'entrée des bactéries dans les cellules hôtes, (ii) étudier de la cytotoxicité, (iii) suivre la réplication intracellulaire au niveau de chacune des cellules. L'utilisation de bactéries exprimant la mCherry permet de suivre la multiplication bactérienne. En effet, la moyenne de fluorescence mCherry est corrélée au nombre de bactéries présentes à l'intérieur des cellules (**Figure 68**).

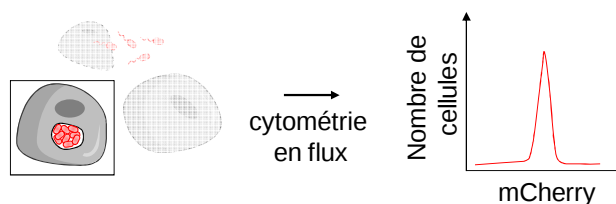


Figure 68 : Analyse de la réplication bactérienne par cytométrie en flux

La veille de l'infection 50 000 cellules sont déposées dans 500µL de milieu de culture cellulaire dans des puits de plaque 24 puits. Après l'infection à une MOI de 10 (cf. V.1.) si la réplication bactérienne a été couplée à l'analyse de la quantité d'autophagosomes, les cellules sont préparées comme précédemment (cf. VI.3.). Dans le cas où la réplication bactérienne est analysée dans des cellules HeLa sans numération de la quantité d'autophagosomes, les cellules ne sont pas perméabilisées et le DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole) est utilisé extemporanément à une concentration de 3µM comme marqueur de viabilité. Cet agent intercalent de l'ADN entre dans les cellules perméabilisées et marque ainsi l'ADN des cellules mortes. La réplication bactérienne est reliée à la mesure de la moyenne de fluorescence mCherry. Les résultats sont présentés sous forme de ratio par rapport à la réplication de la souche étudiée dans la condition contrôle. Les conditions contrôles correspondent à des cellules non traitées ou transfectées avec un siCTRL.

3. Par lecteur de plaque

Dans cette étude, la mesure de la réplication bactérienne par lecteur de plaque est utilisée pour cribler le phénotype de réplication de différentes souches bactériennes. Cette technique permet de mesurer la réplication bactérienne globale en suivant l'acquisition de fluorescence au cours du temps. La réplication des bactéries présentes à l'intérieur des cellules ainsi que les bactéries qui sont sorties à l'extérieur des cellules hôtes après s'être répliquées a été analysée (**Figure 69**).

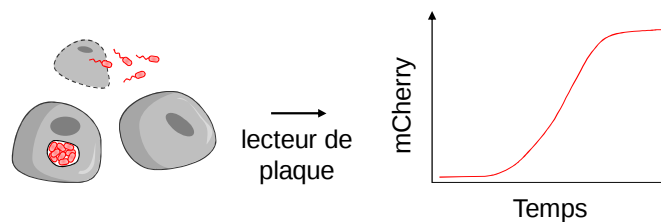


Figure 69 : Analyse de la réplication bactérienne par lecteur de plaque

Le jour de l'infection, 100 000 amibes *A. castellanii* sont plaquées par puit d'une plaque 96 puits à bords noirs et à fonds transparents dans 200µL de PY. Au minimum deux puits sont prévus pour une même condition. Suite à l'infection des amibes (cf. V.3) à une MOI de 10, les cellules infectées sont incubées à 30°C pendant 1 heure puis lavées deux fois avec du PY spécial supplémenté de 5µg/mL de chloramphénicol et de 2mM d'IPTG. Les cellules infectées sont finalement incubées dans un lecteur de plaque (TECAN, Infinite 200pro) à 30°C sans agitation et une lecture de la fluorescence mCherry est réalisée toutes les heures.

Concernant les monocytes U937 dérivés en macrophages (cf. V.2), trois jours avant l'infection, 100 000 cellules sontensemencées dans 200µL de milieu de culture cellulaire contenant 50ng/mL de PMA par puit d'une plaque 96 puits à bords noirs et à fonds transparents. Après 1 heure d'infection à une MOI de 10, les cellules sont lavées deux fois avec du PBS et sont incubées dans 200µL de milieu CO₂-indépendant (Gibco, 18045) contenant 2mM de glutamine, 10% de SVF, 5µg/mL de chloramphénicol et 2mM d'IPTG. Ce milieu permet de pallier au manque de CO₂ de l'enceinte du lecteur de plaque (TECAN, Infinite 200pro). Les cellules infectées sont incubées dans un lecteur de plaque à 37°C, sans agitation et la fluorescence mCherry est mesurée toutes les heures.

VIII. Analyses statistiques

Le logiciel R (version 3.2.3) (R core Team, 2015) est utilisé pour toutes les analyses statistiques de cette étude (<https://www.R-project.org>). Les données sont analysées en utilisant des modèles linéaires. La normalité et l'homoscédasticité sont vérifiées graphiquement pour chaque modèle créé. La statistique F est donnée pour l'effet global d'un facteur et un test de Tukey est utilisé pour les comparaisons deux à deux.

Références

A

- Abdel-Nour, M., Duncan, C., Low, D., and Guyard, C. (2013). Biofilms: The Stronghold of *Legionella pneumophila*. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 21660–21675.
- Abdel-Nour, M., Duncan, C., Prashar, A., Rao, C., Ginevra, C., Jarraud, S., Low, D.E., Ensminger, A.W., Terebiznik, M.R., and Guyard, C. (2014). The *Legionella pneumophila* Collagen-Like Protein Mediates Sedimentation, Autoaggregation, and Pathogen-Phagocyte Interactions. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 1441–1454.
- Abu-Zant, A., Santic, M., Molmeret, M., Jones, S., Helbig, J., and Abu Kwaik, Y. (2005). Incomplete activation of macrophage apoptosis during intracellular replication of *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* **73**, 5339–5349.
- Abu-Zant, A., Jones, S., Asare, R., Suttles, J., Price, C., Graham, J., and Kwaik, Y.A. (2007). Anti-apoptotic signalling by the Dot/Icm secretion system of *L. pneumophila*. *Cell. Microbiol.* **9**, 246–264.
- Agaisse, H. (2016). Molecular and Cellular Mechanisms of *Shigella flexneri* Dissemination. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **6**.
- Akamine, M., Higa, F., Arakaki, N., Kawakami, K., Takeda, K., Akira, S., and Saito, A. (2005). Differential roles of Toll-like receptors 2 and 4 in in vitro responses of macrophages to *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* **73**, 352–361.
- Al-Khodori, S., Price, C.T., Habyarimana, F., Kalia, A., and Abu Kwaik, Y. (2008). A Dot/Icm-translocated ankyrin protein of *Legionella pneumophila* is required for intracellular proliferation within human macrophages and protozoa. *Mol. Microbiol.* **70**, 908–923.
- Alli, O.A.T., Gao, L.-Y., Pedersen, L.L., Zink, S., Radulic, M., Doric, M., and Kwaik, Y.A. (2000). Temporal Pore Formation-Mediated Egress from Macrophages and Alveolar Epithelial Cells by *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* **68**, 6431–6440.
- Altman, E., and Segal, G. (2008). The response regulator CpxR directly regulates expression of several *Legionella pneumophila* icm/dot components as well as new translocated substrates. *J. Bacteriol.* **190**, 1985–1996.
- Amer, A.O., and Swanson, M.S. (2005). Autophagy is an immediate macrophage response to *Legionella pneumophila*. *Cell. Microbiol.* **7**, 765–778.
- Anselme, C., Pérez-Brocal, V., Vallier, A., Vincent-Monegat, C., Charif, D., Latorre, A., Moya, A., and Heddi, A. (2008). Identification of the Weevil immune genes and their expression in the bacteriome tissue. *BMC Biol.* **6**, 43.
- Arasaki, K., Toomre, D.K., and Roy, C.R. (2012). The *Legionella pneumophila* Effector DrrA Is Sufficient to Stimulate SNARE-Dependent Membrane Fusion. *Cell Host Microbe* **11**, 46–57.
- Ashida, H., Mimuro, H., and Sasakawa, C. (2015). *Shigella* Manipulates Host Immune Responses by Delivering Effector Proteins with Specific Roles. *Front. Immunol.* **6**.
- Aurass, P., Schlegel, M., Metwally, O., Harding, C.R., Schroeder, G.N., Frankel, G., and Flieger, A. (2013). The *Legionella pneumophila* Dot/Icm-secreted effector PlcC/CegC1 together with PlcA and PlcB promotes virulence and belongs to a novel zinc metallophospholipase C family present in bacteria and fungi. *J. Biol. Chem.* **288**, 11080–11092.
- 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. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 3320–3322.
- Avruch, J., Long, X., Ortiz-Vega, S., Rapley, J., Papageorgiou, A., and Dai, N. (2009). Amino acid regulation of TOR complex 1. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **296**, E592–602.
- Axe, E.L., Walker, S.A., Manifava, M., Chandra, P., Roderick, H.L., Habermann, A., Griffiths, G., and Kistakis, N.T. (2008). Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* **182**, 685–701.

B

- Bandyopadhyay, P., Liu, S., Gabbai, C.B., Venitelli, Z., and Steinman, H.M. (2007). Environmental Mimics and the Lvh Type IVA Secretion System Contribute to Virulence-Related Phenotypes of *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* **75**, 723–735.
- Bandyopadhyay, P., Lang, E.A.S., Rasaputra, K.S., and Steinman, H.M. (2013). Implication of the VirD4 Coupling Protein of the Lvh Type 4 Secretion System in Virulence Phenotypes of *Legionella pneumophila*. *J. Bacteriol.* **195**, 3468–3475.
- Banga, S., Gao, P., Shen, X., Fiscus, V., Zong, W.-X., Chen, L., and Luo, Z.-Q. (2007). *Legionella pneumophila* inhibits macrophage apoptosis by targeting pro-death members of

- the BCL2 protein family. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 5121–5126.
- Bardill, J.P., Miller, J.L., and Vogel, J.P. (2005). IcmS-dependent translocation of SdeA into macrophages by the *Legionella pneumophila* type IV secretion system: *L. pneumophila* IcmS-dependent protein translocation. *Mol. Microbiol.* **56**, 90–103.
- von Bargaen, K., Gorvel, J.-P., and Salcedo, S.P. (2012). Internal affairs: investigating the *Brucella* intracellular lifestyle. *FEMS Microbiol. Rev.* **36**, 533–562.
- Barnett, T.C., Liebl, D., Seymour, L.M., Gillen, C.M., Lim, J.Y., LaRock, C.N., Davies, M.R., Schulz, B.L., Nizet, V., Teasdale, R.D., *et al.* (2013). The Globally Disseminated M1T1 Clone of Group A *Streptococcus* Evades Autophagy for Intracellular Replication. *Cell Host Microbe* **14**, 675–682.
- Bartfeld, S., Engels, C., Bauer, B., Aurass, P., Flieger, A., Brüggemann, H., and Meyer, T.F. (2009). Temporal resolution of two-tracked NF- κ B activation by *Legionella pneumophila*. *Cell. Microbiol.* **11**, 1638–1651.
- Bastiat-Sempe, B., Love, J.F., Lomayesva, N., and Wessels, M.R. (2014). Streptolysin O and NAD-Glycohydrolase Prevent Phagolysosome Acidification and Promote Group A *Streptococcus* Survival in Macrophages. *mBio* **5**.
- Baxt, L.A., and Goldberg, M.B. (2014). Host and Bacterial Proteins That Repress Recruitment of LC3 to *Shigella* Early during Infection. *PLoS ONE* **9**.
- Behnia, R., and Munro, S. (2005). Organelle identity and the signposts for membrane traffic. *Nature* **438**, 597–604.
- Bellinger-Kawahara, C., and Horwitz, M.A. (1990). Complement component C3 fixes selectively to the major outer membrane protein (MOMP) of *Legionella pneumophila* and mediates phagocytosis of liposome-MOMP complexes by human monocytes. *J. Exp. Med.* **172**, 1201–1210.
- Belyi, Y., Niggeweg, R., Opitz, B., Vogelsang, M., Hippenstiel, S., Wilm, M., and Aktories, K. (2006). *Legionella pneumophila* glucosyltransferase inhibits host elongation factor 1A. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 16953–16958.
- Belyi, Y., Tabakova, I., Stahl, M., and Aktories, K. (2008). Lgt: a Family of Cytotoxic Glucosyltransferases Produced by *Legionella pneumophila*. *J. Bacteriol.* **190**, 3026–3035.
- Bennett, T.L., Kraft, S.M., Reaves, B.J., Mima, J., O'Brien, K.M., and Starai, V.J. (2013). LegC3, an Effector Protein from *Legionella pneumophila*, Inhibits Homotypic Yeast Vacuole Fusion In Vivo and In Vitro. *PLoS ONE* **8**.
- Berger, K.H., Merriam, J.J., and Isberg, R.R. (1994). Altered intracellular targeting properties associated with mutations in the *Legionella pneumophila dotA* gene. *Mol. Microbiol.* **14**, 809–822.
- 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. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 279–286.
- Berks, B.C., Palmer, T., and Sargent, F. (2003). The Tat protein translocation pathway and its role in microbial physiology. *Adv. Microb. Physiol.* **47**, 187–254.
- Berón, W., Gutierrez, M.G., Rabinovitch, M., and Colombo, M.I. (2002). *Coxiella burnetii* localizes in a Rab7-labeled compartment with autophagic characteristics. *Infect. Immun.* **70**, 5816–5821.
- Birmingham, C.L., Canadien, V., Gouin, E., Troy, E.B., Yoshimori, T., Cossart, P., Higgins, D.E., and Brumell, J.H. (2007). *Listeria monocytogenes* Evades Killing by Autophagy During Colonization of Host Cells. *Autophagy* **3**, 442–451.
- Bodemann, B.O., Orvedahl, A., Cheng, T., Ram, R.R., Ou, Y.-H., Formstecher, E., Maiti, M., Hazelett, C.C., Wauson, E.M., Balakireva, M., *et al.* (2011). RalB and the Exocyst Mediate the Cellular Starvation Response by Direct Activation of Autophagosome Assembly. *Cell* **144**, 253–267.
- Borella, P., Guerrieri, E., Marchesi, I., Bondi, M., and Messi, P. (2005). Water ecology of *Legionella* and protozoan: environmental and public health perspectives. In *Biotechnology Annual Review*, (Elsevier), 355–380.
- 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.* **6**.
- 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*. *J. Bacteriol.* **185**, 4630–4637.
- Brenner, D.J. (1986). Classification of *Legionellaceae*. Current status and remaining questions. *Isr J Med Sci* **22**, 620–632.
- 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.

Brombacher, E., Urwyler, S., Ragaz, C., Weber, S.S., Kami, K., Overduin, M., and Hilbi, H. (2009). Rab1 Guanine Nucleotide Exchange Factor SidM Is a Major Phosphatidylinositol 4-Phosphate-binding Effector Protein of *Legionella pneumophila*. *J. Biol. Chem.* 284, 4846–4856.

Bruckert, W.M., and Abu Kwaik, Y. (2016). Lysine11-Linked Polyubiquitination of the AnkB F-Box Effector of *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* 84, 99–107.

Bruckert, W.M., Price, C.T., and Abu Kwaik, Y. (2014). Rapid nutritional remodeling of the host cell upon attachment of *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* 82, 72–82.

Brüggemann, H., Cazalet, C., and Buchrieser, C. (2006a). Adaptation of *Legionella pneumophila* to the host environment: role of protein secretion, effectors and eukaryotic-like proteins. *Curr. Opin. Microbiol.* 9, 86–94.

Brüggemann, H., Hagman, A., Jules, M., Sismeiro, O., Dillies, M.-A., Gouyette, C., Kunst, F., Steinert, M., Heuner, K., Coppée, J.-Y., et al. (2006b). Virulence strategies for infecting phagocytes deduced from the in vivo transcriptional program of *Legionella pneumophila*. *Cell. Microbiol.* 8, 1228–1240.

Bugalhão, J.N., Mota, L.J., and Franco, I.S. (2016). Identification of regions within the *Legionella pneumophila* VipA effector protein involved in actin binding and polymerization and in interference with eukaryotic organelle trafficking. *MicrobiologyOpen* 5, 118–133.

Burstein, D., Zusman, T., Degtyar, E., Viner, R., Segal, G., and Pupko, T. (2009). Genome-scale identification of *Legionella pneumophila* effectors using a machine learning approach. *PLoS Pathog.* 5.

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.

Byrne, B., and Swanson, M.S. (1998). Expression of *Legionella pneumophila* virulence traits in response to growth conditions. *Infect. Immun.* 66, 3029–3034.

Byrne, B.G., Dubuisson, J.-F., Joshi, A.D., Persson, J.J., and Swanson, M.S. (2013). Inflammasome Components Coordinate Autophagy and Pyroptosis as Macrophage Responses to Infection. *mBio* 4.

C

Cambronne, E.D., and Roy, C.R. (2007). The *Legionella pneumophila* lcmSW complex interacts with multiple Dot/Icm effectors to facilitate type IV translocation. *PLoS Pathog.* 3.

Camejo, A., Carvalho, F., Reis, O., Leitão, E., Sousa, S., and Cabanes, D. (2011). The arsenal of virulence factors deployed by *Listeria monocytogenes* to promote its cell infection cycle. *Virulence* 2, 379–394.

Campbell-Valois, F.-X., Sachse, M., Sansonetti, P.J., and Parsot, C. (2015). Escape of Actively Secreting *Shigella flexneri* from ATG8/LC3-Positive Vacuoles Formed during Cell-To-Cell Spread Is Facilitated by IcsB and VirA. *mBio* 6.

Campèse, C., Descours, G., Lepoutre, A., Beraud, L., Maine, C., Che, D., and Jarraud, S. (2015). Legionnaires' disease in France. *Médecine Mal. Infect.* 45, 65–71.

Carlos Martín Zoppino, F., Damián Militello, R., Slavin, I., Álvarez, C., and Colombo, M.I. (2010). Autophagosome Formation Depends on the Small GTPase Rab1 and Functional ER Exit Sites. *Traffic* 11, 1246–1261.

Carvalho, F., Sousa, S., and Cabanes, D. (2014). How *Listeria monocytogenes* organizes its surface for virulence. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4.

Case, C.L., Kohler, L.J., Lima, J.B., Strowig, T., de Zoete, M.R., Flavell, R.A., Zamboni, D.S., and Roy, C.R. (2013). Caspase-11 stimulates rapid flagellin-independent pyroptosis in response to *Legionella pneumophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 1851–1856.

Castilho, B.A., Shanmugam, R., Silva, R.C., Ramesh, R., Himme, B.M., and Sattlegger, E. (2014). Keeping the eIF2 alpha kinase Gcn2 in check. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1843, 1948–1968.

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.

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

Cazalet, C., Jules, M., and Buchrieser, C. (2008b). Genomics and Transcriptomics of *Legionella pneumophila*: Insights into the Life

- Style of an Intracellular Pathogen. In *Legionella*: Molecular Microbiology, 123–150.
- Cazalet, C., Gomez-Valero, L., Rusniok, C., Lomma, M., Dervins-Ravault, D., Newton, H.J., Sansom, F.M., Jarraud, S., Zidane, N., Ma, L., *et al.* (2010). Analysis of the *Legionella* longbeachae Genome and Transcriptome Uncovers Unique Strategies to Cause Legionnaires' Disease. *PLoS Genet.* 6.
- Cemma, M., Lam, G.Y., Stöckli, M., Higgins, D.E., and Brumell, J.H. (2015). Strain-Specific Interactions of *Listeria monocytogenes* with the Autophagy System in Host Cells. *PLoS ONE* 10.
- Cerqueira, D.M., Pereira, M.S.F., Silva, A.L.N., Cunha, L.D., and Zamboni, D.S. (2015). Caspase-1 but Not Caspase-11 Is Required for NLRC4-Mediated Pyroptosis and Restriction of Infection by Flagellated *Legionella* Species in Mouse Macrophages and In Vivo. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 195, 2303–2311.
- Chandler, F.W., Blackmon, J.A., Hicklin, M.D., Cole, R.M., and Callaway, C.S. (1979a). Ultrastructure of the Agent of Legionnaires' Disease in the Human Lung. *Am. J. Clin. Pathol.* 71, 43–50.
- Chandler, F.W., Cole, R.M., Hicklin, M.D., Blackmon, J.A., and Callaway, C.S. (1979b). Ultrastructure of the Legionnaires' disease bacterium: a study using transmission electron microscopy. *Ann. Intern. Med.* 90, 642–647.
- Chang, B., Kura, F., Amemura-Maekawa, J., Koizumi, N., and Watanabe, H. (2005). Identification of a Novel Adhesion Molecule Involved in the Virulence of *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* 73, 4272–4280.
- Charpentier, X., Gabay, J.E., Reyes, M., Zhu, J.W., Weiss, A., and Shuman, H.A. (2009). Chemical genetics reveals bacterial and host cell functions critical for type IV effector translocation by *Legionella pneumophila*. *PLoS Pathog.* 5.
- Chen, C., Zhang, W., Zheng, H., Lan, R., Wang, H., Du, P., Bai, X., Ji, S., Meng, Q., Jin, D., *et al.* (2013). Minimum Core Genome Sequence Typing of Bacterial Pathogens: a Unified Approach for Clinical and Public Health Microbiology. *J. Clin. Microbiol.* 51, 2582–2591.
- Chen, J., Felipe, K.S. de, Clarke, M., Lu, H., Anderson, O.R., Segal, G., and Shuman, H.A. (2004). *Legionella* Effectors That Promote Nonlytic Release from Protozoa. *Science* 303, 1358–1361.
- Cheng, W., Yin, K., Lu, D., Li, B., Zhu, D., Chen, Y., Zhang, H., Xu, S., Chai, J., and Gu, L. (2012). Structural Insights into a Unique *Legionella pneumophila* Effector LidA Recognizing Both GDP and GTP Bound Rab1 in Their Active State. *PLoS Pathog* 8.
- Chiang, H.-L., Terlecky, S.R., Plant, C.P., and Dice, J.F. (1989). A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins. *Science* 246, 382–385.
- 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.
- Choi, A.M.K., Ryter, S.W., and Levine, B. (2013). Autophagy in Human Health and Disease. *N. Engl. J. Med.* 368, 651–662.
- Chong, A., S. Allan, D., Riveroll, A., Garduño, E., and A. Garduño, R. (2006). The Hsp60 Chaperonin of *Legionella pneumophila*: an Intriguing Player in Infection of Host Cells. In *Legionella*, N.P. Cianciotto, J.E. Stout, B.S. Fields, D.F. Geary, C.A. Joseph, Y.A. Kwaik, P.H. Edelstein, M.S. Swanson, T.G. Harrison, and R.M. Ratcliff, eds. (American Society of Microbiology), 255–260.
- Chong, A., Lima, C.A., Allan, D.S., Nasrallah, G.K., and Garduño, R.A. (2009). The purified and recombinant *Legionella pneumophila* chaperonin alters mitochondrial trafficking and microfilament organization. *Infect. Immun.* 77, 4724–4739.
- Choy, A., Dancourt, J., Mugo, B., O'Connor, T.J., Isberg, R.R., Melia, T.J., and Roy, C.R. (2012). The *Legionella* Effector RavZ Inhibits Host Autophagy Through Irreversible ATG8 Deconjugation. *Science* 338, 1072–1076.
- Cianciotto, N.P. (2013). Type II secretion and *Legionella* virulence. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 376, 81–102.
- Cirillo, J.D., Cirillo, S.L., Yan, L., Bermudez, L.E., Falkow, S., and Tompkins, L.S. (1999). Intracellular growth in *Acanthamoeba castellanii* affects monocyte entry mechanisms and enhances virulence of *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* 67, 4427–4434.
- Cirillo, S.L., Lum, J., and Cirillo, J.D. (2000). Identification of novel loci involved in entry by *Legionella pneumophila*. *Microbiology* 146, 1345–1359.
- Cirillo, S.L., Yan, L., Littman, M., Samrakandi, M.M., and Cirillo, J.D. (2002). Role of the *Legionella pneumophila* rtxA gene in amoebae. *Microbiology* 148, 1667–1677.
- Cirillo, S.L.G., Bermudez, L.E., El-Etr, S.H., Duhamel, G.E., and Cirillo, J.D. (2001). *Legionella pneumophila* Entry Gene rtxA Is Involved in Virulence. *Infect. Immun.* 69, 508–517.

- Clemens, D.L., Lee, B.Y., and Horwitz, M.A. (2000). Deviant expression of Rab5 on phagosomes containing the intracellular pathogens *Mycobacterium tuberculosis* and *Legionella pneumophila* is associated with altered phagosomal fate. *Infect. Immun.* 68, 2671–2684.
- Coers, J., Kagan, J.C., Matthews, M., Nagai, H., Zuckman, D.M., and Roy, C.R. (2000). Identification of Icm protein complexes that play distinct roles in the biogenesis of an organelle permissive for *Legionella pneumophila* intracellular growth. *Mol. Microbiol.* 38, 719–736.
- Conover, G.M., Derré, I., Vogel, J.P., and Isberg, R.R. (2003). The *Legionella pneumophila* LidA protein: a translocated substrate of the Dot/Icm system associated with maintenance of bacterial integrity. *Mol. Microbiol.* 48, 305–321.
- Copenhaver, A.M., Casson, C.N., Nguyen, H.T., Fung, T.C., Duda, M.M., Roy, C.R., and Shin, S. (2014). Alveolar Macrophages and Neutrophils Are the Primary Reservoirs for *Legionella pneumophila* and Mediate Cytosolic Surveillance of Type IV Secretion. *Infect. Immun.* 82, 4325–4336.
- Coxon, P.Y., Summersgill, J.T., Ramirez, J.A., and Miller, R.D. (1998). Signal transduction during *Legionella pneumophila* entry into human monocytes. *Infect. Immun.* 66, 2905–2913.
- Creasey, E.A., and Isberg, R.R. (2012). The protein SdhA maintains the integrity of the *Legionella*-containing vacuole. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 3481–3486.
- Crichton, D., Wilkinson, S., O'Prey, J., Syed, N., Smith, P., Harrison, P.R., Gasco, M., Garrone, O., Crook, T., and Ryan, K.M. (2006). DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell* 126, 121–134.
- Cunha, L.D., and Zamboni, D.S. (2014). Recognition of *Legionella pneumophila* nucleic acids by innate immune receptors. *Microbes Infect. Inst. Pasteur* 16, 985–990.
- Currie, S.L., and Beattie, T.K. (2015). Compost and *Legionella longbeachae* : an emerging infection? *Perspect. Public Health* 135, 309–315.
- D**
- Dalebroux, Z.D., Edwards, R.L., and Swanson, M.S. (2009). SpoT governs *Legionella pneumophila* differentiation in host macrophages. *Mol. Microbiol.* 71, 640–658.
- Dallaire-Dufresne, S., Paquet, V.E., and Charette, S.J. (2011). *Dictyostelium discoideum* : un modèle pour l'étude de la virulence bactérienne. *Can. J. Microbiol.* 57, 699–707.
- 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.
- De Buck, E., Lebeau, I., Maes, L., Geukens, N., Meyen, E., Van Mellaert, L., Anné, J., and Lammertyn, E. (2004). A putative twin-arginine translocation pathway in *Legionella pneumophila*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 317, 654–661.
- De Matteis, M.A., and Godi, A. (2004). PI-loting membrane traffic. *Nat. Cell Biol.* 6, 487–492.
- Degtyar, E., Zusman, T., Ehrlich, M., and Segal, G. (2009). A *Legionella* effector acquired from protozoa is involved in sphingolipids metabolism and is targeted to the host cell mitochondria. *Cell. Microbiol.* 11, 1219–1235.
- Del Campo, C.M., Mishra, A.K., Wang, Y.-H., Roy, C.R., Janmey, P.A., and Lambright, D.G. (2014). Structural Basis for PI(4)P-Specific Membrane Recruitment of the *Legionella pneumophila* Effector DrrA/SidM. *Structure* 22, 397–408.
- Deng, W., Liou, S.-R., Plunkett III, G., Mayhew, G.F., Rose, D.J., Burland, V., Kodoyianni, V., Schwartz, D.C., and Blattner, F.R. (2003). Comparative Genomics of *Salmonella enterica* Serovar Typhi Strains Ty2 and CT18. *J. Bacteriol.* 185, 2330–2337.
- Diao, J., Liu, R., Rong, Y., Zhao, M., Zhang, J., Lai, Y., Zhou, Q., Wilz, L.M., Li, J., Vivona, S., et al. (2015). ATG14 promotes membrane tethering and fusion of autophagosomes to endolysosomes. *Nature* 520, 563–566.
- Di Bartolomeo, S., Corazzari, M., Nazio, F., Oliverio, S., Lisi, G., Antonoli, M., Pagliarini, V., Matteoni, S., Fuoco, C., Giunta, L., et al. (2010). The dynamic interaction of AMBRA1 with the dynein motor complex regulates mammalian autophagy. *J. Cell Biol.* 191, 155–168.
- Doleans, A., Aurell, H., Reyrolle, M., Lina, G., Freney, J., Vandenesch, F., Etienne, J., and Jarraud, S. (2004). Clinical and Environmental Distributions of *Legionella* Strains in France Are Different. *J. Clin. Microbiol.* 42, 458–460.
- Doleans-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 Ivh-encoding region in *Legionella pneumophila* strain Paris. *Microbiology* 152, 3561–3568.

Dolezal, P., Aili, M., Tong, J., Jiang, J.-H., Marobbio, C.M.T., Marobbio, C.M., Lee, S.F., Schuelein, R., Belluzzo, S., Binova, E., *et al.* (2012). *Legionella pneumophila* secretes a mitochondrial carrier protein during infection. *PLoS Pathog.* 8.

Dong, N., Zhu, Y., Lu, Q., Hu, L., Zheng, Y., and Shao, F. (2012). Structurally Distinct Bacterial TBC-like GAPs Link Arf GTPase to Rab1 Inactivation to Counteract Host Defenses. *Cell* 150, 1029–1041.

Dortet, L., Mostowy, S., Samba-Louaka, A., Gouin, E., Nahori, M.-A., Wiemer, E.A.C., Dussurget, O., and Cossart, P. (2011). Recruitment of the Major Vault Protein by InlK: A *Listeria monocytogenes* Strategy to Avoid Autophagy. *PLoS Pathog.* 7.

Duncan, C., Prashar, A., So, J., Tang, P., Low, D.E., Terebiznik, M., and Guyard, C. (2011). Lcl of *Legionella pneumophila* Is an Immunogenic GAG Binding Adhesin That Promotes Interactions with Lung Epithelial Cells and Plays a Crucial Role in Biofilm Formation. *Infect. Immun.* 79, 2168–2181.

Dupuy, M., Binet, M., Bouteleux, C., Herbelin, P., Soreau, S., and Héchard, Y. (2016). Permissiveness of freshly isolated environmental strains of amoebae for growth of *Legionella pneumophila*. *FEMS Microbiol. Lett.* 363.

Dupont, N., Lacas-Gervais, S., Bertout, J., Paz, I., Freche, B., Van Nhieu, G.T., van der Goot, F.G., Sansonetti, P.J., and Lafont, F. (2009). *Shigella* Phagocytic Vacuolar Membrane Remnants Participate in the Cellular Response to Pathogen Invasion and Are Regulated by Autophagy. *Cell Host Microbe* 6, 137–149.

Duszenko, M., Ginger, M.L., Brennand, A., Gualdrón-López, M., Colombo, M.I., Coombs, G.H., Coppens, I., Jayabalasingham, B., Langsley, G., Lisboa de Castro, S., *et al.* (2011). Autophagy in protists. *Autophagy* 7, 127–158.

de Duve, C., and Wattiaux, R. (1966). Functions of Lysosomes. *Annu. Rev. Physiol.* 28, 435–492.

E

Ensminger, A.W., and Isberg, R.R. (2010). E3 Ubiquitin Ligase Activity and Targeting of BAT3 by Multiple *Legionella pneumophila* Translocated Substrates. *Infect. Immun.* 78, 3905–3919.

F

Farbrother, P., Wagner, C., Na, J., Tunggal, B., Morio, T., Urushihara, H., Tanaka, Y., Schleicher, M., Steinert, M., and Eichinger, L. (2006). Dictyostelium transcriptional host cell response upon infection with *Legionella*. *Cell. Microbiol.* 8, 438–456.

Fass, E., Shvets, E., Degani, I., Hirschberg, K., and Elazar, Z. (2006). Microtubules Support Production of Starvation-induced Autophagosomes but Not Their Targeting and Fusion with Lysosomes. *J. Biol. Chem.* 281, 36303–36316.

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. *J. Bacteriol.* 187, 7716–7726.

de Felipe, K.S., Glover, R.T., Charpentier, X., Anderson, O.R., Reyes, M., Pericone, C.D., and Shuman, H.A. (2008). *Legionella* Eukaryotic-Like Type IV Substrates Interfere with Organelle Trafficking. *PLoS Pathog.* 4.

Finsel, I., Ragaz, C., Hoffmann, C., Harrison, C.F., Weber, S., van Rahden, V.A., Johannes, L., and Hilbi, H. (2013). The *Legionella* Effector RidL Inhibits Retrograde Trafficking to Promote Intracellular Replication. *Cell Host Microbe* 14, 38–50.

Flannagan, R.S., Cosío, G., and Grinstein, S. (2009). Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 355–366.

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*. *Appl. Environ. Microbiol.* 41, 9–16.

Folly-Klan, M., Alix, E., Stalder, D., Ray, P., Duarte, L.V., Delprato, A., Zeghouf, M., Antonny, B., Campanacci, V., Roy, C.R., *et al.* (2013). A Novel Membrane Sensor Controls the Localization and ArfGEF Activity of Bacterial RalF. *PLoS Pathog.* 9.

Fontana, M.F., Banga, S., Barry, K.C., Shen, X., Tan, Y., Luo, Z.-Q., and Vance, R.E. (2011). Secreted Bacterial Effectors That Inhibit Host Protein Synthesis Are Critical for Induction of the Innate Immune Response to Virulent *Legionella pneumophila*. *PLoS Pathog.* 7.

Francis, C.L., Ryan, T.A., Jones, B.D., Smith, S.J., and Falkow, S. (1993). Ruffles induced by *Salmonella* and other stimuli direct macropinocytosis of bacteria. *Nature* 364, 639–642.

- Franco, I.S., Shohdy, N., and Shuman, H.A. (2012). The *Legionella pneumophila* Effector VipA Is an Actin Nucleator That Alters Host Cell Organelle Trafficking. *PLoS Pathog* 8.
- 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.
- Fredlund, J., and Enninga, J. (2014). Cytoplasmic access by intracellular bacterial pathogens. *Trends Microbiol.* 22, 128–137.
- Fuche, F., Vianney, A., Andrea, C., Doublet, P., and Gilbert, C. (2015). Functional Type 1 Secretion System Involved in *Legionella pneumophila* Virulence. *J. Bacteriol.* 197, 563–571.
- Fürste, J.P., Pansegrau, W., Frank, R., Blöcker, H., Scholz, P., Bagdasarian, M., and Lanka, E. (1986). Molecular cloning of the plasmid RP4 primase region in a multi-host-range tacP expression vector. *Gene* 48, 119–131.
- Fuse, E.T., Tateda, K., Kikuchi, Y., Matsumoto, T., Gondaira, F., Azuma, A., Kudoh, S., Standiford, T.J., and Yamaguchi, K. (2007). Role of Toll-like receptor 2 in recognition of *Legionella pneumophila* in a murine pneumonia model. *J. Med. Microbiol.* 56, 305–312.
- G**
- Gallagher, L.E., Williamson, L.E., and Chan, E.Y.W. (2016). Advances in Autophagy Regulatory Mechanisms. *Cells* 5, 24.
- Garduno, R.A., Chong, A., Nasrallah, G.K., and Allan, D.S. (2011). The *Legionella pneumophila* chaperonin – an unusual multifunctional protein in unusual locations. *Cell. Infect. Microbiol. - Closed Sect.* 2, 122.
- Gaspar, A.H., and Machner, M.P. (2014). VipD is a Rab5-activated phospholipase A1 that protects *Legionella pneumophila* from endosomal fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 4560–4565.
- Ge, J., Xu, H., Li, T., Zhou, Y., Zhang, Z., Li, S., Liu, L., and Shao, F. (2009). A *Legionella* type IV effector activates the NF- κ B pathway by phosphorylating the I κ B family of inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 13725–13730.
- Geukens, N., De Buck, E., Meyen, E., Maes, L., Vranckx, L., Van Mellaert, L., Anné, J., and Lammertyn, E. (2006). The type II signal peptidase of *Legionella pneumophila*. *Res. Microbiol.* 157, 836–841.
- Ginevra, C., Forey, F., Campese, C., Che, D., Etienne, J., and Jarraud, S. (2008). Lorraine Strain of *Legionella pneumophila* Serogroup 1, France. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 673–675.
- Girard, R., Pedron, T., Uematsu, S., Balloy, V., Chignard, M., Akira, S., and Chaby, R. (2003). Lipopolysaccharides from *Legionella* and *Rhizobium* stimulate mouse bone marrow granulocytes via Toll-like receptor 2. *J. Cell Sci.* 116, 293–302.
- Glick, D., Barth, S., and Macleod, K.F. (2010). Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J. Pathol.* 221, 3–12.
- 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.
- Glöckner, G., Albert-Weissenberger, C., Weinmann, E., Jacobi, S., Schunder, E., Steinert, M., Hacker, J., and Heuner, K. (2008). Identification and characterization of a new conjugation/type IVA secretion system (trb/tra) of *Legionella pneumophila* Corby localized on two mobile genomic islands. *Int. J. Med. Microbiol.* 298, 411–428.
- Godi, A., Pertile, P., Meyers, R., Marra, P., Di Tullio, G., Iurisci, C., Luini, A., Corda, D., and De Matteis, M.A. (1999). ARF mediates recruitment of PtdIns-4-OH kinase- β and stimulates synthesis of PtdIns(4,5)P₂ on the Golgi complex. *Nat. Cell Biol.* 1, 280–287.
- Gomez-Valero, L., and Buchrieser, C. (2013). Genome Dynamics in *Legionella*: The Basis of Versatility and Adaptation to Intracellular Replication. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 3.
- Gomez-Valero, L., Rusniok, C., Jarraud, S., Vacherie, B., Rouy, Z., Barbe, V., Medigue, C., Etienne, J., and Buchrieser, C. (2011a). Extensive recombination events and horizontal gene transfer shaped the *Legionella pneumophila* genomes. *BMC Genomics* 12, 1.
- Gomez-Valero, L., Rusniok, C., Cazalet, C., and Buchrieser, C. (2011b). Comparative and Functional Genomics of *Legionella* Identified Eukaryotic Like Proteins as Key Players in Host-Pathogen Interactions. *Front. Microbiol.* 2.
- Goody, P.R., Heller, K., Oesterlin, L.K., Müller, M.P., Itzen, A., and Goody, R.S. (2012). Reversible phosphocholination of Rab proteins by *Legionella pneumophila* effector proteins: Rab phosphocholination and dephosphocholination. *EMBO J.* 31, 1774–1784.

Graham, F.F., White, P.S., Harte, D.J.G., and Kingham, S.P. (2012). Changing epidemiological trends of legionellosis in New Zealand, 1979–2009. *Epidemiol. Infect.* **140**, 1481–1496.

Grenier, A.M., Nardon, C., and Nardon, P. (1994). The role of symbiotes in flight activity of *Sitophilus weevils*. *Entomol. Exp. Appl.* **70**, 201–208.

Grigor'ev, A.A., Bondarev, V.P., Borisevich, I.V., Darmov, I.V., Mironin, A.V., Zolotarev, A.G., Pogorel'skiĭ, I.P., and Ianov, D.S. (2008). [Temperate *Legionella* bacteriophage: discovery and characteristics]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 86–88.

Gronemeyer, T., Wiese, S., Grinhagens, S., Schollenberger, L., Satyagraha, A., Huber, L.A., Meyer, H.E., Warscheid, B., and Just, W.W. (2013). Localization of Rab proteins to peroxisomes: a proteomics and immunofluorescence study. *FEBS Lett.* **587**, 328–338.

Guo, Z., Stephenson, R., Qiu, J., Zheng, S., and Luo, Z.-Q. (2014). A *Legionella* effector modulates host cytoskeletal structure by inhibiting actin polymerization. *Microbes Infect. Inst. Pasteur* **16**, 225–236.

Gutierrez, M.G., Vázquez, C.L., Munafó, D.B., Zoppino, F.C.M., Berón, W., Rabinovitch, M., and Colombo, M.I. (2005). Autophagy induction favours the generation and maturation of the *Coxiella*-replicative vacuoles: Autophagy promotes *Coxiella* replication. *Cell. Microbiol.* **7**, 981–993.

H

Habyarimana, F., Al-khodori, S., Kalia, A., Graham, J.E., Price, C.T., Garcia, M.T., and Kwaik, Y.A. (2008). Role for the Ankyrin eukaryotic-like genes of *Legionella pneumophila* in parasitism of protozoan hosts and human macrophages: Ankyrin genes of *L. pneumophila*. *Environ. Microbiol.* **10**, 1460–1474.

Habyarimana, F., Price, C.T., Santic, M., Al-Khodori, S., and Kwaik, Y.A. (2010). Molecular characterization of the Dot/Icm-translocated AnkH and AnkJ eukaryotic-like effectors of *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* **78**, 1123–1134.

Hägele, S., Köhler, R., Merkert, H., Schleicher, M., Hacker, J., and Steinert, M. (2000). *Dictyostelium discoideum*: a new host model system for intracellular pathogens of the genus *Legionella*. *Cell. Microbiol.* **2**, 165–171.

Hailey, D.W., Rambold, A.S., Satpute-Krishnan, P., Mitra, K., Sougrat, R., Kim, P.K., and Lippincott-Schwartz, J. (2010).

Mitochondria Supply Membranes for Autophagosome Biogenesis during Starvation. *Cell* **141**, 656–667.

Hales, L.M., and Shuman, H.A. (1999). *Legionella pneumophila* contains a type II general secretion pathway required for growth in amoebae as well as for secretion of the Msp protease. *Infect. Immun.* **67**, 3662–3666.

Hamer, I., Goffin, E., De Bolle, X., Letesson, J.-J., and Jadot, M. (2014). Replication of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* in fibroblasts does not require ATG5-dependent macroautophagy. *BMC Microbiol.* **14**, 223.

Haobam, B., Nozawa, T., Minowa-Nozawa, A., Tanaka, M., Oda, S., Watanabe, T., Aikawa, C., Maruyama, F., and Nakagawa, I. (2014). Rab17-mediated recycling endosomes contribute to autophagosome formation in response to Group A *Streptococcus* invasion: Role of recycling endosomes in GcAV formation. *Cell. Microbiol.* **16**, 1806–1821.

Hara, T., Takamura, A., Kishi, C., Iemura, S. -i., Natsume, T., Guan, J.-L., and Mizushima, N. (2008). FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells. *J. Cell Biol.* **181**, 497–510.

Hardiman, C.A., and Roy, C.R. (2014). AMPylation Is Critical for Rab1 Localization to Vacuoles Containing *Legionella pneumophila*. *mBio* **5**.

Harding, C.R., Mattheis, C., Mousnier, A., Oates, C.V., Hartland, E.L., Frankel, G., and Schroeder, G.N. (2013). LtpD Is a Novel *Legionella pneumophila* Effector That Binds Phosphatidylinositol 3-Phosphate and Inositol Monophosphatase IMPA1. *Infect. Immun.* **81**, 4261–4270.

Hayashi, T., Miyake, M., Fukui, T., Sugaya, N., Daimon, T., Itoh, S., Oku, T., Tsuji, T., Toyoshima, S., and Imai, Y. (2008). Exclusion of actin-binding protein p57/coronin-1 from bacteria-containing phagosomes in macrophages infected with *Legionella*. *Biol. Pharm. Bull.* **31**, 861–865.

Hébert, G.A., Callaway, C.S., and Ewing, E.P. (1984). Comparison of *Legionella pneumophila*, *L. micdadei*, *L. bozemanii*, and *L. dumoffii* by transmission electron microscopy. *J. Clin. Microbiol.* **19**, 116–121.

Heidtmann, M., Chen, E.J., Moy, M.-Y., and Isberg, R.R. (2009). Large-scale identification of *Legionella pneumophila* Dot/Icm substrates that modulate host cell vesicle trafficking pathways. *Cell. Microbiol.* **11**, 230–248.

Heitman, J., Movva, N.R., and Hall, M.N. (1991). Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* **253**, 905–909.

- Heller, R., Höller, C., Sübmuth, R., and Gundermann, K. (1998). Effect of salt concentration and temperature on survival of *Legionella pneumophila*. *Lett. Appl. Microbiol.* 26, 64–68.
- Henderson, B. (2010). Integrating the cell stress response: a new view of molecular chaperones as immunological and physiological homeostatic regulators. *Cell Biochem. Funct.* 28, 1–14.
- Hervet, E., Charpentier, X., Vianney, A., Lazzaroni, J.-C., Gilbert, C., Atlan, D., and Doublet, P. (2011). Protein kinase LegK2 is a type IV secretion system effector involved in endoplasmic reticulum recruitment and intracellular replication of *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* 79, 1936–1950.
- Hilbi, H., Segal, G., and Shuman, H.A. (2001). Icm/Dot-dependent upregulation of phagocytosis by *Legionella pneumophila*. *Mol. Microbiol.* 42, 603–617.
- Hilbi, H., Rothmeier, E., Hoffmann, C., and Harrison, C.F. (2014). Beyond Rab GTPases *Legionella* activates the small GTPase Ran to promote microtubule polymerization, pathogen vacuole motility, and infection. *Small GTPases* 5, 1–6.
- Hoffmann, C., Finsel, I., Otto, A., Pfaffinger, G., Rothmeier, E., Hecker, M., Becher, D., and Hilbi, H. (2014). Functional analysis of novel Rab GTPases identified in the proteome of purified *Legionella*-containing vacuoles from macrophages. *Cell. Microbiol.* 16, 1034–1052.
- Horenkamp, F.A., Mukherjee, S., Alix, E., Schauder, C.M., Hubber, A.M., Roy, C.R., and Reinisch, K.M. (2014). *Legionella pneumophila* Subversion of Host Vesicular Transport by SidC Effector Proteins. *Traffic* 15, 488–499.
- Horenkamp, F.A., Kauffman, K.J., Kohler, L.J., Sherwood, R.K., Krueger, K.P., Shteyn, V., Roy, C.R., Melia, T.J., and Reinisch, K.M. (2015). The *Legionella* Anti-autophagy Effector RavZ Targets the Autophagosome via PI3P- and Curvature-Sensing Motifs. *Dev. Cell* 34, 569–576.
- Horwitz, M.A. (1983a). Formation of a novel phagosome by the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) in human monocytes. *J. Exp. Med.* 158, 1319–1331.
- Horwitz, M.A. (1983b). The Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes. *J. Exp. Med.* 158, 2108–2126.
- 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.
- Horwitz, M.A., and Silverstein, S.C. (1980). Legionnaires' Disease Bacterium (*Legionella pneumophila*) Multiplies Intracellularly in Human Monocytes. *J. Clin. Invest.* 66, 441–450.
- Hou, X., Hagemann, N., Schoebel, S., Blankenfeldt, W., Goody, R.S., Erdmann, K.S., and Itzen, A. (2011). A structural basis for Lowe syndrome caused by mutations in the Rab-binding domain of OCRL1. *EMBO J.* 30, 1659–1670.
- Hsu, F., Zhu, W., Brennan, L., Tao, L., Luo, Z.-Q., and Mao, Y. (2012). Structural basis for substrate recognition by a unique *Legionella* phosphoinositide phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 13567–13572.
- Hsu, F., Luo, X., Qiu, J., Teng, Y.-B., Jin, J., Smolka, M.B., Luo, Z.-Q., and Mao, Y. (2014). The *Legionella* effector SidC defines a unique family of ubiquitin ligases important for bacterial phagosomal remodeling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 10538–10543.
- Huang, J., Canadien, V., Lam, G.Y., Steinberg, B.E., Dinaiuer, M.C., Magalhaes, M.A.O., Glogauer, M., Grinstein, S., and Brumell, J.H. (2009). Activation of antibacterial autophagy by NADPH oxidases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 6226–6231.
- Huang, L., Boyd, D., Amyot, W.M., Hempstead, A.D., Luo, Z.-Q., O'Connor, T.J., Chen, C., Machner, M., Montminy, T., and Isberg, R.R. (2011). The E Block motif is associated with *Legionella pneumophila* translocated substrates. *Cell. Microbiol.* 13, 227–245.
- Hubber, A., Arasaki, K., Nakatsu, F., Hardiman, C., Lambright, D., Camilli, P.D., Nagai, H., and Roy, C.R. (2014). The Machinery at Endoplasmic Reticulum-Plasma Membrane Contact Sites Contributes to Spatial Regulation of Multiple *Legionella* Effector Proteins. *PloS Pathog* 10.
- Hutagalung, A.H., and Novick, P.J. (2011). Role of Rab GTPases in Membrane Traffic and Cell Physiology. *Physiol. Rev.* 91, 119–149.
- Ingmundson, A., Delprato, A., Lambright, D.G., and Roy, C.R. (2007). *Legionella pneumophila* proteins that regulate Rab1 membrane cycling. *Nature* 450, 365–369.
- Itakura, E., Kishi-Itakura, C., and Mizushima, N. (2012). The Hairpin-type Tail-Anchored

SNARE Syntaxin 17 Targets to Autophagosomes for Fusion with Endosomes/Lysosomes. *Cell* 151, 1256–1269.

Itoh, T., Fujita, N., Kanno, E., Yamamoto, A., Yoshimori, T., and Fukuda, M. (2008). Golgi-resident small GTPase Rab33B interacts with ATG16L and modulates autophagosome formation. *Mol. Biol. Cell* 19, 2916–2925.

Itoh, T., Kanno, E., Uemura, T., Waguri, S., and Fukuda, M. (2011). OATL1, a novel autophagosome-resident Rab33B-GAP, regulates autophagosomal maturation. *J. Cell Biol.* 192, 839–853.

J

Jacobi, S., and Heuner, K. (2003). Description of a putative type I secretion system in *Legionella pneumophila*. *Int. J. Med. Microbiol.* 293, 349–358.

Janeway, C.A.J., Travers, P., Walport, M., and *et al* (2001). *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. In Immunobiology, (Garland Science).

Jank, T., Böhmer, K.E., Tzivelekidis, T., Schwan, C., Belyi, Y., and Aktories, K. (2012). Domain organization of *Legionella* effector SetA. *Cell. Microbiol.* 14, 852–868.

Jeong, K.C., Sexton, J.A., and Vogel, J.P. (2015). Spatiotemporal Regulation of a *Legionella pneumophila* T4SS Substrate by the Metaeffector SidJ. *PLoS Pathog* 11, e1004695.

Jiang, P., Nishimura, T., Sakamaki, Y., Itakura, E., Hatta, T., Natsume, T., and Mizushima, N. (2014). The HOPS complex mediates autophagosome–lysosome fusion through interaction with syntaxin 17. *Mol. Biol. Cell* 25, 1327–1337.

Johansson, M., Rocha, N., Zwart, W., Jordens, I., Janssen, L., Kuijl, C., Olkkonen, V.M., and Neefjes, J. (2007). Activation of endosomal dynein motors by stepwise assembly of Rab7-RILP-p150Glued, ORP1L, and the receptor III spectrin. *J. Cell Biol.* 176, 459–471.

Jung, C.H., Jun, C.B., Ro, S.-H., Kim, Y.-M., Otto, N.M., Cao, J., Kundu, M., and Kim, D.-H. (2009). ULK-ATG13-FIP200 Complexes Mediate mTOR Signaling to the Autophagy Machinery. *Mol. Biol. Cell* 20, 1992–2003.

K

Kageyama, S., Omori, H., Saitoh, T., Sone, T., Guan, J.-L., Akira, S., Imamoto, F., Noda, T., and Yoshimori, T. (2011). The LC3 recruitment mechanism is separate from ATG9L1-dependent membrane formation in the

autophagic response against *Salmonella*. *Mol. Biol. Cell* 22, 2290–2300.

Kaufmann, S.H.E., and Dorhoi, A. (2016). Molecular Determinants in Phagocyte-Bacteria Interactions. *Immunity* 44, 476–491.

Ke, Y., Wang, Y., Li, W., and Chen, Z. (2015). Type IV secretion system of *Brucella* spp. and its effectors. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 5.

Kessler, A., Schell, U., Sahr, T., Tiaden, A., Harrison, C., Buchrieser, C., and Hilbi, H. (2013). The *Legionella pneumophila* orphan sensor kinase LqsT regulates competence and pathogen-host interactions as a component of the LAI-1 circuit. *Environ. Microbiol.* 15, 646–662.

de Keyzer, J., van der Does, C., and Driessen, A.J.M. (2003). The bacterial translocase: a dynamic protein channel complex. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 60, 2034–2052.

Khweek, A.A., Caution, K., Akhter, A., Abdulrahman, B.A., Tazi, M., Hassan, H., Majumdar, N., Doran, A., Guirado, E., Schlesinger, L.S., *et al.* (2013). A bacterial protein promotes the recognition of the *Legionella pneumophila* vacuole by autophagy. *Eur. J. Immunol.* 43, 1333–1344.

Khweek, A.A., Kanneganti, A., Guttridge D, D.C., and Amer, A.O. (2016). The Sphingosine-1-Phosphate Lyase (LegS2) Contributes to the Restriction of *Legionella pneumophila* in Murine Macrophages. *PLoS ONE* 11.

Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., and Guan, K.-L. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat. Cell Biol.* 13, 132–141.

Kim, M., Ashida, H., Ogawa, M., Yoshikawa, Y., Mimuro, H., and Sasakawa, C. (2010). Bacterial Interactions with the Host Epithelium. *Cell Host Microbe* 8, 20–35.

Kimura, S., Noda, T., and Yoshimori, T. (2008). Dynein-dependent Movement of Autophagosomes Mediates Efficient Encounters with Lysosomes.

King, N.P., Newton, P., Schuelein, R., Brown, D.L., Petru, M., Zarsky, V., Dolezal, P., Luo, L., Bugarcic, A., Stanley, A.C., *et al.* (2015). Soluble NSF attachment protein receptor molecular mimicry by a *Legionella pneumophila* Dot/Icm effector. *Cell. Microbiol.* 17, 767–784.

Kirkin, V., Lamark, T., Sou, Y.-S., Bjørkøy, G., Nunn, J.L., Bruun, J.-A., Shvets, E., McEwan, D.G., Clausen, T.H., Wild, P., *et al.* (2009). A Role for NBR1 in Autophagosomal Degradation of Ubiquitinated Substrates. *Mol. Cell* 33, 505–516.

- Klionsky, D.J. (2008). Autophagy revisited: A conversation with Christian de Duve. *Autophagy* 4, 740–743.
- Knævelsrud, H., Carlsson, S.R., and Simonsen, A. (2013). SNX18 tubulates recycling endosomes for autophagosome biogenesis. *Autophagy* 9, 1639–1641.
- Knodler, L.A. (2015). *Salmonella* enterica: living a double life in epithelial cells. *Curr. Opin. Microbiol.* 23, 23–31.
- Kotecha, N., Krutzik, P.O., and Irish, J.M. (2010). Web-Based Analysis and Publication of Flow Cytometry Experiments. In *Current Protocols in Cytometry*, J.P. Robinson, Z. Darzynkiewicz, J. Dobrucki, W.C. Hyun, J.P. Nolan, A. Orfao, and P.S. Rabinovitch, eds. (Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.).
- Kreibich, S., Emmenlauer, M., Fredlund, J., Rämö, P., Münz, C., Dehio, C., Enninga, J., and Hardt, W.-D. (2015). Autophagy Proteins Promote Repair of Endosomal Membranes Damaged by the *Salmonella* Type Three Secretion System 1. *Cell Host Microbe* 18, 527–537.
- Krinos, C., High, A.S., and Rodgers, F.G. (1999). Role of the 25 kDa major outer membrane protein of *Legionella pneumophila* in attachment to U-937 cells and its potential as a virulence factor for chick embryos. *J. Appl. Microbiol.* 86, 237–244.
- Ku, B., Lee, K.-H., Park, W.S., Yang, C.-S., Ge, J., Lee, S.-G., Cha, S.-S., Shao, F., Heo, W.D., Jung, J.U., et al. (2012). VipD of *Legionella pneumophila* targets activated Rab5 and Rab22 to interfere with endosomal trafficking in macrophages. *PLoS Pathog.* 8.
- Kubori, T., and Nagai, H. (2016). The Type IVB secretion system: an enigmatic chimera. *Curr. Opin. Microbiol.* 29, 22–29.
- Kubori, T., Hyakutake, A., and Nagai, H. (2008). *Legionella* translocates an E3 ubiquitin ligase that has multiple U-boxes with distinct functions. *Mol. Microbiol.* 67, 1307–1319.
- Kubori, T., Shinzawa, N., Kanuka, H., and Nagai, H. (2010). *Legionella* Metaeffector Exploits Host Proteasome to Temporally Regulate Cognate Effector. *PLoS Pathog.* 6.
- L**
- Laguna, R.K., Creasey, E.A., Li, Z., Valtz, N., and Isberg, R.R. (2006). A *Legionella pneumophila*-translocated substrate that is required for growth within macrophages and protection from host cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 18745–18750.
- Lazar, I., Friedmann, Y., and Gottlieb, Y. (2014). Tissue tropism and vertical transmission of *Coxiella* in *Rhipicephalus sanguineus* and *Rhipicephalus turanicus* ticks. *Environ. Microbiol.* 16, 3657–3668.
- Lam, G.Y., Cemma, M., Muise, A.M., Higgins, D.E., and Brumell, J.H. (2013). Host and bacterial factors that regulate LC3 recruitment to *Listeria monocytogenes* during the early stages of macrophage infection. *Autophagy* 9, 985–995.
- Lammertyn, E., and Anné, J. (2004). Protein secretion in *Legionella pneumophila* and its relation to virulence. *FEMS Microbiol. Lett.* 238, 273–279.
- Lammertyn, E., Voorde, J.V., Meyen, E., Maes, L., Mast, J., and Anné, J. (2007). Evidence for the Presence of *Legionella* Bacteriophages in Environmental Water Samples. *Microb. Ecol.* 56, 191–197.
- Landry, J.J., Pyl, P.T., Rausch, T., Zichner, T., Tekkedil, M.M., Stütz, A.M., Jauch, A., Aiyar, R.S., Pau, G., Delhomme, N., et al. (2013). The genomic and transcriptomic landscape of a HeLa cell line. *G3 Genes Genomes Genet.* 3, 1213–1224.
- LaRock, D.L., Chaudhary, A., and Miller, S.I. (2015). *Salmonellae* interactions with host processes. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 191–205.
- 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.
- Lawrence, C., Reyrolle, M., Dubrou, S., Forey, F., Decludt, B., Goulvestre, C., Matsiota-Bernard, P., Etienne, J., and Nauciel, C. (1999). Single clonal origin of a high proportion of *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from patients and the environment in the area of Paris, France, over a 10-year period. *J. Clin. Microbiol.* 37, 2652–2655.
- Lee, H.K., Lund, J.M., Ramanathan, B., Mizushima, N., and Iwasaki, A. (2007). Autophagy-dependent viral recognition by plasmacytoid dendritic cells. *Science* 315, 1398–1401.
- Lettinga, K.D., Florquin, S., Speelman, P., van Ketel, R., van der Poll, T., and Verbon, A. (2002). Toll-like receptor 4 is not involved in host defense against pulmonary *Legionella pneumophila* infection in a mouse model. *J. Infect. Dis.* 186, 570–573.
- Levine, B. (2005). Eating Oneself and Uninvited Guests. *Cell* 120, 159–162.
- Li, L., Kim, E., Yuan, H., Inoki, K., Goraksha-Hicks, P., Schiesher, R.L., Neufeld, T.P., and Guan, K.-L. (2010). Regulation of mTORC1 by the Rab and Arf GTPases. *J. Biol. Chem.* 285, 19705–19709.

- Li, T., Lu, Q., Wang, G., Xu, H., Huang, H., Cai, T., Kan, B., Ge, J., and Shao, F. (2013). SET-domain bacterial effectors target heterochromatin protein 1 to activate host rDNA transcription. *EMBO Rep.* **14**, 733–740.
- Liang, C., Lee, J., Inn, K.-S., Gack, M.U., Li, Q., Roberts, E.A., Vergne, I., Deretic, V., Feng, P., Akazawa, C., *et al.* (2008). BECLIN1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking. *Nat. Cell Biol.* **10**, 776–787.
- Liang, X.H., Jackson, S., Seaman, M., Brown, K., Kempkes, B., Hibshoosh, H., and Levine, B. (1999). Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* **402**, 672–676.
- Lifshitz, Z., Burstein, D., Peeri, M., Zusman, T., Schwartz, K., Shuman, H.A., Pupko, T., and Segal, G. (2013). Computational modeling and experimental validation of the *Legionella* and *Coxiella* virulence-related type-IVB secretion signal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 707–715.
- Liles, M.R., Viswanathan, V.K., and Cianciotto, N.P. (1998). Identification and temperature regulation of *Legionella pneumophila* genes involved in type IV pilus biogenesis and type II protein secretion. *Infect. Immun.* **66**, 1776–1782.
- Liles, M.R., Edelstein, P.H., and Cianciotto, N.P. (1999). The prepilin peptidase is required for protein secretion by and the virulence of the intracellular pathogen *Legionella pneumophila*. *Mol. Microbiol.* **31**, 959–970.
- Lim, J.P., and Gleeson, P.A. (2011). Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps. *Immunol. Cell Biol.* **89**, 836–843.
- Lin, Y.-H., Doms, A.G., Cheng, E., Kim, B., Evans, T.R., and Machner, M.P. (2015). Host Cell-catalyzed S-Palmitoylation Mediates Golgi Targeting of the *Legionella* Ubiquitin Ligase GbX. *J. Biol. Chem.* **290**, 25766–25781.
- Liu, Y., and Luo, Z.-Q. (2007). The *Legionella pneumophila* Effector SidJ Is Required for Efficient Recruitment of Endoplasmic Reticulum Proteins to the Bacterial Phagosome. *Infect. Immun.* **75**, 592–603.
- Lomma, M., Dervins-Ravault, D., Rolando, M., Nora, T., Newton, H.J., Sansom, F.M., Sahr, T., Gomez-Valero, L., Jules, M., Hartland, E.L., *et al.* (2010). The *Legionella pneumophila* F-box protein Lpp2082 (AnkB) modulates ubiquitination of the host protein parvin B and promotes intracellular replication: *L. pneumophila* modulates ParvB. *Cell. Microbiol.* **12**, 1272–1291.
- Longatti, A., and Tooze, S.A. (2009). Vesicular trafficking and autophagosome formation. *Cell Death Differ.* **16**, 956–965.
- Longatti, A., Lamb, C.A., Razi, M., Yoshimura, S.-i., Barr, F.A., and Tooze, S.A. (2012). TBC1D14 regulates autophagosome formation via Rab11- and ULK1-positive recycling endosomes. *J. Cell Biol.* **197**, 659–675.
- Losick, V.P., and Isberg, R.R. (2006). NF- κ B translocation prevents host cell death after low-dose challenge by *Legionella pneumophila*. *J. Exp. Med.* **203**, 2177–2189.
- Losick, V.P., Haenssler, E., Moy, M.-Y., and Isberg, R.R. (2010). LnaB: a *Legionella pneumophila* activator of NF- κ B. *Cell. Microbiol.* **12**, 1083–1097.
- Lu, S.-L., Kuo, C.-F., Chen, H.-W., Yang, Y.-S., Liu, C.-C., Anderson, R., Wu, J.-J., and Lin, Y.-S. (2015). Insufficient Acidification of Autophagosomes Facilitates Group A *Streptococcus* Survival and Growth in Endothelial Cells. *mBio* **6**.
- Lü, W., Du, J., Stahl, M., Tzivelekidis, T., Belyi, Y., Gerhardt, S., Aktories, K., and Einsle, O. (2010). Structural Basis of the Action of Glucosyltransferase Lgt1 from *Legionella pneumophila*. *J. Mol. Biol.* **396**, 321–331.
- Lucas, M., Gaspar, A.H., Pallara, C., Rojas, A.L., Fernández-Recio, J., Machner, M.P., and Hierro, A. (2014). Structural basis for the recruitment and activation of the *Legionella* phospholipase VipD by the host GTPase Rab5. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 3514–3523.
- Lück, C., Fry, N.K., Helbig, J.H., Jarraud, S., and Harrison, T.G. (2013). Typing Methods for *Legionella*. In *Legionella*, C. Buchrieser, and H. Hilbi, eds. (Totowa, NJ: Humana Press), 119–148.
- Luo, Z.-Q., and Isberg, R.R. (2004). Multiple substrates of the *Legionella pneumophila* Dot/Icm system identified by interbacterial protein transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 841–846.
- 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*. *Int. J. Med. Microbiol.* **300**, 470–481.
- M**
- Machner, M.P., and Isberg, R.R. (2006). Targeting of Host Rab GTPase Function by the Intravacuolar Pathogen *Legionella pneumophila*. *Dev. Cell* **11**, 47–56.
- Machner, M.P., and Isberg, R.R. (2007). A Bifunctional Bacterial Protein Links GDI

- Displacement to Rab1 Activation. *Science* 318, 974–977.
- Massip, C. *et al.* Role of two genes of putative efflux pump in *Legionella pneumophila* resistance to macrolides. En préparation.
- Matsuda, F., Fujii, J., and Yoshida, S. (2009). Autophagy induced by 2-deoxy-D-glucose suppresses intracellular multiplication of *Legionella pneumophila* in A/J mouse macrophages. *Autophagy* 5, 484–493.
- Maturana, P., Graham, J.G., Sharma, U.M., and Voth, D.E. (2013). Refining the plasmid-encoded type IV secretion system substrate repertoire of *Coxiella burnetii*. *J. Bacteriol.* 195, 3269–3276.
- Maurin, M., and Raoult, D. (1999). Q Fever. *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 518–553.
- Mauvezin, C., Nagy, P., Juhász, G., and Neufeld, T.P. (2015). Autophagosome-lysosome fusion is independent of V-ATPase-mediated acidification. *Nat. Commun.* 6.
- 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.
- Mercer, C.A., Kaliappan, A., and Dennis, P.B. (2009). A novel, human ATG13 binding protein, ATG101, interacts with ULK1 and is essential for macroautophagy. *Autophagy* 5, 649–662.
- Meyer-Morse, N., Robbins, J.R., Rae, C.S., Mohegova, S.N., Swanson, M.S., Zhao, Z., Virgin, H.W., and Portnoy, D. (2010). Listeriolysin O Is Necessary and Sufficient to Induce Autophagy during *Listeria monocytogenes* Infection. *PLoS ONE* 5.
- Michard, C., Sperandio, D., Baïlo, N., Pizarro-Cerdá, J., LeClaire, L., Chadeau-Argaud, E., Pombo-Grégoire, I., Hervet, E., Vianney, A., Gilbert, C., *et al.* (2015). The *Legionella* Kinase LegK2 Targets the ARP2/3 Complex To Inhibit Actin Nucleation on Phagosomes and Allow Bacterial Evasion of the Late Endocytic Pathway. *mBio* 6.
- Mihai Gazdag, E., Streller, A., Haneburger, I., Hilbi, H., Vetter, I.R., Goody, R.S., and Itzen, A. (2013). Mechanism of Rab1b deactivation by the *Legionella pneumophila* GAP LepB. *EMBO Rep.* 14, 199–205.
- Mintz, C.S., Arnold, P.I., Johnson, W., and Schultz, D.R. (1995). Antibody-independent binding of complement component C1q by *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* 63, 4939–4943.
- Mizushima, N., Yamamoto, A., Hatano, M., Kobayashi, Y., Kabeya, Y., Suzuki, K., Tokuhisa, T., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2001). Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J. Cell Biol.* 152, 657–668.
- Mody, C.H., Paine, R., Shahrabadi, M.S., Simon, R.H., Pearlman, E., Eisenstein, B.I., and Toews, G.B. (1993). *Legionella pneumophila* replicates within rat alveolar epithelial cells. *J. Infect. Dis.* 167, 1138–1145.
- Moffatt, J.H., Newton, P., and Newton, H.J. (2015). *Coxiella burnetii*: turning hostility into a home. *Cell. Microbiol.* 17, 621–631.
- Molejon, M.I., Ropolo, A., Re, A.L., Boggio, V., and Vaccaro, M.I. (2013). The VMP1-BECLIN 1 interaction regulates autophagy induction. *Sci. Rep.* 3.
- Molmeret, M., and Kwaik, Y.A. (2002). How does *Legionella pneumophila* exit the host cell? *Trends Microbiol.* 10, 258–260.
- Molmeret, M., Alli, O.A.T., Zink, S., Flieger, A., Cianciotto, N.P., and Kwaik, Y.A. (2002). IcmT Is Essential for Pore Formation-Mediated Egress of *Legionella pneumophila* from Mammalian and Protozoan Cells. *Infect. Immun.* 70, 69–78.
- Molmeret, M., Zink, S.D., Han, L., Abu-Zant, A., Asari, R., Bitar, D.M., and Abu Kwaik, Y. (2004). Activation of caspase-3 by the Dot/Icm virulence system is essential for arrested biogenesis of the *Legionella* -containing phagosome. *Cell. Microbiol.* 6, 33–48.
- Molmeret, M., Jones, S., Santic, M., Habyarimana, F., Garcia Esteban, M.T., and Abu Kwaik, Y. (2010). Temporal and spatial trigger of post-exponential virulence-associated regulatory cascades by *Legionella pneumophila* after bacterial escape into the host cell cytosol. *Environ. Microbiol.* 12, 704–715.
- Molofsky, A.B. (2006). Cytosolic recognition of flagellin by mouse macrophages restricts *Legionella pneumophila* infection. *J. Exp. Med.* 203, 1093–1104.
- Morales, V.M., Bäckman, A., and Bagdasarian, M. (1991). A series of wide-host-range low-copy-number vectors that allow direct screening for recombinants. *Gene* 97, 39–47.
- Moreau, K., Ravikumar, B., Puri, C., and Rubinsztein, D.C. (2012). Arf6 promotes autophagosome formation via effects on phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and phospholipase D. *J. Cell Biol.* 196, 483–496.
- Mostowy, S., Bonazzi, M., Hamon, M.A., Tham, T.N., Mallet, A., Lelek, M., Gouin, E., Demangel, C., Brosch, R., Zimmer, C., *et al.*

(2010). Entrapment of Intracytosolic Bacteria by Septin Cage-like Structures. *Cell Host Microbe* 8, 433–444.

Mostowy, S., Sancho-Shimizu, V., Hamon, M.A., Simeone, R., Brosch, R., Johansen, T., and Cossart, P. (2011). p62 and NDP52 Proteins Target Intracytosolic *Shigella* and *Listeria* to Different Autophagy Pathways. *J. Biol. Chem.* 286, 26987–26995.

Mousnier, A., Schroeder, G.N., Stoneham, C.A., So, E.C., Garnett, J.A., Yu, L., Matthews, S.J., Choudhary, J.S., Hartland, E.L., and Frankel, G. (2014). A new method to determine in vivo interactomes reveals binding of the *Legionella pneumophila* effector PieE to multiple rab GTPases. *mBio* 5.

Mukherjee, S., Liu, X., Arasaki, K., McDonough, J., Galán, J.E., and Roy, C.R. (2011). Modulation of Rab GTPase function by a protein phosphocholine transferase. *Nature* 477, 103–106.

Müller, M.P., Peters, H., Blümer, J., Blankenfeldt, W., Goody, R.S., and Itzen, A. (2010). The *Legionella* Effector Protein DrrA AMPylates the Membrane Traffic Regulator Rab1b. *Science* 329, 946–949.

Murata, T., Delprato, A., Ingmundson, A., Toomre, D.K., Lambright, D.G., and Roy, C.R. (2006). The *Legionella pneumophila* effector protein DrrA is a Rab1 guanine nucleotide-exchange factor. *Nat. Cell Biol.* 8, 971–977.

N

Nagai, H., Kagan, J.C., Zhu, X., Kahn, R.A., and Roy, C.R. (2002). A Bacterial Guanine Nucleotide Exchange Factor Activates ARF on *Legionella* Phagosomes. *Science* 295, 679–682.

Nagai, H., Cambronne, E.D., Kagan, J.C., Amor, J.C., Kahn, R.A., and Roy, C.R. (2005). A C-terminal translocation signal required for Dot/Icm-dependent delivery of the *Legionella* RalF protein to host cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 826–831.

Nakagawa, I., Amano, A., Mizushima, N., Yamamoto, A., Yamaguchi, H., Kamimoto, T., Nara, A., Funao, J., Nakata, M., Tsuda, K., *et al.* (2004). Autophagy defends cells against invading group A *Streptococcus*. *Science* 306, 1037–1040.

Nasrallah, G.K. (2015). A yeast two-hybrid screen reveals a strong interaction between the *Legionella* chaperonin Hsp60 and the host cell small heat shock protein Hsp10. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 62, 121–135.

Neunuebel, M.R., Chen, Y., Gaspar, A.H., Backlund, P.S., Yergey, A., and Machner, M.P.

(2011). De-AMPylation of the Small GTPase Rab1 by the Pathogen *Legionella pneumophila*. *Science* 333, 453–456.

Neunuebel, M.R., Mohammadi, S., Jarnik, M., and Machner, M.P. (2012). *Legionella pneumophila* LidA Affects Nucleotide Binding and Activity of the Host GTPase Rab1. *J. Bacteriol.* 194, 1389–1400.

Newton, H.J., Sansom, F.M., Dao, J., McAlister, A.D., Sloan, J., Cianciotto, N.P., and Hartland, E.L. (2007). Sel1 Repeat Protein LpnE Is a *Legionella pneumophila* Virulence Determinant That Influences Vacuolar Trafficking. *Infect. Immun.* 75, 5575–5585.

Newton, H.J., Sansom, F.M., Dao, J., Cazalet, C., Bruggemann, H., Albert-Weissenberger, C., Buchrieser, C., Cianciotto, N.P., and Hartland, E.L. (2008). Significant Role for IadC in Initiation of *Legionella pneumophila* Infection. *Infect. Immun.* 76, 3075–3085.

Newton, H.J., Kohler, L.J., McDonough, J.A., Temoche-Diaz, M., Crabill, E., Hartland, E.L., and Roy, C.R. (2014). A Screen of *Coxiella burnetii* Mutants Reveals Important Roles for Dot/Icm Effectors and Host Autophagy in Vacuole Biogenesis. *PLoS Pathog.* 10.

Nguyen, T.M.N., Ilef, D., Jarraud, S., Rouil, L., Campese, C., Che, D., Haeghebaert, S., Ganiayre, F., Marcel, F., Etienne, J., *et al.* (2006). A community-wide outbreak of legionnaires disease linked to industrial cooling towers—how far can contaminated aerosols spread? *J. Infect. Dis.* 193, 102–111.

Ninio, S., Celli, J., and Roy, C.R. (2009). A *Legionella pneumophila* Effector Protein Encoded in a Region of Genomic Plasticity Binds to Dot/Icm-Modified Vacuoles. *PLoS Pathog.* 5.

Nozawa, T., Aikawa, C., Goda, A., Maruyama, F., Hamada, S., and Nakagawa, I. (2012). The small GTPases Rab9A and Rab23 function at distinct steps in autophagy during Group A *Streptococcus* infection: Role of Rab9A and Rab23 in autophagy of GAS. *Cell. Microbiol.* 14, 1149–1165.

O

O'Brien, K.M., Lindsay, E.L., and Starai, V.J. (2015). The *Legionella pneumophila* Effector Protein, LegC7, Alters Yeast Endosomal Trafficking. *PLoS ONE* 10.

O'Connor, T.J., Adepoju, Y., Boyd, D., and Isberg, R.R. (2011). Minimization of the *Legionella pneumophila* genome reveals chromosomal regions involved in host range expansion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 14733–14740.

- Oesterlin, L.K., Goody, R.S., and Itzen, A. (2012). Posttranslational modifications of Rab proteins cause effective displacement of GDP dissociation inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 5621–5626.
- Ogawa, M., Yoshimori, T., Suzuki, T., Sagara, H., Mizushima, N., and Sasakawa, C. (2005). Escape of Intracellular *Shigella* from Autophagy. *Science* 307, 727–731.
- Ogawa, M., Yoshikawa, Y., Kobayashi, T., Mimuro, H., Fukumatsu, M., Kiga, K., Piao, Z., Ashida, H., Yoshida, M., Kakuta, S., *et al.* (2011). A Tecpr1-Dependent Selective Autophagy Pathway Targets Bacterial Pathogens. *Cell Host Microbe* 9, 376–389.
- Orsi, A., Razi, M., Dooley, H.C., Robinson, D., Weston, A.E., Collinson, L.M., and Tooze, S.A. (2012). Dynamic and transient interactions of ATG9 with autophagosomes, but not membrane integration, are required for autophagy. *Mol. Biol. Cell* 23, 1860–1873.
- Orvedahl, A., and Levine, B. (2009). Eating the enemy within: autophagy in infectious diseases. *Cell Death Differ.* 16, 57–69.
- O'Seaghdha, M., and Wessels, M.R. (2013). Streptolysin O and its Co-Toxin NAD-glycohydrolase Protect Group A *Streptococcus* from Xenophagic Killing. *PLoS Pathog.* 9.
- Otomo, C., Metlagel, Z., Takaesu, G., and Otomo, T. (2013). Structure of the human ATG12–ATG5 conjugate required for LC3 lipidation in autophagy. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 59–66.
- Otto, G.P., Wu, M.Y., Kazgan, N., Anderson, O.R., and Kessin, R.H. (2003a). Macroautophagy Is Required for Multicellular Development of the Social Amoeba *Dictyostelium discoideum*. *J. Biol. Chem.* 278, 17636–17645.
- Otto, G.P., Wu, M.Y., Clarke, M., Lu, H., Anderson, O.R., Hilbi, H., Shuman, H.A., and Kessin, R.H. (2003b). Macroautophagy is dispensable for intracellular replication of *Legionella pneumophila* in *Dictyostelium discoideum*: Macroautophagy is dispensable for *Legionella* replication. *Mol. Microbiol.* 51, 63–72.
- Pan, X., Lührmann, A., Satoh, A., Laskowski-Arce, M.A., and Roy, C.R. (2008a). Ankyrin Repeat Proteins Comprise a Diverse Family of Bacterial Type IV Effectors. *Science* 320, 1651–1654.
- Pan, X., Luhrmann, A., Satoh, A., Laskowski-Arce, M.A., and Roy, C.R. (2008b). Ankyrin Repeat Proteins Comprise a Diverse Family of Bacterial Type IV Effectors. *Science* 320, 1651–1654.
- Pankiv, S., Clausen, T.H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J.-A., Outzen, H., Øvervatn, A., Bjørkøy, G., and Johansen, T. (2007). p62/SQSTM1 Binds Directly to ATG8/LC3 to Facilitate Degradation of Ubiquitinated Protein Aggregates by Autophagy. *J. Biol. Chem.* 282, 24131–24145.
- Pankiv, S., Alemu, E.A., Brech, A., Bruun, J.-A., Lamark, T., Overvatn, A., Bjorkoy, G., and Johansen, T. (2010). FYCO1 is a Rab7 effector that binds to LC3 and PI3P to mediate microtubule plus end-directed vesicle transport. *J. Cell Biol.* 188, 253–269.
- Payne, N.R., and Horwitz, M.A. (1987). Phagocytosis of *Legionella pneumophila* is mediated by human monocyte complement receptors. *J. Exp. Med.* 166, 1377–1389.
- Peracino, B., Balest, A., and Bozzaro, S. (2010). Phosphoinositides differentially regulate bacterial uptake and Nramp1-induced resistance to *Legionella* infection in *Dictyostelium*. *J. Cell Sci.* 123, 4039–4051.
- Pereira, M.S.F., Morgantetti, G.F., Massis, L.M., Horta, C.V., Hori, J.I., and Zamboni, D.S. (2011). Activation of NLRC4 by flagellated bacteria triggers caspase-1-dependent and -independent responses to restrict *Legionella pneumophila* replication in macrophages and in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 187, 6447–6455.
- Phin, N., Parry-Ford, F., Harrison, T., Stagg, H.R., Zhang, N., Kumar, K., Lortholary, O., Zumla, A., and Abubakar, I. (2014). Epidemiology and clinical management of Legionnaires' disease. *Lancet Infect. Dis.* 14, 1011–1021.
- Pizarro-Cerdá, J., Moreno, E., Sanguedolce, V., Mege, J.-L., and Gorvel, J.-P. (1998). Virulent *Brucella abortus* Prevents Lysosome Fusion and Is Distributed within Autophagosome-Like Compartments. *Infect. Immun.* 66, 2387–2392.
- Pollack, J., Harris, S., and Marten, M. (2009). Autophagy in filamentous fungi. *Fungal Genet. Biol.* 46, 1–8.
- Price, C.T.D., and Kwaik, Y.A. (2013). One bacterial effector with two distinct catalytic

P

Palmer, C.J., Tsai, Y.L., Paszko-Kolva, C., Mayer, C., and Sangermano, L.R. (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.

activities by different strains. *EMBO Rep.* 14, 753–754.

Price, C.T., Al-Khodori, S., Al-Quadan, T., Santic, M., Habyarimana, F., Kalia, A., and Kwaik, Y.A. (2009). Molecular Mimicry by an F-Box Effector of *Legionella pneumophila* Hijacks a Conserved Polyubiquitination Machinery within Macrophages and Protozoa. *PLoS Pathog* 5.

Price, C.T.D., Al-Quadan, T., Santic, M., Jones, S.C., and Abu Kwaik, Y. (2010). Exploitation of conserved eukaryotic host cell farnesylation machinery by an F-box effector of *Legionella pneumophila*. *J. Exp. Med.* 207, 1713–1726.

Proikas-Cezanne, T., Ruckerbauer, S., Stierhof, Y.-D., Berg, C., and Nordheim, A. (2007). Human WIPI-1 puncta-formation: A novel assay to assess mammalian autophagy. *FEBS Lett.* 581, 3396–3404.

Pugsley, H.R. (2016). Quantifying autophagy: Measuring LC3 puncta and autolysosome formation in cells using multispectral imaging flow cytometry. *Methods San Diego Calif.*

Py, B.F., Lipinski, M.M., and Yuan, J. (2007). Autophagy Limits *Listeria monocytogenes* Intracellular Growth in the Early Phase of Primary Infection. *Autophagy* 3, 117–125.

Q

Qin, Q.-M., Pei, J., Ancona, V., Shaw, B.D., Ficht, T.A., and Figueiredo, P. de (2008). RNAi Screen of Endoplasmic Reticulum-Associated Host Factors Reveals a Role for IRE1 α in Supporting Brucella Replication. *PLoS Pathog* 4.

Qin, T., Zhang, W., Liu, W., Zhou, H., Ren, H., Shao, Z., Lan, R., and Xu, J. (2016). Population structure and minimum core genome typing of *Legionella pneumophila*. *Sci. Rep.* 6.

Qiu, J., Sheedlo, M.J., Yu, K., Tan, Y., Nakayasu, E.S., Das, C., Liu, X., and Luo, Z.-Q. (2016). Ubiquitination independent of E1 and E2 enzymes by bacterial effectors. *Nature* 533, 120–124.

Quaile, A.T., Urbanus, M.L., Stogios, P.J., Nocek, B., Skarina, T., Ensminger, A.W., and Savchenko, A. (2015). Molecular Characterization of LubX: Functional Divergence of the U-Box Fold by *Legionella pneumophila*. *Structure* 23, 1459–1469.

R

Ragaz, C., Pietsch, H., Urwyler, S., Tiaden, A., Weber, S.S., and Hilbi, H. (2008). The

Legionella pneumophila phosphatidylinositol-4 phosphate-binding type IV substrate SidC recruits endoplasmic reticulum vesicles to a replication-permissive vacuole. *Cell. Microbiol.* 10, 2416–2433.

Rao, C., Benhabib, H., and Ensminger, A.W. (2013). Phylogenetic Reconstruction of the *Legionella pneumophila* Philadelphia-1 Laboratory Strains through Comparative Genomics. *PLoS ONE* 8.

Raper, K.B. (1935). *Dictyostelium discoideum*, a new species of slime mold from decaying forest leaves. *J. Agr. Res* 50, 135–147.

Raper, K.B. (1937). Growth and development of *Dictyostelium discoideum* with different bacterial associates. *J. Agric. Research* 55, 289–316.

Ravikumar, B., Moreau, K., Jahreiss, L., Puri, C., and Rubinshtein, D.C. (2010). Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nat. Cell Biol.* 12, 747–757.

Rechnitzer, C., and Blom, J. (1989). Engulfment of the Philadelphia strain of *Legionella pneumophila* within pseudopod coils in human phagocytes. *APMIS* 97, 105–114.

Rechnitzer, C., Williams, A., Wright, J.B., Dowsett, A.B., Milman, N., and Fitzgeorge, R.B. (1992). Demonstration of the intracellular production of tissue-destructive protease by *Legionella pneumophila* multiplying within guinea-pig and human alveolar macrophages. *Microbiology* 138, 1671–1677.

Reeves, M.W., Pine, L., Hutner, S.H., George, J.R., and Harrell, W.K. (1981). Metal requirements of *Legionella pneumophila*. *J. Clin. Microbiol.* 13, 688–695.

Reggiori, F., and Klionsky, D.J. (2013). Autophagic Processes in Yeast: Mechanism, Machinery and Regulation. *Genetics* 194, 341–361.

Ren, T., Zamboni, D.S., Roy, C.R., Dietrich, W.F., and Vance, R.E. (2006). Flagellin-deficient *Legionella* mutants evade caspase-1- and Naip5-mediated macrophage immunity. *PLoS Pathog*.

Retzlaff, C., Yamamoto, Y., Okubo, S., Hoffman, P.S., Friedman, H., and Klein, T.W. (1996). *Legionella pneumophila* heat-shock protein-induced increase of interleukin-1 β mRNA involves protein kinase C signalling in macrophages. *Immunology* 89, 281–288.

Ribet, D., and Cossart, P. (2015). How bacterial pathogens colonize their hosts and invade deeper tissues. *Microbes Infect.* 17, 173–183.

- Rikihisa, Y. (1984). Glycogen autophagosomes in polymorphonuclear leukocytes induced by rickettsiae. *Anat. Rec.* 208, 319–327.
- 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.
- Rogov, V., Dötsch, V., Johansen, T., and Kirkin, V. (2014). Interactions between autophagy receptors and ubiquitin-like proteins form the molecular basis for selective autophagy. *Mol. Cell* 53, 167–178.
- Rohde, M., and Cleary, P.P. (2016). Adhesion and invasion of *Streptococcus pyogenes* into host cells and clinical relevance of intracellular streptococci.
- Rolando, M., Sanulli, S., Rusniok, C., Gomez-Valero, L., Bertholet, C., Sahr, T., Margueron, R., and Buchrieser, C. (2013). *Legionella pneumophila* Effector RomA Uniquely Modifies Host Chromatin to Repress Gene Expression and Promote Intracellular Bacterial Replication. *Cell Host Microbe* 13, 395–405.
- 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.*
- Romano, P.S., Gutierrez, M.G., Berón, W., Rabinovitch, M., and Colombo, M.I. (2007). The autophagic pathway is actively modulated by phase II *Coxiella burnetii* to efficiently replicate in the host cell. *Cell. Microbiol.* 9, 891–909.
- Rossier, O., and Cianciotto, N.P. (2001). Type II protein secretion is a subset of the PilD-dependent processes that facilitate intracellular infection by *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* 69, 2092–2098.
- Rossier, O., and Cianciotto, N.P. (2005). The *Legionella pneumophila* tatB gene facilitates secretion of phospholipase C, growth under iron-limiting conditions, and intracellular infection. *Infect. Immun.* 73, 2020–2032.
- Rossier, O., Starkenburg, S.R., and Cianciotto, N.P. (2004). *Legionella pneumophila* type II protein secretion promotes virulence in the A/J mouse model of Legionnaires' disease pneumonia. *Infect. Immun.* 72, 310–321.
- Rothmeier, E., Pfaffinger, G., Hoffmann, C., Harrison, C.F., Grabmayr, H., Repnik, U., Hannemann, M., Wölke, S., Bausch, A., Griffiths, G., et al. (2013). Activation of Ran GTPase by a *Legionella* effector promotes microtubule polymerization, pathogen vacuole motility and infection. *PLoS Pathog.* 9.
- Rowbotham, T.J. (1980). Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J. Clin. Pathol.* 33, 1179–1183.
- Roy, C.R., and Isberg, R.R. (1997). Topology of *Legionella pneumophila* DotA: an inner membrane protein required for replication in macrophages. *Infect. Immun.* 65, 571–578.
- Russell, R.C., Tian, Y., Yuan, H., Park, H.W., Chang, Y.-Y., Kim, J., Kim, H., Neufeld, T.P., Dillin, A., and Guan, K.-L. (2013). ULK1 induces autophagy by phosphorylating BECLIN-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nat. Cell Biol.* 15, 741–750.
- Rusten, T.E., and Stenmark, H. (2009). How do ESCRT proteins control autophagy? *J. Cell Sci.* 122, 2179–2183.
- S**
- Sakurai, A., Maruyama, F., Funao, J., Nozawa, T., Aikawa, C., Okahashi, N., Shintani, S., Hamada, S., Ooshima, T., and Nakagawa, I. (2010). Specific Behavior of Intracellular *Streptococcus pyogenes* That Has Undergone Autophagic Degradation Is Associated with Bacterial Streptolysin O and Host Small G Proteins Rab5 and Rab7. *J. Biol. Chem.* 285, 22666–22675.
- Sancak, Y., Bar-Peled, L., Zoncu, R., Markhard, A.L., Nada, S., and Sabatini, D.M. (2010). Ragulator-Rag Complex Targets mTORC1 to the Lysosomal Surface and Is Necessary for Its Activation by Amino Acids. *Cell* 141, 290–303.
- van Schaik, E.J., Chen, C., Mertens, K., Weber, M.M., and Samuel, J.E. (2013). Molecular pathogenesis of the obligate intracellular bacterium *Coxiella burnetii*. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 561–573.
- Schmid, D., Pypaert, M., and Münz, C. (2007). Antigen-Loading Compartments for Major Histocompatibility Complex Class II Molecules Continuously Receive Input from Autophagosomes. *Immunity* 26, 79–92.
- Schoebel, S., Oesterlin, L.K., Blankenfeldt, W., Goody, R.S., and Itzen, A. (2009). RabGDI Displacement by DrrA from *Legionella* Is a Consequence of Its Guanine Nucleotide Exchange Activity. *Mol. Cell* 36, 1060–1072.
- Schoebel, S., Blankenfeldt, W., Goody, R.S., and Itzen, A. (2010). High-affinity binding of phosphatidylinositol 4-phosphate by *Legionella pneumophila* DrrA. *EMBO Rep.* 11, 598–604.
- Schoebel, S., Cichy, A.L., Goody, R.S., and Itzen, A. (2011). Protein LidA from *Legionella* is a Rab GTPase supereffector. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 17945–17950.

- 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. *J. Bacteriol.* 192, 6001–6016.
- Schroeder, G.N., Aurass, P., Oates, C.V., Tate, E.W., Hartland, E.L., Flieger, A., and Frankel, G. (2015). *Legionella pneumophila* Effector LpdA Is a Palmitoylated Phospholipase D Virulence Factor. *Infect. Immun.* 83, 3989–4002.
- Segal, G., and Shuman, H.A. (1997). Characterization of a new region required for macrophage killing by *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* 65, 5057–5066.
- Segal, G., Purcell, M., and Shuman, H.A. (1998). Host cell killing and bacterial conjugation require overlapping sets of genes within a 22-kb region of the *Legionella pneumophila* genome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 1669–1674.
- Segal, G., Russo, J.J., and Shuman, H.A. (1999). Relationships between a new type IV secretion system and the icm/dot virulence system of *Legionella pneumophila*. *Mol. Microbiol.* 34, 799–809.
- Sexton, J.A., and Vogel, J.P. (2002). Type IVB secretion by intracellular pathogens. *Traffic* 3, 178–185.
- Shahnazari, S., Yen, W.-L., Birmingham, C.L., Shiu, J., Namolovan, A., Zheng, Y.T., Nakayama, K., Klionsky, D.J., and Brumell, J.H. (2010). A Diacylglycerol-Dependent Signaling Pathway Contributes to Regulation of Antibacterial Autophagy. *Cell Host Microbe* 8, 137–146.
- Sheedlo, M.J., Qiu, J., Tan, Y., Paul, L.N., Luo, Z.-Q., and Das, C. (2015). Structural basis of substrate recognition by a bacterial deubiquitinase important for dynamics of phagosome ubiquitination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 15090–15095.
- Shen, X., Banga, S., Liu, Y., Xu, L., Gao, P., Shamovsky, I., Nudler, E., and Luo, Z.-Q. (2009). Targeting eEF1A by a *Legionella pneumophila* effector leads to inhibition of protein synthesis and induction of host stress response. *Cell. Microbiol.* 11, 911–926.
- Shim, H.K., Kim, J.Y., Kim, M.J., Sim, H.S., Park, D.W., Sohn, J.W., and Kim, M.J. (2009). *Legionella* lipoprotein activates toll-like receptor 2 and induces cytokine production and expression of costimulatory molecules in peritoneal macrophages. *Exp. Mol. Med.* 41, 687–694.
- Shohdy, N., Efe, J.A., Emr, S.D., and Shuman, H.A. (2005). Pathogen effector protein screening in yeast identifies *Legionella* factors that interfere with membrane trafficking. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 4866–4871.
- Shvets, E., Fass, E., and Elazar, Z. (2008). Utilizing flow cytometry to monitor autophagy in living mammalian cells. *Autophagy* 4, 621–628.
- So, E.C., Schroeder, G.N., Carson, D., Mattheis, C., Mousnier, A., Broncel, M., Tate, E.W., and Frankel, G. (2016). The Rab-binding Profiles of Bacterial Virulence Factors during Infection. *J. Biol. Chem.* 291, 5832–5843.
- Sohn, Y.-S., Shin, H.-C., Park, W.S., Ge, J., Kim, C.-H., Lee, B.L., Heo, W.D., Jung, J.U., Rigden, D.J., and Oh, B.-H. (2015). Lpg0393 of *Legionella pneumophila* is a guanine-nucleotide exchange factor for Rab5, Rab21 and Rab22. *PloS One* 10.
- Solomon, J.M., Rupper, A., Cardelli, J.A., and Isberg, R.R. (2000). Intracellular growth of *Legionella pneumophila* in *Dictyostelium discoideum*, a system for genetic analysis of host-pathogen interactions. *Infect. Immun.* 68, 2939–2947.
- Son, J., Jo, C.H., Murugan, R.N., Bang, J.K., Hwang, K.Y., and Lee, W.C. (2015). Crystal structure of *Legionella pneumophila* type IV secretion system effector LegAS4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 465, 817–824.
- Sorbara, M.T., Ellison, L.K., Ramjeet, M., Travassos, L.H., Jones, N.L., Girardin, S.E., and Philpott, D.J. (2013). The Protein ATG16L1 Suppresses Inflammatory Cytokines Induced by the Intracellular Sensors Nod1 and Nod2 in an Autophagy-Independent Manner. *Immunity* 39, 858–873.
- Starr, T., Child, R., Wehrly, T.D., Hansen, B., Hwang, S., López-Otin, C., Virgin, H.W., and Celli, J. (2012). Selective Subversion of Autophagy Complexes Facilitates Completion of the Brucella Intracellular Cycle. *Cell Host Microbe* 11, 33–45.
- Steinert, M., Heuner, K., Buchrieser, C., Albert-Weissenberger, C., and Glöckner, G. (2007). *Legionella* pathogenicity: Genome structure, regulatory networks and the host cell response. *Int. J. Med. Microbiol.* 297, 577–587.
- Stone, B.J., and Kwai, Y.A. (1998). Expression of multiple pili by *Legionella pneumophila*: identification and characterization of a type IV pilin gene and its role in adherence to mammalian and protozoan cells. *Infect. Immun.* 66, 1768–1775.
- Stone, B.J., and Kwai, Y.A. (1999). Natural Competence for DNA Transformation by *Legionella pneumophila* and Its Association

with Expression of Type IV Pili. *J. Bacteriol.* **181**, 1395–1402.

Sturgill-Koszycki, S., and Swanson, M.S. (2000). *Legionella pneumophila* replication vacuoles mature into acidic, endocytic organelles. *J. Exp. Med.* **192**, 1261–1272.

Sun, Q., Westphal, W., Wong, K.N., Tan, I., and Zhong, Q. (2010). Rubicon controls endosome maturation as a Rab7 effector. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 19338–19343.

Sutherland, M.C., Nguyen, T.L., Tseng, V., and Vogel, J.P. (2012). The *Legionella* IcmSW complex directly interacts with DotL to mediate translocation of adaptor-dependent substrates. *PLoS Pathog.* **8**.

Swanson, M.S., and Isberg, R.R. (1995). Association of *Legionella pneumophila* with the macrophage endoplasmic reticulum. *Infect. Immun.* **63**, 3609–3620.

Swanson, M.S., Fernandez-Moreira, E., and Fernandez-Moreira, E. (2002). A microbial strategy to multiply in macrophages: the pregnant pause. *Traffic Cph. Den.* **3**, 170–177.

T

Takahashi, Y., Coppola, D., Matsushita, N., Cualing, H.D., Sun, M., Sato, Y., Liang, C., Jung, J.U., Cheng, J.Q., Mul, J.J., *et al.* (2007). Bif-1 interacts with BECLIN 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nat. Cell Biol.* **9**, 1142–1151.

Tan, Y., and Luo, Z.-Q. (2011). *Legionella pneumophila* SidD is a deAMPyase that modifies Rab1. *Nature* **475**, 506–509.

Tan, Y., Arnold, R.J., and Luo, Z.-Q. (2011). *Legionella pneumophila* regulates the small GTPase Rab1 activity by reversible phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 21212–21217.

Tattoli, I., Sorbara, M.T., Vuckovic, D., Ling, A., Soares, F., Carneiro, L.A.M., Yang, C., Emili, A., Philpott, D.J., and Girardin, S.E. (2012a). Amino Acid Starvation Induced by Invasive Bacterial Pathogens Triggers an Innate Host Defense Program. *Cell Host Microbe* **11**, 563–575.

Tattoli, I., Philpott, D.J., and Girardin, S.E. (2012b). The bacterial and cellular determinants controlling the recruitment of mTOR to the *Salmonella*-containing vacuole. *Biol. Open* **1**, 1215–1225.

Tattoli, I., Sorbara, M.T., Yang, C., Tooze, S.A., Philpott, D.J., and Girardin, S.E. (2013). *Listeria* phospholipases subvert host autophagic defenses by stalling pre-autophagosomal structures. *EMBO J* **32**, 3066–3078.

Thomas, P., and Smart, T.G. (2005). HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **51**, 187–200.

Thomason, B.M., Chandler, F.W., and Hollis, D.G. (1979). Flagella on Legionnaires' disease bacteria: an interim report. *Ann. Intern. Med.* **91**, 224–226.

Thurston, T.L.M., Ryzhakov, G., Bloor, S., von Muhlinen, N., and Randow, F. (2009). The TBK1 adaptor and autophagy receptor NDP52 restricts the proliferation of ubiquitin-coated bacteria. *Nat. Immunol.* **10**, 1215–1221.

Thurston, T.L.M., Wandel, M.P., von Muhlinen, N., Foeglein, A., and Randow, F. (2012). Galectin 8 targets damaged vesicles for autophagy to defend cells against bacterial invasion. *Nature* **482**, 414–418.

Tiaden, A., Spirig, T., Weber, S.S., Brüggemann, H., Bosshard, R., Buchrieser, C., and Hilbi, H. (2007). The *Legionella pneumophila* response regulator LqsR promotes host cell interactions as an element of the virulence regulatory network controlled by RpoS and LetA. *Cell. Microbiol.* **9**, 2903–2920.

Tilney, L.G., and Portnoy, D.A. (1989). Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *J. Cell Biol.* **109**, 1597–1608.

Toulabi, L., Wu, X., Cheng, Y., and Mao, Y. (2013). Identification and Structural Characterization of a *Legionella* Phosphoinositide Phosphatase. *J. Biol. Chem.* **288**, 24518–24527.

Travassos, L.H., Carneiro, L.A.M., Ramjeet, M., Hussey, S., Kim, Y.-G., Magalhães, J.G., Yuan, L., Soares, F., Chea, E., Le Bourhis, L., *et al.* (2010). Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nat. Immunol.* **11**, 55–62.

Treacy-Abarca, S., and Mukherjee, S. (2015). *Legionella* suppresses the host unfolded protein response via multiple mechanisms. *Nat. Commun.* **6**.

Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., and Tada, K. (1980). Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer* **26**, 171–176.

Tung, S.M., Ünal, C., Ley, A., Peña, C., Tunggal, B., Noegel, A.A., Krut, O., Steinert, M., and Eichinger, L. (2010). Loss of Dictyostelium ATG9 results in a pleiotropic phenotype affecting growth, development, phagocytosis and clearance and replication of

Legionella pneumophila: Autophagy in growth, development, phagocytosis and infection. *Cell. Microbiol.* 12, 765–780.

U

Urwylter, S., Nyfeler, Y., Ragaz, C., Lee, H., Mueller, L.N., Aebersold, R., and Hilbi, H. (2009). Proteome Analysis of *Legionella* Vacuoles Purified by Magnetic Immunoseparation Reveals Secretory and Endosomal GTPases. *Traffic* 10, 76–87.

V

Valencia-Gallardo, C.M., Carayol, N., and Tran Van Nhieu, G. (2015). Cytoskeletal mechanics during *S. higella* invasion and dissemination in epithelial cells: Actin mechanics and *S. higella*. *Cell. Microbiol.* 17, 174–182.

Vandersmissen, L., De Buck, E., Saels, V., Coil, D.A., and Anné, J. (2010). A *Legionella pneumophila* collagen-like protein encoded by a gene with a variable number of tandem repeats is involved in the adherence and invasion of host cells. *FEMS Microbiol. Lett.* 306, 168–176.

Vazquez, C.L., and Colombo, M.I. (2010). *Coxiella burnetii* modulates BECLIN 1 and BCL-2, preventing host cell apoptosis to generate a persistent bacterial infection. *Cell Death Differ.* 17, 421–438.

Velikkakath, A.K.G., Nishimura, T., Oita, E., Ishihara, N., and Mizushima, N. (2012). Mammalian ATG2 proteins are essential for autophagosome formation and important for regulation of size and distribution of lipid droplets. *Mol. Biol. Cell* 23, 896–909.

Viala, J.P.M., Mohegova, S.N., Meyer-Morse, N., and Portnoy, D.A. (2008). A bacterial pore-forming toxin forms aggregates in cells that resemble those associated with neurodegenerative diseases. *Cell. Microbiol.* 10, 985–993.

Vigneron, A., Masson, F., Vallier, A., Balmand, S., Rey, M., Vincent-Monégat, C., Aksoy, E., Aubailly-Giraud, E., Zaidman-Rémy, A., and Heddi, A. (2014). Insects Recycle Endosymbionts when the Benefit Is Over. *Curr. Biol.* 24, 2267–2273.

Vincent, C.D., and Vogel, J.P. (2006). The *Legionella pneumophila* lcmS-LvgA protein complex is important for Dot/Icm-dependent intracellular growth. *Mol. Microbiol.* 61, 596–613.

Viner, R., Chetrit, D., Ehrlich, M., and Segal, G. (2012). Identification of Two *Legionella*

pneumophila Effectors that Manipulate Host Phospholipids Biosynthesis. *PLoS Pathog* 8.

Vinzing, M., Eitel, J., Lippmann, J., Hocke, A.C., Zahlten, J., Slevogt, H., N'guessan, P.D., Günther, S., Schmeck, B., Hippenstiel, S., et al. (2008). NAIP and IPAF control *Legionella pneumophila* replication in human cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 180, 6808–6815.

Vogel, J.P., Andrews, H.L., Wong, S.K., and Isberg, R.R. (1998). Conjugative Transfer by the Virulence System of *Legionella pneumophila*. *Science* 279, 873–876.

Voth, D.E., Beare, P.A., Howe, D., Sharma, U.M., Samoilis, G., Cockrell, D.C., Omsland, A., and Heinzen, R.A. (2011). The *Coxiella burnetii* Cryptic Plasmid Is Enriched in Genes Encoding Type IV Secretion System Substrates. *J. Bacteriol.* 193, 1493–1503.

W

Wadowsky, R.M., Butler, L.J., Cook, M.K., Verma, S.M., Paul, M.A., Fields, B.S., Keleti, G., Sykora, J.L., and Yee, R.B. (1988). Growth-supporting activity for *Legionella pneumophila* in tap water cultures and implication of hartmannellid amoebae as growth factors. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 2677–2682.

Watarai, M., Derre, I., Kirby, J., Gowney, J.D., Dietrich, W.F., and Isberg, R.R. (2001). *Legionella pneumophila* Is Internalized by a Macropinoscytotic Uptake Pathway Controlled by the Dot/Icm System and the Mouse Lgn1 Locus. *J. Exp. Med.* 194, 1081–1096.

Webber, J.L., and Tooze, S.A. (2010). New insights into the function of ATG9. *FEBS Lett.* 584, 1319–1326.

Weber, S., Wagner, M., and Hilbi, H. (2014a). Live-Cell Imaging of Phosphoinositide Dynamics and Membrane Architecture during *Legionella* Infection. *mBio* 5.

Weber, S., Stirnimann, C.U., Wieser, M., Frey, D., Meier, R., Engelhardt, S., Li, X., Capitani, G., Kammerer, R.A., and Hilbi, H. (2014b). A type IV translocated *Legionella* cysteine phytase counteracts intracellular growth restriction by phytate. *J. Biol. Chem.* 289, 34175–34188.

Weber, S.S., Ragaz, C., Reus, K., Nyfeler, Y., and Hilbi, H. (2006). *Legionella pneumophila* Exploits PI(4)P to Anchor Secreted Effector Proteins to the Replicative Vacuole. *PLoS Pathog* 2.

Weber, S.S., Ragaz, C., and Hilbi, H. (2009). The inositol polyphosphate 5-phosphatase OCRL1 restricts intracellular growth of *Legionella*, localizes to the replicative vacuole

and binds to the bacterial effector LpnE. *Cell. Microbiol.* **11**, 442–460.

Weidberg, H., Shpilka, T., Shvets, E., Abada, A., Shimron, F., and Elazar, Z. (2011). LC3 and GATE-16 N Termini Mediate Membrane Fusion Processes Required for Autophagosome Biogenesis. *Dev. Cell* **20**, 444–454.

Wicher, C. (1983). Differential vitamin and choline requirements of symbiotic and aposymbiotic *S. oryzae* (coleoptera : curculionidae). *Comp Biochem Physiol* **76**, 177–182.

Wicker, C., and Nardon, P. (1982). Development responses of symbiotic and aposymbiotic weevils *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera, curculionidae) to a diet supplemented with aromatic amino acids. *J. Insect Physiol.* **28**, 1021–1024.

Wild, P., Farhan, H., McEwan, D.G., Wagner, S., Rogov, V.V., Brady, N.R., Richter, B., Korac, J., Waidmann, O., Choudhary, C., et al. (2011). Phosphorylation of the Autophagy Receptor Optineurin Restricts *Salmonella* Growth. *Science* **333**, 228–233.

Winchell, C.G., Graham, J.G., Kurten, R.C., and Voth, D.E. (2014). *Coxiella burnetii* Type IV Secretion-Dependent Recruitment of Macrophage Autophagosomes. *Infect. Immun.* **82**, 2229–2238.

Winn, W.C. (1988). Legionnaires disease: historical perspective. *Clin. Microbiol. Rev.* **1**, 60–81.

Winslow, A.R., Chen, C.-W., Corrochano, S., Acevedo-Arozena, A., Gordon, D.E., Peden, A.A., Lichtenberg, M., Menzies, F.M., Ravikumar, B., Imarisio, S., et al. (2010). α -Synuclein impairs macroautophagy: implications for Parkinson's disease. *J. Cell Biol.* **190**, 1023–1037.

Wright, E.K., Goodart, S.A., Growney, J.D., Hadinoto, V., Endrizzi, M.G., Long, E.M., Sadigh, K., Abney, A.L., Bernstein-Hanley, I., and Dietrich, W.F. (2003). Naip5 affects host susceptibility to the intracellular pathogen *Legionella pneumophila*. *Curr. Biol.* **13**, 27–36.

X

Xu, L., Shen, X., Bryan, A., Banga, S., Swanson, M.S., and Luo, Z.-Q. (2010). Inhibition of Host Vacuolar H⁺-ATPase Activity by a *Legionella pneumophila* Effector. *PLoS Pathog* **6**.

Xu, Z., Yang, L., Xu, S., Zhang, Z., and Cao, Y. (2015). The receptor proteins: pivotal roles in selective autophagy. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **47**, 571–580.

Yamaguchi, H., Nakagawa, I., Yamamoto, A., Amano, A., Noda, T., and Yoshimori, T. (2009). An Initial Step of GAS-Containing Autophagosome-Like Vacuoles Formation Requires Rab7. *PLoS Pathog.* **5**.

Yoshikawa, Y., Ogawa, M., Hain, T., Yoshida, M., Fukumatsu, M., Kim, M., Mimuro, H., Nakagawa, I., Yanagawa, T., Ishii, T., et al. (2009). *Listeria monocytogenes* ActA-mediated escape from autophagic recognition. *Nat. Cell Biol.* **11**, 1233–1240.

Yoshimoto, K., Takano, Y., and Sakai, Y. (2010). Autophagy in plants and phytopathogens. *FEBS Lett.* **584**, 1350–1358.

Young, A.R.J. (2006). Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian ATG9 between the TGN and endosomes. *J. Cell Sci.* **119**, 3888–3900.

Young, M.M., Kester, M., and Wang, H.-G. (2013). Sphingolipids: regulators of crosstalk between apoptosis and autophagy. *J. Lipid Res.* **54**, 5–19.

Yu, H.B., Croxen, M.A., Marchiando, A.M., Ferreira, R.B.R., Cadwell, K., Foster, L.J., and Finlay, B.B. (2014). Autophagy Facilitates *Salmonella* Replication in HeLa Cells. *mBio* **5**.

Yu, L., McPhee, C.K., Zheng, L., Mardones, G.A., Rong, Y., Peng, J., Mi, N., Zhao, Y., Liu, Z., Wan, F., et al. (2010). Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR. *Nature* **465**, 942–946.

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. *J. Infect. Dis.* **186**, 127–128.

Z

Zähringer, U., Knirel, Y., Lindner, B., Helbig, J., Sonesson, A., Marre, R., and Rietschel, E. (1995). The lipopolysaccharide of *Legionella pneumophila* serogroup 1 (strain Philadelphia 1): chemical structure and biological significance. *Prog. Clin. Biol. Res.* **392**, 113–139.

Zamboni, D.S., Kobayashi, K.S., Kohlsdorf, T., Ogura, Y., Long, E.M., Vance, R.E., Kuida, K., Mariathasan, S., Dixit, V.M., Flavell, R.A., et al. (2006). The Birc1e cytosolic pattern-recognition receptor contributes to the detection and control of *Legionella pneumophila* infection. *Nat. Immunol.* **7**, 318–325.

- Zheng, Y.T., Shahnazari, S., Brech, A., Lamark, T., Johansen, T., and Brumell, J.H. (2009). The Adaptor Protein p62/SQSTM1 Targets Invading Bacteria to the Autophagy Pathway. *J. Immunol.* **183**, 5909–5916.
- Zhong, Y., Wang, Q.J., Li, X., Yan, Y., Backer, J.M., Chait, B.T., Heintz, N., and Yue, Z. (2009). Distinct regulation of autophagic activity by ATG14L and Rubicon associated with BECLIN 1–phosphatidylinositol-3-kinase complex. *Nat. Cell Biol.* **11**, 468–476.
- Zhu, W., and Luo, Z.-Q. (2015). A new way to detect the danger: Lysosomal cell death induced by a bacterial ribosomal protein. *J. Nat. Sci.* **1**.
- Zhu, W., Banga, S., Tan, Y., Zheng, C., Stephenson, R., Gately, J., and Luo, Z.-Q. (2011a). Comprehensive identification of protein substrates of the Dot/Icm type IV transporter of *Legionella pneumophila*. *PLoS One* **6**.
- Zhu, W., Meng, G., Liu, Y., Zhang, F., and Zheng, X. (2011b). Protein expression, crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of LidA from *Legionella pneumophila*. *Acta Crystallograph. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **67**, 637–639.
- Zhu, W., Hammad, L.A., Hsu, F., Mao, Y., and Luo, Z.-Q. (2013). Induction of caspase 3 activation by multiple *Legionella pneumophila* Dot/Icm substrates. *Cell. Microbiol.* **15**, 1783–1795.
- Zhu, W., Tao, L., Quick, M.L., Joyce, J.A., Qu, J.-M., and Luo, Z.-Q. (2015). Sensing Cytosolic RpsL by Macrophages Induces Lysosomal Cell Death and Termination of Bacterial Infection. *PLoS Pathog.* **11**.
- Zhu, Y., Hu, L., Zhou, Y., Yao, Q., Liu, L., and Shao, F. (2010). Structural mechanism of host Rab1 activation by the bifunctional *Legionella* type IV effector SidM/DrrA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 4699–4704.
- Zink, S.D., Pedersen, L., Cianciotto, N.P., and Kwaik, Y.A. (2002). The Dot/Icm Type IV Secretion System of *Legionella pneumophila* Is Essential for the Induction of Apoptosis in Human Macrophages. *Infect. Immun.* **70**, 1657–1663.
- Zusman, T., Aloni, G., Halperin, E., Kotzer, H., Degtyar, E., Feldman, M., and Segal, G. (2007). The response regulator PmrA is a major regulator of the icm/dot type IV secretion system in *Legionella pneumophila* and *Coxiella burnetii*. *Mol. Microbiol.* **63**, 1508–1523.
- Zusman, T., Degtyar, E., and Segal, G. (2008). Identification of a hypervariable region containing new *Legionella pneumophila* Icm/Dot translocated substrates by using the conserved icmQ regulatory signature. *Infect. Immun.* **76**, 4581–459