



HAL
open science

Rôle des pompes à efflux de legionella pneumophila dans la résistance aux biocides et à l'hôte

Mourad Ferhat

► To cite this version:

Mourad Ferhat. Rôle des pompes à efflux de legionella pneumophila dans la résistance aux biocides et à l'hôte. Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I, 2010. Français. NNT : 2010LYO10067 . tel-00810657

HAL Id: tel-00810657

<https://theses.hal.science/tel-00810657>

Submitted on 10 Apr 2013

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

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

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD-LYON I

ECOLE DOCTORALE E2M2

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 25 avril 2002)

présentée et soutenue publiquement le

20 mai 2010

par **Mourad FERHAT**

TITRE

**ROLE DES POMPES A EFFLUX DE *LEGIONELLA PNEUMOPHILA*
DANS LA RESISTANCE AUX BIOCIDES ET A L'HOTE**

Directeur de thèse : Dr Christophe GILBERT (HDR)

JURY : Carmen BUCHRIESER, rapporteur
Yann HECHARD, rapporteur
Dominique SCHNEIDER
Gérard LINA
Christophe GILBERT

Remerciements

Madame Carmen Buchrieser et Monsieur Yann Héchard ainsi que les deux autres membres du jury Dominique Schneider et Gérard Lina : je vous remercie tous pour avoir accepté de juger ce travail ainsi que pour précieuses suggestions qui m'ont permis d'améliorer de façon sensible le présent manuscrit.

Tous mes remerciements vont également à Christophe Gilbert pour m'avoir encadré durant ces quatre années de thèse. J'ai appris beaucoup de choses en te cotoyant tant sur le plan personnel que sur le plan scientifique. Pour cela je te suis infiniment reconnaissant. Ma reconnaissance va également à Danièle Atlan qui m'a accueilli au laboratoire mais qui m'a également consacré de son temps pour m'encadrer. Tu as tout fait pour que je m'intègre au mieux dans l'équipe ce qui n'était pas facile pour moi. Je n'oublierais pas tes remarques qui, au moment où cela allait un peu moins bien pour moi ... Au fond, trouvé un second père et une seconde mère en vos deux personnes. Je n'oublierais jamais Anne Vianney. Tu a été là au début de mon projet de thèse en m'aidant et tu as notamment initié les stratégies de mutagenèse utilisées au laboratoire. Toujours partante pour développer de nouvelles techniques, ta joie et ta bonne humeur sont communicatives ... comme le sont aussi celles de Florence Hommais. Je te remercie pour ton aide et ton expertise toi qui es la spécialiste des ARN au laboratoire. Un grand merci également à Jean-claude Lazzaroni, le sage du laboratoire : j'apprécie ta hauteur de vue dans le domaine scientifique qui permet d'apprécier toute la noblesse qu'il y a à étudier le vivant. Je n'oublie pas également Patricia Doublet. Tu as apporté un vent nouveau qui a soufflé dans tout le laboratoire. Ton approche différente du problème nous a tous enrichi et a ouvert de nouvelles perspectives dans chacune de nos thématiques.

Je ne peux également oublier les trois prochaines sur la liste des futurs docteurs. Je veux en fait parler de toi Mélanie, de Eva et de Stéphanie. Je n'oublierais pas votre bonne humeur mais également les longues discussions que nous avons pu avoir : nous avons longtemps refait le monde du fond de notre bureau. Je souhaite également bonne chance à Fabien. J'espère que tu obtiendras ta bourse pour la thèse mais je ne fais pas de soucis pour cela.

Merci également à toute l'équipe technique, Claire mais aussi Marie-Jo qui a depuis pris sa retraite et qui a longtemps été une institution au laboratoire ... mais heureusement, Josy nous a depuis rejoint : j'apprécie ton aide ainsi que ta vaste culture qui me permet de discuter avec toi d'une passion commune, la littérature.

Cette liste ne serait pas complète si je ne remerciais pas également Christophe Ginevra et Maëlle molmeret qui ont été tous deux mes mentors pour l'étude de la virulence. Merci pour votre patience et votre accueil.

Enfin je remercie ma famille qui m'a apporté le soutien et l'équilibre dont j'avais besoin.

Le chapitre de ma thèse est maintenant clos. Au moment où je m'appête à débiter une autre vie je pense à tout ce que j'ai appris à vos côtés. Vous m'avez tous enrichi personnellement par vos approches et vos points de vue différents. Vous m'avez aidé dans la difficulté. Vous avez tous fait pour que je m'intègre au mieux dans le laboratoire. Pour tout cela je ne vous oublierais pas. A tous je vous dis encore merci .

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON I

Président de l'Université

Vice-président du Conseil Scientifique
Vice-président du Conseil d'Administration
Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie
Universitaire
Secrétaire Général

M. le Professeur L. COLLET

M. le Professeur J.F. MORNEX

M. le Professeur G. ANNAT

M. le Professeur D. SIMON

M. G. GAY

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est-Claude Bernard

Faculté de Médecine Lyon Sud-Charles Mérieux

UFR d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences Techniques de Réadaptation

Département de Formation et Centre de Recherche

en Biologie humaine

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Directeur : M. le Professeur F-N. GILLY

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : M. le Professeur F. LOCHER

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Directeur : M. le Professeur P. FARGE

COMPOSANTES SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques
et sportives

Observatoire de Lyon

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

Institut Universitaire de Technologie A

Institut Universitaire de Technologie B

Institut de Science financières et d'Assurance

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. le Professeur F. GIERES

Directeur : M. C. COLLIGNON

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. le Professeur J. LIETO

Directeur : M. le Professeur C. COULET

Directeur : M. le Professeur R. LAMARTINE

Directeur : M. le Professeur J-C. AUGROS

Directeur : M. R. BERNARD

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	19
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	25
I. INTRODUCTION	27
II. LES MECANISMES DE DEFENSE DE L'ORGANISME	31
1. La reconnaissance du micro-organisme	31
1.1. La reconnaissance du micro-organisme par la réponse innée	31
1.2. La reconnaissance du micro-organisme par la réponse adaptative	33
2. La conséquence de la reconnaissance du micro-organisme	37
2.1. La réponse inflammatoire	37
2.2. L'action du complément	39
2.3. La phagocytose	41
2.4. La différenciation des lymphocytes	41
2.5. L'action des anticorps	43
2.5.1. Neutralisation	43
2.5.2. Activation du complément	43
2.5.3. Activation des cellules	43
III. LES STRATEGIES DE SURVIE DES BACTERIES FACE A LA REPOSE IMMUNE DE L'HOTE	47
1. Les stratégies de survie des bactéries à multiplication extracellulaire	47
1.1. Evitement de la reconnaissance par le système immunitaire	47
1.1.1. Synthèse d'enzymes de dégradation	49
1.1.1.1. Enzymes dégradant les anticorps : les IgA1 protéases	49
1.1.1.2. Enzymes dégradant des protéines du complément	51
1.1.2. Protection par la fixation de régulateurs du complément	51
1.1.3. Structures de surface protectrices	51
1.1.3.1. La synthèse d'une capsule faiblement immunogène	51
1.1.3.2. Modification du LPS	55
1.1.4. Modification de la flagelline	57
1.2. Evitement de l'ingestion par les phagocytes : l'antiphagocytose	57
1.3. Conclusion	61
2. Les stratégies de survie des bactéries à multiplication intracellulaire	61
2.1. Invasion des cellules non-phagocytaires	61
2.2. Invasion des cellules phagocytaires	63
2.2.1. Pénétration via un récepteur au complément	63
2.2.2. Echappement du phagosome	65
2.2.3. Prévention ou inhibition de la fusion phagosome-lysosome	67
2.3. Le cas intéressant du cycle de <i>Legionella</i>	69
2.3.1. Un cycle biphasique	69
2.3.2. Les formes intracellulaires matures (MIFs) : la véritable forme infectieuse de <i>Legionella</i> dans l'environnement ?	69
2.3.3. Contrôle de la transition biphasique	71
2.3.4. Rôle d'effecteurs dans le cycle d'infection	75
2.3.4.1. Remodelage de la vacuole par action sur les protéines G	79
a. RalF, un facteur d'échange bactérien	79
b. L'effecteur LidA	85
c. L'effecteur SidM (aussi nommé DrrA)	85
d. Les effecteurs de la famille Vip	85
e. Les effecteurs de la famille Leg	89
f. L'effecteur LepB	89
2.3.4.2. Remodelage de la vacuole par ciblage du transport des vésicules microtubule-dépendant	89
2.3.4.3. Remodelage de la vacuole par recrutement du réticulum	91
2.3.4.4. Remodelage de la vacuole par le ciblage des phosphoinositides	91
a. L'effecteur LpnE	93

b. L'effecteur SidC	93
c. Les effecteurs SidM/DrrA et LidA	93
2.3.4.5. Les effecteurs ciblant le système d'ubiquitination	93
a. L'effecteur LubX	93
b. L'effecteur SetA	97
2.3.4.6. Effecteurs intervenant dans la mort de la cellule hôte	97
2.3.4.7. Les effecteurs à activité anti-apoptotique	97
a. L'effecteur SdhA	101
b. L'effecteur SidF	101
2.3.4.8. Conclusion	101
IV. LE ROLE CLEF DES COMPLEXES MULTIPROTEIQUES DE L'ENVELOPPE BACTERIENNE	103
1. Les différentes classes de systèmes de sécrétion	103
1.1. Sécrétion en deux étapes ("two partner system secretion")	103
1.1.1. Les systèmes de type II	103
1.1.1.1. La première étape : la sécrétion vers le périplasme	105
a. Système Sec	105
b. Système Tat	105
1.1.1.2. La seconde étape : l'adressage à la membrane externe	107
1.1.1.3. Les particularités du système de type II (lsp) de <i>Legionella</i>	107
1.1.2. Le système de sécrétion de type V	109
1.2. Systèmes de sécrétion en une étape	111
1.2.1. Les systèmes de type III	111
1.2.1.1. Le système de sécrétion de type III de <i>Salmonella</i>	111
1.2.1.2. Structure et organisation du système Inv/Spa	113
1.2.1.3. Organisation génétique	113
1.2.1.4. Conditions d'expression des gènes SPI1 de <i>Salmonella</i>	113
1.2.2. Les systèmes de type IV	115
1.2.2.1. Transfert d'ADN vers une autre cellule	115
1.2.2.2. Compétence ou transfert d'ADN vers le milieu extracellulaire	119
1.2.2.3. Sécrétion d'effecteurs protéiques dans la cellule hôte	119
a. Le système de sécrétion de type IV (type IVb) de <i>Legionella pneumophila</i>	119
b. Structure et organisation du système de type IV Dot/Icm de <i>Legionella</i>	121
c. Organisation des gènes <i>dot/icm</i>	123
d. Condition d'expression des gènes <i>dot/icm</i> de <i>Legionella</i>	123
1.2.3. Les systèmes de type I	123
1.2.4. Sécrétion de type VI et VII	125
1.2.4.1. Le système de sécrétion de type VI	125
1.2.4.2. Le système de sécrétion de type VII	129
2. Les systèmes d'efflux de composés toxiques, un mécanisme de résistance aux drogues	129
2.1. Mécanismes de résistance aux drogues	131
2.1.1. Diminution de perméabilité	131
2.1.2. Inactivation enzymatique	133
2.1.2.1. Inactivation par des enzymes lytiques : le cas des β -lactames	133
2.1.2.2. Inactivation par modification : le cas des aminoglycosides	133
2.1.3. Altération de la cible	133
2.1.4. L'efflux	135
2.1.4.1. Les cinq classes de systèmes d'efflux	135
a. Famille MFS	135
b. Famille MATE	139
c. Famille SMR	139
d. Famille ABC	143
e. Famille RND	147
2.1.4.2. La pompe AcrA/AcrB/TolC : l'archétype des systèmes d'efflux	147
2.1.4.3. Structure des trois composants de la pompe AcrA/AcrB/TolC	147
a. AcrB fournit l'énergie	147
b. AcrA, la protéine de fusion	149
c. TolC, une protéine de membrane externe	149
2.1.4.4. Fonctionnement de la pompe AcrA/AcrB/TolC	153
2.1.4.5. Régulation de l'expression des gènes <i>acrA</i> , <i>acrB</i> , <i>tolC</i>	155
2.1.4.6. Une coopération entre pompes à efflux	159

2.1.4.7. Les autres rôles joués par les pompes d'efflux	161
a. Pompes d'efflux et quorum sensing	161
b. Pompes d'efflux et virulence	163
V CONCLUSION	167
PARTIE RESULTATS	169
I. INVALIDATION DES GENES CODANT POUR DES POMPES A EFFLUX CHEZ <i>L. PNEUMOPHILA</i>	
LENS	171
1. Recherche bioinformatique	171
1.1. Préliminaire : origine de la recherche bioinformatique	171
1.2. Les étapes de la recherche bioinformatique	173
1.3. Résultats de la recherche bioinformatique	175
1.4. Gènes cibles retenus pour la construction de mutants chez <i>L. pneumophila</i> Lens	181
1.4.1. Résultats de l'étude bioinformatique chez la souche Lens	181
1.4.2. Gènes retenus pour l'inactivation et la construction de mutants de pompes à efflux chez <i>L. pneumophila</i> Lens	183
2. Construction des mutants chez <i>L. pneumophila</i> Lens	183
2.1. Choix des gènes à invalider	183
2.2. Stratégie d'inactivation	183
2.3. Vecteur utilisé	185
2.4. Etape préliminaire chez <i>E. coli</i>	185
2.4.1. Stratégie d'amplification et résultats	185
2.4.1.1. Stratégie	185
2.4.1.2. Résultats	185
2.4.2. Clonage des amplicons chez <i>E. coli</i>	189
2.5. Construction de mutants altérés pour des pompes à efflux potentielles chez <i>L. pneumophila</i> : étape chez <i>Legionella</i>	193
2.5.1. Mise au point d'un protocole de transformation de <i>Legionella</i>	193
2.5.2. Obtention de mutants de <i>Legionella</i> ciblés	193
2.5.3. Contrôle de la construction génétique sur les chromosomes des mutants de <i>L. pneumophila</i>	195
II. ANALYSE PHENOTYPIQUE DES MUTANTS	199
1. Test de sensibilité aux drogues	199
2. Tests de virulence	199
2.1. "Plate test"	201
2.2. Infections en plaques de culture de 24 puits	201
2.3. Conclusion	205
3. Analyse du mutant <i>tolC</i>	207
3.1. <i>Legionella pneumophila</i> code pour un homologue à TolC	207
3.2. Construction des souches pour l'étude du mutant <i>tolC</i>	207
3.3. L'inactivation du gène <i>tolC</i> n'a pas d'effet sur la croissance	211
3.4. TolC est impliqué dans la résistance aux drogues et au stress	211
3.4.1. TolC est impliqué dans la résistance aux drogues	211
3.4.1.1. Le mutant <i>tolC</i> est plus sensible aux drogues	211
3.4.1.2. La résistance aux drogues conférée par TolC passe par un mécanisme d'efflux	213
a. Principe	213
b. Mesure de l'efflux chez le mutant MF201	213
3.4.2. TolC est impliqué dans la résistance aux stress	213
3.5. TolC est essentiel à la virulence de <i>Legionella</i> chez les macrophages et les protozoaires	217
3.5.1. Observations microscopiques	217
3.5.2. Capacité de multiplication	217
3.5.2.1. Bactéries extracellulaires	217
3.5.2.2. Viabilité des cellules eucaryotes après infection	219
3.5.2.3. Bactéries intracellulaires	219
3.5.3. Capacité d'invasion	219
III. ETUDE DE L'EXPRESSION DES GENES CODANT POUR DES POMPES A EFFLUX	225
1. Intérêt de la démarche	225
2. Choix de la méthode	225
3. Choix des gènes à étudier	225
4. Dessin d'amorce	227
5. RT-qPCR	227

5.1. Extraction de l'ARN et synthèse de l'ADN complémentaire (RT)	227
5.2. PCR quantitative sur l'ADN complémentaire	231
5.2.1. Principe de la PCR quantitative	231
5.2.1.1. Format de détection des amplicons	231
5.2.1.2. Analyse	231
a. Courbe d'amplification	231
b. Courbe de fusion	231
c. Quantification	233
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	239
I. CONCLUSION	241
II PERSPECTIVES	251
FICHES TECHNIQUES	257
FICHE TECHNIQUE 1 : SOUCHES BACTERIENNES ET PLASMIDES	
FICHE TECHNIQUE 2 : MILIEUX DE CULTURE ET CONDITIONS DE CROISSANCE DES BACTERIES	
FICHE TECHNIQUE 3 : TRANSFORMATION DES BACTERIES PAR ELECTROPORATION	
FICHE TECHNIQUE 4 : TECHNIQUES DE MANIPULATION DE L'ADN	
FICHE TECHNIQUE 5 : TRANSFERT D'ADN SUR MEMBRANE DE NITROCELLULOSE-	
HYBRIDATION SPECIFIQUE A L'AIDE D'UNE SONDRE MARQUEE A LA DIGOXIGENINE	
FICHE TECHNIQUE 6 : MILIEUX DE CULTURE ET CONDITIONS DE CROISSANCE DES CELLULES	
EUCARYOTES	
FICHE TECHNIQUE 7 : INFECTION DES CELLULES EUCARYOTES	
FICHE TECHNIQUE 9 : TEST D'ACCUMULATION DU BROMURE D'ETHIDIUM CHEZ <i>LEGIONELLA</i>	
FICHE TECHNIQUE 10 : ETUDE DE L'EXPRESSION DES GENES PAR RT-PCR QUANTITATIVE	
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	309
PUBLICATION.....	325

LISTE DES FIGURES

- Figure 1.** Les étapes d'un processus infectieux dans l'organisme humain
- Figure 2.** Les composants de l'immunité innée et de l'immunité adaptative chez l'Homme
- Figure 3.** Les récepteurs de la famille Toll reconnaissent divers motifs présents sur les micro-organismes
- Figure 4.** Structure des anticorps
- Figure 5.** L'établissement d'une synapse entre les lymphocytes et les cellules dendritiques permet l'activation des lymphocytes T
- Figure 6.** Représentation schématique de la structure des IgA1 protéases
- Figure 7.** Les modifications du lipopolysaccharide bactérien ou LPS
- Figure 8.** Domaine de la flagelline chez *E. coli* reconnue par TLR5 et superposition à la portion de séquence de la flagelline chez *E. coli*
- Figure 9.** Les effecteurs de *Yersinia* impliqués dans l'inhibition de la phagocytose
- Figure 10.** L'interaction entre *Mycobacterium leprae* et les cellules de Schwann met en jeu la laminine α -2
- Figure 11.** Mécanisme permettant à *Listeria* d'entrer dans les cellules non phagocytaires
- Figure 12.** Photos de microscopie électronique montrant différentes étapes du cycle infectieux de *Listeria monocytogenes*
- Figure 13.** Stratégie de survie intracellulaire de quelques bactéries pathogènes
- Figure 14.** Schéma représentant les différentes étapes du cycle infectieux de *Legionella pneumophila* dans le macrophage
- Figure 15.** Observations microscopiques montrant les différences entre les cellules de *Legionella* en phase stationnaire et sous la forme MIF
- Figure 16.** Cinétique de l'ingestion puis sous forme d'agrégats de *Legionella pneumophila* par le cilié *Tetrahymena*
- Figure 17.** Modèle de différenciation de *Legionella pneumophila*
- Figure 18.** Cellules de *Legionella pneumophila* observées en microscopie
- Figure 19.** Schéma représentant le rôle de RelA et SpoT dans la synthèse ou la dégradation du ppGpp
- Figure 20.** La transition biphasique est contrôlée par la réponse ppGpp chez *Legionella*
- Figure 21.** Les différentes stratégies utilisées pour étudier la sécrétion d'effecteurs par le système Dot/Icm de *Legionella*
- Figure 22.** La sécrétion de RalF vers le cytoplasme de la cellule hôte
- Figure 23.** La protéine RalF possède un domaine d'homologie retrouvé chez le facteur d'échange Sec7
- Figure 24.** Contrôle du trafic membranaire entre le Réticulum Endoplasmique Granuleux (REG) et le Golgi
- Figure 25.** Structure de RalF déduite après cristallisation
- Figure 26.** Effets de LidA sur le trafic intracellulaire de la levure *Saccharomyces cerevisiae*
- Figure 27.** Identification d'effecteurs causant des perturbations du trafic intracellulaire eucaryote
- Figure 28.** les répétitions ankyrines chez les protéines Ank de *Legionella pneumophila*
- Figure 29.** Les phosphoinositides (PI), cibles des bactéries pathogènes
- Figure 30.** SidC lie PI4(P) *in vitro*
- Figure 31.** LubX, une E3 ubiquitine ligase
- Figure 32.** SetA possède un domaine glycosyltransférase
- Figure 33.** Manipulation de l'hôte par *Legionella* pour assurer sa survie et sa réplication
- Figure 34.** *Legionella* manipule son hôte afin de mener à bien le cycle infectieux
- Figure 35.** Les systèmes de sécrétion bactériens
- Figure 36.** Le mécanisme de sécrétion via le système Sec
- Figure 37.** Schéma illustrant le fonctionnement de la machinerie de sécrétion Tat
- Figure 38.** La sécrétion de type V
- Figure 39.** L'appareil de sécrétion de type III Inv/Spa de *Salmonella*

- Figure 40.** Organisation génétique de la région codant pour l'appareil de sécrétion de type III chez *Salmonella*
- Figure 41.** Régulation de l'expression des gènes de l'îlot SPI1 de *Salmonella*
- Figure 42.** Les différents rôles joués par les systèmes de sécrétion de type IV bactériens
- Figure 43.** Architecture de l'appareil de sécrétion de type IV d'*Agrobacterium tumefaciens*
- Figure 44.** Schéma représentant le transfert d'ADN dans la plante lors d'une infection et les conséquences
- Figure 45.** Structure de l'appareil de sécrétion Dot/Icm de *Legionella pneumophila*
- Figure 46.** Organisation des gènes *dot/icm* codant pour l'appareil de sécrétion de type IV chez *Legionella*
- Figure 47.** Modèle de système de sécrétion de type VI proposé par Shrivasta *et al.*
- Figure 48.** La structure et l'assemblage de l'appareil de sécrétion de type VI
- Figure 49.** Structure de l'appareil basal (« baseplate ») du phage T4 et comparaison avec la protéine VgrG de *E. coli* et ses homologues chez le phage T4, gp5 et gp27
- Figure 50.** Modèles de structure et de fonctionnement de l'appareil de sécrétion de type VII « ESX-1 » de *Mycobacterium*
- Figure 51.** Les mécanismes de résistance aux drogues
- Figure 52.** Les cinq familles de systèmes d'efflux chez les bactéries à Gram négatif
- Figure 53.** Modèle structural des transporteurs de type MFS à 14 domaines transmembranaires
- Figure 54.** Modèle structural des transporteurs de type MFS à 12 domaines transmembranaires
- Figure 55.** Structure et modèle de fonctionnement de la pompe EmrD chez *E. coli*
- Figure 56.** La structure secondaire typique des transporteurs de type MATE
- Figure 57.** Structure générale des transporteurs de la famille SMR
- Figure 58.** Structure et mécanisme de fonctionnement de EmrE
- Figure 59.** Structure des transporteurs de la superfamille ABC
- Figure 60.** Structure et mécanisme de transport des pompes de la famille ABC
- Figure 61.** Structure des transporteurs de la famille RND
- Figure 62.** Représentation schématique de la pompe tripartite AcrA/AcrB/TolC de *E. coli*
- Figure 63.** Structure de AcrB
- Figure 64.** Structure de AcrA
- Figure 65.** Structure de TolC
- Figure 66.** Les structures de protéines de membrane externe bactériennes
- Figure 67.** Arbre phylogénétique des protéines appartenant à la famille TolC
- Figure 68.** Mécanisme de fonctionnement de la pompe AcrA/AcrB/TolC
- Figure 69.** Un mécanisme proposé pour l'export de drogues via la pompe AcrA/AcrB/TolC
- Figure 70.** Représentation des 3 tunnels présents dans AcrB
- Figure 71.** Les analogies structurales entre les sous-unités α/β de l'ATP synthase bovine F1F0 (vue du cytosol) et le domaine périplasmique de AcrB (vue du périplasme)
- Figure 72.** Représentation schématique des réseaux de régulation gouvernant l'expression des gènes *acrAB* et *tolC* chez *E. coli*
- Figure 73.** Un modèle de l'interaction entre la pompe AcrA/AcrB/TolC et deux pompes à un composant EmrE et MdfA chez *E. coli*
- Figure 74.** Gènes choisis pour l'inactivation chez *Legionella* de systèmes d'efflux potentiels
- Figure 75.** Stratégie d'inactivation des gènes chez *Legionella* par recombinaison homologue
- Figure 76.** Carte des plasmides pCDPO5 (A) et p695 (B)
- Figure 77.** Démarche pour réaliser la construction contenant les deux régions d'homologie 5' et 3' du gène cible à invalider chez *Legionella*
- Figure 78.** Electrophorèse sur gel des fragments PCR obtenus avec les amorces P1/P2 et P3/P4 fragments obtenus à partir de l'ADN chromosomique de *L. pneumophila* Lens
- Figure 79.** Electrophorèse sur gel des amplicons obtenus après PCR avec les amorces P1/P4 sur le produit de la ligation des fragments de PCR obtenus précédemment
- Figure 80.** Electrophorèse sur gel après analyse de restriction à SalI des amplicons obtenus avec les amorces P1 et P4 : 'lpl2849-'lpl2852 (colonne 2), 'lpl2103-'lpl2104 (colonne 3), 'lssD-'lssB (colonne 4) et 'lpl880-'lpl882' (colonne 5)
- Figure 81.** Etapes du clonage de la construction et amplification chez *E. coli*

Figure 82. Electrophorèse sur gel après analyse de restriction du plasmide contenant la construction p695/'*lp12103-kan-lp2104*' (plasmide pMF7) par une digestion à NotI (colonne 4) à SalI (colonne 5) et par une double digestion à NotI et à SalI (colonne 6)

Figure 83. Carte du plasmide pBR328

Figure 84. Analyse des mutants de *Legionella* obtenus

Figure 85. Résultats du test de virulence « APT » (« amoebal plate test ») sur les différents mutants

Figure 86. Etude de la virulence des mutants chez *A. castellanii*

Figure 87. Séquence et structure de TolC

Figure 88. Représentation schématique de la stratégie utilisée pour la construction du mutant *tolC* chez *L. pneumophila* Lens

Figure 89. Représentation schématique montrant les étapes de la construction du plasmide permettant la complémentation du mutant *tolC* chez *L. pneumophila* Lens

Figure 90. Courbes de croissance des souches de *Legionella* en milieu liquide (milieu LGM, voir matériel et méthodes)

Figure 91. Test d'efflux du bromure d'éthidium

Figure 92. Survie de cellules bactériennes de *Legionella* après une exposition à des stress

Figure 93. Observation au microscope de cellules d'*A. castellanii* (A) ou de *D. discoideum* (B) infectées avec *Legionella* 72 heures après infection (grossissement X 20)

Figure 94. Cinétique de libération des cellules bactériennes au cours de l'infection de protozoaires et de macrophages

Figure 95. Cytotoxicité de *L. pneumophila* Lens et des souches dérivées vis-à-vis de différents hôtes

Figure 96. Croissance intracellulaire de *L. pneumophila* Lens et des souches dérivées

Figure 97. Capacité d'invasion de *L. pneumophila* Lens et des souches dérivées

Figure 98. Exemple de spectre d'absorption obtenu à l'aide du « nanodrop » avec un extrait d'ARN

Figure 99. Allure type d'une courbe d'amplification telle qu'obtenue sur le Lightcycler

Figure 100. Allure type d'une courbe de fusion telle qu'obtenue sur le Lightcycler

Figure 101. Exemple de résultats d'analyses obtenus avec le Lightcycler

Figure 102. Graphique représentant les facteurs de régulation obtenus pour les différents gènes étudiés par RT-qPCR

LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1.** Les différentes classes de récepteurs impliqués dans la reconnaissance directe des micro-organismes et leur fonction
- Tableau 2.** Les différentes classes de récepteurs impliqués dans la reconnaissance indirecte des micro-organismes et leur fonction
- Tableau 3.** Les différents systèmes de sécrétion de type IV et leurs substrats identifiés à ce jour
- Tableau 4.** Pompes d'efflux impliquées dans la résistance bactérienne aux antibiotiques chez des bactéries d'intérêt médical
- Tableau 5.** Protéines d'efflux potentielles identifiées par l'approche bioinformatique
- Tableau 6.** Tableau regroupant les associations de protéines pouvant participer à une pompe d'efflux de la famille ABC
- Tableau 7.** Tableau regroupant les associations de protéines pouvant participer à une pompe d'efflux de la famille RND
- Tableau 8.** Tableau regroupant les associations de protéines pouvant participer à une pompe d'efflux de la famille MFS
- Tableau 9.** Tableau regroupant les associations de deux protéines MFP/OMF
- Tableau 10.** Tableau regroupant les protéines orphelines
- Tableau 11.** Séquence des amorces P1, P2, P3 et P4, position et taille des amplicons générés
- Tableau 12.** Mutants invalidés chez *L. pneumophila* Lens
- Tableau 13.** Sensibilité de *L. pneumophila* Lens et des mutants invalidés vis-à-vis de différents composés toxiques
- Tableau 14.** Les différentes souches construites ainsi que les plasmides pour l'étude du mutant *tolC*
- Tableau 15.** Sensibilité aux drogues des souches de *L. pneumophila* (souche parentale et dérivées) après croissance sur milieu BCYE
- Tableau 16.** Liste des gènes retenus pour l'étude par RT-qPCR
- Tableau 17.** Amorces utilisées pour la PCR quantitative
- Tableau 18.** Concentration et rapport d'absorbance A260/280 et A260/230 des deux extraits d'ARN indépendants utilisés pour l'étude de RT-qPCR (valeurs obtenues grâce au nanodrop)
- Tableau 19.** Tableau récapitulatif des facteurs de régulation obtenus (entre parenthèses) ainsi que les différents gènes testés

LISTE DES ABREVIATIONS

A

A	adénine
aa	acide aminé
Å	angström
AAC	aminoglycoside-acétyltransférase
AAD	aminoglycoside-adényltransférase
ABC	transporteurs dépendant de l'énergie fournie par l'ATP (« ATP binding cassette family »)
ACD	actin cross-linking domain
Acyl HSL	acyl-homosérine lactone
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADP	Adénosine diphosphate
AI	Autoinducteur
AMP	Adénosine monophosphate
AMPc	AMP cyclique
APC	antigen presenting cell
APT	amoebal plate test
Ank	ankyrin (repeats protein)
ARF	ADP ribosylation factor
ARN	acide ribonucléique
ARNt	ARN de transfert
ARNO	ARF nucleotide-binding site opener
ATCC	american type culture collection
ATP	adénosine triphosphate

B

BCG	Bacille de Calmette et Guérin
BCR	B cell receptor
BCYE	milieu de culture solide des legionelles (« buffered charcoal yeast extract »)
BET	bromure d'éthidium
Blast	basic local alignment search protein tool
BNIP3	Bcl-2/19 kda interacting protein-3

C

C	cytosine
Ca²⁺	ions calcium
C1 ... C9	protéines de la cascade du complément
C4BP	C4 binding protein
CAM	complexe d'attaque membranaire
CCCP	cyanide m-chlorophenylhydrazone
CD	cluster designation
CD40L	ligand de CD40
Cdc42	cell division cycle protein 42
Ceg	co-regulated with the effector encoding genes
CFH	complement factor H
CFHR-1	factor H-related protein 1
CFHL-1	factor H-like protein 1
CFP10	culture filtrate protein 10

CFU	colony forming unit
Clk1	cdc2/cdc28-like kinase 1
ClpB	caseinolytic peptidase B
CMI	concentration minimale inhibitrice
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
CNRL	centre national de référence des legionelles
Cp	crossing point
CPY	carboxypeptidase Y
CR	complement recetor
CTAB	hexadecyltrimethylammonium

D

DEPC	diéthylpyrocarbonate
DmsABC	dimethyl sulfoxide reductase ABC
dNTP	desoxyribonucleoside 5'-triphosphate
DO	densité optique
Dot	defect in organelle trafficking

E

E	efficacité (« efficiency »)
EAEC	<i>E. coli</i> enterroaggrégatif
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	éthylène diamine tétra-acétate de sodium
EEA1	early endosome antigen 1
EPEC	<i>E. coli</i> enthéropathogène
ERGIC	ER-golgi intermediate compartment
ESAT-6	early secreted antigenic target 6 kDa protein
ESBL	extended spectrum beta lactamase
EVP	<i>Edwardsiella tarda</i> virulence protein

F

Fab	fragment antigen binding
FAK	focal adhesion kinase
Fc	fragment crystallizable region
FdnGHI	formate deshydrogenase
Fe²⁺	ions ferreux
FLP	fibrinogen-like protein
FHA	forkhead-associated
FRET	fluorescence resonance energy transfer
FRT	FLP recombination target
Fyb	Fyn binding protein

G

G	guanine
GAP	GTPase activating protein
gC1q-R	receptor for the globular heads of C1q
GDI	guanine nucleotide dissociation inhibitor
GDP	guanosine di phosphate
GEF	guanine nucleotide exchange factor

gp glycoprotéine
GTP guanosine triphosphate

H

H⁺ ions hydroxyles
H₂O₂ peroxyde d'hydrogène
Hcp haemolysin-coregulated protein
Hly hemolysin

I

ICAM-1 intracellular adhesion molecule 1
Icm intracellular multiplication
Ig immunoglobuline
IL interleukine
IMP protéine de membrane interne (« inner membrane protein »)
InlA/B internaline A ou B
iNOS inductible nitric oxyde synthase
IP3 inositol 3-phosphate
IP5P inositol 5-phosphatase
ITAM immunoreceptor tyrosine based activation motif

K

Kan kanamycine
Kb kilobase

L

LAMP lysosomal associated membrane protein
LCV *Legionella* containing vacuole
Leg *Legionella* eukaryotic genes
LepB *Legionella* effector protein B
LGM milieu de culture liquide des legionelles (« *Legionella* growth medium »)
Lmr multidrug resistance in *Lactococcus*
LPS lipopolysaccharide
LRR leucin reach repeat
LTC4/D4/E4 leucotrien C4, D4, E4
LubX *Legionella* U-box protein X

M

MBP mannose binding protein
MCP-1 monocyte chemoattractant protein 1
MIF mature intracellular form
Mn²⁺ ions magnésium
MVB multivesicular body

N

Na⁺	ions sodium
NapA	nitrate reductase
NBD	nucleotide binding domain
NK	natural killer
NOS2	nitric oxyde synthase 2
NOX2	NADPH oxydase 2

O

O	open
OCRL1	oculocerebrorenal syndrome of Lowe protein 1
OMF	outer membrane factor

P

P	proline
P4C	PI(4)P-binding of SidC
P4M	PI(4)P-binding of SidM/DrrA
PAI	pathogenicity island
PAI-1	N-3-oxododecanoyl-L-HSL
PAMP	pathogen associated molecular patterns
pb	paire de base
PCR	polymerase chain reaction
PGE2/D2/I2	prostaglandin E2/D2/I2
PFGE	pulse field gel electrophoresis
pH	potentiel hydrogène
PI (ou PtdIns)	phosphatidylinositol/phosphoinositides
PI(4,5)P₂	phosphatidylinositol 4,5 biphosphate
PI(3,4,5)P₃	phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate
PLP	protéine de liaison à la penicilline
Plr	streptococcal plasmin receptor
ppGpp	guanosine 3'-diphosphate 5'-diphosphate
PRR	pattern recognition receptor
PSS	position specific scoring matrix

Q

QAC	ammonium quaternaire
qPCR	quantitative PCR
QS	quorum sensing

R

RD1	region of difference 1
RF	replicative phase form
RFc	recepteur au fragment Fc des immunoglobulines
RND	protéine impliquée dans les résistances, la nodulation et la division cellulaire chez les bactéries (« resistance nodulation cell division »)
ROS	reactive oxygen species
RT	reverse transcription
RTX	repeat in structural toxin

S

S	sérine
SBP	substrate binding protein
SCIN	staphylococcal complement inhibitor
SetA	subversion of eukaryotic vesicle
SMP	small multidrug protein
SMR	petite protéine conférant des multirésistances (« small multidrug resistance »)
SP	stationnary phase form
SPI	<i>Salmonella</i> pathogenicity islands
SRP	signal recognition particle
SUG	supressor of GroEL protein

T

T	thréonine (acide aminé)
T	tight
TACO	tryptophane-aspartate containing coat protein
Tat	twin arginine translocation
T4CP	type 4 secretion coupling protein
TCR	T cell receptor
T_H	T helper
TGF β	tumour growth factor β
TI	T indépendant
TLR	Toll-like receptor
T_m	melting temperature
TNFα	tumour necrosis factor α
TorA	trimethylamine N-oxyde reductase
TPP	tetraphenylphosphonium
T3SS	type III secretion system
T4SS	type IV secretion system
TXA2	thromboxane A2

U

U	unité d'activité enzymatique
μg	microgramme
μL	microlitre
UPEC	<i>E. coli</i> uropathogène
UV	ultraviolet

V

V	volt
Vas	virulence associated secretion
V-ATPase	vacuolar type H ⁺ -ATPase
VgrG	val-gly repeat
Vip	VPS inhibitor protein
Vps	vacuolar protein sorting

W

WASP	wiskott-aldrich syndrom protein
WT	wild-type

Y

Ylf yeast lethal factor

Yop *Yersinia* outer protein

Z

Zn²⁺ ions zinc

INTRODUCTION

On qualifie d'émergente une maladie dont l'incidence au sein de la population augmente par rapport à la situation habituellement rencontrée (Revankar *et al.*, 2002). Un grand nombre de ces maladies émergentes sont d'origine infectieuse : les maladies infectieuses représentaient au début du XX^e siècle la principale cause de décès à l'échelle mondiale (Avila *et al.*, 2008). En 2001, Taylor *et al.* évaluaient à 1415 espèces le nombre d'agents infectieux connus pour être pathogènes chez l'Homme (Taylor *et al.*, 2001). Parmi ces agents, on comptait déjà 538 espèces bactériennes. Le mythe de l'éradication des maladies infectieuses avancé à son époque par William H. Stewart devant le congrès américain s'est bel et bien effondré (Avila *et al.*, 2008). « Le chapitre des maladies infectieuses ne s'est pas clot » avec l'amélioration des conditions de vie, l'hygiène et l'apport des antibiotiques. Bien au contraire, les conditions de vie moderne ont favorisé l'émergence de nouvelles maladies. Si l'idée d'émergence était déjà sous-jacente dans l'approche épidémiologique développée au XIX^e, il faut cependant attendre la publication du rapport de Joshua Lederberg pour que soit abordé le concept de maladie émergente (Drotman, 1998). Par la suite Mirko D. Gmerk, historien des sciences et spécialiste du SIDA fera entrer le terme de « maladie infectieuse émergente » dans la sphère publique (Barreto *et al.*, 2006). Dans son concept Gmerk prend en compte les modifications environnementales comme pouvant favoriser l'émergence d'un agent infectieux. Ainsi la legionellose, maladie qui a émergé dans les années 1970 serait liée aux modifications nées avec le développement du confort de vie moderne. Cette maladie a frappé les esprits lorsqu'en 1976 une épidémie de pneumonie atypique et particulièrement grave a frappé 182 des 4500 membres de la légion américaine réunis en congrès à Philadelphie. Le constat est accablant : 29 personnes décèdent des suites de l'infection (Fraser *et al.*, 1977). Il faudra cependant attendre fin décembre 1976 pour que le fruit d'intenses investigations aboutisse : l'équipe de Joe Mc Dade identifie l'agent responsable de la maladie en isolant pour la première fois la bactérie *Legionella pneumophila* (McDade *et al.*, 1977). Depuis l'isolement de l'agent infectieux, d'intenses études ont permis d'éclaircir certains aspects concernant aussi bien la physiologie que la pathogénie de la bactérie *L. pneumophila*. Si 42 espèces et plus de 64 sérogroupes de *Legionella* ont été reportés depuis, 90 % des cas décrits en pathologie humaine sont dus à *Legionella pneumophila* séro groupe 1 (Yu *et al.*, 2002) .

Présente dans l'environnement (le sol et les eaux), *L. pneumophila* est une bactérie qui a la particularité de survivre et de se multiplier dans les protozoaires aquatiques tel que l'amibe *Acanthamoeba castellanii* dont on pense aujourd'hui qu'elle est l'hôte naturel (Thomas *et al.*, 2004). La voie de contamination est connue : l'infection de l'Homme fait suite à l'inhalation de gouttelettes contaminées qui atteignent les poumons. On incrimine souvent dans ce cas la dispersion d'aérosols par les tours aéroréfrigérantes (TARs). On pense que le risque d'infection devient significatif lorsqu'on atteint une concentration équivalente à 10^3 - 10^4 CFU.L⁻¹ dans les aérosols (Carducci *et al.*, 2010). De ce fait, d'importantes mesures ont été prises en France pour contrôler, suivre et traiter les TARs. Cependant, ces traitements ne prennent pas en compte la présence des amibes qui peuvent protéger *Legionella* et conditionner sa virulence. Ainsi, il a été montré très tôt par Barker *et al.* que *L. pneumophila*, après avoir infecté puis lysé l'amibe *A. castellanii*, était non seulement plus infectieuse vis-à-vis d'un autre hôte mais aussi plus résistante à des biocides et à des agents antimicrobiens tels que les antibiotiques et les biocides utilisés dans le traitement des tours (Barker *et al.*, 1995).

Au sein de notre laboratoire, nous étudions les mécanismes de résistance développés par la bactérie *Legionella pneumophila*. A ce jour, la légionellose reste une maladie grave avec plus d'une dizaine d'épidémies recensées en France et un taux de mortalité qui se situe entre 20% et 30% (Roch & Maurin, 2005). Notre laboratoire dispose actuellement de trois souches de *Legionella pneumophila* acquises par l'intermédiaire du CNRL de Lyon (Centre National de Référence des Légionelles) dirigé par Jérôme ETIENNE et Sophie JARRAUD. Ce centre possède une collection de 46 espèces de légionelles d'origine environnementale ou clinique identifiées par une approche d'immunofluorescence directe grâce à des sérums immuns et par biologie moléculaire (technique de restriction génomique par électrophorèse en champ pulsé ou PFGE).

Une approche bioinformatique, basée sur la comparaison de séquences avec des protéines de systèmes d'efflux connues chez *E. coli*, a été menée au laboratoire sur les banques protéiques (protéines connues ou putatives) traduites à partir des génomes complets séquencés en 2005 de deux souches de *Legionella pneumophila* impliquées dans les épidémies de Lens et Philadelphie. Cette étude menée dans le but de trouver d'éventuels composants de systèmes d'efflux chez cette bactérie a permis de dresser une liste de gènes susceptibles de coder pour des pompes d'efflux chez *Legionella* et a servi de bases aux travaux que j'ai entrepris : isolement des mutants de pompes à efflux chez *Legionella pneumophila* et analyse de leur phénotype de résistance aux drogues. A ce jour, le rôle de pompes d'efflux dans la résistance de *Legionella* aux antibiotiques ou à divers désinfectants n'a jamais été mise en évidence. Aucune étude chez *Legionella* n'a décrit des mécanismes liés à des résistances observées en particulier lors des traitements par des désinfectants. Cependant, il a pu être observé que les légionelles qui se multiplient dans des amibes sont plus résistantes à des biocides suite à la lyse de l'hôte. Ce phénotype semble corrélé à leur pouvoir pathogène puisque ces bactéries sont également plus virulentes vis-à-vis des macrophages, établissant par là une des voies d'infection de l'Homme. L'hypothèse de l'implication d'un mécanisme de résistance aux drogues dans la virulence de *Legionella* a été l'une des lignes directrices de ma thèse et a émergé dès ma première année au laboratoire. Nous avons ciblé comme mécanisme de résistance les pompes d'efflux car ce mécanisme très répandu permet à la bactérie de résister à un large panel de drogue et est un des contributeurs majeurs aux résistances observées en clinique. Par la suite, nombre de publications sont venues appuyer notre première hypothèse en reliant les pompes d'efflux à la virulence de certaines bactéries. Notre sujet, démarré en 2005, suite à un changement de thématique du laboratoire est désormais un des axes de recherche de l'équipe dirigée par Danièle ATLAN sur la thématique de *Legionella* au sein de l'UMR5240. En effet, d'autres approches sont venues étoffer la thématique *Legionella* comme l'étude de l'implication de sérines thréonines kinases ainsi que le rôle de protéines à motif GGDEF/EAL dans la virulence. Toutes ces approches combinées visent à éclaircir certains des aspects de la virulence de *Legionella*. Afin d'étudier les mécanismes de résistance présents chez *Legionella pneumophila*, l'approche que j'ai choisie est l'étude de mutants par invalidation de gènes cibles désignés à la suite d'une recherche bioinformatique. Ce sont, d'une part, des gènes homologues aux gènes codant pour la protéine TolC d'*E. coli* dont l'effet pléiotrope est associé aux mécanismes de résistances à divers détergents et antibiotiques, et, d'autre part, des gènes codant pour des composants potentiels des systèmes d'efflux. L'invalidation de ces gènes chez *Legionella* et l'analyse des mutants obtenus font l'objet des travaux de recherche que j'ai mené durant ces trois années et qui sont présentés dans ce manuscrit.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

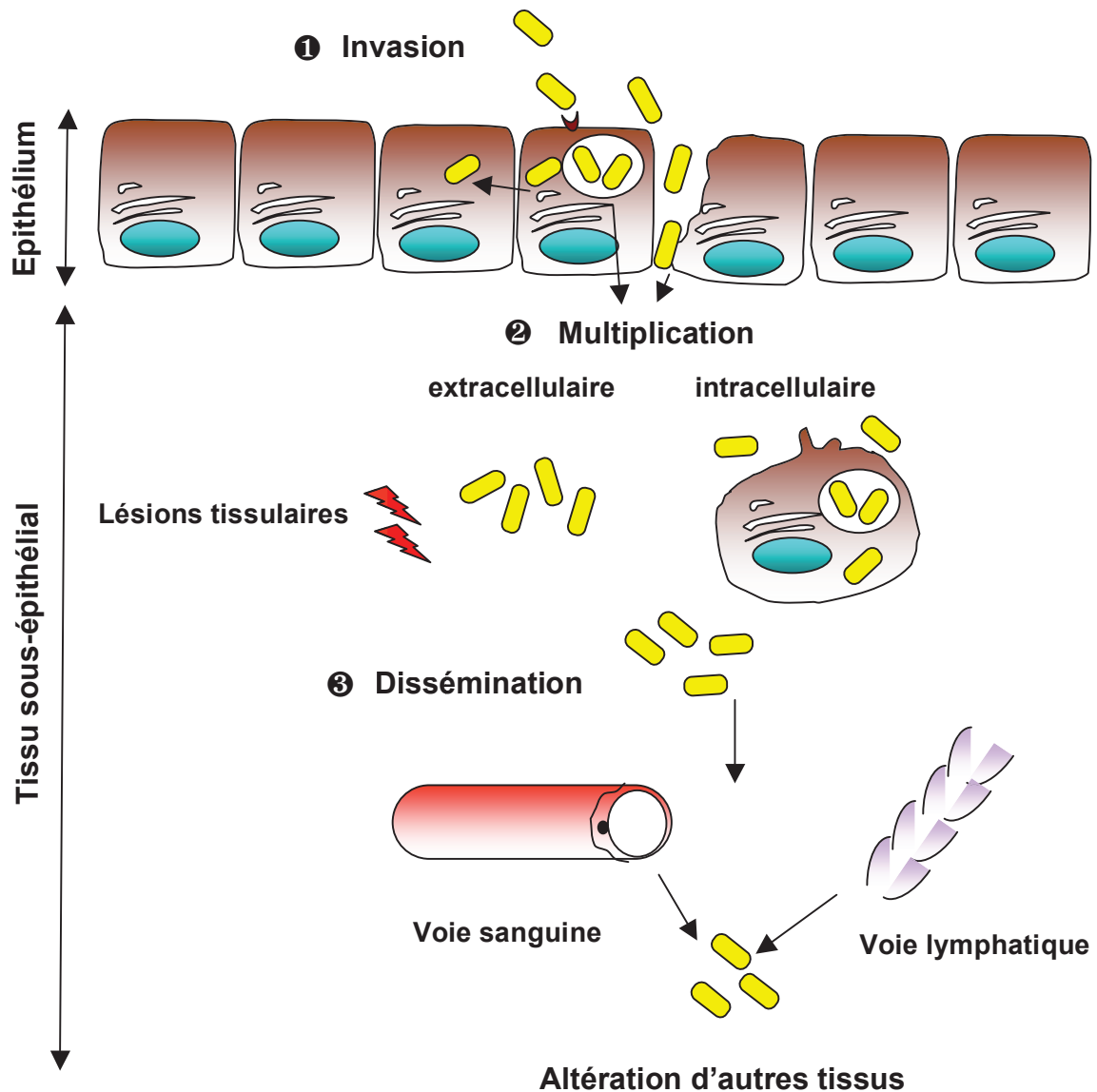


Figure 1. Les étapes d'un processus infectieux dans l'organisme humain .

A l'étape d'invasion, les micro-organismes pénètrent à travers les épithéliums de façon active (la bactérie provoque sa capture par les cellules épithéliales) ou passive (à la suite de lésions). Certaines bactéries peuvent alors continuer à se disséminer aux cellules épithéliales adjacentes et/ou pénétrer dans le tissu sous-épithélial. S'ensuit une étape de multiplication extracellulaire ou intracellulaire (dans les cellules épithéliales mais aussi dans des cellules phagocytaires) s'accompagnant de lésions tissulaires. A cette étape de l'infection, la situation peut se compliquer car certaines bactéries pathogènes peuvent se propager par voie sanguine ou lymphatique et atteindre d'autres tissus et organes.

I. Introduction

Parmi les bactéries présentes dans l'environnement, certaines sont potentiellement pathogènes car elles peuvent engendrer des dommages dans l'organisme qu'elles infectent. Ces dommages conduisent aux symptômes observables de la maladie. Au sein de l'organisme hôte, les bactéries pathogènes ont développé de remarquables stratégies pour survivre et se multiplier (Hornef *et al.*, 2002). Loin de ne désigner que les organismes complexes, la notion d'hôte peut également se référer au cas d'une unique cellule eucaryote pouvant « héberger » la bactérie et assurer sa réplication. L'hôte, dans le sens général du terme (organisme complexe comme l'Homme ou cellule unique), peut être dit « naturel » ou par défaut. L'hôte naturel correspond à celui fréquemment rencontré dans l'environnement comme, par exemple, les protozoaires aquatiques qui hébergent la bactérie *Legionella*, lui assurant par là une protection contre les stress environnementaux ainsi qu'une niche riche en nutriments et favorable à la multiplication (Taylor *et al.*, 2009). Cet hôte constitue un réservoir naturel pour la bactérie qui peut ainsi se multiplier et se disperser dans sa niche écologique. Mais il se peut qu'une bactérie échappe à cet hôte naturel et infecte accidentellement un autre hôte qui va constituer le point mort de son cycle de vie : dans ce cas, on parlera d'hôte par défaut. Par exemple, la bactérie *Legionella pneumophila*, après s'être multipliée dans des protozoaires comme l'amibe *Acanthamoeba castellanii*, peut infecter l'Homme à la suite de la dispersion de gouttelettes contaminées émises via des aérosols (jets d'eau, tours aérorefrigérées...). A ce stade, aucune transmission interhumaine de legionellose, maladie dont est responsable cette bactérie n'a été observée : dans ce cas, l'Homme constitue l'hôte par défaut.

Dans les deux situations (infection de l'hôte naturel ou accidentel), les bactéries pathogènes ont développé un arsenal de facteurs de virulence pour envahir leur hôte. Chez l'Homme, ces facteurs permettent aux bactéries pathogènes la colonisation des tissus au niveau de leur site d'infection et la dissémination à d'autres tissus via la circulation sanguine (Figure 1). Il semble aujourd'hui admis que certains de ces facteurs de virulence aient été acquis via un transfert horizontal de gènes ayant eu lieu entre la bactérie et son hôte naturel comme en atteste la présence de nombreux gènes codant pour des protéines homologues à des protéines eucaryotes dans le génome de la bactérie *Legionella* (Cazalet *et al.*, 2004). Ce processus fait partie de la théorie de la co-évolution, théorie selon laquelle la pression de sélection dans un hôte eucaryote naturel aurait permis la sélection des bactéries les plus aptes à survivre dans une cellule eucaryote (Albert-Weissenberger *et al.*, 2007). Ces bactéries, qui auraient évolué au contact de l'hôte naturel, auraient ainsi acquis, sous la pression de sélection, une panoplie de facteurs de virulence afin de survivre dans divers autres types cellulaires présents notamment chez l'Homme.

Suite à l'invasion de notre organisme, le processus infectieux permet de distinguer deux types de bactéries pathogènes : les bactéries à multiplication extracellulaire et celles à multiplication intracellulaire. Dans le cas du parasitisme intracellulaire, les bactéries sont capables de pénétrer et de survivre dans des cellules de l'hôte pour s'y répliquer de façon transitoire avant de se disséminer dans les cellules adjacentes ou de gagner la circulation

sanguine. Pour pénétrer dans l'organisme, les micro-organismes doivent franchir une première barrière constituée par des cellules épithéliales.

Mais, dans de nombreux cas, la dissémination des cellules bactériennes est conditionnée par le franchissement d'une seconde barrière constituée par les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses. Ces tissus sous-jacents aux cellules épithéliales regroupent des cellules spécialisées, les phagocytes (polynucléaires neutrophiles, macrophages et cellules dendritiques), qui sont capables de dégrader les bactéries attaquant l'organisme. Les phagocytes et bien d'autres cellules (cellules NK, lymphocytes B et T) et molécules spécialisées (protéines du complément, peptides antimicrobiens comme les défensines) font partie des défenses immunitaires développées par les organismes complexes afin de lutter contre l'intrusion de micro-organismes étrangers (bactéries, parasites et virus) et, le cas échéant, de limiter leurs effets délétères.

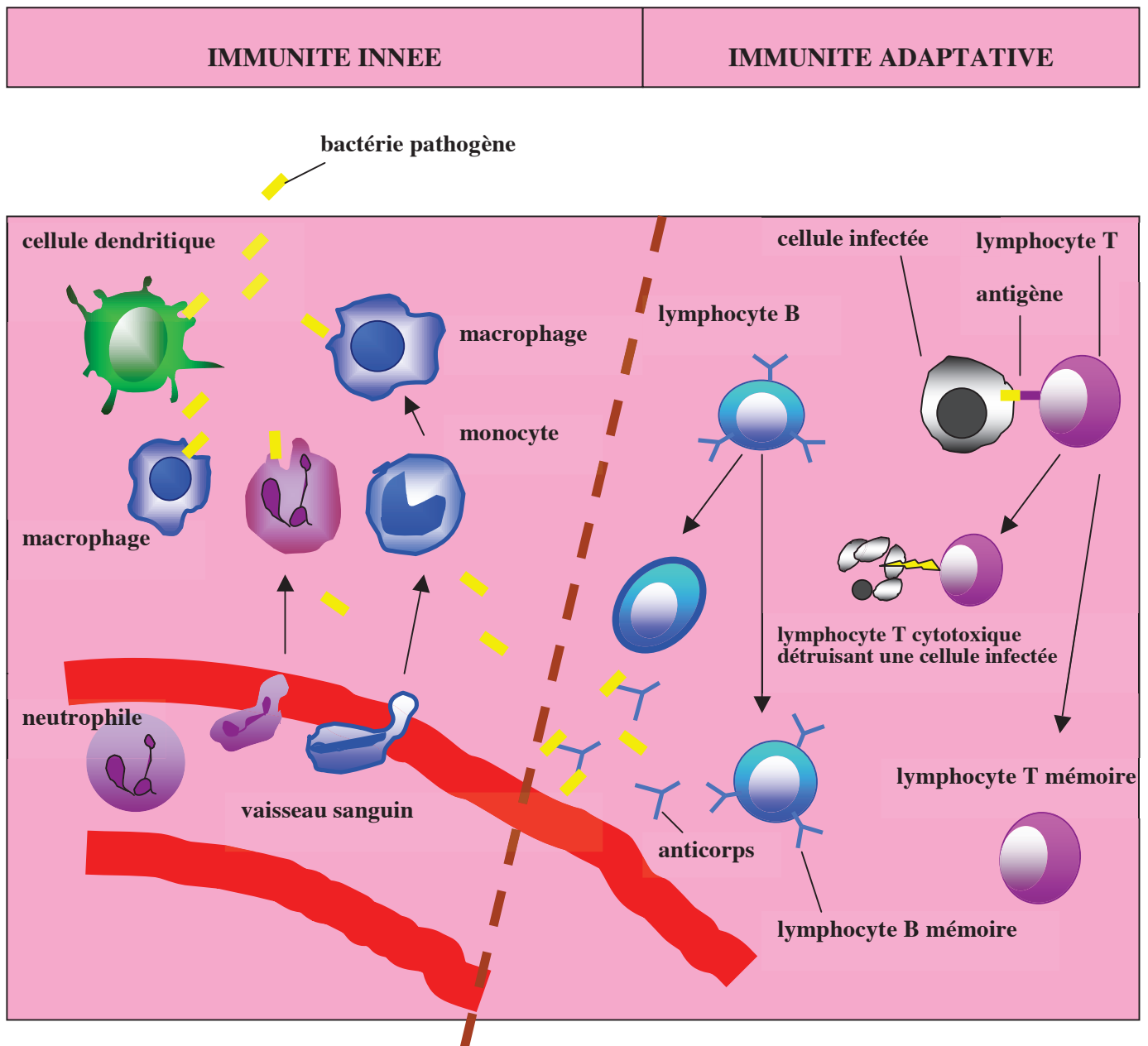


Figure 2. Les composants de l'immunité innée et de l'immunité adaptative chez l'Homme.

La défense contre l'agression de bactéries extérieures se compose de deux réponses : l'immunité innée (à gauche) et l'immunité adaptative (à droite). L'immunité innée comprend diverses molécules antimicrobiennes et des cellules phagocytaires capables d'ingérer et de détruire les micro-organismes. Les phagocytes qui incluent des cellules dendritiques et les macrophages activent également la réponse inflammatoire grâce aux cytokines que ces cellules sécrètent pour attirer au lieu de l'infection d'autres cellules immunitaires comme les monocytes (qui peuvent se différencier en macrophages) et les neutrophiles. L'immunité adaptative est initiée en grande partie par les cellules dendritiques de l'immunité innée et conduit à l'activation de deux populations de lymphocytes : les lymphocytes B et T. Les lymphocytes B sécrètent des anticorps reconnaissant des antigènes à la surface de la bactérie cible : les anticorps permettent une lyse directe ou servent à « marquer » des bactéries en les désignant comme cible pour d'autres cellules à activité lytique. Les lymphocytes T participent à l'activation des cellules B (par coopération cellulaire) soit à la lyse des cellules infectées suite à leur différenciation (cellules T à activité cytotoxique). La réponse adaptative conduit à l'émergence d'une mémoire immunologique qui permettra de répondre plus rapidement à la suite d'une seconde rencontre avec la bactérie en cause.

II. Les mécanismes de défense de l'organisme contre les bactéries pathogènes

L'organisme humain présente plusieurs sites pouvant être la cible de la colonisation par des micro-organismes incluant la peau, l'intestin, les tractus respiratoires supérieur et inférieur, le tractus urogénital et les organes internes (Medzhitov *et al.*, 2007). Lorsque l'organisme hôte tire bénéfice de cette colonisation (symbiose) on parle de flore commensale. Mais il se peut que la colonisation aboutisse à des effets dommageables pour l'organisme : on parle alors de micro-organismes pathogènes.

Cependant, l'organisme a développé des mécanismes de défense permettant de lutter contre les effets néfastes de tels micro-organismes : ce sont les mécanismes du système immunitaire qui comprend la réponse immunitaire innée et adaptative (figure 2). Si la réponse immunitaire innée répond de façon précoce à l'intrusion du pathogène, elle reste néanmoins souvent insuffisante. Dans ce cas, un second type de réponse, la réponse adaptative prend le relais : plus spécifique que la réponse innée, elle permet l'éradication du micro-organisme et la mise en place d'une mémoire immunologique. Mais, dans les deux cas, le déclenchement de la réponse immunitaire nécessite la reconnaissance préalable du micro-organisme.

1. La reconnaissance du micro-organisme

Pour être déclenchée, la réponse immunitaire nécessite la reconnaissance de molécules du pathogène : il peut s'agir de molécules de surface ou internes à la cellule. La reconnaissance du micro-organisme s'effectue par des récepteurs distincts suivant qu'elle met en jeu la réponse innée ou adaptative : alors que ce sont les PRRs (« Pattern Recognition Receptors ») qui assurent la reconnaissance dans le cas de la réponse immunitaire innée, ce sont les récepteurs aux antigènes portés par les lymphocytes B et T qui l'assure dans le cas de la réponse immunitaire adaptative. Les deux ensembles de récepteurs permettent de répondre à l'extrême diversité du répertoire des molécules du pathogène.

1.1. La reconnaissance du micro-organisme par la réponse innée

La reconnaissance du micro-organisme par la réponse innée met en jeu des récepteurs nommés PRRs. Portés par diverses cellules de l'immunité innée (macrophages, cellules dendritiques...), les PRRs permettent la reconnaissance de divers motifs conservés retrouvés au sein de molécules caractéristiques des micro-organismes (Kumar *et al.*, 2009). Ces récepteurs reconnaissent par exemple le lipopolysaccharide (LPS) de surface caractéristique des bactéries à Gram négatif, ou l'acide lipotéichoïque, composant de surface des bactéries à Gram positif. Ce type de reconnaissance permet ainsi de discriminer les bactéries, les virus et les parasites via la reconnaissance de molécules présentes à leur surface (LPS,...) ou à localisation intracellulaire (acides nucléiques). Dans ce second cas, les récepteurs sont localisés à l'intérieur de la cellule et induisent des voies de signalisation impliquées dans la dégradation des micro-organismes. A ce jour, trois catégories de récepteurs de reconnaissance ou PRRs ont été décrits (tableau 1) : les récepteurs solubles (opsonines), les récepteurs

Tableau 1. Les différentes classes de récepteurs impliqués dans la reconnaissance directe des micro-organismes et leur fonction.

gpi : glycosylphosphatidyl inositol, osp : « outer surface protein », LPS : lipopolysaccharide, Ig : immunoglobuline, LTA : acide lipotéichoïque, Ox-LDL : LDL (« light density lipoprotein ») oxydé, NAG : N-acétylglucosamine.

Reconnaissance directe du ligand (PRR au sens strict)					
Fonction	Famille	récepteur	localisation	Ligands	Référence
Endocytose	Récepteurs à ancre glypiée ou ancre gpi (« gpi-linked receptors»)	CD14	Membrane	LPS, acide lipotéichoïque (LTA), protéine de surface de <i>B. burgdorferi</i> , peptidoglycane	(Taylor <i>et al.</i> , 2005)
	Récepteurs éboueurs (« scavenger receptors » ou SR)	SR-A (I/II)	Membrane	Ox-LDL, LPS, LTA, bactéries à Gram positif et à Gram négatif	(Areschoug, 2009)
		LOX-1	Membrane	Ox-LDL, bactéries à Gram positif et à Gram négatif	(Taylor, 2005)
		MARCO	Membrane	LPS soluble et bactéries à Gram positif et négatif	(Areschoug, 2009)
		CD36 (SR-B)	Membrane	LTA et lipopeptide diacylé (MALP-2)	(Areschoug, 2009)
		CLA-1 (SR-B)	Membrane	LPS	(Areschoug, 2009)
	Récepteurs de la famille des lectines (« C-type lectin family »)	Récepteur au mannose (« Mannose receptor » ou MR)	Membrane	Résidus mannose terminaux, β -glucanes, zymosan	(Kerrigan, 2009)
Dectin-1					
DC-SIGN					
Signalisation	TLR (« Toll-like receptors »)	TLR2 (+TLR1 ou TLR6)	Membrane	LTA, lipoprotéines, peptidoglycane, zymosan	(Kumar, 2009)
		TLR4 (+CD14 + LBP+MD2)	Membrane	LPS	
		TLR5	Membrane	Flagelline	
		TLR7,8,9	Cytosol	ARN double brin viral, ARN simple brin viral. TLR9 : lie l'ADN bactérien à motif CpG	
	NLR (« NOD-like receptors »)	NOD1 NOD2	Cytosol	Peptidoglycane, LPS	(Jeannin, 2008)
	RLH (« RIG1-like helicase »)	RIG1 Mda5	Cytosol	ARN double brin viral	
	Récepteurs cytosoliques à l'ADN	STING DAI	Cytosol	ARN double brin viral et bactérien	
Oponines	Collectines	MBL	Sécrété	Glycoconjugués microbiens, résidus mannoses terminaux	(Holmskov, 2003)
		SP-A SP-D	Sécrété Sécrété	LTA, peptidoglycane	
	Ficolines	H-ficoline L-ficoline	Sécrété Sécrété	NAG, peptidoglycane	(Holmskov, 2003)
		Pentraxines	CRP	Sécrété	
	SAP		Sécrété	LPS, zymosan (levure)	
	PTX3		Sécrété	OmpA, bactéries à Gram positif et à Gram négatif, zymosan (levure) et virus	

activant les voies de signalisation intracellulaire impliquées dans la réponse immunitaire et les récepteurs d'endocytose (Jeannin *et al.*, 2008).

Parmi les récepteurs solubles figurent entre autres la protéine liant le mannose (« mannose-binding protein ») ou MBP qui joue le rôle d'opsonine en facilitant la phagocytose de l'agent infectieux (Kerrigan & Brown, 2009).

Les récepteurs appartenant à la seconde catégorie sont, quant à eux, impliqués dans l'activation des cellules ayant rencontré un micro-organisme. Cette activation, induite suite à la reconnaissance, aboutit au déclenchement d'une voie de signalisation intracellulaire conduisant à la synthèse de diverses molécules effectrices. Ainsi, la famille des récepteurs de type Toll ou TLRs (« Toll-like receptors »), très étudiée, comprend près de 10 récepteurs chez l'Homme permettant la reconnaissance de diverses molécules bactériennes de surface ou intracellulaires (Figure 3) (Kumar *et al.*, 2009). Outre les TLRs qui sont des récepteurs transmembranaires, on compte des récepteurs cytosoliques à localisation intracellulaire comme la vaste famille des NLRs (« NOD-like receptors ») et divers autres récepteurs (RIG1, Mda5, DAI) impliqués dans la reconnaissance d'acides nucléiques viraux (Tableau 1).

La dernière catégorie comprend les récepteurs de surface (membranaires) exprimés par les cellules à forte activité d'endocytose, telles que les monocytes et les macrophages. Ces récepteurs parmi lesquels figurent la famille des lectines de type C (récepteur au mannose par exemple) et les récepteurs de type éboueur (« scavengers ») permettent l'internalisation des micro-organismes après leur reconnaissance (Kerrigan & Brown, 2009). Outre les récepteurs d'endocytose, d'autres types de récepteurs permettant une reconnaissance indirecte du micro-organisme sont impliqués dans la phagocytose. Il s'agit de récepteurs de surface pour des opsonines, des molécules capables de se fixer à la surface des bactéries, facilitant de ce fait leur internalisation (Tableau 2). Ainsi, le macrophage est capable de reconnaître, grâce à ses récepteurs, le fragment C₃b du complément (récepteur au complément CR1 pour « complement receptor 1 ») et le fragment Fc des immunoglobulines (récepteur reconnaissant la partie Fc des immunoglobuline ou RFc) qui recouvrent les bactéries suite à leur intrusion au sein de l'organisme (Taylor *et al.*, 2005).

1.2. La reconnaissance du micro-organisme par la réponse adaptative

La reconnaissance via la réponse adaptative met en jeu des récepteurs distincts que sont les récepteurs aux antigènes. Ces récepteurs qui sont situés à la surface des lymphocytes B (BCR pour « B-cell receptor ») et T (TCR pour « T-cell receptor ») permettent une reconnaissance assez fine et une distinction au-delà des grandes classes de micro-organismes en ciblant un pathogène spécifiquement. Ainsi, les lymphocytes B possèdent des anticorps membranaires ou sécrétés également nommés immunoglobulines capables de reconnaître des motifs structuraux assez spécifiques à un pathogène au sein d'une molécule : ce sont les antigènes. Le large répertoire des immunoglobulines permet de couvrir l'ensemble des variations antigéniques susceptibles d'être présentes grâce à la présence de domaines variables au sein du domaine de liaison à l'antigène ou domaine Fab (« Fragment antigen binding ») (Figure 4). Les récepteurs situés à la surface des cellules T permettent la reconnaissance d'antigènes qui sont associés à des molécules du CMH (« complexe majeur d'histocompatibilité »). Ce complexe CMH-peptide est porté par des cellules dites présentatrices d'antigène ou APC (« antigen presenting cell ») : il en est ainsi des cellules dendritiques douées d'activité phagocytaire et capables de dégrader le micro-organisme avant de présenter des peptides issus de la dégradation à des cellules T. Cette reconnaissance du complexe CMH-peptide associée à d'autres signaux permet l'activation des cellules T pour leur prolifération et leur différenciation en cellules T effectrices. Les cellules dendritiques,

Tableau 2. Les différentes classes de récepteurs impliqués dans la reconnaissance indirecte des micro-organismes et leur fonction.

LPS : lipopolysaccharide ; RFc : Récepteur au fragment Fc des immunoglobulines ; Ig : immunoglobuline ; MBP : « mannose binding protein » ; CR : récepteur au complément « complement receptor ».

Reconnaissance indirecte du ligand				
Famille	récepteur	localisation	Ligands	Référence
Récepteurs au complément (CR : « complement receptor »)	CR1 CR3 CR4	Membrane	C3b, C4b, C1q, MBP iC3b, β-glucanes, LPS iC3b, LPS	(Gasque, 2004)
Récepteurs au fragment Fc des immunoglobulines (RFc)	RFcγI, II, III RFcαI RFcε RFcη	Membrane	Fragment Fc des IgG Fragment Fc des IgA Fragment Fc des IgE Fragment Fc des IgG	(Jefferis, 2002)

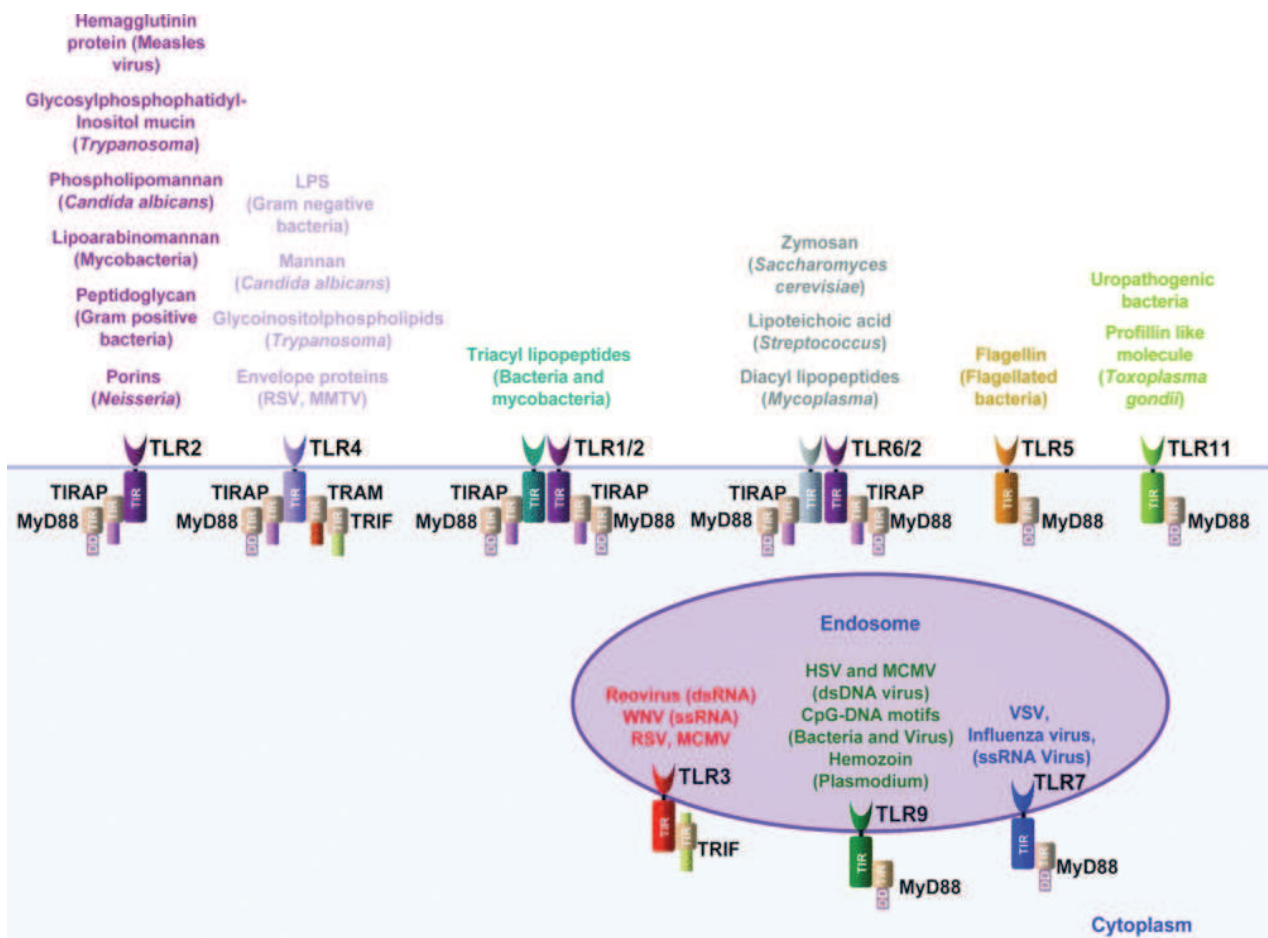


Figure 3. Les récepteurs de la famille Toll reconnaissent divers motifs présents sur les micro-organismes (Kumar *et al.*, 2009).

La famille Toll regroupe près de 10 récepteurs chez l'Homme (TLR11 est uniquement présent chez la souris) qui sont situés à la surface des cellules (TLR4, 5, 11 et TLR2 qui peut s'associer avec TLR1 ou TLR6) ou à localisation intracellulaire (cas des récepteurs TLR3, 7 et 9). Suite à la liaison d'une structure bactérienne reconnue ou PAMP, les récepteurs Toll recrutent des protéines adaptatrices pour initier la cascade de signalisation intracellulaire. TLR1, 2, 4 et TLR6 recrutent les protéines TIRAP et Myd88. TLR4 recrute en plus TRAM et TRIF. TLR5, 7, 9 et TLR11 recrutent Myd88 alors que TLR3 recrute TRIF.

TIRAP : « toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein » ; **TRAM** : « translocating chain-associating membrane protein » ; **TRIF** : « TIR domain-containing adapter-inducing interferon β », **DD** : « death domain » ; **TIR** : « Toll-interleukin 1 Receptor » ; **RSV** : « respiratory syncytial virus », **MMTV** : « mouse mammary tumour virus » ; **HSV** : « herpes simplex virus » ; **MCMV** : « mouse cytomegalovirus » ; **VSV** : « vesicular stomatis virus » ; **WNV** : « west Nile virus » ; **LPS** : lipopolysaccharide ; **Myd88** : « myeloid differentiation factor 88 ».

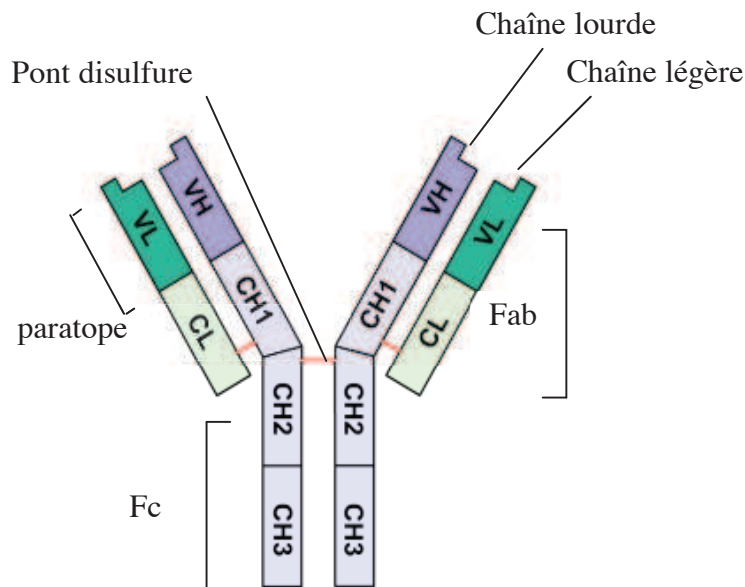


Figure 4. Structure des anticorps.

A. Structure d'un anticorps : L'anticorps se structure autour de quatre chaînes polypeptidiques : deux chaînes lourdes (H : « heavy ») et deux chaînes légères (L : « Light ») reliées entre elles par des ponts disulfures. Chaque chaîne comprend un ou plusieurs domaines constants (notés CH pour les chaînes lourdes et CL pour les chaînes légères) et un domaine variable (noté VH pour les chaînes lourdes et VL pour les chaînes légères). La reconnaissance avec l'antigène se fait au niveau des domaines variables (le terme de paratope désigne le site de reconnaissance associant le domaine variable d'une chaîne lourde à celui d'une chaîne légère). Une digestion enzymatique permet d'isoler le fragment Fc constitué par les fragments constants de la chaîne lourde non associés aux chaînes légères (ici CH2 et CH3) et le fragment Fab comprenant la chaîne légère (VL+CL) associé à une partie de la chaîne lourde (VH+CH1). Cette partie reconnaît l'antigène.

véritables sentinelles de l'immunité innée, sont ainsi capables d'initier la réponse adaptative en activant les lymphocytes T.

2. La conséquence de la reconnaissance du micro-organisme

La reconnaissance du micro-organisme, via les récepteurs, entraîne dans la cellule de l'immunité toute une série de modifications provenant de la transduction du signal au niveau intracellulaire. La transduction de ce signal, suite à l'activation du récepteur, se traduit notamment par l'induction de l'expression de certains gènes dont le produit de l'expression contribue à l'élimination du micro-organisme en cause via la mise en place de mécanismes bactéricides.

2.1. La réponse inflammatoire

Les cellules de l'immunité innée, activées après la reconnaissance du micro-organisme via leurs récepteurs, sécrètent de nombreuses molécules qui sont :

- des chimiokines ;
- des médiateurs lipidiques

De manière conjointe, ces deux types de molécules vont contribuer à l'établissement de la réponse inflammatoire pour contenir, combattre l'infection et réparer les tissus.

Appartenant à la vaste famille des cytokines, les chimiokines (cytokines chimio-attractantes) sont de petites protéines solubles (8-14 kDa) dont la fonction principale est l'attraction de cellules du système immunitaire (Zhang & An, 2007). Ainsi, au cours de l'inflammation, les chimiokines vont attirer de nombreux leucocytes au site de l'infection comme les neutrophiles (attirés par la chimiokine IL-8) et les monocytes (attirés par MCP-1). Les leucocytes circulants vont également mieux se fixer aux cellules endothéliales bordant les capillaires sanguins au site de l'infection. Cette fixation est due à l'augmentation de la synthèse de molécules d'adhérence par les cellules endothéliales induite par les cytokines IL-1, TNF α et IL-6 produites par les mastocytes et les macrophages. Certaines de ces cytokines, comme l'IL-6, peuvent stimuler l'activité microbicide des phagocytes (stimulation de l'explosion oxydative).

Les médiateurs lipidiques, principalement synthétisés par les mastocytes (et les macrophages au travers de réactions enzymatiques dégradant les phospholipides membranaires) vont avoir des effets sur la vasodilatation (prostaglandines PGE2, PGD2, PGI2), l'agrégation plaquettaire (thromboxane TXA2) et l'augmentation de la perméabilité capillaire (leucotriènes LTC4, LTD4 LTE4) (Serhan *et al.*, 2008).

La réponse inflammatoire va donc permettre l'afflux massif de leucocytes au site de l'infection de par la vasodilatation et surtout l'augmentation de la perméabilité vasculaire. Les mécanismes d'adhérence (adhérence par roulement ou « rolling ») et de pénétration de leucocytes dans les tissus suite au franchissement des vaisseaux sanguins (diapédèse) ont été décrits en détail (Vestweber, 2007) (Petri & Bixel, 2006). Les leucocytes arrivés au niveau du site infectieux peuvent alors contribuer à l'élimination du micro-organisme.

2.2. L'action du complément

Outre les leucocytes, des protéines plasmatiques vont également converger au site de l'infection. Certaines de ces protéines, connues sous le nom de protéines du complément et capables d'activer l'inflammation, vont également contribuer à l'élimination du micro-organisme.

Le complément comprend plus de 30 protéines plasmatiques synthétisées essentiellement par le foie (mais également par les monocytes et les macrophages). Ce système fonctionne par l'activation en cascade de ses composants via des séries de clivages protéolytiques en chaîne (Markiewski & Lambris, 2007).

Il existe trois voies distinctes par lesquelles le complément peut être activé à la surface du pathogène :

- la voie dite classique déclenchée par la liaison de la protéine C1q, première protéine de la cascade du complément, à des complexes antigène-anticorps.

- la voie des lectines liant le mannose est activée par la liaison de la protéine sérique MBP (« mannose-binding protein ») aux mannoses contenus dans les polysaccharides bactériens.

- la voie alterne, déclenchée lorsqu'un composant du complément activé spontanément se lie directement à la surface du pathogène (Murata & Baldwin, 2009).

Quelle que soit la voie empruntée, l'activation de la cascade du complément permet de générer les mêmes molécules effectrices. Ces molécules effectrices exercent leur effet sur les cellules de l'immunité pourvues de récepteurs au complément.

Ces effets sont de trois ordres :

- l'opsonisation : le composant C3b du complément qui se lie à la surface des bactéries stimule la phagocytose en jouant le rôle d'opsonine via sa fixation aux récepteurs du complément présents sur les macrophages.

- la lyse : le composant C5b du complément se fixe à la surface de la bactérie puis recrute C6, C7, C8 et finalement C9 qui se polymérise pour former un pore hydrophile dans la membrane plasmique bactérienne : l'ensemble, appelé complexe d'attaque membranaire ou CAM, désorganise l'équilibre osmotique de la bactérie (fuite d'eau et d'électrolytes) conduisant à sa lyse.

- le chimiotactisme : les composants C3a et C5a du complément, à l'image des chimiokines peuvent attirer des leucocytes (granulocytes neutrophiles et monocytes) au lieu de l'infection. Leur action est cependant plus large car ces composants peuvent stimuler la production de dérivés toxiques de l'oxygène chez les phagocytes professionnels et induisent la dégranulation des mastocytes (rôle d'anaphylatoxines).

2.3. La phagocytose

Les tissus de l'organisme hébergent un nombre important de cellules phagocytaires dont le rôle est de reconnaître puis de détruire les micro-organismes présents. Les cellules les plus actives sont les phagocytes dits « professionnels » (monocytes, macrophages, cellules dendritiques et polynucléaires neutrophiles). Parmi ceux-ci figurent les macrophages qui résident dans de nombreux tissus suite à une différenciation à partir de monocytes sanguins. Les macrophages sont concentrés en des lieux cibles de l'invasion bactérienne correspondant aux portes d'entrées fréquentes des micro-organismes. Cette omniprésence leur permet d'exercer un rôle de surveillance via l'aptitude à reconnaître puis à dégrader les micro-organismes ayant traversé les barrières épithéliales. Ce processus de dégradation dit de phagocytose a été étudié en détail.

La phagocytose est un processus dynamique durant lequel le micro-organisme après avoir été reconnu (PPRs) est internalisé puis finalement dégradé. L'activation des récepteurs de surface suite à la reconnaissance du micro-organisme conduit à de nombreux

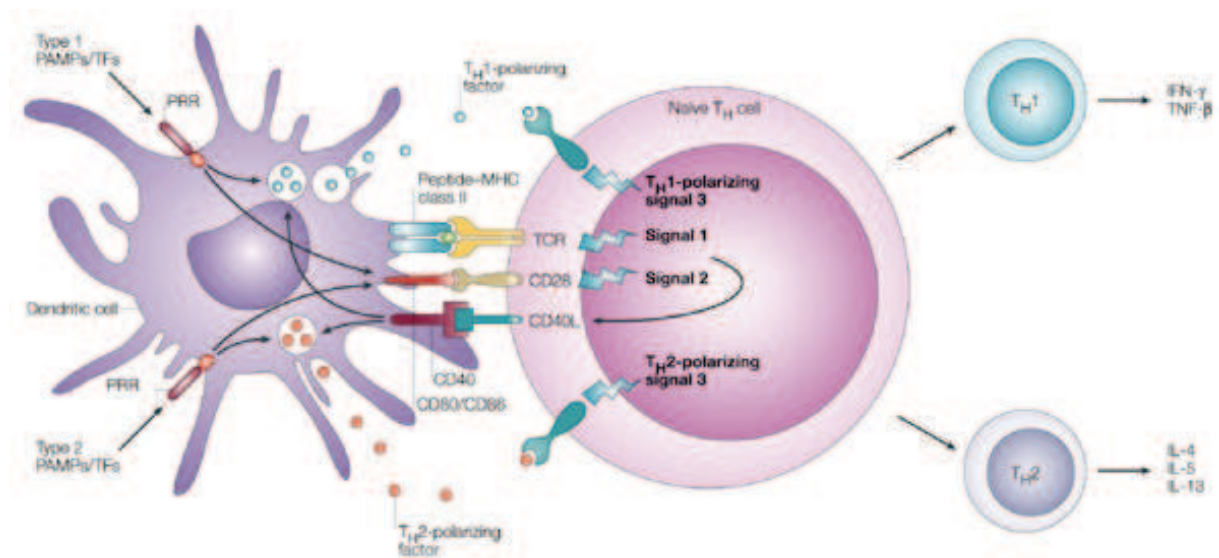


Figure 5. L'établissement d'une synapse entre les lymphocytes et les cellules dendritiques permet l'activation des lymphocytes T (Kapsenberg, 2003).

La synapse immune désigne le nom de la zone où s'établit le contact cellulaire. Différentes molécules entrent en jeu : le complexe TCR/CMHII-peptide constitue le signal 1 ; le second signal nécessaire à l'activation des cellules T met en jeu la liaison entre des molécules de co-stimulation CD80/CD86 exprimées par les cellules dendritiques et le récepteur CD28 situé sur les cellules T naïves. Enfin l'interaction entre des molécules d'adhérence ICAM-1 et LFA-1 stabilise le contact. Suite au contact, les cellules T naïves prolifèrent et se différencient en deux sous-populations de cellules T : les T_H1 et T_H2 suivant la nature des micro-organismes reconnus et présentés par la cellule dendritique et suivant la nature des cytokines produites par les cellules dendritiques et reconnues par la cellule T (signal 3).

PRR : « pathogen recognition receptor » ; **IFN** : « interferon » ; **TNF** : « tumor necrosis factor » ; **IL** : « interleukin » ; **PAMP** : « pathogen associated microbe pattern » ; **TF** : « tissue factor » ; **T_H** : « T helper ».

remaniements du cytosquelette à l'intérieur du phagocyte. Ceux-ci sont à l'origine de l'émission d'extensions cytosoliques ou pseudopodes qui viennent entourer la bactérie dans certains types de phagocytose (Ernst, 2000). Suite à la capture, le micro-organisme se trouve enfermé dans une vacuole intracellulaire nommée phagosome qui va subir une maturation distinguée par trois étapes : le phagosome précoce, tardif et le phagolysosome (Flannagan *et al.*, 2009). Durant la maturation, le phagosome qui fusionne avec des endosomes s'acidifie : on passe en effet d'un pH 6,1 à un pH 4,5 au cours du processus. La maturation culmine avec la fusion du phagosome et du lysosome aboutissant à la formation du phagolysosome au sein duquel le micro-organisme est dégradé. En effet, le lysosome contient de nombreuses enzymes lytiques dont le lysozyme capable de dégrader le peptidoglycane bactérien. Outre la présence d'enzymes lytiques, le phagolysosome est le siège d'autres mécanismes microbicides visant soit à empêcher la croissance du micro-organisme via la séquestration d'éléments essentiels comme le fer, soit à lyser le micro-organisme. Parmi les mécanismes visant à lyser le micro-organisme, on notera la contribution significative de l'explosion oxydative. Elle consiste en la génération de radicaux libres toxiques dérivés de l'oxygène (ROS : « reactive oxygen species ») ou de l'azote (RNS : « reactive nitrogen species ») synthétisés par deux complexes enzymatiques : la NADPH oxydase NOX2 et la NO synthase NOS2 respectivement. Les effets des radicaux toxiques s'exercent au niveau protéines, des lipides et de l'ADN ce qui touche directement au métabolisme et à la multiplication des cellules bactériennes.

2.4. La différenciation des lymphocytes

L'activation des récepteurs des lymphocytes conduit à deux types de réponse : une prolifération par division cellulaire (expansion clonale) et une différenciation donnant naissance à des lymphocytes effecteurs impliqués dans le processus d'élimination du pathogène et à des lymphocytes mémoires permettant de répondre plus efficacement et plus rapidement lors d'une seconde rencontre avec l'antigène. Prolifération et différenciation dépendent toutes deux de cytokines sécrétées et de molécules de surface. La différenciation d'une population particulière de cellules T, les cellules TCD4⁺ est essentielle dans le déclenchement de la réponse adaptative. En effet les cellules TCD4⁺ sont capables de reconnaître les antigènes présentés par les cellules dendritiques après leur rencontre avec l'antigène. Suite à la rencontre, les cellules T se différencient en cellules T_H1 ou T_H2 (figure 5) (Kapsenberg, 2003) suivant l'antigène présenté et les cytokines sécrétés au sein du foyer infectieux :

- la sous-population de cellules effectrices T_H1 est induite en présence de micro-organismes intracellulaires et induit une réponse immunitaire adaptative à médiation cellulaire. L'action des cellules T_H1 va s'exercer de deux manières : activation des macrophages et activation d'autres cellules à activité cytotoxique. Les cellules T_H1 activées sécrètent de nombreuses cytokines dont l'IL-2 qui contribue à la prolifération et à la différenciation d'une population particulière de lymphocytes : les lymphocytes TCD8⁺.

Suite à cette activation, les cellules T cytotoxiques peuvent déclencher la mort des cellules infectées leur ayant présenté l'antigène endogène (via CMHI) selon deux voies :

- la voie perforine-granzyme avec exocytose des granules lytiques (phénomène majeur) qui contiennent notamment la perforine et les granzymes A et B ;

- la voie des récepteurs de mort avec expression de ligands de récepteurs de mort .

Ces deux voies induisent principalement l'apoptose de la cible en mettant en jeu différentes voies biochimiques conduisant à la mort cellulaire programmée.

- la sous-population T_H2 est induite en présence de micro-organismes extracellulaires et induit une réponse immunitaire adaptative à médiation humorale. Le principal rôle des

lymphocytes T_{H2} est la mise en route d'une réponse adaptative humorale via la coopération avec les lymphocytes B. Cette coopération permet la production d'anticorps à même de répondre contre les pathogènes extracellulaires et leurs toxines.

Une fraction des lymphocytes va se différencier en cellules mémoires. Il s'agit de cellules à longue durée de vie qui persistent même après l'éradication de l'infection et la disparition de l'antigène au niveau des organes lymphoïdes, des muqueuses et de la circulation.

Une autre fraction de lymphocytes va se différencier en lymphocytes T régulateurs ou T_{H7}. Ces lymphocytes sont chargés de moduler la réponse immunitaire afin d'éviter un emballement du système et une réponse trop excessive risquant d'endommager des cellules du soi sans discrimination. Ces cellules régulatrices sécrètent des cytokines inhibitrices comme le TGF- β (Vignali *et al.*, 2008).

2.5. L'action des anticorps

Les anticorps ont deux domaines principaux :

- le fragment Fab (« antigen binding ») capable de fixer une partie d'un antigène (épitope);
- la partie Fc effectrice responsable des différents rôles joués par les anticorps.

Les anticorps exercent 3 fonctions essentielles pour lutter contre les effets délétères causés par les bactéries pathogènes (Casadevall *et al.*, 2004) : la neutralisation, l'activation du complément et l'activation des cellules.

2.5.1. Neutralisation

Les anticorps sont capables de fixer avec une très haute affinité l'antigène qu'elles reconnaissent grâce à leur partie Fab. Ainsi, en fixant certaines toxines bactériennes, les anticorps sont capables de neutraliser leur action. En effet, l'activité biologique de nombreuses toxines dépend de la liaison à des récepteurs situés sur leur cellule cible (cas des toxines ciblant les cellules du système nerveux). Certaines classes d'anticorps (IgG et IgA) se fixent directement sur les bactéries : ce faisant les anticorps gênent l'adhérence bactérienne aux cellules eucaryotes ainsi que leur entrée dans ces cellules. Les anticorps vont de ce fait protéger l'organisme contre l'effet délétère des bactéries et de leurs toxines.

2.5.2. Activation du complément

Comme nous l'avons déjà abordé, les complexes antigènes-anticorps sont capables d'activer la voie classique du complément. Cette activation du composant C1 du complément s'effectue via la partie Fc des anticorps de classe IgG et IgM. Cette fixation antigène/anticorps est essentielle et permet de diriger spécifiquement l'action du complément.

2.5.3. Activation des cellules

Les cellules de l'immunité sont pourvues de récepteurs aux fragments Fc des immunoglobulines. Ces récepteurs fixant diverses classes d'immunoglobulines activent, au sein de la cellule, des mécanismes effecteurs comme :

- la dégranulation des mastocytes (déclenchée par la fixation des IgE) responsable en grande partie de l'inflammation ;
- l'opsonisation déclenchée par les IgG, IgM ou IgA qui facilitent l'ingestion des micro-organismes par les phagocytes ;

- la cytotoxicité dépendante des anticorps. Les IgG sont capables de recouvrir les cellules infectées exprimant à leur surface des antigènes microbiens. Ces IgG stimulent les récepteurs RFc γ III des cellules NK mais aussi des éosinophiles et des macrophages qui conduisent à la destruction des cellules infectées.

III Les stratégies de survie des bactéries face à la réponse immunitaire de l'hôte

Face à la réponse de l'hôte, les bactéries pathogènes ont développé des stratégies permettant de résister à la réponse immunitaire :

- en restant dans des compartiments extracellulaires à l'intérieur de l'hôte tout en empêchant l'activation des mécanismes bactéricides de l'hôte (cas des pathogènes extracellulaires)

- en pénétrant dans les cellules de l'hôte pour s'y répliquer (cas des pathogènes intracellulaires). En l'absence de lésions des barrières épithéliales, les bactéries pathogènes ont développé de remarquables stratégies pour pénétrer dans l'organisme. A côté du cas rare de passage transcutané de la bactérie *Leptospira* (Vijayachari *et al.*, 2008) ou de la destruction des tissus de l'hôte (enzymes de dégradation, toxines, induction de l'apoptose), certaines bactéries contournent les barrières épithéliales et les muqueuses : ainsi *Salmonella* et *Shigella* passent à travers la barrière intestinale via les cellules M alors qu'*E. coli* (souche enthéropathogène ou EPEC) injecte des effecteurs pour rompre les jonctions serrées et s'imiscer entre les interstices laissés entre les cellules épithéliales (Gruenheid & Finlay, 2003) (Sousa *et al.*, 2005).

Après pénétration, un certain nombre de bactéries pathogènes persistent dans l'environnement extracellulaire où elles acquièrent l'essentiel de leurs nutriments pour la multiplication via la séquestration (capture du fer) et la destruction des tissus de l'hôte (destruction des cellules par des toxines).

1. Les stratégies de survie des bactéries à multiplication extracellulaire

Après leur entrée dans l'organisme, les bactéries pathogènes extracellulaires sont capables de survivre sans pénétrer dans les cellules de l'hôte. Pour persister dans cet environnement extracellulaire hostile, ces bactéries ont développé tout un arsenal afin d'éviter la reconnaissance par les anticorps de l'hôte, mais également de résister à l'activité bactéricide des phagocytes et à l'action du complément.

1.1. Evitement de la reconnaissance par le système immunitaire

Les protéines du complément, les anticorps ainsi que les nombreux récepteurs de l'immunité innée présents sur les cellules interviennent dans la détection précoce des bactéries pathogènes et leur élimination. Cependant, différentes stratégies ont été développées par les bactéries pour contrer cette reconnaissance : la dégradation, la fixation de régulateurs (inhibiteurs) ou la modification de structures reconnues par le système immunitaire.

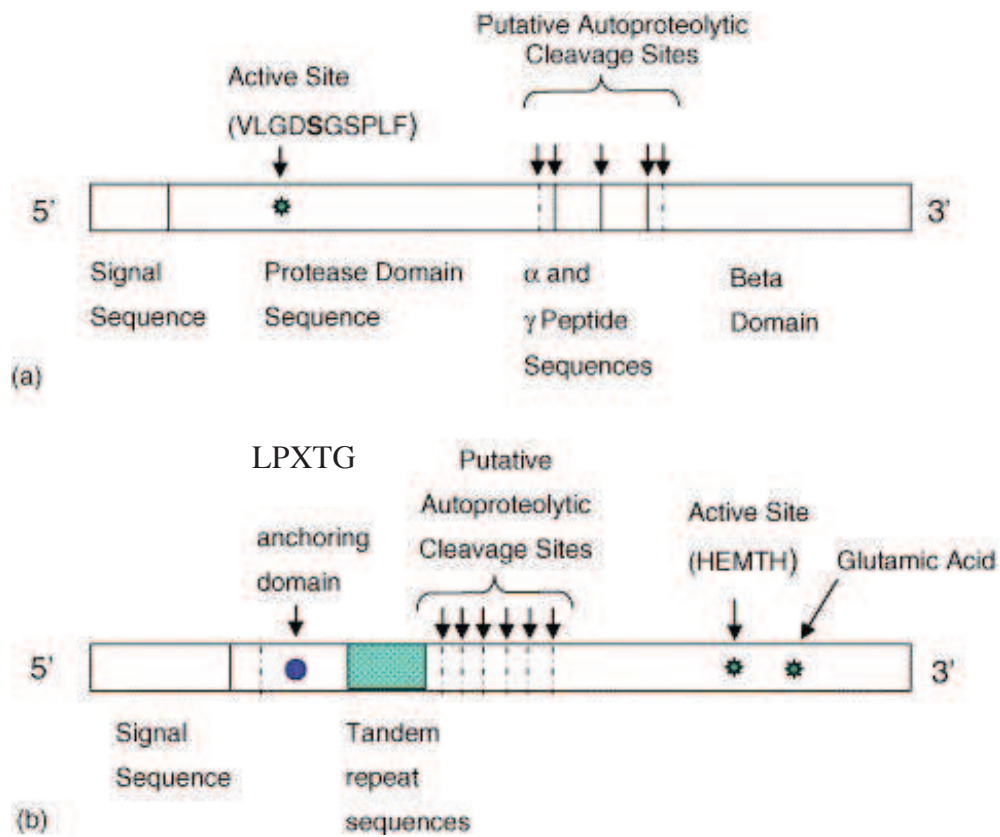


Figure 6. Représentation schématique de la structure des IgA1 protéases (Mistry & Stockley, 2006):

- a) structure d'une sérine protéase.
- b) structure des metallo-protéases de *Streptococcus* spp.

Code des acides aminés : V : valine ; L : leucine ; G : glycine ; D : acide aspartique ; S : sérine ; P : proline ; F : phénylalanine ; T : thréonine ; N : asparagine ; H : Histidine ; E : acide glutamique ; M : méthionine.

1.1.1. Synthèse d'enzymes de dégradation

1.1.1.1. Enzymes dégradant les anticorps : les IgA1 protéases

Les immunoglobulines humaines sont importantes pour empêcher les bactéries pathogènes d'envahir les tissus. Les immunoglobulines de l'isotype A (IgA) sont abondamment produites au niveau des muqueuses et en assurent la protection : elles sont notamment présentes dans les sécrétions corporelles comme la salive, la sueur et les larmes mais certaines sont également retrouvées dans le sang. Leur rôle principal consiste notamment à neutraliser les pathogènes ou leurs toxines avant que ceux-ci n'atteignent leur cible d'action que sont les cellules épithéliales bordant les muqueuses. Se présentant sous forme de dimère au niveau des muqueuses (forme monomérique dans le sang) les IgA sont réparties au sein de deux sous-classes connues à ce jour : les IgA1 et les IgA2.

Il a été découvert que nombre de bactéries pathogènes (*Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae* et *Neisseria meningitidis*) sont capables de dégrader les IgA1 via la sécrétion de protéases (Mistry & Stockley, 2006). Ces IgA1 protéases, découvertes pour la première fois en 1973, agissent en clivant les liens sérine-proline (S-P) et proline-thréonine (P-T) contenus dans la séquence TPPTSPSTPPTSPS des IgA1. A ce jour, trois types de protéases ont été répertoriés : les sérine-, les metallo- et les cystéine protéases suivant les résidus présents dans le site actif (Figure 6).

Les sérines protéases comprennent une séquence signal suivie du domaine protéase contenant le site actif en position N-terminale. A l'extrémité se trouve le domaine β où l'on retrouve 300 résidus conservés nécessaires à la translocation de la protéase. Une région centrale « linker » assure la connection entre les deux domaines.

Les metallo protéases possèdent également une séquence signal mais en position N-terminale suivie de près par un domaine d'ancrage au peptidoglycane (motif LPXTG, où X, acide aminé quelconque). Le site actif, séparé de la région N-terminale par une région comportant des répétitions en tandem, est quand à lui localisé en position C-terminale et contient un motif de liaison au zinc (HEMTH).

Faute de pouvoir faire des expérimentations sur l'homme (IgA1 est spécifique de l'homme) nombre de preuves indirectes suggèrent l'importance des IgA1 protéases dans la pathogénie. Ainsi, des anticorps anti-IgA1 protéases sont produits chez des patients durant la phase aiguë de l'infection. De plus, le taux d'anticorps chez ces patients est de loin supérieur à ceux détectés chez les porteurs sains (c'est-à-dire hébergeant la bactérie mais ne développant aucun symptôme). Ceci suggère que les IgA1 protéases seraient un facteur de virulence essentiel à l'invasion bactérienne en intervenant lors de la phase de colonisation.

Le rôle de ces protéases pourrait aller plus loin que la simple neutralisation de l'action des immunoglobulines. En effet, la dégradation des IgA1 par ces protéases aboutit au clivage de l'immunoglobuline au niveau de la région charnière de l'anticorps libérant ainsi les fragments Fab impliqués dans la reconnaissance du pathogène ou de la toxine et le fragment Fc qui est essentiel à l'action de l'anticorps car reconnu entre autre par les phagocytes et permettant l'opsonisation. Ceci permettrait à la bactérie d'être recouverte par des fragments d'anticorps Fab seuls sans la partie effectrice Fc. Ces anticorps rendus inactifs, serviraient à masquer les épitopes ou motifs moléculaires reconnus par des anticorps intacts ou les récepteurs de phagocytes. De ce fait, via ce mécanisme, la bactérie pourrait échapper à la reconnaissance et donc à la surveillance immunitaire.

1.1.1.2. Enzymes dégradant des protéines du complément

Le complément, activé en quelques secondes suite à l'intrusion du pathogène, est capable de se fixer à la surface des bactéries pour induire une lyse directe (formation d'un pore membranaire par les protéines du complément) ou indirecte (reconnaissance par les récepteurs au complément du phagocyte).

Vu l'importance des protéines du complément dans la réponse immunitaire, l'inactivation ou la neutralisation de ces protéines est une stratégie intéressante développée par certains micro-organismes. Ainsi, les streptocoques du groupe B synthétisent une endopeptidase de surface ScpB qui est capable de cliver et donc d'inactiver la protéine C5a, ce qui lui confère un avantage lors de la colonisation des muqueuses. D'autres protéases sont capables de dégrader les protéines du complément C1q, C3, C4 et le complexe C5-C9.

1.1.2. Protection par la fixation de régulateurs du complément

De plus, il semble que la bactérie *Streptococcus* est capable d'inactiver C5a par d'autres moyens que le clivage. En effet, elle possède une protéine de surface Plr (« Streptococcal Plasmin receptor ») fixant la protéine du complément C5a avec une haute affinité et neutralisant de fait son action (Zipfel *et al.*, 2007).

Certaines bactéries sont capables de fixer à leur surface des protéines régulatrices du complément qui inhibent l'action de certaines protéines du complément. Les régulateurs liés sont le facteur H, et les protéines voisines (le facteur « H-like » (CFHL-1), le facteur relié au facteur H (« factor H-related ou CFHR-1 ») et la C4BP (« C4 binding protein »). Le facteur H qui peut être capté par *S. pyogenes* et *S. pneumoniae* agit sur la dissociation des C3/C5 convertases alterne et comme cofacteur du facteur I dans l'inactivation de la protéine C3b. La C4BP lie et inactive la fraction C4b du complément. L'inactivation de C3b et de C4b a pour conséquence d'empêcher la génération de la C3 convertase lors de la cascade du complément et donc la formation du pore conduisant à la lyse du micro-organisme et l'opsonisation par C3b. Les streptocoques du groupe A auxquels appartient *S. pyogenes* expriment aussi la protéine M qui est capable de lier les régulateurs CFH, CFHL1, CFHR3, C4BP. La protéine M présente également une extrême variation dans sa partie N-terminale dont le rôle pourrait servir à échapper à la reconnaissance par les anticorps du système immunitaire.

La neutralisation de l'action du complément passe également par la synthèse d'inhibiteur du complément par la bactérie. Ainsi *Staphylococcus* est capable de sécréter la protéine de 10 kDa SCIN (« staphylococcal complement inhibitor ») qui bloque les trois voies d'activation du complément.

1.1.3. Structures de surface protectrices

1.1.3.1. La synthèse d'une capsule faiblement immunogène

Certaines bactéries pathogènes sont recouvertes d'une enveloppe externe que l'on nomme capsule. A l'exception de certaines espèces de *Bacillus* (notamment *Bacillus anthracis*) dont la capsule est constituée de polypeptides formés d'un seul acide aminé (acide D-glutamique), la capsule bactérienne est de nature polysaccharidique. La nature des sucres qui la composent et leur mode de liaison peuvent varier au sein d'une même espèce. La capsule représente, à l'instar des autres molécules de surface bactériennes, la première interface entre la bactérie et son hôte.

Certaines capsules utilisées en vaccination (vaccins polysaccharidiques en particulier contre *S. pneumoniae* et *H. influenzae*) sont suffisamment immunogènes pour permettre la fixation d'anticorps (opsonisation) et l'activation du complément aboutissant à la lyse de la bactérie. Mais certaines bactéries pathogènes comme *N. meningitidis* ont développé des polysaccharides composant leur capsule de telle manière qu'ils fixent moins les anticorps et qu'ils n'activent pas le complément (voie alterne non déclenchée). De telles bactéries arrivent, de ce fait, à survivre dans le milieu extracellulaire (Comstock & Kasper, 2006).

Le rôle des capsules en tant que facteur de virulence a été mis en évidence chez bon nombre de bactéries pathogènes pour l'homme comme *H. influenzae*, *N. meningitidis*, *E. coli*, *K. pneumoniae* et les streptocoques du groupe B. Le plus ancien exemple de bactérie capsulée connu est *S. pneumoniae* dont le rôle des capsules dans la virulence a été très tôt envisagé. Dès 1928, Griffith a montré qu'une souche de *S. pneumoniae* mutante non encapsulée ne peut plus induire de septicémie mortelle chez la souris.

Ce rôle dans la pathogénie pourrait trouver son origine au niveau écologique car la capsule protégerait la bactérie vis-à-vis de la fixation de bactériophages mais également de nombreux prédateurs de l'environnement pouvant effectuer la phagocytose comme les protozoaires. En outre, elle permet une protection contre les agents chimiques ou physiques comme la dessiccation, les chocs thermiques, les variations de pH et autres sources de stress bactériens. Le rôle de ces capsules dans la pathogénie a été étudié en détail. Certaines de ces capsules empêchent la phagocytose et, de plus, sont faiblement immunogénique. Au delà de la barrière physique qu'elle constitue, cette propriété particulière de la capsule est attribuable au fait que certaines d'entre elles sont constituées de polysaccharides retrouvés chez l'hôte, ce qui induit une faible reconnaissance par les anticorps. Ainsi les capsules de *N. meningitidis* du groupe B contiennent de l'acide sialique, une molécule que l'on retrouve habituellement chez l'Homme. Un autre exemple peut être fourni par la capsule de la bactérie *S. pyogenes* qui contient de l'acide hyaluronique, une molécule habituellement retrouvée dans la matrice extracellulaire chez l'Homme.

Mais le mimétisme moléculaire peut aller plus loin et concerner la structure des polysaccharides de la capsule. Ainsi chez *N. meningitidis*, la différence entre les capsules des méningocoques du groupe B faiblement immunogènes et celles des méningocoques du groupe C qui elles sont fortement immunogènes et sont utilisées en vaccination tient à la nature de liaison entre les polymères d'acide sialique (liaisons α -2-9 entre les homopolymères d'acide sialique des méningocoques du groupe C contre liaisons α -2-8 pour les méningocoques du groupe B). La faible immunogénicité des capsules des méningocoques du groupe B pourrait provenir du fait qu'un tel agencement des sucres mimerait la structure des glycoprotéines de tissus cérébraux fœtaux chez l'humain.

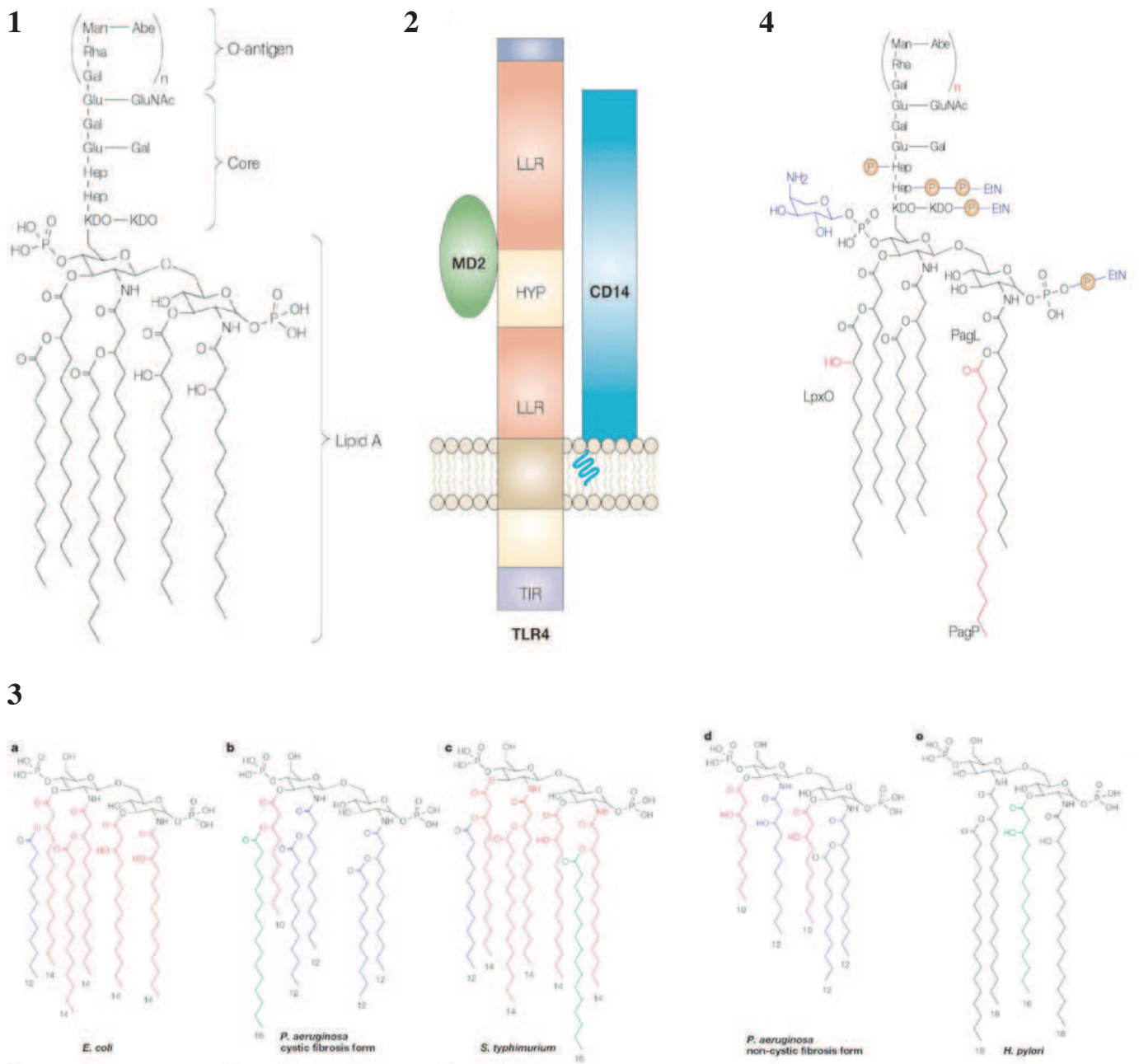


Figure 7. Les modifications du lipopolysaccharide bactérien ou LPS (Miller *et al.*, 2005).

1. Structure du LPS : le lipopolysaccharide bactérien ou LPS comprend le lipide A (endotoxine), le cœur (« core») oligosaccharidique et l'antigène O.

2. Le récepteur TLR4-MD2-CD14 reconnaissant le LPS. TLR4 comprend différentes régions : **LRR** : « leucine riche repeat » ; **HYP** : « hypervariable region » et le domaine **TIR** (« Toll/Interleukin-1 receptor (TIR) domain ») intracellulaire.

3. La diversité de la structure du lipide A chez les bactéries gram négatives. **a**) LPS hexaacylé de *E. coli* ; **b**) de *P. aeruginosa*, **c**) LPS heptaacylé de *Salmonella*, **d**) LPS pentaacylé de *P. aeruginosa*, **e**) LPS tetraacylé de *H. pylori*.

4. Les modifications du lipide A de *Salmonella*. Les modifications médiées par PhoP sont en rouge et celles par PmrA/B sont indiquées en bleu. **KDO** : « 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid » ; **EtN** : ethanolamine ; **Gal** : galactosamine ; **Rha** : rhamnose ; **Man** : mannose ; **Glu** : glucose ; **GluNac** : N-acétyl-glucosamine ; **Hep** : heptose ; **Abe** : abequeuse ; **HYP** : « hypervariable region » ; **LLR** : leucine riche repeat ; **TIR** : « Toll/Interleukin-1 receptor domain ».

1.1.3.2. Modification du LPS

Chez les bactéries à Gram négatif, la couche de peptidoglycane est mince et recouverte d'une seconde membrane ou membrane externe. Au niveau de la membrane externe, se trouve une macromolécule complexe : le LPS (lipopolysaccharide) qui peut être reconnu par le système immunitaire. Le LPS est reconnu par le récepteur TL4 et initie divers éléments de la réponse immune : il est à l'origine de l'activation des macrophages, des monocytes, des polynucléaires neutrophiles et des cellules endothéliales. Cette activation entraîne la libération de cytokines pro-inflammatoires IL1, IL6, IL8, TNF α , de radicaux libres, de prostaglandines E2 et de facteurs activant les plaquettes (PAF). De plus, il y a activation du complément.

Le LPS est une macromolécule complexe (Miller *et al.*, 2005). Elle se compose d'une partie externe de nature polysaccharidique et d'une partie interne de nature lipidique nommé lipide A. La fraction glucidique comprend deux régions, une partie qui reste constante dans l'espèce ou noyau (ou coeur oligosaccharidique) et composée d'une dizaine de sucres à structure non répétitive et une partie plus superficielle faite de la répétition de sous-unités saccharidiques nommée antigène O. Les modifications concernant le LPS chez les bactéries pathogènes concernent essentiellement le lipide A (Roy & Mocarski, 2007).

La modification de la structure du lipide A s'avère être une stratégie intéressante développée par certaines bactéries pour ne pas être détectée par le système immunitaire. En effet, le lipide A est reconnu par le récepteur de l'immunité innée qui fonctionne sous forme de complexe avec les protéines MD2 et CD14. Ce mécanisme de reconnaissance est parmi les plus connus et les plus étudiés et conduit à l'enclenchement d'une voie de signalisation pour induire l'expression des gènes codant pour des cytokines inflammatoires et pour l'interféron.

Des études se focalisant sur la voie de signalisation de TLR4 indiquent que la longueur et le nombre des chaînes acyles du lipide A jouent sur la stimulation du récepteur (Figure 7). Ainsi, le lipide A hexaacylé retrouvé chez *E.coli* avec des chaînes contenant de 12 à 14 atomes de carbone stimule fortement la voie TLR4. Par contre, le lipide A de la bactérie *Helicobacter pylori* ne stimule que faiblement la voie TLR4, ceci s'expliquant en partie par un nombre plus réduit de chaînes acylées (chaîne tétraacylée) et la variation dans la longueur des chaînes (16 à 18 atomes de carbones contre 12 à 14 chez *E. coli*). L'observation attentive de la structure d'autres lipides A retrouvés chez les bactéries pathogènes telles que *Legionella pneumophila*, *Yersinia pestis* et *Francisella spp.* permet de dire que la structure ne stimulant que faiblement le TLR se caractérise par une faible acylation (présence de 4 à 5 chaînes acylées) et l'allongement de la chaîne carbonée (16 à 18 atomes de carbones). Mais le cas le plus intéressant se trouve chez la bactérie *Salmonella* (Miller *et al.*, 2005). Cette bactérie est capable de modifier la structure du lipide A en fonction de signaux extracellulaires perçus via des senseurs de systèmes à deux composants : le système PhoP/PhoQ impliqué dans la virulence de *Salmonella* et le système PmrA/PmrB. Ces systèmes induisent des modifications du lipide A en fonction de signaux perçus comme la concentration en antibiotiques, en calcium et en magnésium dans le milieu. La voie de signalisation induite par le système PhoP/PhoQ joue sur l'expression des gènes codant pour les enzymes PagP, PagL et LpxO impliquées dans l'acylation, la désacylation et l'hydroxylation du lipide A. D'autres modifications sont observées comme l'addition de palmitate, d'aminoarabinose et de phosphoéthanolamine au lipide A.

E. coli 88-L^{*}Q^{*}R^{*}I^{*}R^{*}E^{*}L^{*}T^{*}V^{*}O^{*}A^{*}S^{*}T^{*}G
H. pylori 88-L^{*}D^{*}T^{*}V^{*}K^{*}V^{*}A^{*}T^{*}Q^{*}A^{*}A^{*}Q^{*}D

Figure 8. Domaine de la flageline chez *E. coli* reconnue par TLR5 et superposition à la portion de séquence de la flageline chez *H. pylori* (Roy & Mocarski, 2007).

* : résidus critiques pour la reconnaissance par TLR5. Les lettres rouges indiquent qu'il y a des différences dans les acides aminés expliquant la non détection par TLR5.

1.1.4. Modification de la flagelline

Le flagelle bactérien est un long et fin filament d'environ 20 nm d'épaisseur et de longueur variable que l'on peut observer en microscopie électronique à la surface de certaines cellules bactériennes. Pouvant représenter 3 à 10 fois la longueur de la cellule bactérienne, le flagelle s'avère essentiel au pouvoir pathogène de certaines bactéries du fait de ses nombreux rôles dans la mobilité bactérienne mais aussi dans l'adhérence aux cellules hôtes. Le flagelle pourrait également permettre la sécrétion de facteurs de virulence comme la phospholipase YplA associée à la virulence de la bactérie *Yersinia enterocolitica* (Young *et al.*, 1999).

Les analyses structurales poussées ont montré que la partie externe du flagelle ou filament est un tube creux constitué par une seule protéine : la flagelline. La flagelline est une protéine dotée d'un pouvoir antigénique puissant. Cette protéine est reconnue par le récepteur TLR5, reconnaissance qui s'exerce au niveau de la région N-terminale conservée de la flagelline (Andersen-Nissen *et al.*, 2005).

Malgré la conservation de cette protéine, un polymorphisme au niveau de la séquence N-terminale reconnue par le TLR5 est observé chez certaines bactéries pathogènes. Notamment, ce polymorphisme en acides aminés dans le domaine N-terminal est observé chez des protéobactéries pathogènes connues pour induire une faible signalisation de TLR5. Plusieurs de ces protéobactéries colonisent l'épithélium des muqueuses où TLR5 est présent sur la face basolatérale des cellules eucaryotes hôtes. De ce fait, les dommages ou l'invasion des tissus épithéliaux sont immédiatement détectés par les récepteurs TLR5.

Aussi, bon nombre de ces pathogènes se sont adaptés et sont capables d'éviter cette détection. Par exemple, chez *Helicobacter pylori* qui ne stimule pas TLR5 et TLR4, il y a une variation au niveau de la séquence N-terminale de la flagelline (Figure 8). D'autres pathogènes affectant les muqueuses diminueraient tout simplement l'expression du gène de la flagelline après l'entrée dans l'hôte.

1.2. Evitement de l'ingestion par les phagocytes : l'antiphagocytose

Si la modification des structures de surface reconnues par les récepteurs de l'immunité innée se révèle être une stratégie intéressante elle n'est pas l'apanage de toutes les bactéries pathogènes. De plus, les bactéries extracellulaires doivent faire face à l'action des phagocytes qui sont présents au niveau des tissus et dans le sang. La stratégie consiste alors à empêcher la capture par ce type de cellule.

Les phagocytes professionnels que sont les neutrophiles et les macrophages utilisent la phagocytose pour capturer, internaliser puis détruire les bactéries pathogènes qui ont été reconnus par les récepteurs situés à leurs surface. La fixation de la bactérie à ces récepteurs (récepteurs aux opsonines ou récepteurs d'endocytose) déclenche dans le phagocyte toute une série de voies de signalisation qui vont induire des modifications du cytosquelette d'actine pour internaliser la bactérie mais aussi des voies de dégradation. Les bactéries pathogènes ont su tirer parti de ces voies de signalisation et sont capables de paralyser les phagocytes dès la reconnaissance pour empêcher leur capture. La paralysie des phagocytes au-delà de son impact sur l'immunité cellulaire, empêche le développement d'une réponse adaptative initiée par les phagocytes suite à la présentation des fragments antigéniques aux lymphocytes. L'une des bactéries pathogènes parmi les plus étudiées à ce sujet est sans doute la bactérie *Yersinia pestis*. Causant des symptômes gastro-intestinaux et agent de la peste, cette bactérie doit traverser la barrière intestinale via les cellules M avant d'atteindre le milieu interstitiel (ou matrice extracellulaire) où se trouvent de nombreux phagocytes chargés de la protection des muqueuses.

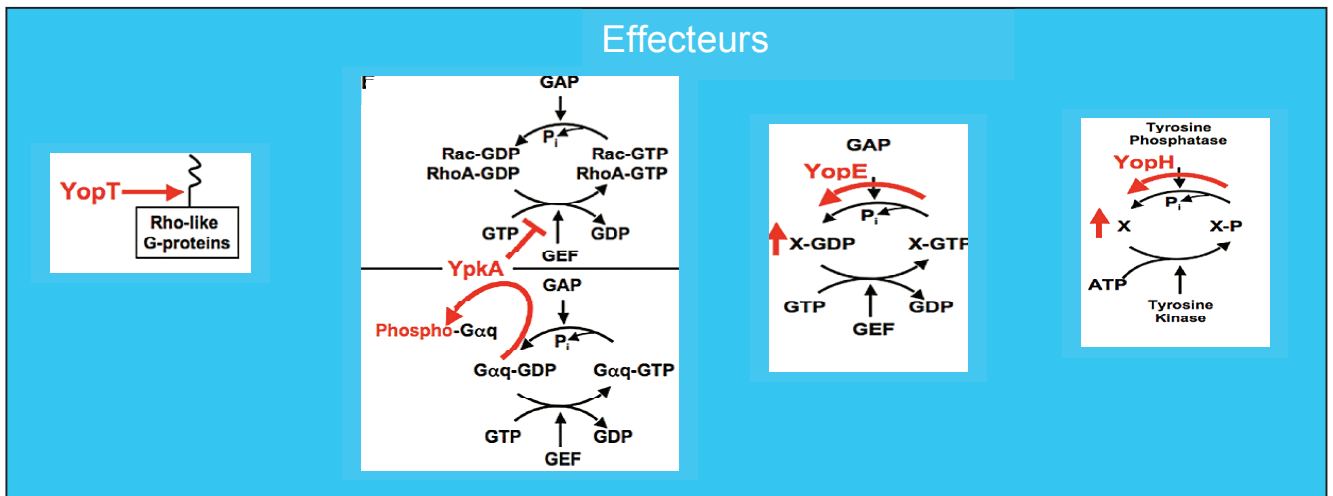
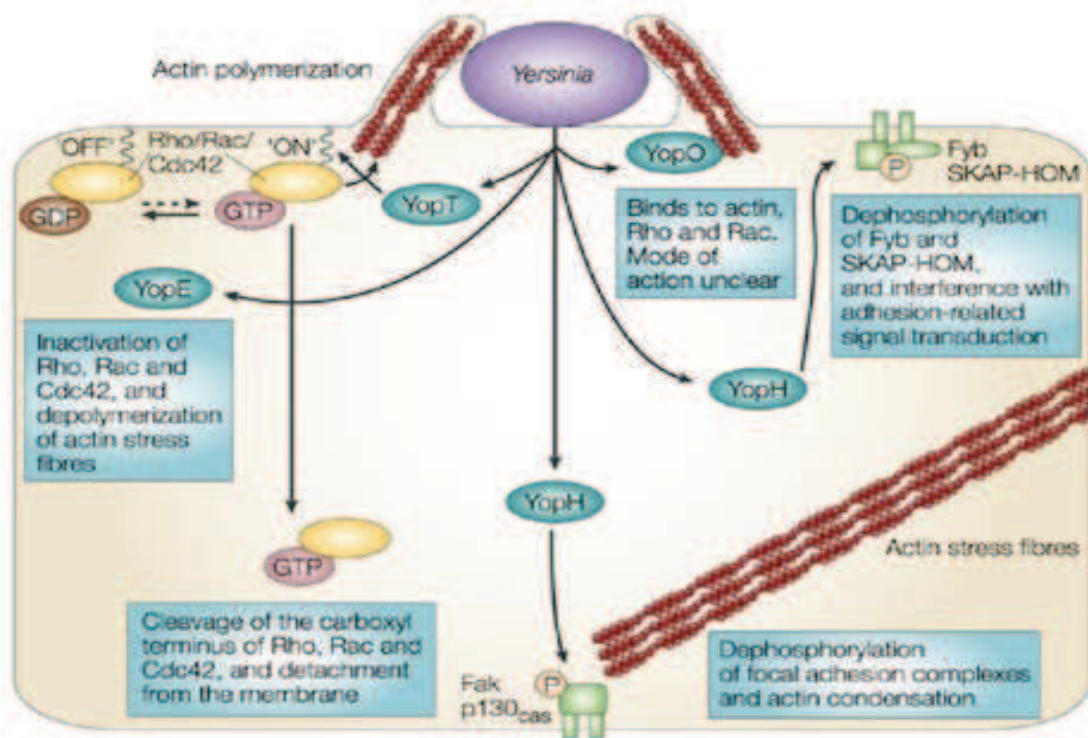


Figure 9. Les effecteurs de *Yersinia* impliqués dans l'inhibition de la phagocytose (Cornelis, 2002) .

Les effecteurs YopE, YopT et YopO (YpkA) inactivent les protéines G (de la famille Rho) en jouant sur la liaison du GTP (YopE et YopO) ou sur la localisation (YopT). Ceci a pour conséquence la dépolymérisation des filaments d'actine. YopO interfère également avec l'activation de Gαq par phosphorylation. YopH déphosphoryle les protéines du complexe d'adhésion focal et donc inhibe les voies de signalisation déclenchant la phagocytose.

En bas, sont représentés les mécanismes d'actions des effecteurs (Trosky *et al.*, 2008) : YoH est une tyrosine phosphatase qui déphosphoryle des cibles notées X (X représente les substrats p130Cas, FAK, paxillin, Lck, Fyb et SKAP-HOM déphosphorylés par YopH). YopE active les petites protéines G incluant Rac, RhoA et CDC42. YopO (YpkA) a un domaine GDI (« guanine nucleotide dissociation inhibitor ») qui bloque empêche l'activation des protéines G par les facteurs d'échanges. La modification de Gαq par sa phosphorylation via YopO résulte en la non-fixation du GTP

Cependant, *Yersinia* est capable d'éviter son internalisation par les phagocytes après sa fixation sur les récepteurs de surface de son hôte (intégrine $\beta 1$ à la surface du phagocyte). Pour cela elle est capable de sécréter des protéines effectrices directement dans le cytoplasme du phagocyte. Ces effecteurs agissent de manière très précoce en bloquant les voies de signalisation conduisant aux réarrangements du cytosquelette permettant la capture puis l'internalisation du pathogène. Suite au contact avec la cellule phagocytaire, *Yersinia* injecte divers effecteurs (Figure 9) connus sous le nom de protéines Yops (« Yersinia Outer Proteins »). YopT, YopH, YopE et YopO participent à l'inhibition de la phagocytose et ce de diverses manières.

L'effecteur YopH délivré par *Yersinia* agit de manière précoce pour empêcher le déclenchement de la voie de signalisation dépendante de l'intégrine $\beta 1$ conduisant à l'ingestion de la bactérie. YopH se compose d'un domaine N-terminal assez particulier lui permettant de reconnaître les phosphotyrosines des protéines cibles qu'elle va déphosphoryler grâce à son activité tyrosine phosphatase située dans le domaine C-terminal. Suite à l'engagement de l'intégrine YopH est capable de déphosphoryler les protéines d'adhésion focale FAK (« focal adhesion kinase ») et p103^{cas} mais aussi SKAP-HOM (Celli & Finlay, 2002) (Trosky *et al.*, 2008) (Cornelis, 2002) (Shao, 2008) (Matsumoto & Young, 2009) et Fyb. Les complexes d'adhérence focaux qui se forment suite à l'engagement de l'intégrine à son ligand sont très bien décrits chez les cellules eucaryotes. Ce complexe qui se forme au voisinage de la zone de contact entre l'intégrine et son ligand rassemble au niveau du cytoplasme des protéines du cytosquelette telles que l'actine, la taline, la paxilline et des protéines participant au remaniement du cytosquelette telles que la PI3 kinase et la protéine de 130 kDa associée à crk ou p130Cas. On y trouve également la kinase FAK qui est capable de phosphoryler des résidus tyrosines sur les protéines du cytosquelette. L'engagement de ces protéines suite à leur activation est responsable de l'activation de voies de signalisation intracellulaires induisant l'expression de gènes conduisant entre autres à des réarrangements du cytosquelette que l'on peut observer lors des processus cellulaires divers tels que la migration ou l'émission de pseudopodes à la phagocytose.

Les autres effecteurs, YopT, YopE et YopO agissent au niveau du cytosquelette sur la polymérisation de l'actine. Pour cela elles agissent sur les petites protéines G qui contrôlent la polymérisation de l'actine. L'activité de ces protéines G est finement régulée par les facteurs d'échange ou GEF (activation) et par les GAP (inactivation).

Ainsi, parmi les effecteurs sécrétés par *Yersinia* dans le phagocyte, la protéine YopT est une cystéine protéase clivant un site proche de l'extrémité C des petites protéines G RhoA, Rac1 et Cdc42. Le clivage à ces sites enlève le groupe prenyl ancrant les protéines G à la membrane cellulaire. Le changement de localisation des protéines G a pour conséquence une inhibition de leur fonction et donc une altération de l'assemblage de l'actine (Knodler *et al.*, 2001).

YopE possède un domaine régulateur GAP en C-terminal partageant une forte similarité avec les domaines N-terminaux des protéines ExoS et SptP de *P.aeruginosa* et de *S. Typhi*. Elle inactive les protéines G similaires à RhoA comme Rac, Cdc42 et RhoA qui participent à l'assemblage du cytosquelette d'actine : leur inactivation conduit à la dépolymérisation des fibres d'actine dans la cellule cible.

YopO (YpkA) est une sérine thréonine kinase agissant sur les protéines G. Cette protéine possède un domaine GDI (« guanine nucleotide dissociation inhibitor ») pouvant lier RhoA et Rac1 et les inactiver en inhibant l'échange de GTP en GDP par des facteurs d'échange. Ceci empêcherait la formation des fibres d'actine formant les pseudopodes nécessaires à la capture des bactéries. YopO est également capable d'inactiver G α q, une protéine G, par phosphorylation du résidu sérine en position 47 (Ser47) ce qui aurait pour conséquence d'inactiver les voies de signalisation, dont les voies dépendantes de RhoA.

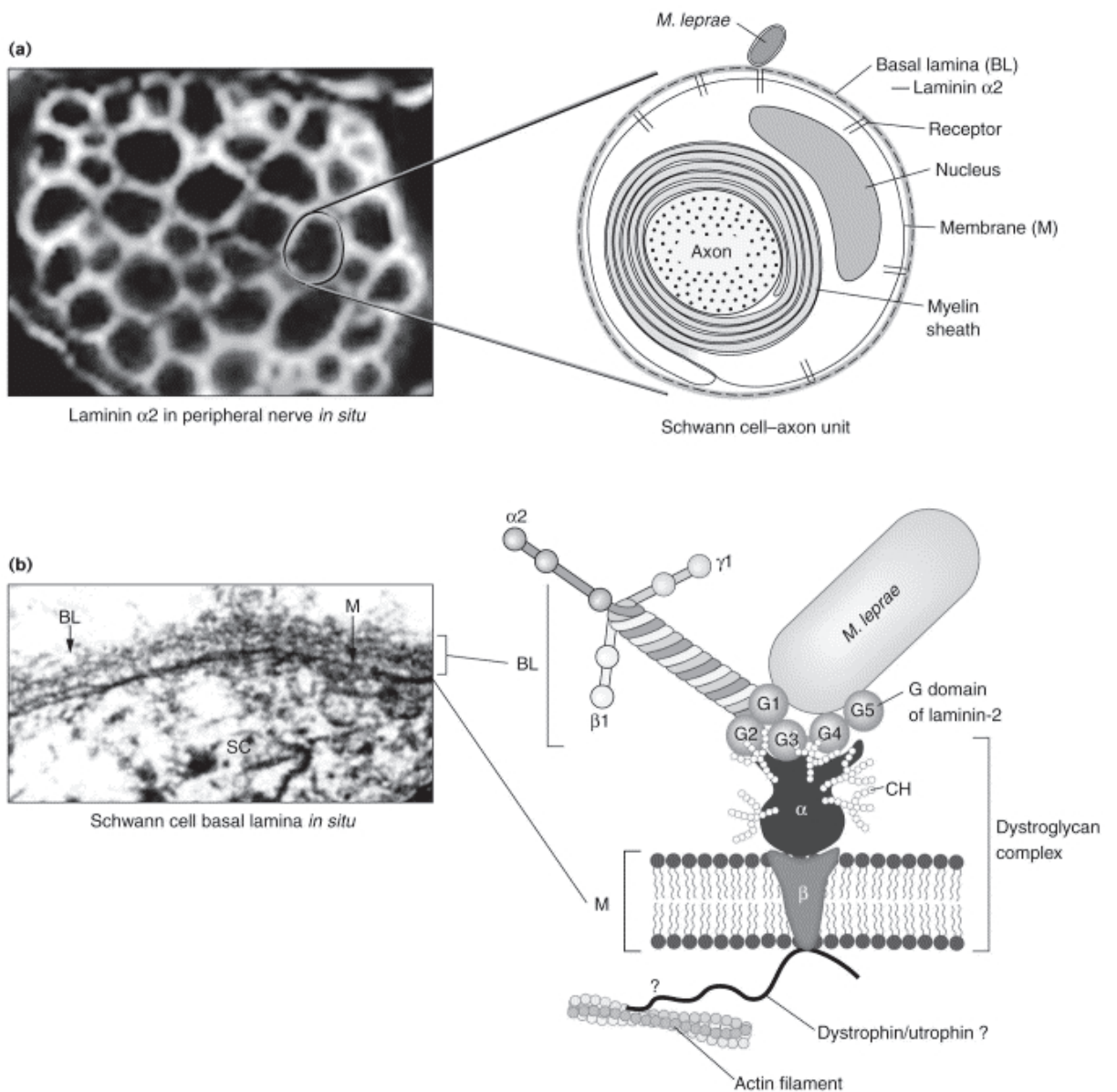


Figure 10. L'interaction entre *Mycobacterium leprae* et les cellules de Schwann met en jeu la laminine α -2 (Rambukkana, 2001).

(a) photo de microscopie d'une coupe transversale de nerf sciatique révélant par marquage à la fluorescence l'expression de la laminine α -2 autour de cellules de Schwann.

(b) Modèle représentant l'interaction entre le domaine G de la laminine exprimée par *M. leprae* et l' α -dystroglycane présente au niveau des cellules de Schwann qui permet l'interaction entre la cellule bactérienne et son hôte.

Mais l'inhibition de la phagocytose ne s'arrête pas seulement à l'inactivation de protéines intervenant de manière précoce. D'autres protéines intervenant dans la voie de signalisation peuvent être ciblées par les bactéries pathogènes comme c'est le cas pour les souches d'*E. coli* enthéropathogènes (ou EPEC). Ces bactéries responsables de diarrhées, empêchent leur capture par les macrophages en inactivant le signal de phagocytose PI3K-dépendant qui est essentiel à la polymérisation de l'actine F (Dean *et al.*, 2005) (Celli *et al.*, 2001) (Dean & Kenny, 2009) (Marches *et al.*, 2008).

1.3. Conclusion

Ainsi, certaines bactéries, suite à leur intrusion dans l'organisme, peuvent survivre dans l'hôte en restant dans le milieu extracellulaire. La survie dans le milieu extracellulaire nécessite des stratégies pour bloquer certains mécanismes de l'hôte conduisant à leur élimination (antiphagocytose, synthèse d'une capsule, modification de structures de surfaces reconnues par le système immunitaire...). Elles ont aussi développé des mécanismes leur permettant d'entrer en compétition avec les cellules de l'hôte pour l'acquisition des cofacteurs essentiels à leur multiplication comme le fer via des sidérophores. Mais d'autres bactéries pathogènes ont choisi d'acquérir leurs nutriments au sein même des cellules de l'hôte qui constituent une excellente niche, favorable à leur réplication et à leur survie : pour cela, elles ont développé des mécanismes pour envahir ces cellules et s'y multiplier.

2. Les stratégies de survie des bactéries à multiplication intracellulaire

Après pénétration dans l'organisme, les bactéries pathogènes intracellulaires ont la capacité de résider à l'intérieur des cellules de l'hôte et de s'y multiplier. Au-delà de pouvoir se protéger des réponses immunitaires (action du complément et des phagocytes), les cellules de l'organisme constituent une réserve non négligeable en nutriments pour la survie de la bactérie dans l'hôte.

Mais si certains pathogènes envahissent les cellules non phagocytaires d'autres comme *Mycobacterium*, *Chlamydia*, *Salmonella* et *Legionella* ont la capacité de se répliquer au sein de vacuoles à l'intérieur des macrophages. Pour cela, elles sont capables de détourner ou d'arrêter la maturation des phagosomes évoluant classiquement vers la fusion avec les lysosomes puis la dégradation lors de la phagocytose (Alonso & Garcia-del Portillo, 2004). Les phagosomes ainsi détournés, deviennent des « phagosomes réplicatifs » formant des niches de multiplication intracellulaire pour les cellules bactériennes.

2.1. Invasion des cellules non-phagocytaires

Une des stratégies intéressantes développées par les pathogènes intracellulaires pour faire face au système immunitaire consiste tout simplement de pénétrer de façon active dans les cellules non-phagocytaires. Plusieurs de ces espèces bactériennes peuvent pénétrer dans les cellules épithéliales et les fibroblastes notamment en induisant leur capture par la cellule à envahir.

Un premier exemple est fourni par *Mycobacterium leprae* qui est à l'origine de neuropathies sévères. Cette bactérie est capable d'envahir les cellules du système nerveux périphérique nommées les cellules de Schwann en exprimant à leur surface la laminine (Figure 10). Cette molécule de surface bactérienne mime un composant de la « lamina basal »

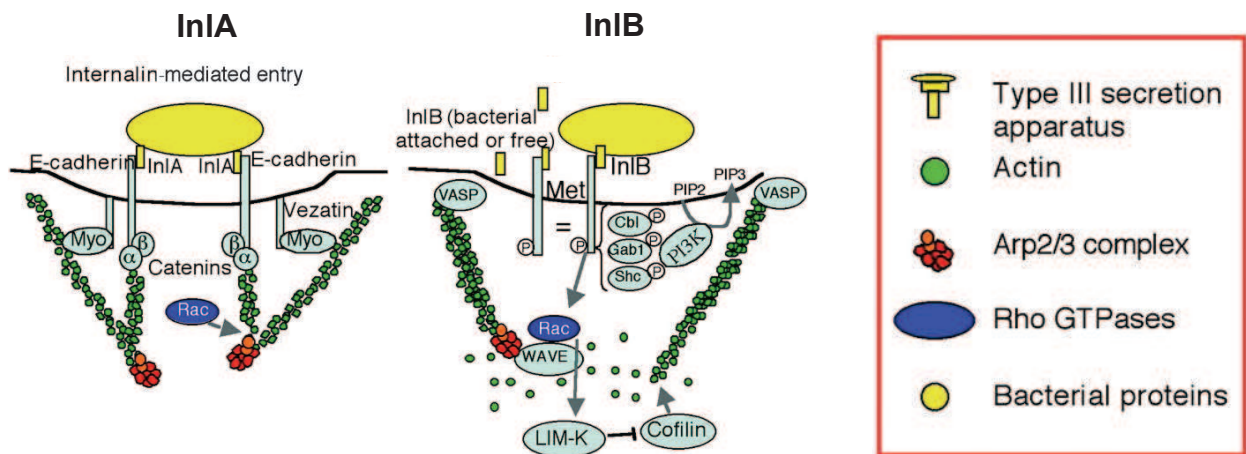


Figure 11. Mécanisme permettant à *Listeria* d'entrer dans les cellules non phagocytaires (Cossart & Sansonetti, 2004).

Listeria utilise deux types de protéines nommées internalines pour interagir avec les cellules puis y pénétrer.

L'internaline A (InIA) de *Listeria* est une protéine ayant des motifs LRR (« leucine rich repeat ») permettant l'interaction avec une glycoprotéine transmembranaire la E-cadherine, qui assure normalement la jonction entre deux cellules épithéliales par une interaction homotypique (E-cadherine-E-cadherine). Cette interaction permet à la E-cadherine de recruter via son extrémité cytoplasmique les caténines α et β , l' α -caténine interagissant avec l'actine. S'ensuit alors une polymérisation de l'actine via Rac. La myosine (myosine VIIa) et son ligand, la vezatine, seraient également impliqués dans l'entrée de *Listeria*.

L'internaline B (InIB) interagit avec différents récepteurs cellulaires tels que le récepteur transmembranaire Met dont le ligand naturel est un facteur de croissance HGF (« hepatocyte growth factor »). L'interaction avec InIB conduit à une phosphorylation de Met au niveau de son domaine cytosolique. Cette phosphorylation permet le recrutement et la phosphorylation des protéines adaptatrices Cbl, Gab1 et Shc et l'activation de la PI3 kinase avec la génération de PIP₃ à la membrane plasmique. La liaison initie également la nucléation et la polymérisation de l'actine via les protéines G Rac, WAVE et le complexe Arp2/3. L'extension des filaments d'actine implique la protéine VASP (« anti-capping ») et est modulée par la cofiline dont l'activité est contrôlée par la LIM-kinase. Il existe donc deux voies : la voie Rac-WAVE-Arp2/3 initiant la polymérisation de l'actine et la voie Rac-PAK-LIM kinase pour la dépolymérisation.

On pense que l'accumulation de cofiline est à l'origine du désassemblage des filaments d'actine par dépolymérisation. Cette dépolymérisation serait nécessaire à la rétraction des filaments d'actine lors de la fermeture de la vacuole entourant la bactérie. La PI3-kinase (PI3K) faciliterait la fermeture de la vacuole probablement en recrutant des vésicules membranaires et des régulateurs de l'actine. PI3K induirait aussi une activation soutenue de Rac.

des cellules de Schwann. Les cellules de Schwann qui possèdent le récepteur à la laminine qui est l' α -dystroglycane vont donc se lier à la bactérie (Rambukkana, 2001).

Listeria monocytogenes est une bactérie intracellulaire facultative. Après son entrée au niveau de la porte intestinale, cette bactérie gagne les ganglions lymphatiques puis la circulation sanguine pour diffuser et envahir un grand nombre de cellules. Ces bactéries se multiplient dans le foie et la rate qui sont les organes cibles. Pour envahir ces cellules et s'y multiplier, *Listeria* exprime à sa surface l'internaline (Figure 11). Il existe différents types d'internalines dont l'internaline A (InlA) et l'internaline B (InlB) sont les plus étudiées (Cossart & Sansonetti, 2004) (Stebbins & Galan, 2001) (Stebbins, 2004). InlA interagit avec une molécule d'adhésion nommée E-cadhérine alors que InlB interagit avec le récepteur au premier composant de la cascade du complément C1q nommé gC1q-R, le récepteur du facteur de croissance hépatocytaire (c-Met) et avec les glycosaminoglycanes (y compris les héparines sulfates) (Knodler et al., 2001). L'internaline A et l'internaline B font partie de deux familles distinctes : InlA possède un domaine C-terminale avec un motif LPXTG alors que InlB est caractérisé par la présence de répétitions en tandem Gly-Trp nommés motifs GW (Bierne *et al.*, 2007). Une troisième famille regroupe les internalines sécrétées (InlC2, InlD et InlH). La présence de motifs LRR (« leucine rich repeat ») est commune aux internalines InlA et InlB : ils permettent l'interaction de l'internaline avec sa protéine cible située à la surface de la cellule eucaryote à envahir.

2.2. Invasion des cellules phagocytaires

Contrairement à d'autres bactéries qui sont lysées par les « phagocytes professionnels » comme le macrophage, certaines bactéries à l'image de *L. pneumophila* sont capables d'y survivre et de s'y multiplier. Les bactéries intracellulaires ont développé différentes stratégies. Pour échapper à leur dégradation, certaines bactéries pénètrent via une autre voie utilisant des récepteurs qui n'activent pas les mécanismes bactéricides du phagocyte. D'autres lysent le phagosome pour se répliquer librement dans le cytosol de la cellule eucaryote. Enfin certaines bactéries bloquent l'évolution classique du phagosome en arrêtant sa maturation à un stade précoce ou en inhibant spécifiquement sa fusion avec le lysosome.

2.2.1. Pénétration via un récepteur au complément

Pour tenter d'enrayer la phagocytose de cellules telles que les macrophages, plusieurs options s'offrent à la bactérie. L'une d'entre elles consiste à entrer via un récepteur du phagocyte ne stimulant pas son activité bactéricide et bloquant donc la dégradation via la voie lysosomiale. Ainsi, le fait de pénétrer via un récepteur au complément conduit à une faible activation des mécanismes bactéricides mis en œuvre par le phagocyte et donc à une faible destruction de la bactérie internalisée. A l'opposé, une fixation via le récepteur au fragment Fc des immunoglobulines stimule une telle activité bactéricide conduisant à la destruction des cellules bactériennes.

Cette différence de réponse se situe au niveau des voies de signalisation enclenchées via l'engagement des deux types de récepteurs. Ainsi, alors que les petites protéines G : Rac, Rho et Cdc42 sont activées suite à l'engagement des récepteurs Fc, seulement Rho est activé en cas d'internalisation via le récepteur au complément. Ceci a de lourdes conséquences concernant les voies de signalisation mises en route puisque l'activation de Rac, Rho et Cdc42 permet l'induction des kinases JNK et de la MAP kinase p38 qui sont cruciales pour la réponse inflammatoire alors que l'engagement des récepteurs au complément ne le permet pas.

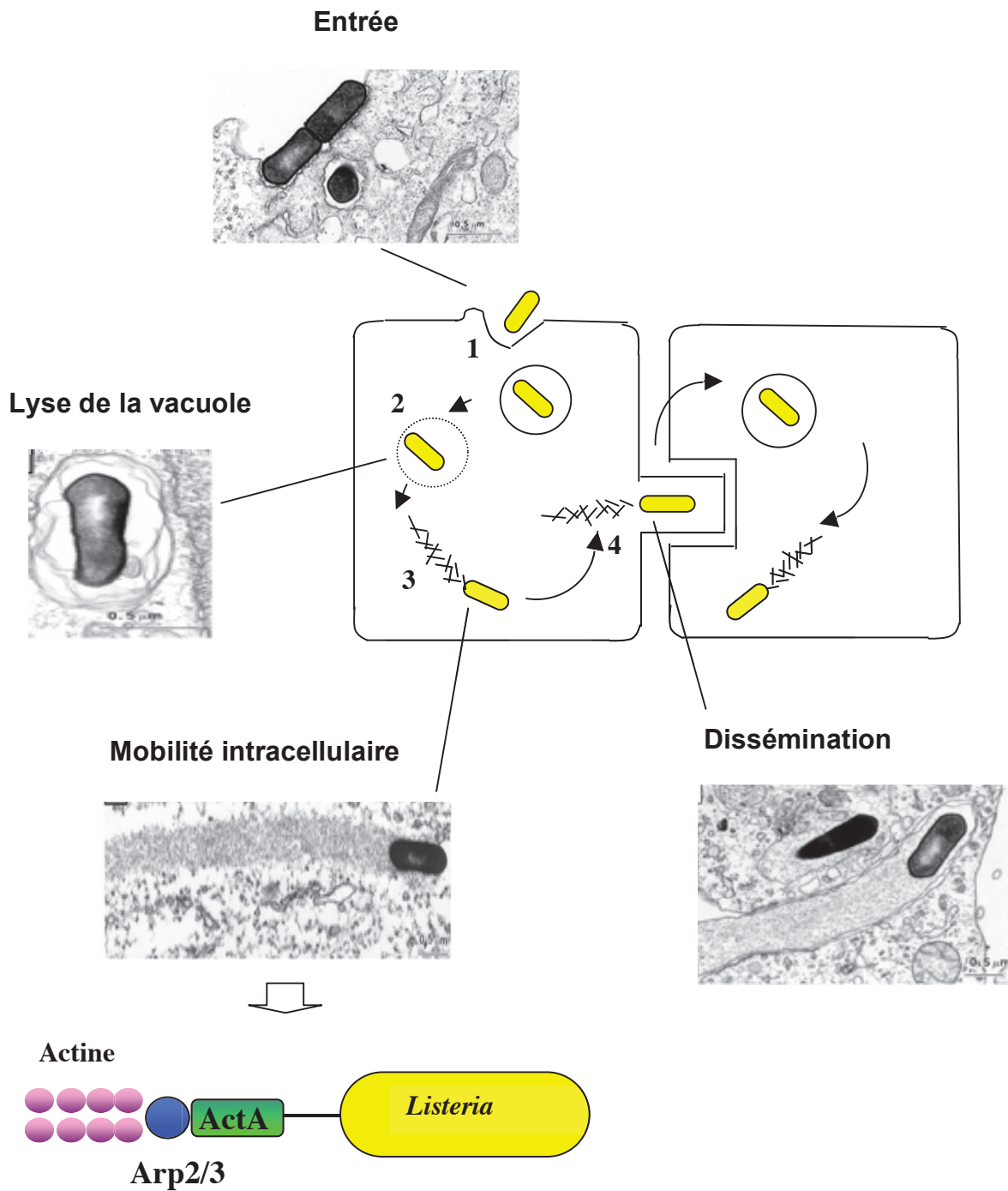


Figure 12. Photos de microscopie électronique montrant différentes étapes du cycle infectieux de *Listeria monocytogenes* (Dussurget *et al.*, 2004).

Suite à l'entrée dans la cellule eucaryote (1), *Listeria* est capable de lyser sa vacuole (2) grâce à des phospholipases, puis de se mouvoir à l'intérieur de la cellule par la polymérisation d'actine (3). La comète d'actine qui se forme alors à la base de la cellule bactérienne permet sa propulsion et sa dissémination aux cellules adjacentes (4).

Ainsi, nombre de bactéries pathogènes pénètrent via un récepteur au complément (Falkow, 1991) tel que la bactérie *L. pneumophila* (Payne & Horwitz, 1987). Il a très tôt été démontré que l'engagement des récepteurs au complément reconnaissant les protéines du complément C3b et C3bi ne stimule pas les mécanismes microbicides (Marshall *et al.*, 1995) tels que la libération de dérivés toxiques de l'oxygène (H₂O₂) (Wright & Silverstein, 1983). Ainsi la phagocytose médiée par des anticorps (via les récepteurs au fragment Fc des immunoglobulines) est plus efficace dans l'élimination des bactéries intracellulaires par le phagocyte que la phagocytose via les récepteurs au complément. Les mêmes observations ont été faites chez *Bordetella pertussis* (Hellwig *et al.*, 2001). Chez *Porphyromonas gingivalis*, il y a également une diminution de la sécrétion de cytokines comme l'IL-12 par les macrophages, une cytokine impliquée dans le déclenchement de la réponse inflammatoire (Hajishengallis *et al.*, 2008). Un autre exemple intéressant semble être celui de *Mycobacterium*. Cette bactérie est capable de produire une molécule de surface mimant un constituant majeur du complément, la molécule C3b, responsable de la liaison au récepteur au complément situé sur les macrophages (Pieters, 2001).

Cependant, d'autres bactéries n'ont pas d'autre alternative que de pénétrer dans les phagocytes via les récepteurs activant la phagocytose. Dans ce cas, d'autres mécanismes pour contourner le processus de maturation du phagosome (qui à terme conduit à la destruction bactérienne) ont été développés par les bactéries pathogènes. Il existe deux stratégies : s'échapper du phagosome ou inhiber la fusion du phagosome avec le lysosome.

2.2.2. Echappement du phagosome

L'échappement du phagosome est un mécanisme intéressant développé par les bactéries des genres *Listeria*, *Rickettsia* et *Shigella*.

Après avoir franchi la barrière épithéliale de manière active, *Listeria* et *Shigella* peuvent être internalisées par les macrophages environnants. Après l'internalisation, ces bactéries s'avèrent néanmoins capables de lyser le phagosome dans lequel elle se trouvent pour empêcher leur dégradation via le processus de phagocytose.

A cette fin, *Listeria* exprime une toxine formant des pores dans le phagosome : la listeriolysine O (exotoxine hémolytique). Les pores formés par cette toxine permettent le passage de phospholipases de type C qui lysent les phospholipides contenus dans la membrane du phagosome. La bactérie ainsi libérée dans le cytosol est capable de se multiplier, mais aussi de se disséminer aux cellules adjacentes. En effet suite à la rupture membranaire, les bactéries *Listeria* et *Shigella* se propagent de cellule en cellule grâce à une polymérisation d'actine qui permet la propulsion de la bactérie (Figure 12). Dans le cytoplasme, les bactéries polymérisent l'actine F en actine G, créant des "comètes" d'actine qui propulsent les bactéries hors des cellules. Chez *Listeria*, la protéine ActA mime la protéine eucaryotique WASP (présence du domaine WCA) assurant le recrutement et l'activation du complexe Arp2/3 impliqué dans la polymérisation de l'actine. Ce processus de polymérisation de l'actine, détourné par la bactérie est commun aux cellules eucaryotes qui l'utilisent pour la nucléation, la mobilité et la chimiotaxie (Gouin *et al.*, 2005) (Nhieu *et al.*, 2005) (Rottner *et al.*, 2004).

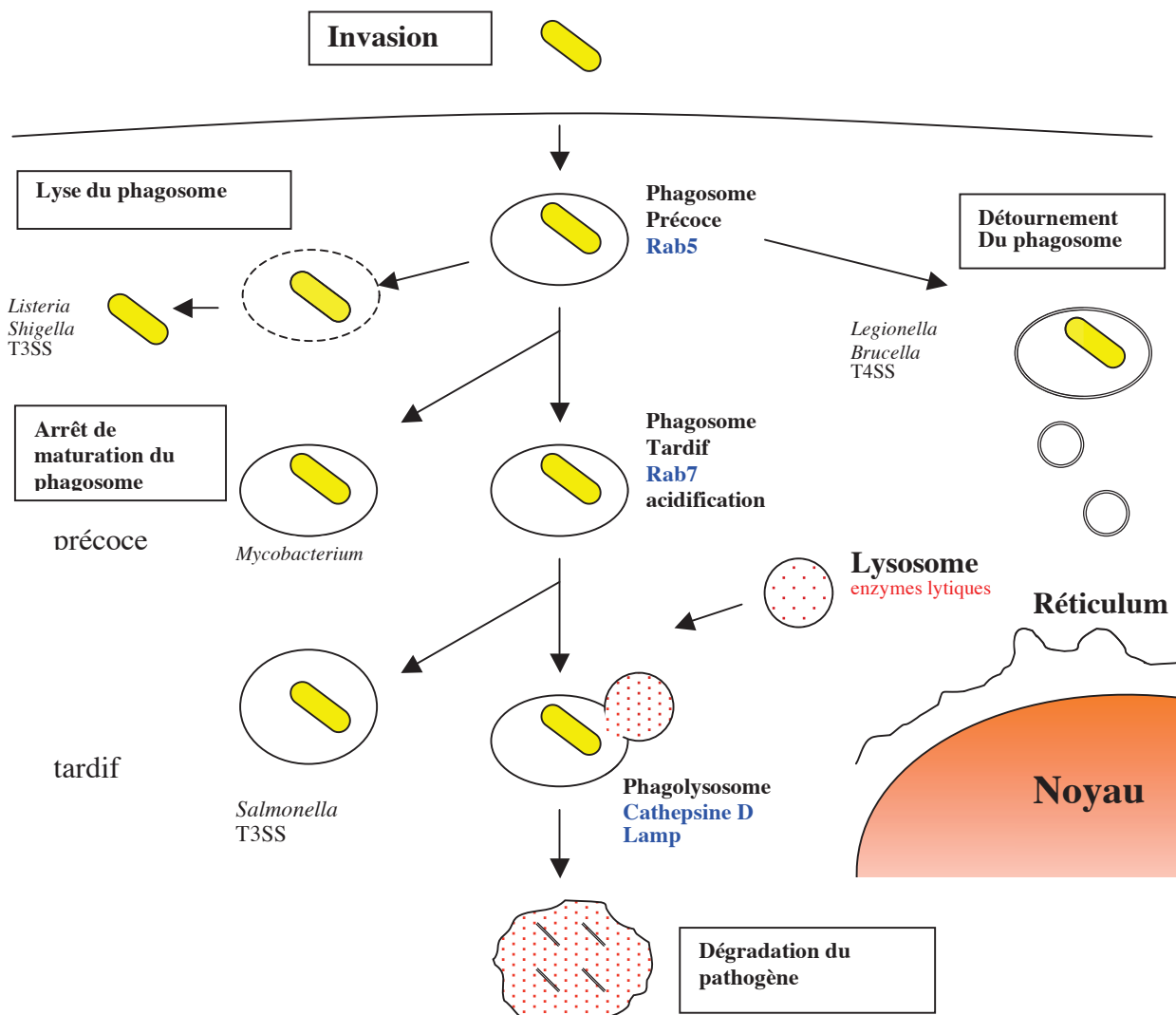


Figure 13. Stratégies de survie intracellulaire de quelques bactéries pathogènes (d'après (Alonso & Garcia-del Portillo, 2004)). Différentes stratégies permettent d'échapper à la voie lysosomiale : lyse du phagosome (*Listeria*, *Shigella*) ou arrêt de la maturation à un stade plus ou moins précoce (*Salmonella*, *Mycobacterium*) pour établir un phagosome de réplication qui dans certains cas peut être dérivé du réticulum (*Legionella*, *Brucella*). L'intervention des différents systèmes de sécrétion de type IV (T4SS) ou de type III (T3SS) est indiquée. La voie lysosomiale est marquée par différents stades de maturation du phagosome caractérisables par des marqueurs (en caractères bleus sur la figure) et qui aboutit à la fusion avec le lysosome, un organelle dérivé de l'endocytose et riche en enzymes lytiques.

2.2.3. Prévention ou Inhibition de la fusion phagosome-lysosome

La caractérisation des phagosomes contenant les bactéries, fondée sur des analyses de marqueurs spécifiques des compartiments endocytaires, montre que ces bactéries intracellulaires établissent des compartiments pour éviter la dégradation lysosomiale (Meresse *et al.*, 1999) (Duclos & Desjardins, 2000) (Scott *et al.*, 2003) (Russell, 1998) (Salcedo & Holden, 2005).

Ainsi, après entrée dans le macrophage, *M. tuberculosis*, la bactérie responsable de la tuberculose, est capable de survivre et de se répliquer dans son phagosome sans que celui-ci ne fusionne avec le lysosome (Figure 13). Des études plus précises ont révélé que le phagosome de *Mycobacterium* est en fait situé dans une étape précoce de la voie endocyttaire. Ce phagosome a des caractéristiques membranaires d'endosomes précoces et ne fusionne pas avec le lysosome. En effet *Mycobacterium* recrute et retient une protéine de la cellule hôte à la surface de son phagosome : la protéine TACO (« tryptophan-aspartate containing coat protein »). Or, la protéine TACO, qui est capable de lier le cholestérol présent à la surface du phagosome est normalement relâchée lors de la maturation du phagosome avant que ne s'opère la fusion avec le lysosome. La rétention de TACO au niveau du phagosome empêche donc au contenu du phagosome d'être délivré au lysosome. Des expériences intéressantes ont montré par ailleurs que la carence en cholestérol au niveau des macrophages les rendaient incapables d'ingérer puis d'internaliser des mycobactéries. Ceci suggère que le cholestérol est essentiel et intervient dans l'interaction entre la bactérie et le phagocyte (probablement via une interaction entre des lipides de surfaces bactériens et ceux de la membrane du macrophage). L'entrée via des membranes riches en cholestérol assurerait dès lors la meilleure rétention de la protéine TACO à la surface du phagosome dès lors que la protéine TACO est capable de lier le cholestérol présent au niveau de cette membrane phagosomale (Amer & Swanson, 2002) (Nguyen & Pieters, 2005) (Hestvik *et al.*, 2005).

Le compartiment dans lequel *Salmonella* se réplique diffère des vacuoles évoluant classiquement vers la dégradation puisque certains marqueurs des lysosomes tels que la cathepsine D sont absents (Figure 13). D'après certaines études, le phagosome de *Salmonella* montre un recrutement accentué de la protéine Rab5 qui, en favorisant sa fusion avec des endosomes précoces retarderait la maturation vers un compartiment lysosomal. De plus, *Salmonella* pourrait inhiber une étape de fusion tardive avec les lysosomes : la protéine SpiC, requise pour la survie intracellulaire est acheminée dans le cytosol cellulaire par un système de sécrétion et elle est engagée dans ce processus d'inhibition (Patel *et al.*, 2005) (Hashim *et al.*, 2000) (Guiney & Lesnick, 2005) (Lilic & Stebbins, 2004) (Linehan & Holden, 2003).

Le phagosome de *Brucella* est également arrêté en phase précoce : il acquiert des marqueurs d'endosomes précoces EEA1, Lamp1 et V-ATPase et exclut des marqueurs d'endosomes tardifs. Une autre caractéristique est que le phagosome fusionne avec le réticulum endoplasmique (Figure 13) (Celli & Gorvel, 2004) (Gorvel & Moreno, 2002).

De même, *Legionella* se réplique dans un phagosome caractérisé par un pH neutre et une absence des marqueurs lysosomiaux LAMPs (« lysosomal associated membrane proteins ») et de la cathepsine D, indiquant une absence de fusion avec les lysosomes (Horwitz, 1983).

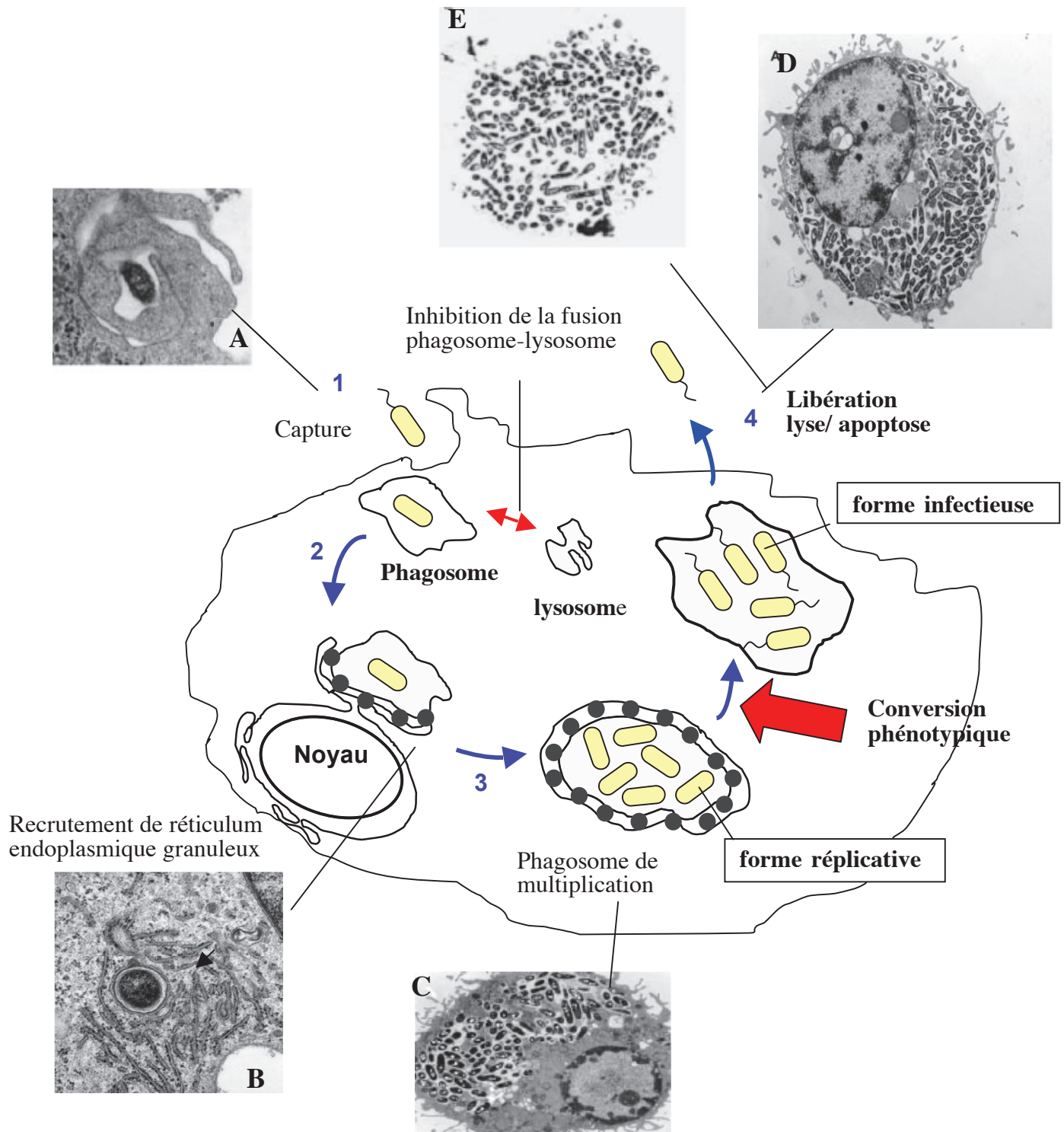


Figure 14. Schéma représentant les différentes étapes du cycle infectieux de *Legionella pneumophila* dans le macrophage (Cazalet *et al.*, 2004).

Après adhésion à la cellule hôte (1), *Legionella* est internalisée via une phagocytose par enroulement (coiling phagocytosis, photo A (Bitar *et al.*, 2004)) dans une vacuole qui échappe à la voie de dégradation lysosomiale. Cette vacuole est par la suite modifiée via le recrutement de protéines venant du réticulum (2, photo B (Molmeret *et al.*, 2005) où la flèche indique le réticulum). Les cellules bactériennes commencent à se multiplier dans la vacuole (3, photo C (Bitar *et al.*, 2004)) puis sont libérées suite à la lyse de la cellule hôte (4, photo D (Molmeret *et al.*, 2005) et photo E (Bitar *et al.*, 2004)). Durant le cycle infectieux, *Legionella* subit d'importantes modifications phénotypiques (conversion phénotypique) conduisant à la transition entre la phase répliquative et la phase transmissive. A chaque étape du cycle infectieux des clichés de microscopie électronique montrent les différentes étapes observées chez les macrophages (cellules U937) qui semblent très similaires à celles observées chez les protozoaires.

2.3. Le cas intéressant du cycle de *Legionella*

2.3.1. Un cycle biphasique

Rapidement après l'entrée, le phagosome dans lequel réside la bactérie est entouré de vésicules de la cellule hôte et de mitochondries (Figure 14).

L'association avec ces vésicules donne lieu à des modifications de la membrane du phagosome qui est recouvert de ribosomes à sa surface (dès 4 heures après l'internalisation) (Tilney *et al.*, 2001). Ces vésicules trouvent leur origine au niveau du réticulum endoplasmique granuleux des cellules eucaryotes (Roy & Tilney, 2002) (Kagan & Roy, 2002) (Swanson & Isberg, 1995) (Kagan *et al.*, 2004) et contribuent à la formation d'une vacuole à l'intérieur de laquelle la bactérie trouve un environnement pour se multiplier. Un cycle biphasique accompagne le cycle d'infection de son hôte par *Legionella*. Quelques heures après l'entrée dans la cellule hôte, *Legionella* empêche la fusion phagosome/lysosome et détourne les vacuoles dérivées du réticulum pour se constituer une vacuole « répliquative ».

Nombre d'éléments viennent étayer l'hypothèse selon laquelle les vésicules dérivées du réticulum fusionnent avec la vacuole de *Legionella* et déversent leur contenu au sein de la vacuole. Cette vacuole riche en nutriments et notamment en protéines synthétisés par les ribosomes du réticulum constitue de ce fait un environnement favorable pour les cellules bactériennes qui se multiplient activement et assurent leur synthèse protéique : on dit alors que *Legionella* est en phase répliquative (Molofsky & Swanson, 2004) (Swanson & Fernandez-Moreira, 2002) (Bitar *et al.*, 2004). Après plusieurs cycles de multiplication, les bactéries finissent par envahir le cytoplasme de la cellule hôte en rompant la membrane de la vacuole dans laquelle elles étaient séquestrées. Ceci conduit à l'épuisement des nutriments de la cellule hôte. Les bactéries confrontées au stress accompagnant cette carence en nutriment vont se différencier en une forme transmissive certainement la mieux adaptée à une viabilité prolongée dans l'environnement. L'entrée en phase transmissive se traduit par une augmentation de la résistance aux biocides, une plus grande sensibilité au sodium, une augmentation de la mobilité et surtout par un changement de forme : les cellules en bâtonnet se rétrécissent et adoptent une forme coccoïde et acquièrent un flagelle. Les cellules en phase transmissive vont ensuite lyser la membrane de la cellule hôte et être libérées. Les cellules bactériennes dont le pouvoir de virulence a été augmenté après le passage en phase transmissive sont alors capables d'infecter les cellules avoisinantes et de se propager. Il a ainsi été démontré qu'une cellule en sortie d'amibe a une virulence accrue d'un facteur d'environ 10 vis-à-vis d'un macrophage (Cirillo *et al.*, 1994).

2.3.2. Les formes intracellulaires matures (MIFs) : la véritable forme infectieuse de *Legionella* dans l'environnement ?

La volonté de prévenir les épidémies de légionellose conduit à toute une série d'approches environnementales. Il s'agit entre autres de comprendre comment l'environnement peut conditionner la virulence de *Legionella*. Mais si l'on pense que le stress engendré par les variations de milieu de croissance (dessiccation, pH...) conditionne en partie la virulence des légionelles, il apparaît que des études se focalisent de plus en plus sur le rôle d'hôtes environnementaux autres qu'*Acanthamoeba castellanii*. Il semble ainsi que d'autres hôtes aussi surprenants que le ver *Caenorhabditis elegans* peuvent héberger *Legionella*, ouvrant le chemin à d'autres voies de contamination (notamment par les sols en Australie). Dans cette optique, Garduno *et al.* se sont attachés à déterminer la véritable forme infectieuse de *Legionella* dans l'environnement ainsi que ses conditions d'émergence. En étudiant de très

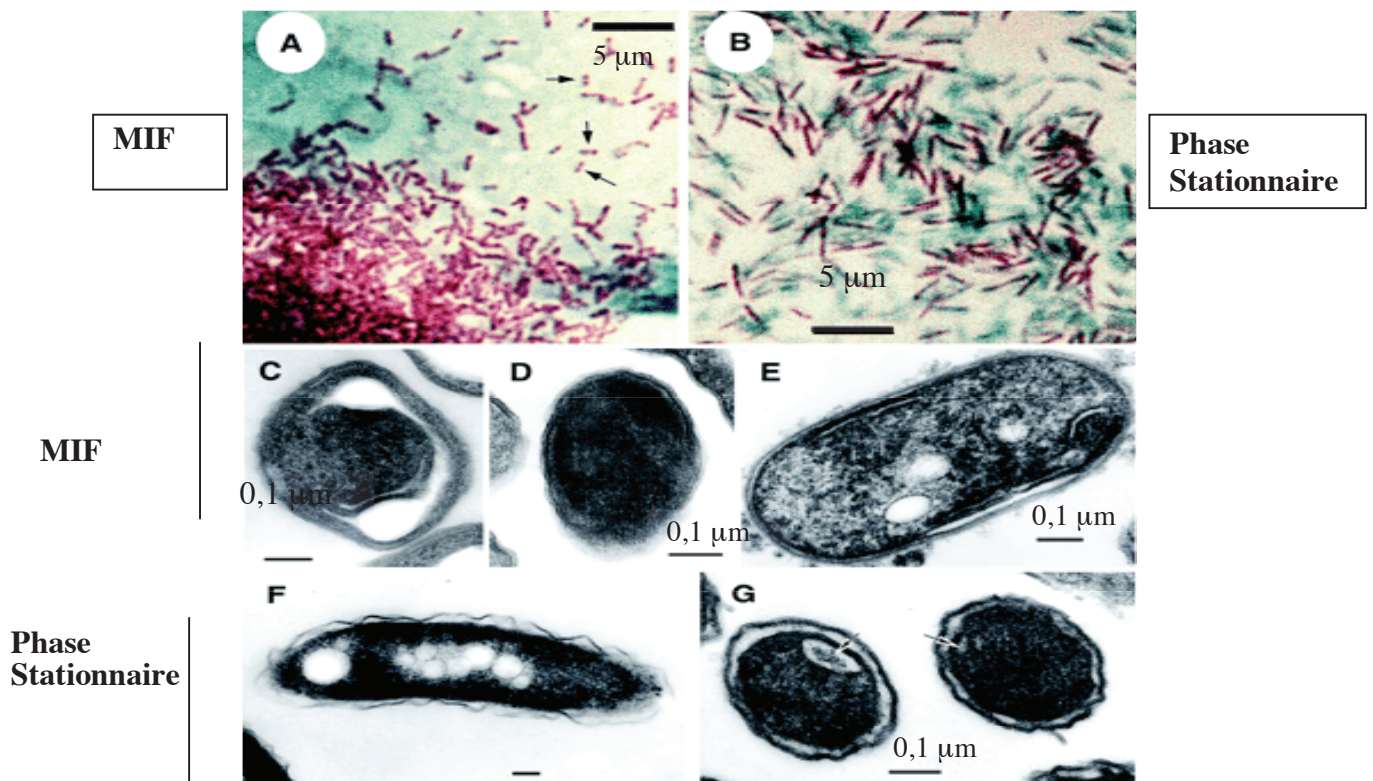


Figure 15. Observations microscopiques (Garduno *et al.*, 2002) montrant les différences entre les cellules de *Legionella* en phase stationnaire (*in vitro*) et sous la forme MIF (« mature intracellular form », *in vivo*). Observation microscopique après coloration de Giménez des MIFs (A) et des cellules en phase stationnaire (B). Alors que les cellules en phase stationnaire se présentent sous la forme de longs bâtonnets fins et présentent une coloration homogène (B), les MIFs forment des bâtonnets courts avec une coloration plus claire et bipolaire (voir les flèches). Les clichés de microscopie électronique (C à G) montrent des différences au niveau de l'ultrastructure de l'enveloppe cellulaire. Les MIFs présentent des invaginations de la membrane cytoplasmique (C), l'enveloppe a un aspect de couche épaisse stratifiée (D) ou ressemble à un empilement de membranes (E). Les cellules en phase stationnaire (comme celles montrées en photo F) ont une enveloppe typiquement retrouvée chez les bactéries à Gram négatif, avec une membrane externe ondulée. Cependant environ 30% des cellules en phase stationnaire montrent des signes de maturation observés au stade MIF comme la présence d'inclusions cytoplasmiques (F) et la présence de membranes internes qui délimitent des pseudo-compartiments.

près l'infection de cellules eucaryotes HeLa par *L. pneumophila*, il ont identifié une nouvelle forme infectieuse de type cyste observée uniquement *in vivo* durant les phases tardives du cycle infectieux (Garduno *et al.*, 2002). Cette forme a été nommée MIF pour « mature intracellular form » (Figure 15). Contrairement à la phase répliquative qui se rapproche de la phase exponentielle *in vitro*, la forme MIF possède des différences avec des cellules en phase stationnaire. Aussi, comparé aux cellules en phase stationnaire, les MIFs sont 10 fois plus virulentes vis-à-vis des cellules HeLa, sont plus résistantes aux antibiotiques (3 à 5 fois plus résistantes à la rifampicine et 10 à 1000 fois plus résistantes à la gentamycine) et présentent un profil d'expression protéique différent.

Cependant, le fait que ces deux formes aient des caractéristiques communes (pouvoir infectieux et présence d'inclusions cytoplasmiques) a laissé suggérer que les cellules en phase stationnaire ne seraient qu'une forme moins avancée de la différenciation des légionelles en MIFs. Pour tester cette hypothèse Faulkner *et al.*, ont décidé d'utiliser comme modèle de cellule hôte, le cilié *Tetrahymena tropicalis* (Faulkner *et al.*, 2008). Chez *Tetrahymena*, *Legionella pneumophila* réside dans des vacuoles après ingestion et survit sans se répliquer avant d'être expulsé 1 à 2 heures après ingestion sous forme d'agrégats contenant les cellules bactériennes (Figure 16) (Berk *et al.*, 2008). De manière intéressante, Faulkner *et al.*, ont montré que les cellules en phase stationnaire se différenciaient en MIFs après passage chez *Tetrahymena*. Il en a été déduit que la phase stationnaire observée *in vitro* n'est qu'une forme de différenciation incomplète conduisant à la forme MIF *in vivo*.

La pleine différenciation des cellules stationnaires en MIFs nécessiterait des signaux présents dans la cellule hôte. Les résultats d'études menées auparavant combinés aux résultats obtenus chez *Tetrahymena* ont permis d'établir un modèle de transition entre forme répliquative (RF : « replicative form »), forme transmissive (SP : « stationary phase form ») et MIF en fonction des signaux présents chez l'hôte (Figure 17). Loin de se cantonner à une forme de différenciation particulière, les MIFs pourraient représenter la forme hautement infectieuse réellement présente dans l'environnement. Les agrégats protecteurs contenant des MIFs formées par des hôtes comme *Tetrahymena*, permettraient aux cellules bactériennes de résister aux stress environnementaux, favoriseraient leur survie et seraient la forme de dissémination privilégiée. Les études se poursuivent pour identifier la présence de tels agrégats dans l'environnement (eau par exemple) par immunomarquage (« Mature infectious forms (MIFs) and MIF-pellets as factors in the transmission of Legionnaires' disease », Rafael A. Garduno, *Legionella* 2009, Paris, 13-17 octobre).

2.3.3. Contrôle de la transition biphasique

La transition biphasique (phase répliquative/phase transmissive au cours d'une infection) reproduit de manière intéressante la transition entre phase exponentielle et phase stationnaire de croissance observée en milieu de culture synthétique (Jules & Buchrieser, 2007) (Figure 18).

Dans le milieu de culture, le passage de la phase exponentielle à la phase stationnaire est associé à l'accumulation de ppGpp ou « guanosine tétraphosphate », une alarmone agissant comme un signal de stress bactérien déclenché par la carence nutritionnelle (carence en carbone, carence en phosphate, carence en fer et inhibition des acides gras). Ainsi, lors d'une situation de carence, le ppGpp synthétisé *de novo* agit au niveau transcriptionnel et plus précisément au niveau de l'ARN polymérase comme régulateur pour activer ou réprimer l'expression de certains gènes : c'est ce que l'on appelle la réponse stringente (Swanson & Hammer, 2000). Chez *E. coli* par exemple, la réponse stringente contrôle l'expression de nombreux gènes : opérons ribosomiaux et impliqués dans la biosynthèse des acides aminés, gènes liés à la synthèse des flagelles et à la chimiotaxie, gènes codant des enzymes clefs de la

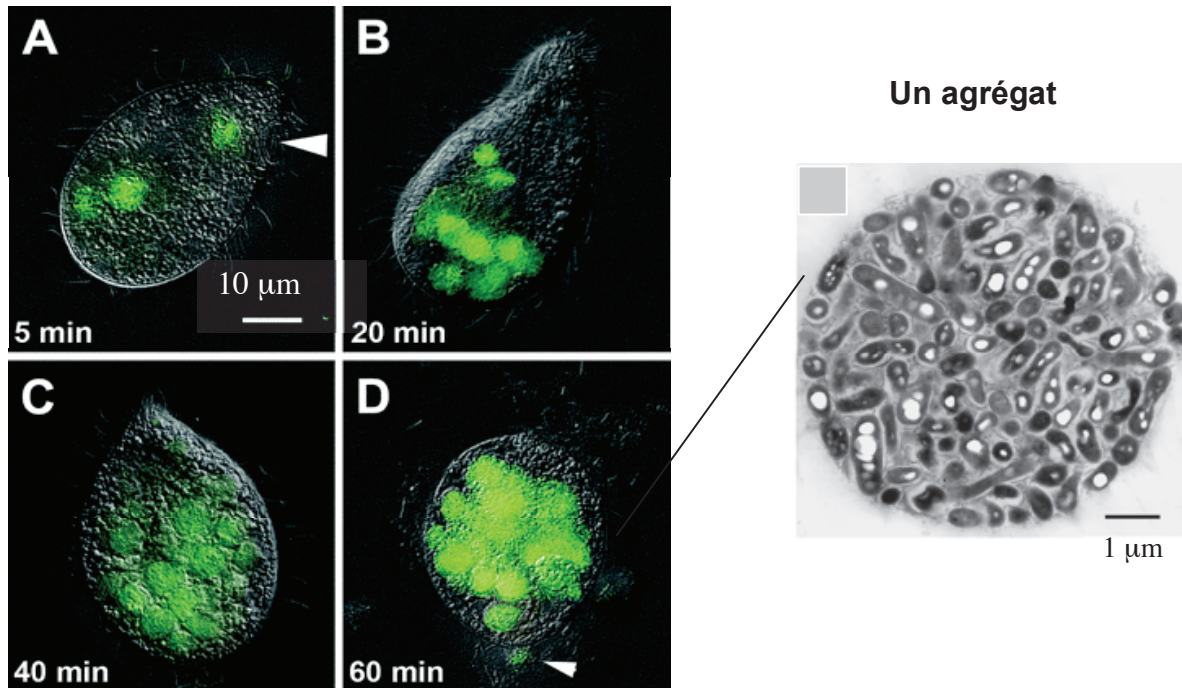


Figure 16. Cinétique de l'ingestion puis de l'expulsion sous forme d'agrégats de *Legionella pneumophila* par le cilié *Tetrahymena* (Berk et al., 2008).

Les cellules de *Legionella* marquées à la fluorescence (fluorescence verte) ont été incubées avec l'hôte *Tetrahymena* et des observations par microscopie ont été effectuées aux différents temps indiqués (figures A, B, C et D correspondant aux temps 5 min, 20 min, 40 min et 60 min respectivement). La flèche dans la figure A pointe l'entrée du cytopharinx (début du vestibule) où sont ingérées les cellules bactériennes qui sont ensuite emprisonnées dans des vacuoles nutritives qui s'accumulent au cours du temps (clichés B, C et D). Au bout de 60 minutes des vacuoles commencent à être expulsées (flèche dans la figure D). Des observations plus fines de ces vacuoles expulsées (clichés de microscopie électronique à droite) indiquent qu'il s'agit d'agrégats renfermant des cellules bactériennes.

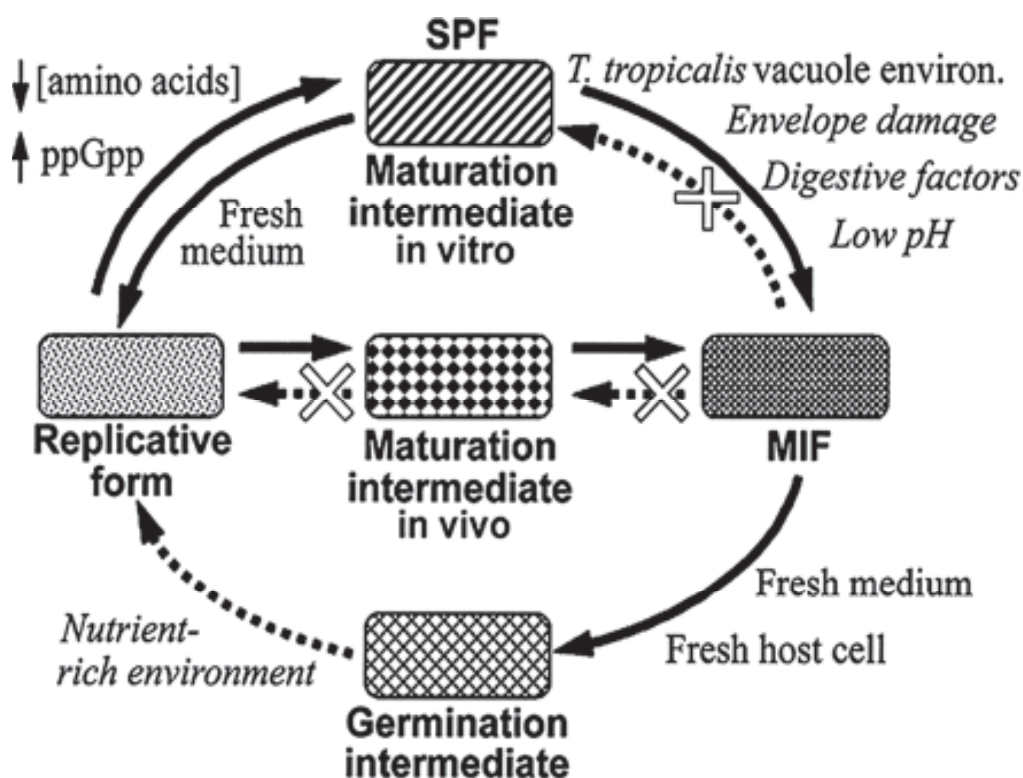


Figure 17. Modèle de différenciation de *Legionella pneumophila* (Faulkner et al., 2008).

Ici est présentée une différenciation de la forme répliquative à la forme MIF sous forme d'un processus cyclique. Cette différenciation impliquerait deux voies différenciées par les termes de maturation et de germination. La voie de maturation se réfère à la différenciation de la phase répliquative à la forme MIF alors que la voie de germination désigne la différenciation se produisant dans le sens inverse (MIF à phase répliquative). La phase stationnaire observée *in vitro* (SPF) représenterait un intermédiaire de la voie de maturation mais rien ne dit que cet intermédiaire soit identique à celui observé *in vivo* (preuve expérimentale nécessaire). Les flèches en pointillés et les termes en italiques se réfèrent à des événements plus spéculatifs nécessitant l'appui d'une preuve expérimentale.

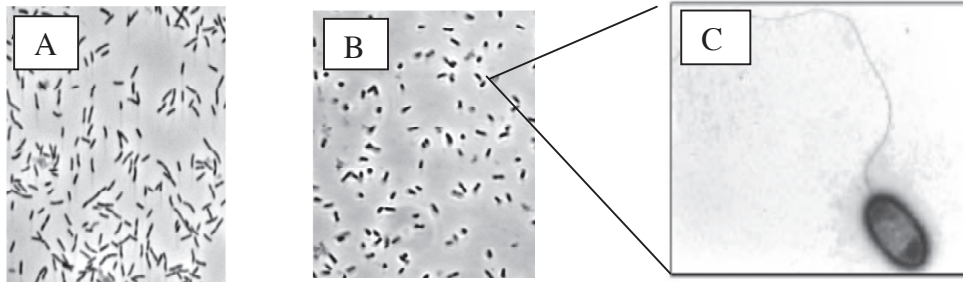


Figure 18. Cellules de *Legionella pneumophila* observées en microscopie.

En milieu de culture, les cellules bactériennes montrent une différence de morphologie entre la phase exponentielle et la phase stationnaire aisément observable en microscopie optique. Les cellules en phase exponentielle (A, photo (Molofsky & Swanson, 2003)) se présentent sous la forme de cellules en bâtonnets alors que les cellules en phase stationnaire (B, photo (Molofsky & Swanson, 2003)), plus petites, adoptent une forme cocoïde. Une observation plus précise des cellules en phase stationnaire montre la présence d'un flagelle (cliché de microscopie électronique C (Heuner & Steinert, 2003)) qui est absent à la phase exponentielle.

synthèse des acides gras. Chez les bactéries pathogènes, la réponse stringente intervient dans la virulence : elle permet la transition vers le phénotype infectieux de *L. pneumophila*, la résistance aux stress, l'adhésion, l'invasion et la survie intracellulaire de *Campylobacter jejuni* (Gaynor *et al.*, 2005) et la capacité de *Pseudomonas aeruginosa* à tuer la drosophile (Erickson *et al.*, 2004). Enfin, l'expression de fimbriae de type I par les *E. coli* uropathogènes ou UPEC est régulée par la réponse stringente (Aberg *et al.*, 2006).

Les mécanismes de déclenchement de la réponse stringente ont été étudiés en détail et font intervenir divers réseaux de régulation. Le niveau de ppGpp dans la cellule est finement régulé par une ppGpp synthase connue sous le nom de RelA et par SpoT ((p)ppGpp 3'-pyrophosphohydrolase), une enzyme possédant la double activité ppGpp synthase et hydrolase (Figure 19). Ainsi, lors d'une carence nutritionnelle se caractérisant par une carence en acides aminés, les ARN de transfert (ARNt) non chargés stimulent la synthèse rapide de ppGpp via RelA. Le ppGpp interagit au niveau de la sous-unité β de l'ARN polymérase et favorise son interaction avec le facteur sigma rpoS ayant pour conséquence l'expression des gènes de réponse stringente. Lorsque les conditions redeviennent favorables (= présence de nutriments) comme en phase exponentielle, SpoT stoppe la réponse stringente et évite au ppGpp de s'accumuler en l'hydrolysant. Chez *L. pneumophila* il a été montré que RelA et SpoT sont nécessaires pour l'accumulation du ppGpp lors de l'entrée en phase stationnaire ou transmissive lorsqu'il s'agit d'une infection. Ces deux ppGpp synthases contrôlant la transition de phase répondent à deux types de signaux : acides aminés pour RelA et acides gras pour SpoT (Dalebroux *et al.*, 2009) (Figure 20).

2.3.4. Rôle d'effecteurs dans le cycle d'infection

La survie dans les macrophages est un élément clef de la pathogénie de *L. pneumophila* conditionnant sa virulence *in vivo*. Chez l'Homme, cette bactérie peut survivre et se multiplier dans les macrophages pulmonaires et les pneumocytes au sein de vacuoles. Les modifications qui conduisent à la formation de cette vacuole de réplication intracellulaire dépendent de la sécrétion de protéines effectrices directement injectées dans le cytosol de la cellule hôte et intervenant dans la virulence. Des études pour identifier des protéines sécrétées impliquées dans cette modification ont permis d'isoler plusieurs effecteurs intervenant dans les différentes étapes du cycle infectieux (Cazalet *et al.*, 2004) (Shin & Roy, 2008) (Franco *et al.*, 2009) (Ninio & Roy, 2007) (Ensminger & Isberg, 2009) (Luo & Isberg, 2004).

Les études pour la recherche d'effecteurs s'est rapidement heurtée au problème de la redondance. Dans le génome de *Legionella*, il peut exister jusqu'à six gènes codant pour des protéines appartenant à la même famille (exemple de la famille Sid). De ce fait, les nombreuses études ayant consisté à invalider le gène codant pour un effecteur n'ont pas permis d'observer un quelconque défaut dans le déroulement du cycle infectieux. Ceci s'explique par la compensation de la fonction par une autre protéine exerçant la même fonction mais qui n'a pas été altérée. A cela s'ajoute le fait que deux protéines n'ayant pas la même fonction peuvent néanmoins cibler le même processus cellulaire de l'hôte, aboutissant au même effet. Par exemple l'action sur le trafic membranaire de l'hôte peut s'exercer sur les petites protéines G régulant le trafic ou sur des protéines contrôlant la fusion des vésicules intracellulaires. Chez *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Typhimurium, il existe deux effecteurs SopE et SopB qui interviennent dans la même fonction à savoir la capture de la bactérie par l'hôte mais par deux moyens différents. SopE est un facteur d'échange qui active directement les protéines G alors que SopB, une inositol polyphosphatase, les active indirectement en exerçant son effet sur les facteurs d'échange (activation des facteurs d'échange qui ensuite vont activer les protéines G). La conséquence est que des gènes *sopE* et *sopB* est nécessaire pour visualiser un défaut de capture de *Salmonella*.

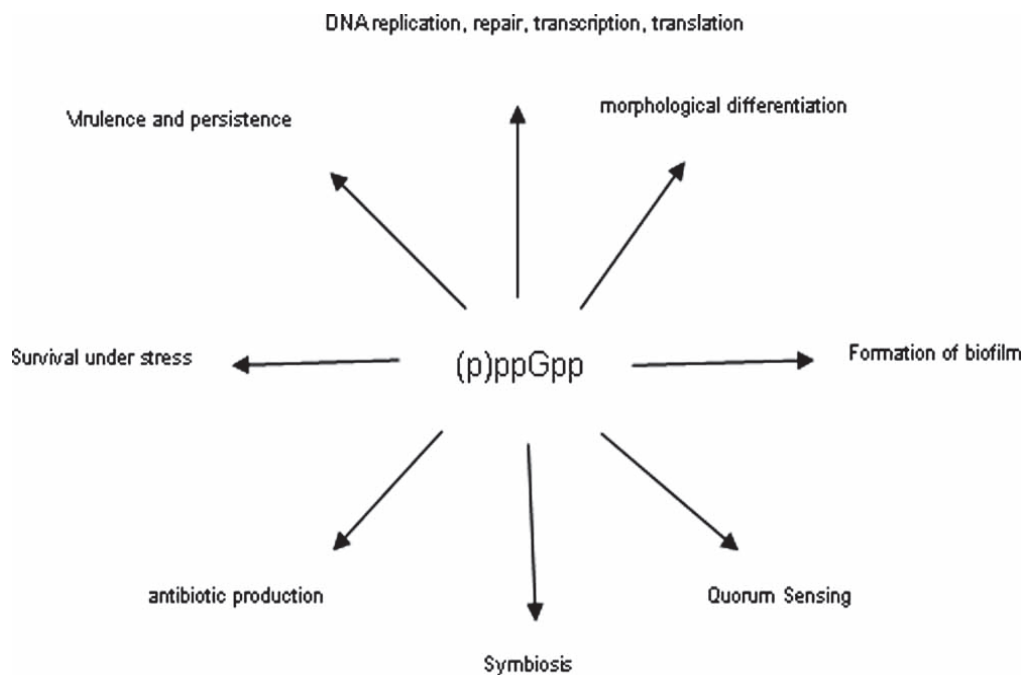
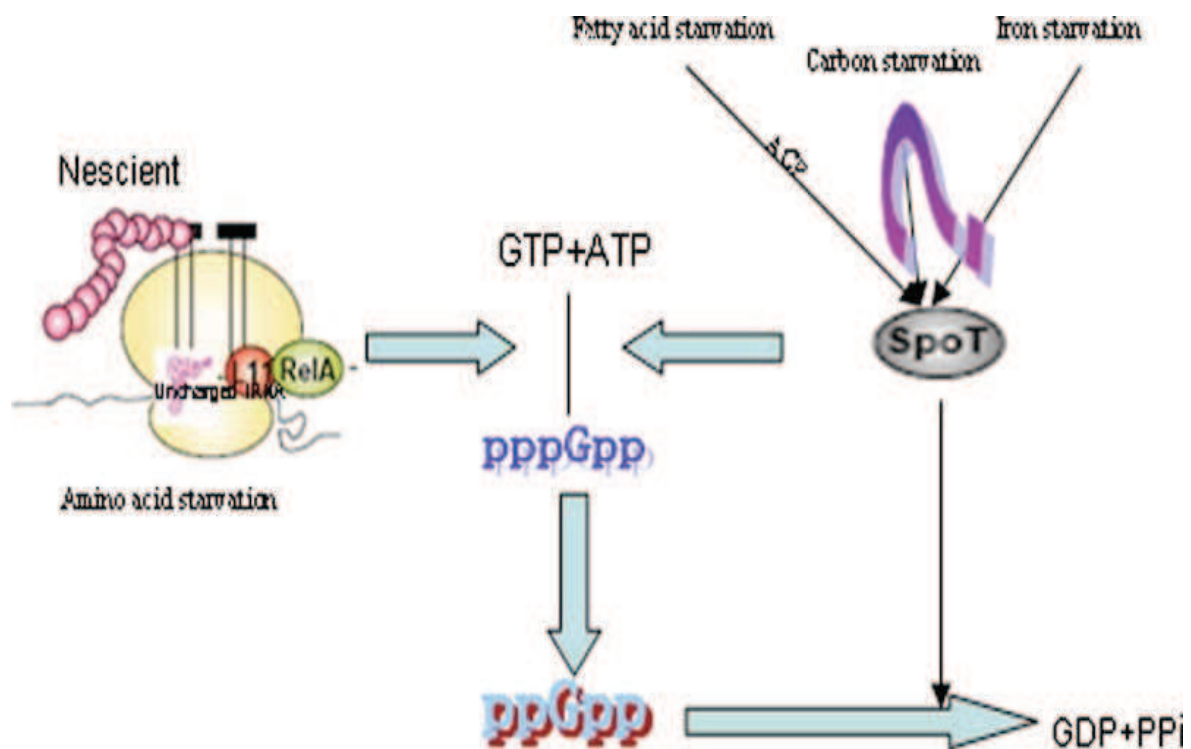


Figure 19. Schéma représentant le rôle de RelA et SpoT dans la synthèse ou la dégradation du ppGpp (Wu & Xie, 2009).

RelA et SpoT qui répondent à des situations de carence peuvent participer à la synthèse du ppGpp grâce à leur activité enzymatique de ppGpp synthase. Le ppGpp exerce alors divers rôles dans la cellule en activant des voies dont la plupart participent de la réponse au stress. SpoT possède également une activité hydrolase qui lui permet de dégrader le ppGpp.

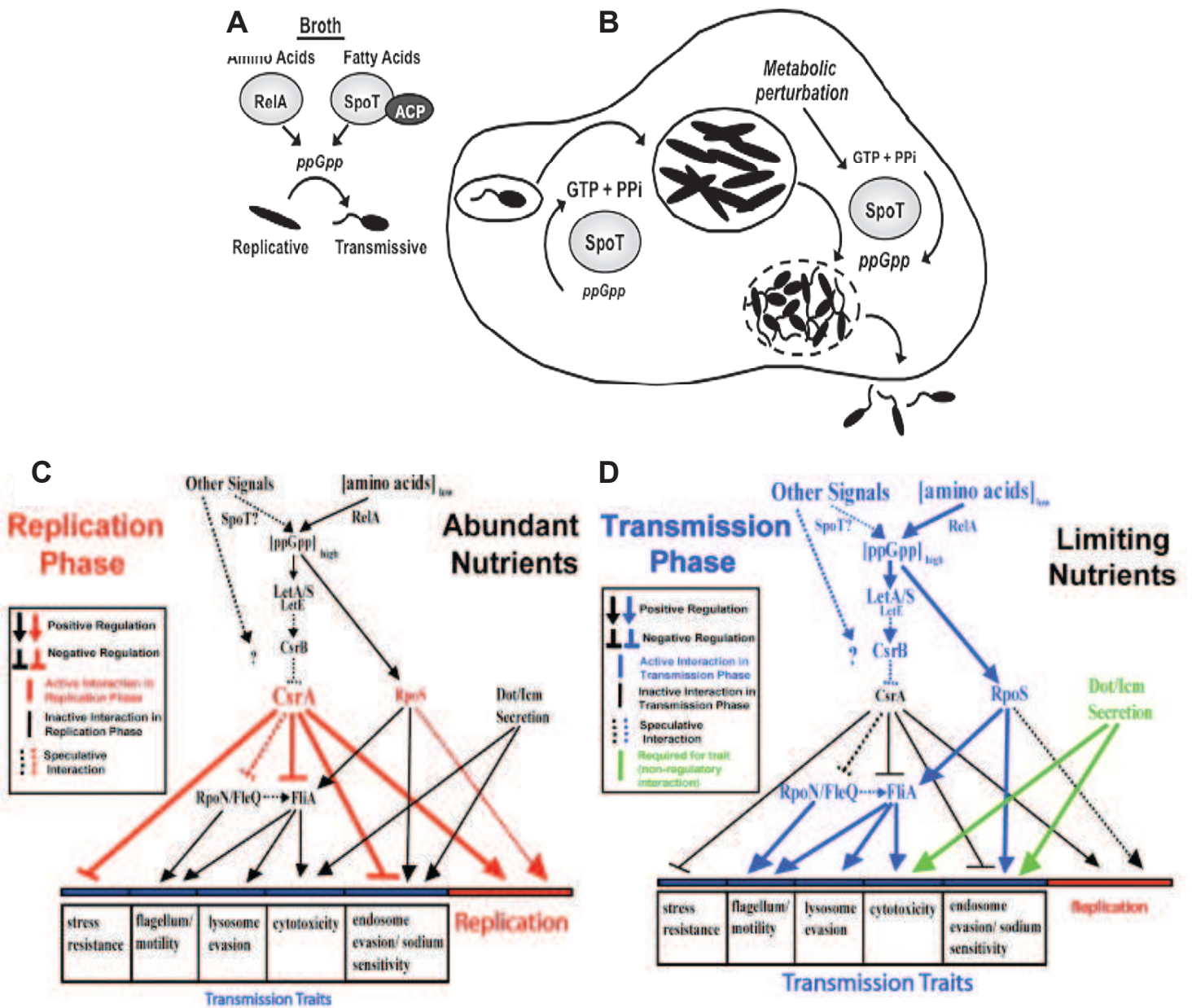


Figure 20. La transition biphasique est contrôlée par la réponse ppGpp chez *Legionella* (d'après Molofsky *et al.*, 2004). En haut : Schéma montrant le rôle de SpoT dans la différenciation de *Legionella* au sein des macrophages (Dalebroux *et al.*, 2009). **A.** La synthèse du ppGpp par les enzymes RelA et SpoT permet la différenciation de *Legionella* pour passer de la phase répliquative à la phase transmissive. RelA et SpoT (qui interagit avec une protéine ACP pour « acyl carrier protein ») répondent à des carences en acides aminés et en acides gras respectivement. **B.** Durant le cycle infectieux de *Legionella*, SpoT jouerait deux rôles différents. Lorsque les cellules bactériennes pénètrent dans la cellule hôte, la richesse en nutriment stimulerait l'hydrolyse de ppGpp par SpoT permettant la différenciation vers la forme répliquative. Lorsque la source en nutriments devient limitante suite à la répliquative, SpoT synthétise du ppGpp qui initie la différenciation vers la forme transmissive. En bas : Schémas représentant les réseaux de régulation sous-jacent de la réponse ppGpp chez *Legionella* pour chaque phase (Molofsky & Swanson, 2004). **C.** Durant la phase répliquative, les régulateurs post-transcriptionnels, CsrA mais également RpoS favorisent l'expression de gènes intervenant dans la multiplication des cellules bactériennes. CsrA réprime en même temps l'expression de gènes de phase transmissive en réprimant notamment le régulateur de l'expression des flagelles FliA (σ^{28}) directement ou indirectement via la répression de FleQ et/ou RpoN (régulateurs globaux agissant sur FliA). De ce fait, CsrA empêche l'expression de caractères de phase transmissive tels que la résistance aux stress, la sensibilité au sodium et l'échappement à la dégradation lysosomiale. **D.** Durant la phase transmissive, RelA activé par la carence en acides aminés et SpoT permettent la synthèse de ppGpp. A son tour, le ppGpp active le système à deux composants LetA/S, LetE, RpoS et peut-être le régulateur global RpoN qui ensemble favorisent l'expression de gènes responsables des caractères de la phase transmissive comme la cytotoxicité, l'évasion, la mobilité et la sensibilité au sodium. Mais si LetA agit directement en produisant un ARN régulateur similaire à CsrB séquestrant CsrA et levant sa répression, les régulateurs RpoS et RpoN peuvent activer directement les gènes.

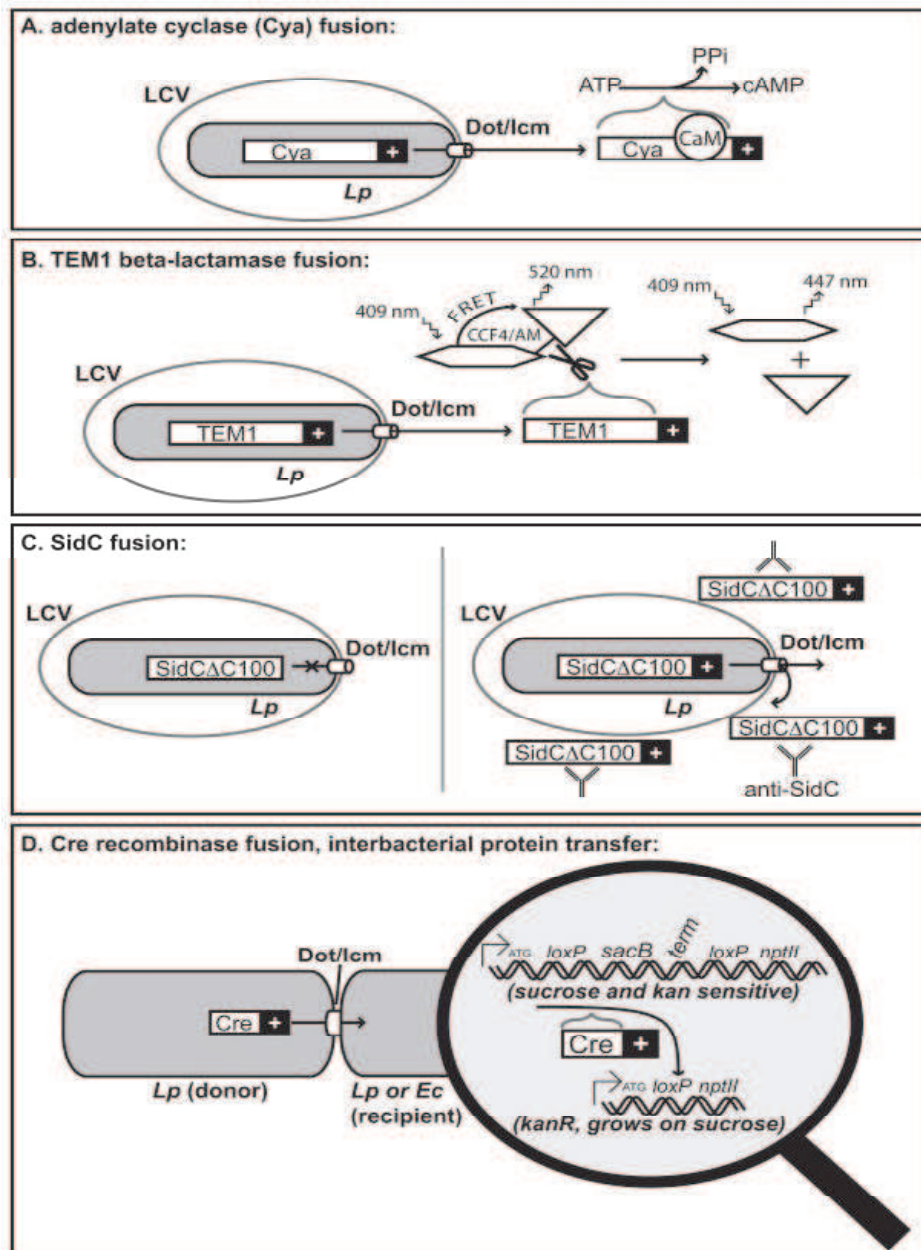


Figure 21. Les différentes stratégies utilisées pour étudier la sécrétion d'effecteurs par le système Dot/Icm de *Legionella* (Ensminger & Isberg, 2009).

A. Fusion avec l'adénylate cyclase (Cya). Pour savoir si un effecteur est sécrété dans une cellule eucaryote, une fusion de cet effecteur est effectuée avec la partie C-terminale de l'adénylate cyclase Cya. L'adénylate cyclase qui catalyse la formation d'AMPc n'est active qu'en présence de son cofacteur la calmoduline (caM) uniquement présente dans les cellules eucaryotes. En cas de « translocation » il y a augmentation du taux d'AMPc intracellulaire dans la cellule eucaryote. **B. Fusion avec la (TEM-1) β -lactamase.** Dans cette technique, une molécule, le CCF4 modifié pour passer à travers les membranes (CCF4/AM) est chargée dans les cellules eucaryotes. CCF4 comprend deux fluorophores la coumarine et la fluorescéine reliés entre eux par un anneau β -lactame. En l'absence d'une β -lactamase, l'excitation de la coumarine à 409 nm donne lieu à un transfert d'énergie (FRET) à la fluorescéine qui émet une fluorescence à 520 nm (vert). Mais si l'on introduit une β -lactamase dans une fusion avec un effecteur, la « translocation » de l'effecteur dans la cellule eucaryote conduit au clivage de CCF4 au niveau de l'anneau β -lactame séparant les deux fluorophores. Il en résulte que l'excitation de la coumarine ne donne plus de signal FRET mais conduit à l'émission d'une fluorescence bleue à 447 nm. **C. Fusions à SidC.** SidC est un effecteur sécrété par Dot/Icm. SidC délété de sa partie C-terminale ne peut être sécrété à moins qu'il ne soit fusionné à la partie C-terminale d'un effecteur sécrété par le système Dot/Icm. La « translocation » est détectée par un marquage aux anticorps (immunofluorescence) ciblant SidC. **D. Fusions à la recombinase Cre.** La « translocation » de protéines peut être étudiée entre deux cellules bactériennes. Chez la cellule donneuse la recombinase Cre est fusionnée à un signal de sécrétion d'une protéine candidate. La bactérie réceptrice contient un site rapporteur flanqué par des séquences loxP reconnues par la recombinase Cre. Si il y a « translocation » de la fusion Cre-séquence signal (c'est-à-dire que la séquence signal candidate est un signal de sécrétion de la protéine testée qui est alors un substrat de l'appareil de sécrétion) alors il y a transfert de la recombinase vers la cellule réceptrice. La recombinase effectuée la recombinaison au niveau des sites loxP provoquant la perte du gène *sacB* (marqueur de contre-sélection) et la constitution en parallèle de la fusion traductionnelle loxP-*nptII* (neomycine phosphotransférase) conférant la résistance à la kanamycine aux cellules réceptrices.

Les problèmes posés par la redondance ont donc conduit à développer différentes stratégies afin d'identifier certains effecteurs transportés et de caractériser leur fonction. Les approches développées ont été orientées afin de trouver des effecteurs intervenant dans le détournement du trafic intracellulaire de l'hôte. Ainsi, l'analyse des génomes a révélé un nombre important de gènes codant pour des protéines putatives ayant des domaines d'homologie à des protéines eucaryotes impliquées dans le trafic intracellulaire. Le rôle de certaines d'entre elles a pu être établi par une approche intéressante consistant à faire exprimer ces gènes de façon hétérologue chez la levure puis à observer les perturbations du trafic vésiculaire dans ces cellules. L'activité de certaines de ces protéines a pu être caractérisé de façon biochimique et une méthode de translocation a permis de vérifier qu'il s'agissait bien de protéines sécrétées via le système Dot/Icm (Figure 21).

Ces différentes stratégies ont ainsi permis d'identifier un vaste répertoire d'effecteurs intervenant dans le contrôle des différentes étapes du cycle infectieux. Les effecteurs de *Legionella* possèdent des domaines eucaryotes impliqués dans les interactions protéines-protéines (répétitions ankyrines, répétitions riches en leucines, domaines « coiled-coils ») et des domaines avec des activités définies (kinase, ubiquitine ligase, shingosine-1-phosphate lyase, phospholipase, méthyl et acetyltransférases, facteurs d'échanges). Ces effecteurs ont été répertoriés sur le site <http://microbiology.columbia.edu/shuman/effectors.htm>. Cependant même si un grand nombre d'effecteurs sont découverts, peu sont caractérisés fonctionnellement, et, même quand c'est le cas, leur rôle au cours de l'infection est sujet à discussion.

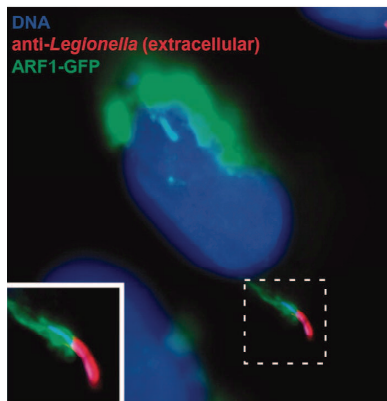
2.3.4.1. Remodelage de la vacuole par action sur les protéines G

Après l'internalisation, les phagosomes contenant *Legionella* ne fusionnent pas avec les lysosomes (non-acquisition du marqueur LAMP-1) empêchant ainsi la dégradation de la bactérie. Toute mutation ciblant les gènes *dot/icm* codant un système de sécrétion de type IV conduit à une maturation de la vacuole et donc à la dégradation des cellules bactériennes. De ce fait il a été suggéré que des effecteurs transitant via cet appareil de sécrétion interviendraient dans l'inhibition de la fusion de façon directe ou indirecte, étape essentielle à la survie de *L. pneumophila* dans la cellule hôte. Cette inhibition de la fusion coïncide avec un remodelage de la vacuole. Un nombre important d'organelles du trafic intracellulaire de l'hôte sont recrutés au LCV (« Legionella containing vacuole ») durant l'infection. Ainsi, dès 15 minutes après la capture, des vésicules dérivant du réticulum de l'hôte s'accumulent autour du LCV. Celles-ci sont accompagnées par des facteurs de l'hôte modulant le trafic entre le réticulum et le golgi : calnexine, PI(4)P phosphatidylinositol(4) phosphate, Sec22b et les petites GTPases Arf1 et Rab1. Au fur et à mesure que l'infection progresse, des ribosomes et des mitochondries sont également recrutés au LCV et les vésicules recrutées fusionnent avec le LCV pour achever l'établissement d'une vacuole répliquative possédant d'étonnantes similarités avec le réticulum endoplasmique granuleux. Dans le but de moduler le trafic du réticulum au golgi dans les cellules eucaryotes, il a été montré que *Legionella* a une action régulatrice sur les protéines G Arf1 et Rab1 via l'action de certains effecteurs.

a. RalF, un facteur d'échange bactérien

RalF est le premier effecteur à avoir été découvert via une recherche au sein du génome de *L. pneumophila* afin de trouver des gènes codant pour des protéines potentielles présentant une homologie aux facteurs d'échanges eucaryotes de la famille Arf.

La protéine RalF est sécrétée par *Legionella* lors de l'infection des macrophages. La stratégie pour révéler cette sécrétion a consisté à utiliser une fusion du gène *ralF* avec le gène

A**B**

L372
↓

RalF	TIERNLALKEGVKDPDAEMQKEKGRQLKF
LidA	PSVTSIRSKTDEVLEQRFNPTPSLSPPFKTS
SidA	EHTKIAEQKTTDTTNEQVPTTFDSISKPTR
SidB	RSGKSAQTFREFVQRTEADHAVKSIPEIN
SidC	TSKQFREAMGEITGRNEPPTDTLYTGIIKK
SidD	HNPAGSDIHSTLNLWTADKIKAAATNSSLTI
SidE	DELLNEFGKQAPRTEMIKTVEEKQGTLLRL
SdeC	VSTKIGKEPVKQDHTITIDEESDDIRYGF
SidF	KPKDMTSKVDLTAAMEDDNRSESTPTPVNF
SidG	EPSMSSTIDEENIDSEHQIETGTETMRI
SidH	QNIKGPEPVATPMETPENEAPLVNANITRF
LepA	SKRPCFFKTRSHRLLEEVDITILHSMAPTSS
LepB	TFFSQTNSGKKLDALEKAISSTHSETLVYIG

Figure 22. La sécrétion de RalF vers le cytoplasme de la cellule hôte.

A . Photo de microscopie à fluorescence montrant le recrutement de ARF1 par *Legionella* (Nagai *et al.*, 2005) . Les cellules CHO exprimant la fusion ARF1-GFP (fluorescence verte) ont été infectées pendant 5 minutes avec *Legionella*. Avant perméabilisation de la membrane cellulaire de l'hôte, les legionelles extracellulaires ont été marquées au DAPI (bleu) après perméabilisation. Sur le cliché, on voit une legionelle extracellulaire recrutant ARF1-GFP au site d'internalisation.

B. RalF possède un domaine C-terminal nécessaire à sa « translocation » (Nagai *et al.*, 2005).

L'alignement de la séquence C-terminale de RalF avec d'autres effecteurs sécrétés par Dot/Icm montre à défaut d'un motif la présence de résidus hydrophobes ou d'un résidu proline aux positions -3 ou -4 avant la fin de l'extrémité C-terminale (encadré). RalF par exemple a une leucine (hydrophobe) à la position -3 (L372) dont la substitution (par un acide aminé hydrophile L372S et L372T) résulte en un défaut sévère de « translocation ».

rapporteur *cya* codant pour l'adénylate cyclase. Cette enzyme catalyse la formation d'AMP cyclique et ne fonctionne qu'à l'intérieur de la cellule eucaryote étant donné que son cofacteur, la calmoduline, n'est pas retrouvée dans les cellules procaryotes (Nagai *et al.*, 2002). Dans le cas de *Legionella*, l'augmentation du taux d'AMPc intracellulaire, donc de la sécrétion de RalF, a été observée uniquement dans la situation où le gène *dotA*, un gène essentiel au système de sécrétion de type IV n'est pas délété. Le domaine impliqué dans la sécrétion de RalF par le système de type IV de *Legionella* réside dans les 20 derniers acides aminés de sa région C-terminale (Nagai *et al.*, 2005) : une délétion de seulement trois acides aminés dans cette région abolit la sécrétion de cette protéine. L'alignement de la séquence de RalF avec d'autres protéines sécrétées par ce système (protéines SidA-H, LidA et LepA-B) a révélé la présence d'un acide aminé hydrophobe essentiel à la sécrétion en position -3 ou -4 en amont de la fin de la partie C-terminale (Figure 22). Dans le cas de RalF cet acide aminé correspond à une leucine localisée en position 372 : toute substitution de cette leucine par un acide aminé hydrophile entraîne une réduction de la sécrétion de la protéine. Cette situation est similaire à d'autres systèmes de type IV où, par exemple, la séquence C-terminale est suffisante pour sécréter les protéines associées à l'ADN d'*Agrobacterium*. Cette séquence pourrait donc également correspondre à un signal de sécrétion pour RalF. De façon intéressante, la protéine RalF possède dans sa région N-terminale un domaine d'homologie Sec7 conservé dans la famille des facteurs d'échange eucaryotes comme la protéine humaine ARNO (Jackson & Casanova, 2000) , un facteur d'échange de la protéine Arf (Figure 23). Associée au Golgi, la protéine G, nommée Arf est impliquée dans le trafic intracellulaire entre le réticulum et le golgi. Elle permet notamment le retour de vésicules au Réticulum et est également responsable de la formation d'un compartiment de transition localisé à mi-chemin entre le Réticulum et le Golgi et nommé ERGIC (« ER-Golgi Intermediate Compartment ») (Figure 24).

L'analyse de la structure du domaine Sec7 obtenue d'après la cristallisation de RalF montre qu'elle est superposable au domaine Sec7 du facteur d'échange ARNO (Amor *et al.*, 2005). Ce domaine, organisé en hélices α , (Figure 25) laisse apparaître une poche de liaison à la protéine Arf, essentiellement composée d'acides aminés hydrophobes, et un domaine en « doigt de Glutamate » où le résidu glutamate en position 103 s'est révélé être nécessaire au recrutement de Arf au niveau des phagosomes contenant *Legionella in vivo*. Une étude montrant que RalF peut fixer le GTP sur Arf *in vitro* a néanmoins révélé que ce résidu n'est pas nécessaire à son activité catalytique, contrairement aux résultats obtenus avec les facteurs d'échange eucaryotes.

La découverte du fait que Arf est nécessaire à l'interaction du phagosome avec les vésicules dérivées du Réticulum (Kagan & Roy, 2002) permet de proposer que RalF est impliqué dans la formation du phagosome de multiplication de par son rôle dans l'activation et le recrutement de la protéine Arf. Cependant, le fait que la protéine RalF n'est pas essentielle à la multiplication bactérienne (Nagai *et al.*, 2002) révèle qu'il existe d'autres effecteurs impliqués dans la formation de la vacuole de multiplication capables d'interférer avec les fonctions de la cellule infectée au cours de la pathogénèse.

```

ARNO      72  FNMDPKKGIQFLVENELL--QNTPEETARFL-YKGEGLNKTAIGDYLGEREELNLAVLHAFVDLHEFTDLNL
cytohesin-1 73  FNMDPKKGIQFLIENDLL--KNTCEDIAQFL-YKGEGLNKTAIGDYLGERDEFNIQVLHAFVELHEFTDLNL
GRP1      77  FNMDPKKGIQFLIENDLL--QSSPEVAQFL-YKGEGLNKTVIGDYLGERDEFNIKVLQAFVELHEFADLNL
Sec7      838  FNNKPKKAIIPVLLKKGFLK-DDSPISTAKWL-LETEGLDMAAVGDYLGEGDDKNIAIMHAFVDEFDFGMSI
p200     709  FNKKPKRGIQYLOEQGML--GTPPEDIAQFL-HQEERLDSTQVGEFLGDNDKFNKEVMYAVVDQHDVSGKDF
GBF1     710  FNQKPKKGIQFLOEKGLLTIPMDNTEVAQWL-RENPRLDKMI GEFVSDRKNID--LLESFVSTFSFQGLRL
Gea1     552  FNEKAKKGIQMLTEKGFID-SDSNRDIASFLFLNNGRLNKKTI GLLCDPKKTS--LLKEFTDLDFRGLRV
Legionella 16  FNAKPKNGINKIKETICEQYKISPNEETAEFFHQQRKNLDLEAVGDYLSPEAENQQVLKAFTSQMNFNQGSF
Rickettsia 17  FNDKPKSGIARIKKWCTDNNQDFIAETA KIFYEKSNLNLFEVGDYLGTDGVDNQQVLESFTKQDFFREKDY

ARNO      141  VQALRQFLWSFRLPGEAQKIDRMMEAFQRY-----CLC-----NPG--V-----FQSTDTCYV
cytohesin-1 142  VQALRQFLWSFRLPGEAQKIDRMMEAFQRY-----CQC-----NNG--V-----FQSTDTCYV
GRP1      146  VQALRQFLWSFRLPGEAQKIDRMMEAFASRY-----CLC-----NPG--V-----FQSTDTCYV
Sec7      908  VDALRSFLOSFRLPGEQKIDRFMLKFAERF-----VDQ-----NPG--V-----FSKADTAYV
p200     778  VSALRMFLEGFRLPGEAQKIDRLMEKFAARY-----LEC-----NQQQTL-----FASADTAYV
GBF1     779  DEALRLYLEAFRLPGEAPVIRLLEAFTERW-----MNC-----NGS-PF-----ANSDACFS
Gea1     621  DEAIRILLTKFRLPGESQQTIRIVEAFSSKYSADQSNDKVELEDKKAGKNGSESMTEDDIIHVQPDADSVFV
Legionella 88  VEGLRFTLKTFKLPGEAQKIDRLVQSFSGAY-----FQN-----PDV--VS-----NADAAYL
Rickettsia 89  LESLRRLQSFKLPGEAQKIDRLVESFGTHY-----YEQN-----LNID--IN-----SKDAAYI

ARNO      188  LSFVIMLNTSLHNPVNRDK---PGLERFVAMNRGINEGGDLPEELLRNLYDSTRNEPFKIPEDDGND-
cytohesin-1 189  LSFVIMLNTSLHNPVVKDK---PTVERFIAMNRGINDGGDLPEELLRNLYESTKNEPFKIPEDDGND-
GRP1      193  LSFVIMLNTSLHNPVNRDK---PTAERFIAMNRGINEGGDLPEELLRNLYESTKNEPFKIPEDDGND-
Sec7      955  LSYSIMLNTDLHSSQIKNK---MSLQEFLENNEGIDNGRDLPRDFLEGLFNETANNEIKLISEQHQAM
p200     827  LAYSIMLTTDLHSEQVKNK---MTKEQYIKMNRGINDSKDLPEEYLSAIYNETAGKKISMKETKELTI
GBF1     826  LAYAVIMLNTDCHNHNVRKQAPMTLEEFERKNLKGVNGGKDFEQDILEDMYHAIKNEEIVMPEEQTGLV
Gea1     693  LSYSIMLNTDSLHNPQVKDH---MTFDDYSNNLRGCYNGKDFPRWYDHKIYTSIKVKEIVMPEEHGNE
Legionella 135  LAFQTIMLNTDLHNPISPEK-NKMTVDGLKRNLRGGNNGGDFDAKFL EELYSEIKAKPFELNFKVKTSP-
Rickettsia 137  LAYQTIMLNTDLHNPISIAKS-KKMTFQGLKNNLRGTNESKNFNDNFKKKIYDETEAKPFKLNFKVDS---

```

Figure 23. La protéine RalF possède un domaine d'homologie retrouvé chez le facteur d'échange Sec7 (Nagai *et al.*, 2002).

Les facteurs d'échange eucaryotes de la protéine G Arf possèdent un domaine catalytique homologue à celui retrouvé dans la protéine Sec7 un facteur d'échange qui active la protéine G Arf par fixation de GTP à la place du GDP. De manière intéressante, l'alignement de la séquence de RalF montre une région N-terminale de 200 acides aminés identique à 41% aux domaines d'homologie à Sec7 trouvés chez des membres de la famille des facteurs d'échange eucaryotes de Arf que sont les protéines Gea1, GBF1, ARNO, la Cytohesine 1, GRP1 et p200.

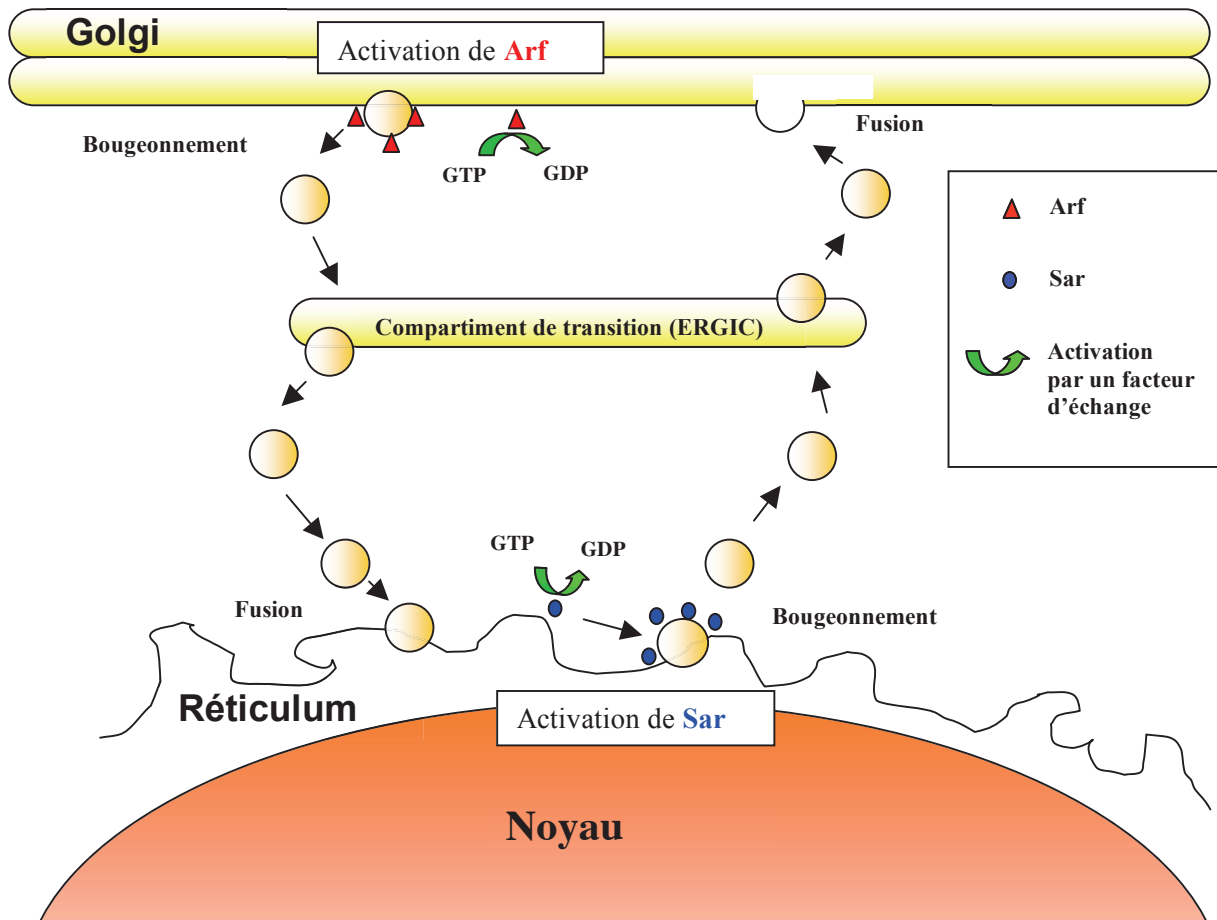
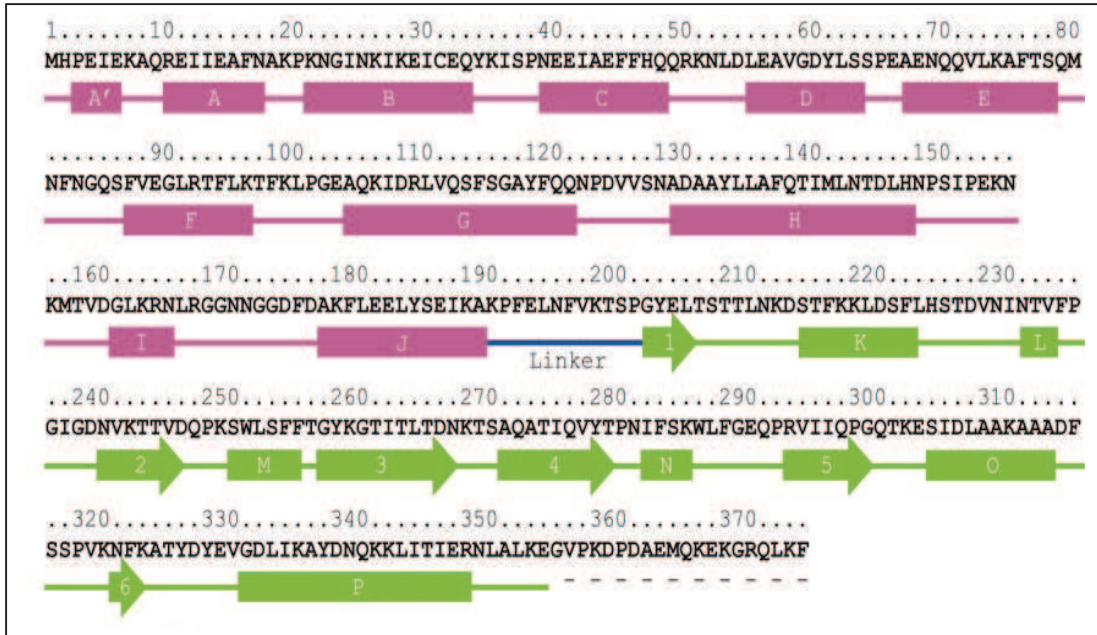


Figure 24. Contrôle du trafic membranaire entre le Réticulum Endoplasmique Granuleux (REG) et le Golgi (Behnia & Munro, 2005). Ce schéma montre que le trajet des vésicules entre ces deux compartiments est contrôlé par deux protéines G : la protéine G Sar (formation des vésicules à partir du Réticulum) et la protéine G Arf (bourgeonnement à partir du Golgi) qui sont activées par la fixation du GTP grâce à un facteur d'échange. Ce trafic qui met en jeu une série d'événements de bourgeonnement et de fusion permet la formation d'un compartiment de transition ou ERGIC.

A



B

RalF

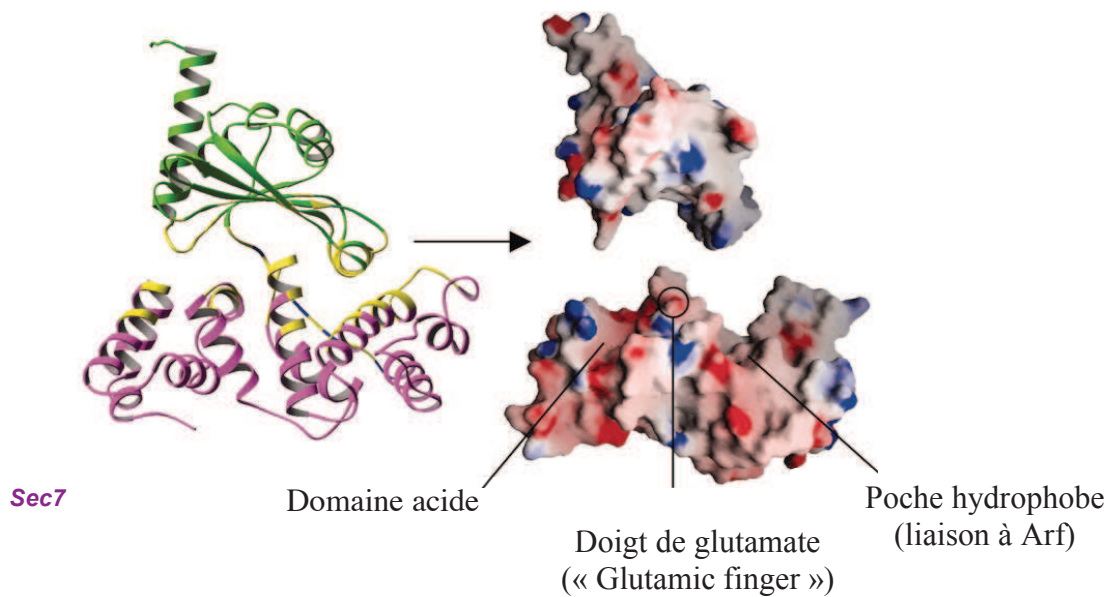


Figure 25. Structure de RalF déduite après cristallisation.

A. Séquence de RalF (Amor *et al.*, 2005). Les hélices et les feuillettes sont indiqués par des rectangles et des flèches respectivement. Le domaine Sec7 est en magenta, le domaine linker en bleu et le domaine SCD (« sec7 capping domain ») en vert. RalF comprend 16 hélices (A-P) et 6 feuillettes. Le domaine Sec7 comprend 11 hélices alpha (hélices A-J) alors que le domaine SCD comprend 6 feuillettes β (1-6) et 6 hélices α (K-P).

B. Structure de RalF (Amor *et al.*, 2005). Les deux principaux domaines sont le domaine Sec7 (violet) et le domaine SCD qui le recouvre. Les zones d'interaction entre ces deux domaines sont représentées en jaune. A droite, la structure en 3 dimensions déduite d'après la charge des acides aminés (acides en rouge et basiques en bleu) révèle que le domaine Sec7 possède trois sous-régions : une poche de liaison à Arf hydrophobe, un domaine acide et une région en forme de doigt de glutamate où le résidu Glutamate en position 103 est essentiel pour le recrutement de Arf au niveau des phagosomes *in vivo*.

b. L'effecteur LidA

La stratégie développée par Conover *et al.* a permis d'identifier LidA comme un effecteur sécrété par *Legionella* (Conover *et al.*, 2003). Dans cette étude, le suivi d'infections au sein des macrophages a montré que les phagosomes contenant le mutant *ΔlidA* étaient colocalisés avec le marqueur LAMP-1 caractéristique des endosomes tardifs ou lysosomes. Cette observation a permis de supposer que LidA interviendrait dans l'évasion à la fusion entre le phagosome et le lysosome au cours de l'infection. Ceci expliquerait les défauts de multiplication intracellulaire observés dans les macrophages avec les mutants *ΔlidA*. Exprimée chez *Saccharomyces cerevisiae*, LidA est capable de perturber le trafic intracellulaire des protéines (Figure 26) (Conover *et al.*, 2003). Sa surexpression dans d'autres cellules eucaryotes (cellules COS1) conduit à une rupture du trafic entre le réticulum et le Golgi. Ce phénomène observable lorsque l'on surexprime Rab1, une protéine G régulant le trafic entre le réticulum et le golgi, a permis de suggérer qu'il s'agissait peut-être là de la cible de LidA. Ce lien a été établi par Machner *et al.* qui ont démontré une interaction entre Rab1 et LidA (plus forte affinité avec la forme liant le GTP) ainsi qu'un défaut de recrutement de Rab1 aux phases précoces (30 min mais pas à 2 heures) de l'infection en l'absence de LidA (Machner & Isberg, 2006).

c. L'effecteur SidM (aussi nommé DrrA).

SidM, un autre effecteur de *Legionella*, a été identifié comme facteur d'échange capable de catalyser l'échange de GDP pour fixer du GTP sur Rab1 *in vitro* (Murata *et al.*, 2006). Au cours de l'infection, l'absence de SidM est à l'origine d'un sévère défaut de recrutement de Rab1 (moins de 3% des vacuoles recrutent Rab1). Outre ces rôles, Machner *et al.* ont montré que SidM permet la libération de Rab1 d'un facteur de séquestration. Ces facteurs de séquestration ou GDI : (« GDP-Dissociation Inhibitor ») sont connus pour extraire les protéines G des membranes et les maintenir sous forme inactive dans le cytosol. En catalysant la libération de Rab1 du GDI, SidM peut ensuite l'activer via son activité facteur d'échange (Machner & Isberg, 2007) et permet l'interception de vésicules transitant entre le réticulum et le golgi. L'interception de ces vésicules est augmentée aussi en présence de LidA (action synergique). Selon Machner *et al.* LidA exercerait son action complémentaire en : (i) inhibant l'hydrolyse de l'activité GTP de Rab1, (ii) interférant avec l'inactivation de Rab1 par des GAP ou (iii) en liant Rab1-GDP après hydrolyse du GTP pour éviter son extraction membranaire par des facteurs de séquestration (GDIs). De ce fait, LidA renforcerait l'action de SidM sur Rab1 en maintenant Rab1 actif suite à la fixation de GTP par SidM (i et ii) ou en évitant la séquestration de Rab1 (iii) par des GDI (rendant Rab1 immédiatement accessible à SidM pour l'activer). Cette coopération entre LidA et SidM qui aboutit au recrutement et à l'activation de Rab1 illustre une remarquable stratégie pour détourner le trafic intracellulaire et intercepter des vésicules de la cellule hôte.

d Les effecteurs de la famille Vip

Saccharomyces est un excellent modèle qui a été utilisé pour identifier des effecteurs de *Legionella* intervenant dans le détournement du trafic intracellulaire (Campodonico *et al.*, 2005). L'outil développé par Shody *et al.* prend avantage d'une protéine hybride résultant de la fusion combinant le domaine Inv (β -D-fructofuranoside fructohydrolase) du gène SUC2 et le domaine carboxypeptidase Y ou CPY du gène PRC1 (Shohdy *et al.*, 2005) (Figure 27).

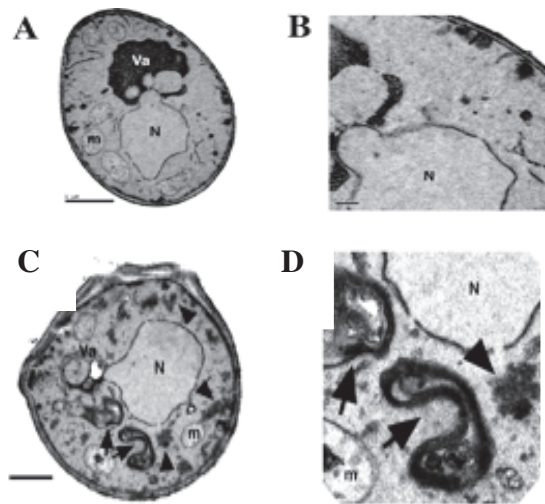


Figure 26. Effets de LidA sur le trafic intracellulaire de la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Derre & Isberg, 2005).

Cellules de levures exprimant un plasmide contrôle (A et B) ou le même plasmide contenant *lidA* sous le contrôle d'un promoteur inducible en présence de galactose. L'observation fine au microscope électronique permet de voir l'accumulation de vésicules (têtes de flèches) et de vésicules (flèches) lorsqu'on induit l'expression de *lidA*. **N** : Noyau; **m** : mitochondrie; **Va** : vacuole.

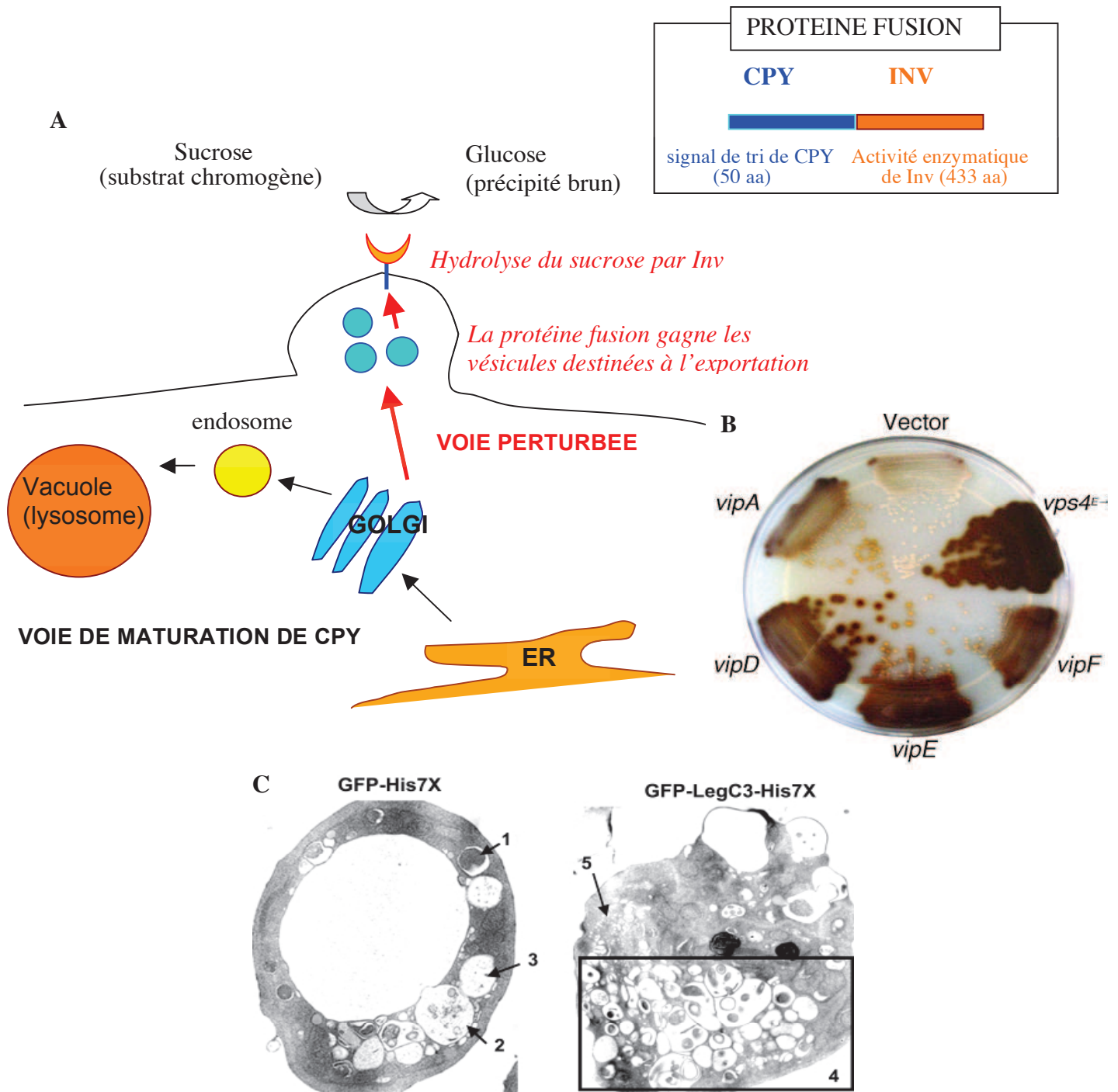


Figure 27. Identification d'effecteurs causant des perturbations du trafic intracellulaire eucaryote.

A. Schéma représentant le principe de mise en évidence des perturbations du trafic intracellulaire chez *Saccharomyces* (Shohdy *et al.*, 2005). Après synthèse, la protéine CPY subit des modifications au niveau du Golgi puis gagne des endosomes avant d'atteindre la vacuole où elle réside. Une perturbation de ce trafic intracellulaire (flèches rouges) conduit à chargement de CPY dans des vésicules destinées à la surface cellulaire. L'utilisation d'une fusion CPY-Inv permet de révéler ce défaut de trafic puisque dans ce cas le domaine permettant l'hydrolyse des sucres (codé par le gène *inv*) est exposé à la surface des cellules. En utilisant du sucrose couplé à un substrat chromogène on révèle cette hydrolyse « anormale » par la formation d'un précipité brun (formation de glucose) témoin d'un trafic perturbé.

B. Test qualitatif de sécrétion de la fusion CPY-Inv (Shohdy *et al.*, 2005). La perturbation du trafic intracellulaire chez les levures exprimant VipD, VipF, VipE et VipA conduit à la formation d'un précipité brun. $Vps4^{E > Q}$ correspond à un témoin positif : il s'agit de l'ATPase Vps4p où la mutation d'un glutamate en position 233 altère sa fonction de contrôle du trafic intracellulaire (« vacuole protein sorting »).

C. Microscopie électronique de cellules de *Dictyostelium* exprimant des fusions LegC3-GFP (de Felipe *et al.*, 2008). 1. matériel non digéré; 2. matériel partiellement digéré; 3. matériel complètement digéré; 4. Un nombre anormal de vésicules avec un matériel partiellement digéré.

La protéine fusion CPY-Inv qui transite entre le réticulum et le golgi rejoint les endosomes tardifs et est normalement séquestrée au sein de vacuoles. Une perturbation de ce trafic intracellulaire peut conduire la protéine fusion à emprunter des vésicules adressées à la surface cellulaire. Exposée à la surface cellulaire de manière anormale la protéine peut alors hydrolyser du sucrose grâce au domaine Inv une activité révélée en présence d'un substrat chromogène indiquant la production de glucose par une coloration brune et correspondant au phénotype *Vps⁻* (« vacuolar protein sorting »). Cette stratégie a permis de retrouver les effecteurs de *Legionella* précédemment identifiés comme LidA, RalF et SidM mais également d'en identifier de nouveaux qui sont capables de perturber le trafic intracellulaire de cette levure. Parmi ces protéines baptisées vip (pour « VPS inhibitor protein »), VipA, VipD et VipF sont capables de perturber le trafic de *Saccharomyces*.

e. Les effecteurs de la famille Leg

D'autres études ont permis d'ajouter des effecteurs ayant pour conséquence un défaut de croissance chez la levure comme les protéines de la famille Ylf (« yeast lethal factor »). Parmi celles-ci on compte les protéines YlfA et YlfB déjà identifiées par De Felipe *et al.* comme les protéines LegC7 et LegC2 sur la base de recherche de motifs eucaryotes (« *Legionella* eucaryotic genes ») (de Felipe *et al.*, 2008) (Campodonico *et al.*, 2005).

Bien que la fonction de ces protéines reste encore obscure, ces études qui indiquent que ces protéines ciblent des voies conservées du trafic intracellulaire chez la levure laisse penser qu'elles jouent un rôle dans le remodelage de la vacuole de *Legionella* lors de l'infection. Ainsi l'expression de LegC3 chez *Dictyostelium* cause l'accumulation de vésicules ou endosomes contenant des bactéries non lysées (Figure 27).

f. L'effecteur LepB

Afin de trouver d'autres protéines interagissant avec Rab1, Ingmundson *et al.* ont réalisé des expériences de co-immunoprécipitation (Ingmundson *et al.*, 2007). Il s'est avéré que LepB, un effecteur sécrété peu de temps après la capture des bactéries (2 heures après l'infection), est capable de lier Rab1 sous sa forme fixée au GTP (Rab1-GTP). La question a alors été de savoir quelle était la signification de cette interaction : la protéine LepB était-elle un effecteur ou un régulateur de Rab1. A l'évidence les observations de l'effet de la surexpression de LepB, qui a résulté en une dispersion et une fragmentation de l'appareil de Golgi, a laissé penser à un rôle de régulateur. La perturbation de la fonction de Rab1 contrôlant le trafic entre le Réticulum et le Golgi expliquerait ces effets. Dès lors Ingmundson *et al.* ont entrepris de caractériser l'activité de LepB (Ingmundson *et al.*, 2007). Tenant compte du fait que LepB liait la forme Rab1-GTP, ils ont immédiatement pensé à un rôle de GAP, hydrolysant le GTP sur Rab1. Cette hypothèse a été vérifiée *in vitro* faisant de LepB une GAP de Rab1.

2.3.4.2. Remodelage de la vacuole par ciblage du transport des vésicules microtubule-dépendant

Parmi les effecteurs de *Legionella* certaines protéines, dont AnkX, possèdent des domaines à répétition ankyrine ou Ank = « Ankyrin repeats containing proteins » (Pan *et al.*, 2008) (Figure 28). Chez les mutants délétés pour le gène *ankX*, Pan *et al.* ont observé que les phagosomes présentent un défaut de colocalisation avec le marqueur LAMP-1, caractéristique des lysosomes. Cette observation indique un rôle de AnkX dans l'évasion de la fusion phagosome/ lysosome. Cette action s'exercerait via un blocage par AnkX du transport de

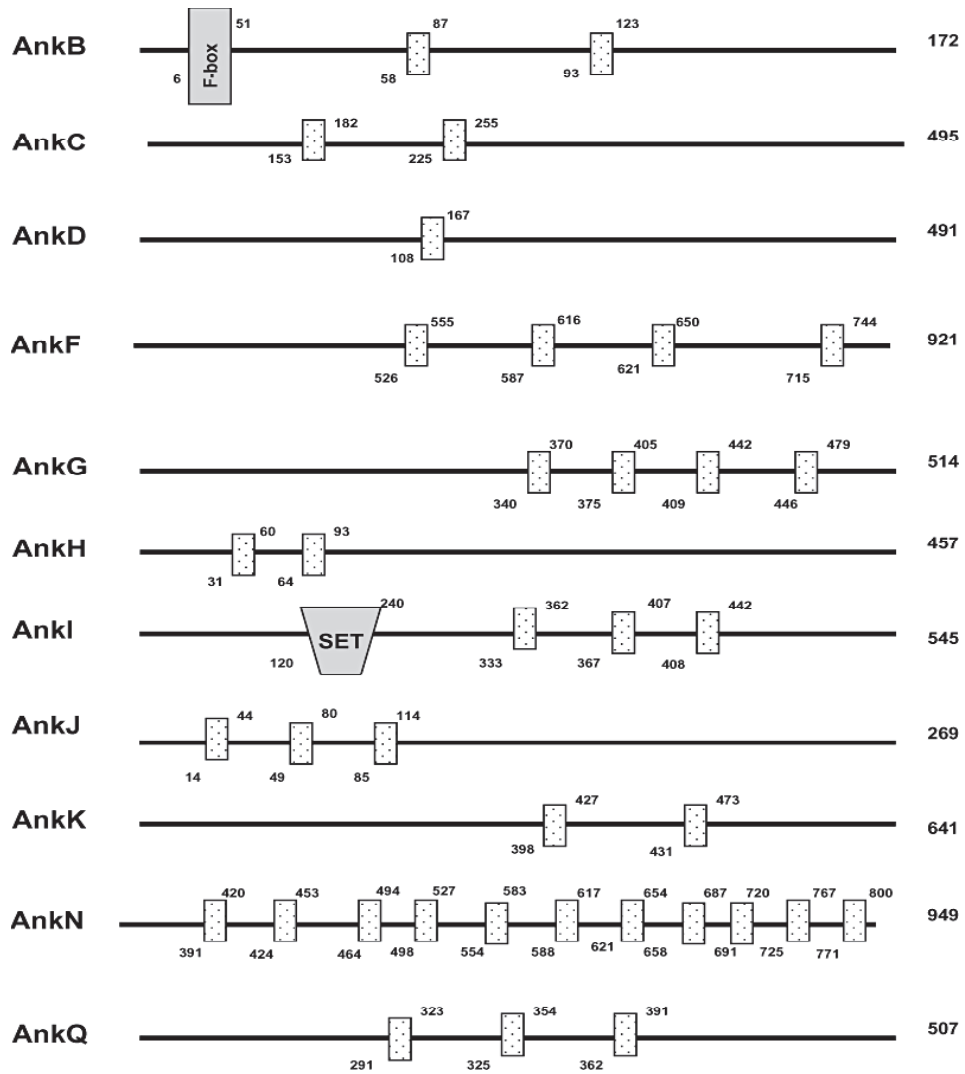


Figure 28. Les répétitions ankyrines chez les protéines Ank de *Legionella pneumophila* (Habyarimana *et al.*, 2008).

Cette représentation schématique montre la localisation des répétitions ankyrines (boîtes blanches) et des motifs non ankyrine (boîtes grises) sur les séquences des protéines de la famille Ank chez *L. pneumophila*.

vésicules LAMP-1 destinées à la fusion avec le phagosome dépendant des microtubules.

Outre AnkX d'autres protéines à motifs ankyrine ont été étudiées : parmi elles, AnkH et AnkJ nécessaires à la réplication intracellulaire seraient également impliquées dans le remodelage du phagosome sans perturbation notable du trafic intracellulaire (Habyarimana *et al.*, 2008).

2.3.4.3. Remodelage de la vacuole par recrutement du réticulum

SidJ fait partie d'une large famille d'effecteurs identifiés comme substrats du système de sécrétion Dot/Icm à travers une approche utilisant le système rapporteur Cre/LoxP (Luo & Isberg, 2004). Le gène *sidJ* est situé au sein d'un opéron comprenant les gènes *sdeC*, *sdeB* et *sdeA* dont la délétion entraîne un défaut de multiplication intracellulaire d'un facteur 20 chez les macrophages. Cependant il a été montré que la simple complémentation des mutants (délétés au niveau de tout l'opéron) par une courte région génique comprenant *sidJ* permettait de restaurer la capacité de multiplication des mutants (Liu & Luo, 2007). Par la suite, la construction d'un mutant délété uniquement pour *sidJ* a permis de montrer que ce gène était à lui seul responsable du défaut de multiplication observé 24 à 48h après infection de macrophages dérivés de la lignée U937 (Liu & Luo, 2007), un défaut de multiplication aussi observé chez l'hôte *Dictyostelium discoideum*. Mais le résultat le plus intéressant est le fait que la délétion de *sidJ* affectait le recrutement de la calnexine, une protéine résidente au niveau du phagosome. Ceci permet de suggérer un rôle de *sidJ* dans l'étape cruciale du remodelage du phagosome.

2.3.4.4. Remodelage de la vacuole par le ciblage des phosphoinositides

Les phosphoinositides sont des lipides qui régulent des fonctions essentielles des cellules eucaryotes (Weber *et al.*, 2009). Ils interviennent dans la transduction de signaux intracellulaires, dans l'architecture du cytosquelette et dans la dynamique des membranes au sein de la cellule. Différents phosphoinositides se distribuent au sein de compartiments membranaires eucaryotes (organelles) : ils se distinguent par leur niveau de phosphorylation en position 3,4 et/ou 5. La membrane plasmique est enrichie en PI(4,5)P₂, PI(4)P et de façon transitoire en PI(3,4,5)P₃ (durant la phagocytose et la transduction de signaux) PI(4)P s'accumule principalement à l'appareil de Golgi mais a récemment été découvert au niveau des endosomes précoces et également des phagosomes et des corps multivésiculaires (MVBs) qui sont aussi « décorés » par PI(3,5)P₂ (Figure 29). Différentes bactéries pathogènes ont appris à manipuler le métabolisme des phosphoinositides pour détourner la signalisation et le trafic intracellulaire à leur propre compte pour assurer leur survie et leur multiplication intracellulaire (Figure 29). Il existe des preuves que *Legionella* manipule le métabolisme des phosphoinositides. Ainsi, l'inhibition de la kinase PI3K, phosphorylant des phosphoinositides chez *Dictyostelium* favorise la survie et la réplication de *Legionella*. Mais d'autres travaux ont prouvé l'implication d'effecteurs dans la manipulation des phosphoinositides.

A

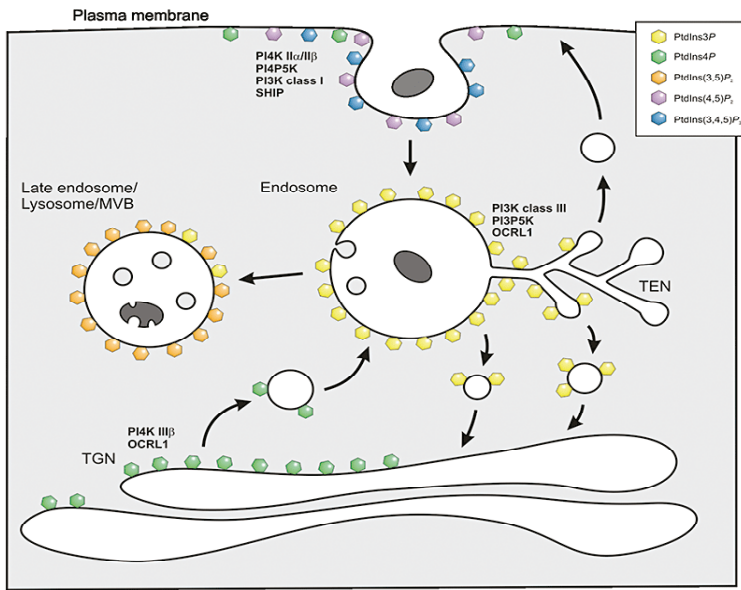


Figure 29. Les phosphoinositides (PI), cibles des bactéries pathogènes (Weber *et al.*, 2009).

A. Distribution des phosphoinositides et des enzymes intervenant dans le métabolisme des phosphoinositides dans la cellule.

La membrane plasmique est enrichie en PI(4)P et PI(4,5)P₂, produits par les PI 4-kinases (PI4K) IIα/β et PI(4)P-5 kinase (PI4P5K) respectivement. Lors de la phagocytose PI(4,5)P₂ est convertit en PI(3,4,5)P₃ par une PI3 kinase de classe I (PI3K) ou hydrolysé en PI(3,4)P₂ par la 5-phosphatase SHIP. Les endosomes précoces et le réseau tubulaire associé aux endosomes (TEN) sont caractérisés par les PI(3)P produits par des PI3K de classe III. PI3P est ensuite converti en PI(3,5)P₂ par une PI(3)P-5 kinase (PI3P5K) au niveau des corps multivésiculaires (MVB) des endosomes tardifs et des lysosomes. PI(4)P est produit au niveau de l'appareil de Golgi (face trans) à partir de PI par PI4KIIIβ et/ou à partir de PI(4,5)P₂ par la 5-phosphatase OCRL1. PI(4)P est localisé au niveau des vésicules de sécrétion, du réticulum.

B. Exemple de bactéries pathogènes détournant le métabolisme des phosphoinositides.

Pour entrer dans les cellules non phagocytaires *Listeria monocytogenes* exprime la protéine InlB qui se lie au récepteur Met sur la cellule hôte. Cette liaison conduit à l'activation de la PI3K de classe I et à la production de PI(3,4,5)P₃. Les kinases PI4KIIα et IIβ sont également recrutées au site d'entrée produisant PI(4)P et facilitant l'internalisation de la bactérie.

L'entrée de *Brucella abortus* dans la cellule hôte dépend également de PI3K de classe I, II et III.

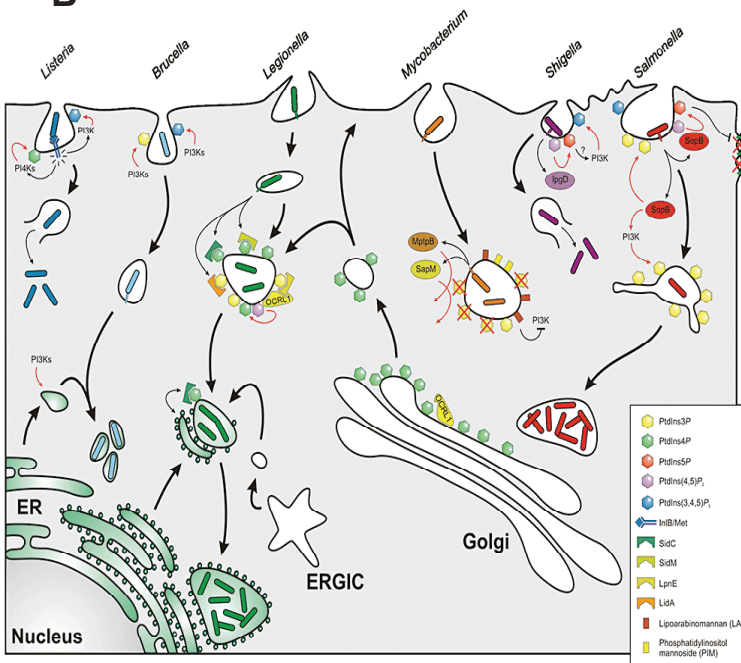
Dans le cas de *Legionella*, les PI permettent l'ancrage d'effecteurs délivrés par le système de sécrétion de type IV à la membrane du phagosome : PI(4)P permet l'ancrage de SidC et SidM alors que PI(3)P permet l'ancrage de LidA et LpnE. PI(4)P serait produit par la kinase PI4KIIIβ et/ou la PI5-phosphatase Dd5P4/OCRL1 (impliquée dans le transport rétrograde de vésicules des endosomes au transgolgi (TGN)).

Mycobacterium inhibe la maturation du phagosome via l'élimination de PI(3)P à la surface du phagosome. Pour cela, les phosphatases SapM et MptpB sont sécrétées et de plus le lipoarabinomannan (LAM) analogue des PI inhibe l'activation des PI3K de classe III produisant PI(3)P. PIM (précurseur de phosphatidylinositol mannoside) permet néanmoins une certaine interaction entre le phage et des endosomes (fusion).

Lors de l'entrée dans les cellules non phagocytaires, *Shigella flexneri* transloque IpgD, une polyphosphatase agissant sur les PI. IpgD est à l'origine des modifications de morphologie des cellules en hydrolysant PI(4,5)P₂. Ceci permet de générer PI(5)P qui à son tour active les PI3K de classe I (et des voies de survie cellulaire dépendant de la kinase Akt).

Salmonella sécrète un homologue de IpgD : SopB/SigD pour favoriser sa capture dans la cellule hôte. SopB agit en éliminant PI(4,5)P₂ du site d'entrée, active la voie anti-apoptotique dépendante de Akt et ouvre les jonctions serrées compromettant l'intégrité épithéliale. Produit en réponse à SopB et la kinase de classe III (PI3K) VPS34, PI(3)P permet la formation d'une vacuole de multiplication en favorisant le recrutement du composant SNX1 (« sorting nexin-1 ») et de la protéine SNARE : VAMP8.

B



a. L'effecteur LpnE

Le rôle de cet effecteur a été mis en évidence par les travaux de Weber *et al.* (Weber *et al.*, 2009). Dans cette étude il a été montré que l'IP5P, une enzyme capable de déphosphoryler les phosphoinositides, est recrutée à la membrane du phagosome chez *Dictyostelium*. L'idée a alors émergée qu'un effecteur serait à l'origine du recrutement de cette phosphatase qui assure notamment dans le transport rétrograde des vésicules vers le Golgi, pour ce qui est le cas de l'IP5P humaine OCRL1. Un effecteur de *Legionella* interagissant avec OCRL1 a pu être identifié dans cette étude : il s'agit de LpnE déjà identifié comme favorisant l'entrée dans la cellule hôte et empêchant l'acquisition de marqueurs lysosomiaux par le phagosome. LpnE, en exploitant l'IP5P permettrait de contrôler plusieurs phases de l'infection. De plus, LpnE lierait directement des phosphoinositides comme PI(3)P.

b. L'effecteur SidC

SidC est un effecteur délivré par *Legionella* et nécessaire au recrutement de vésicules en provenance du réticulum au phagosome, une activité dépendante de sa partie N-terminale. Cet effecteur, qui se localise à la membrane du phagosome durant l'infection, peut lier le PI(4)P *in vitro*. Cette liaison s'effectue au niveau d'un fragment de 20 kDa nommé domaine P4C (PI(4)P-binding of SidC) ne présentant pas d'homologie avec les domaines eucaryotes exerçant la même fonction. Le PI(4)P, véritable marqueur caractéristique des phagosomes contenant *Legionella* est également lié par d'autres effecteurs (Figure 30).

c. Les effecteurs SidM/DrrA et LidA

Ces effecteurs, qui régulent tous deux l'activité de la protéine G Rab1 (cf 3.3.4.1), lient également les phosphoinositides. Ainsi SidM a été identifié comme un autre effecteur capable de lier le PI(4)P grâce à son domaine P4M localisé en C-terminale de 10 kDa (« PI(4)P-binding of SidM/DrrA ») ne possédant pas d'homologie avec le domaine P4C de SidC. Durant l'infection, il entre même en compétition avec l'effecteur SidC pour lier le PI(4)P à la membrane du phagosome. LidA, qui favorise la fonction de SidM, lie le PI(3)P et le PI(4)P.

2.3.4.5. Les effecteurs ciblant le système d'ubiquitination

a. L'effecteur LubX

LubX (ou LegU2) a été identifié comme un effecteur sécrété par l'appareil de sécrétion Dot/Icm de *Legionella* (Kubori *et al.*, 2008). L'analyse de la séquence de cette protéine a permis d'identifier la présence de 2 domaines U-box normalement retrouvés dans les ubiquitines ligases (E3). Chez les eucaryotes, les ubiquitines ligases sont un élément important de la machinerie de dégradation : elles peuvent lier les enzymes intervenant dans la fixation de l'ubiquitine à la protéine substrat à dégrader (Piper & Luzio, 2007). De manière intéressante il s'est avéré que LubX de *Legionella* était capable d'ubiquitiner la protéine Clk1 (« cell cycle protein ») intervenant dans le cycle cellulaire de l'hôte vraisemblablement pour la conduire à la dégradation (Figure 31). Cependant, comme bien d'autres effecteurs, le rôle de LubX et de son activité d'ubiquitination au cours de l'infection sont loin d'être éclaircis,

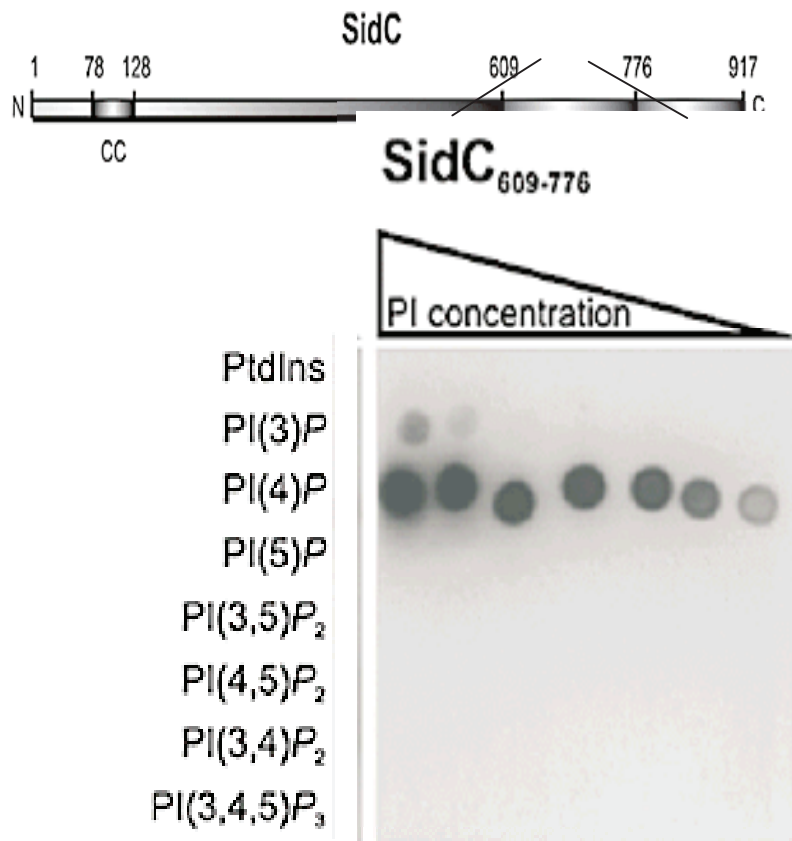
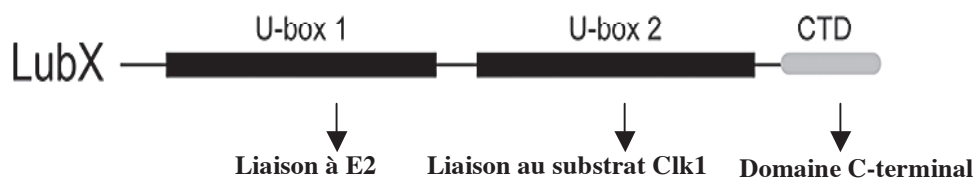


Figure 30. SidC lie PI4(P) *in vitro* (Ragaz *et al.*, 2008).

Schéma représentant la séquence de l'effecteur SidC (106 kDa). CC se réfère à un domaine « coiled-coil ». Le domaine P4C («PI(4)P-binding domain of SidC») de 20 kDa (entre les acides aminés 609 et 776) permet la liaison spécifique au PI(4)P comme le montre le résultat de l'incubation du fragment P4C avec des dilutions de PI immobilisés sur une membrane de nitrocellulose. La détection est réalisée par immunofluorescence : un anticorps primaire reconnaît une étiquette GST sur le fragment P4C puis un anticorps secondaire couplé à une peroxydase permet la révélation après ajout d'un substrat chromogène.

A



B

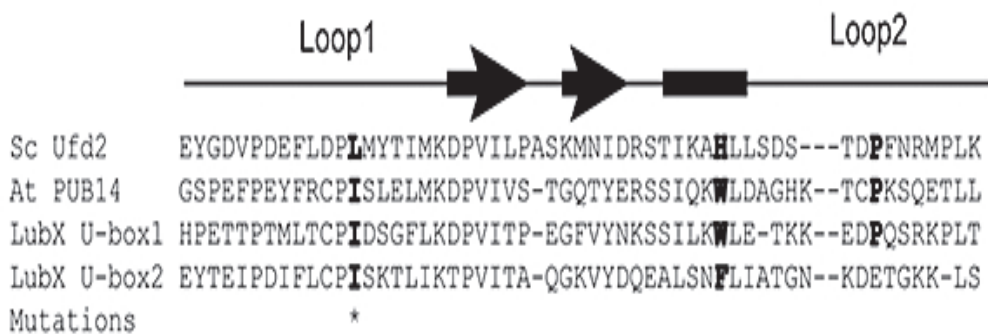


Figure 31. LubX, une E3 ubiquitine ligase (Kubori *et al.*, 2008).

A. Représentation schématique de la séquence de LubX : LubX présente deux domaines ayant une remarquable similarité avec les domaines « U box » eucaryotes et un domaine C-terminal présentant le signal de « translocation ». Les domaines U-box sont retrouvés chez les E3 ubiquitine ligases eucaryotes. Des expériences ont permis de montrer que le domaine « U-box 1 » sert à lier l’enzyme E2 de conjugaison de l’ubiquitine (« ubiquitin conjugating enzyme ») nécessaire à l’ubiquitination alors que le domaine « U-box 2 » sert à lier le substrat ubiquitiné par LubX à savoir la protéine Clk1 .

B. L’alignement des séquences des deux domaines « U-box » avec des protéines eucaryotes contenant des domaines U-box : ScUfd2 (*Saccharomyces cerevisiae* Ufd2) et AtPUB14 (*Arabidopsis thaliana* PUB14). Cet alignement fait apparaître la conservation dans la position de résidus hydrophobes cruciaux (« patch » hydrophobe) pour la liaison de E2 dans le domaine « U-box1 » : ces résidus marqués en gras sont I (isoleucine (en position 39) et la proline. Le domaine « U-box 2 » au contraire manque le résidus Proline invariant dans la boucle 2 suggérant qu’il n’est pas impliqué dans la liaison de E2.

d'autant qu'au moins 2 autres protéines possèdent un domaine F-box également caractéristique des ubiquitines ligases.

b. L'effecteur SetA

Une étude chez *Saccharomyces* a permis d'identifier 21 effecteurs (Heidtman et al., 2009) perturbant le trafic intracellulaire parmi lesquelles 3 protéines ont été plus étudiées : les protéines Ceg19 et Ceg9 (« co-regulated with the effector encoding genes ») possédant un domaine de reconnaissance à PmrA (Zusman *et al.*, 2007) et la protéine SetA. Il s'est avéré que la protéine SetA (« subversion of eucaryotic vesicule ») est ubiquitinée chez les cellules eucaryotes (levures et cellules HeLa). Cette ubiquitination n'a cependant jamais été détectée au cours d'une infection. Une analyse de la séquence SetA a permis d'identifier un domaine glycosyltransférase et une mutation au sein de ce domaine (motif DxD) bloque la capacité de SetA à affecter la croissance et le trafic intracellulaire chez la levure (Figure 32). Une des cibles suggérée par Heidtman *et al.* qui prend appui sur les données expérimentales, serait une des protéines intervenant dans l'endocytose ubiquitine-dépendante (Heidtman *et al.*, 2009). En inactivant de telles protéines par glycosylation, SetA empêcherait l'entrée du phagosome dans la voie de maturation endocyttaire aboutissant à la dégradation lysosomiale.

Un tel domaine glycosyltransférase est retrouvé au sein des toxines de *Clostridium difficile*. Ces toxines sont capables d'inactiver les protéines G Rho en fixant une molécule de glucose sur un résidu thréonine conservé au sein de leur région catalytique. Cette homologie confrontée aux observations laisse suggérer que SetA, de manière similaire à ces toxines, fixerait du glucose sur des protéines de l'hôte impliquées dans le trafic intracellulaire.

2.3.4.6. Effecteurs intervenant dans la mort de la cellule hôte

Legionella peut causer la mort de sa cellule hôte dès 1 heure d'incubation, et ce, dès une multiplicité d'infection ou MOI de 5 (cinq bactéries pour une cellule). *Legionella* peut également lyser les érythrocytes, une faculté liée à la présence du système de sécrétion de type IV Dot/Icm. Ces effets délétères dits cytotoxiques dépendraient là aussi d'effecteurs sécrétés par *Legionella*.

Belyi *et al* ont identifiés 3 protéines chez *Legionella* possédant une activité cytotoxique qui ont le motif DxD retrouvé au sein des protéines faisant partie de la famille des glycosyltransférases. Elles ont été nommées Lgt (*Legionella* glycosyltransférases) (Belyi *et al.*, 2008) (Belyi *et al.*, 2006). L'activité glycosyltransférase caractérise les cytotoxines de *C. difficile* (toxines TcdA et TcdB) qui ciblent la protéine G Rho pour la glycosyler. L'altération des protéines G rho nécessaires à la signalisation intracellulaire et au maintien de la structure du cytosol entraîne généralement la mort cellulaire.

Chez *Legionella* les protéines Lgt1,2,3 sont capables de glycosyler le facteur d'élongation eEF1A (une autre protéine capable de fixer le GTP) au niveau d'un résidu sérine (sérine 53), une faculté liée au motif DxD, un site de fixation de cofacteurs enzymatiques. Cette simple modification a pour conséquence l'inactivation d' eEF1A et donc l'abolition de la synthèse protéique à l'origine de la mort cellulaire.

2.3.4.7. Les effecteurs à activité anti-apoptotique

A l'opposé de l'effet cytotoxique, Losck *et al.* ont montré qu'à de faibles multiplicités d'infection (MOI de 1 ou dose infectieuse) *Legionella* peut induire le déclenchement de la voie de signalisation anti-apoptotique conduisant à l'activation du facteur de transcription NFκB (Figure 33) (Losick & Isberg, 2006) (Abu-Zant *et al.*, 2007). Cette découverte souligne

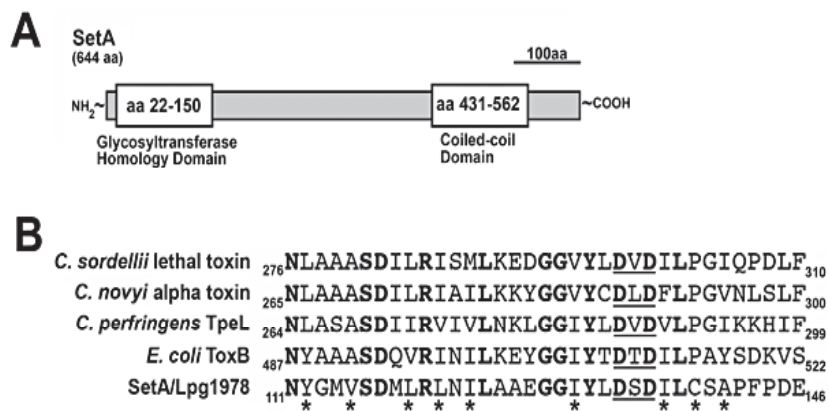


Figure 32. SetA possède un domaine glycosyltransférase (Heidtman *et al.*, 2009).

A. Représentation schématique de la séquence de SetA avec les domaines prédits. La région N-terminale de SetA a des homologies avec les glycosyltransférases eucaryotes et procaryotes alors que la région C-terminale serait un domaine coiled-coil.

B. La partie N-terminale de SetA a des homologies avec des cytotoxines glycosylantes (« glycosylating cytotoxin »). Les résidus 111 à 146 de SetA sont alignés à des régions homologues de cytotoxines bactériennes. Les acides aminés identiques sont en gras alors que les résidus de caractère similaire sont marqués avec un astérisque. La position du motif DxD conservé est soulignée. L'alignement est fait avec ClustalW.

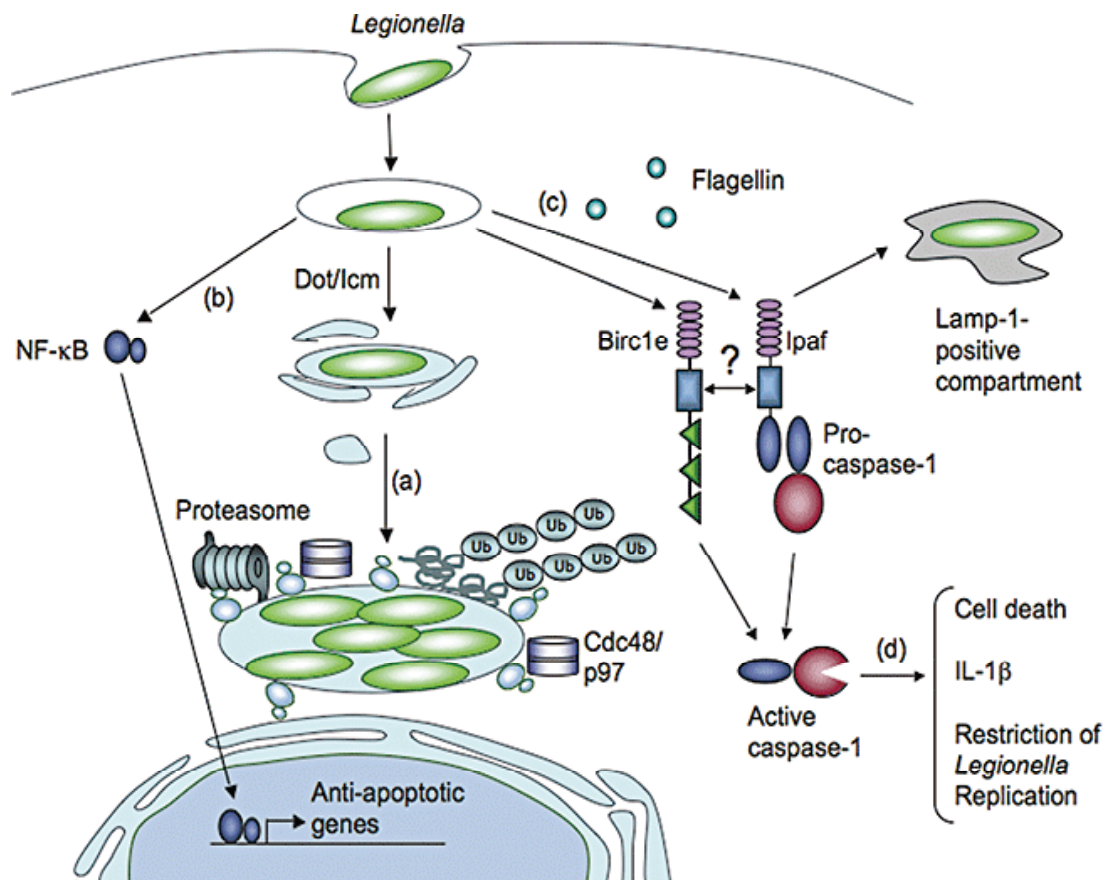


Figure 33. Manipulation de l'hôte par *Legionella* pour assurer sa survie et sa réplication (Shin & Roy, 2008).

Deux éléments sont importants pour la survie et la réplication de *Legionella* dans l'hôte.

a. Le recrutement du protéasome Cdc48/p97 ainsi que des protéines ubiquitinées au phagosome favorisent la réplication de *Legionella*.

b. Le déclenchement de la voie de signalisation NF-κB active l'expression de gènes anti-apoptotiques nécessaires à la survie de l'hôte.

Mais l'hôte active différents mécanismes pour restreindre la réplication de *Legionella*.

c. Ainsi les protéines Birc1e, les récepteurs Nod-LRR et la protéine Ipaf (activée par la reconnaissance de la flagelline cytosolique) conduisent à l'activation de la caspase 1.

d. La caspase 1 est ensuite capable de cliver des substrats causant la mort de la cellule hôte, la production d'IL-1β, la fusion des phagosomes avec les lysosomes et restreignant la réplication de *Legionella*.

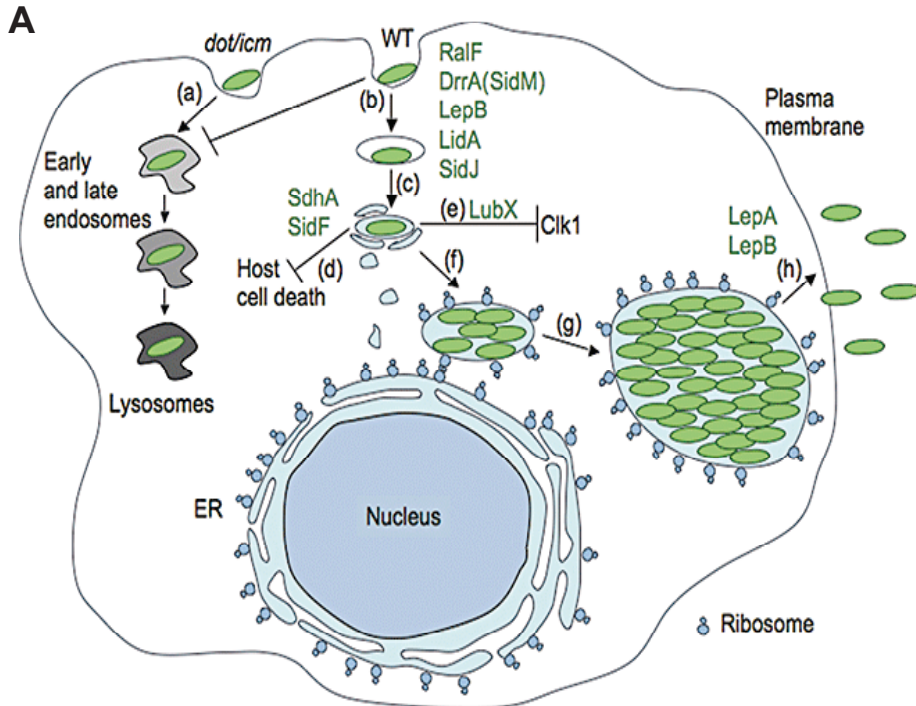


Figure 34. *Legionella* manipule son hôte afin de mener à bien le cycle infectieux.

A. *Legionella* utilise divers effecteurs sécrétés par le système de type IV Dot/Icm pour manipuler son hôte et mener à bien son cycle infectieux (Shin & Roy, 2008).

(a) Des mutants du système de type IV gagnent la voie de dégradation lysosomiale aboutissant à la lyse des bactéries.

(b) Dans le cas normal (souche sauvage WT) *Legionella* détourne son phagosome de la voie de dégradation classique. Pour cela, *Legionella* utilise son système de sécrétion de type IV pour injecter divers effecteurs dans l'hôte pour assurer sa survie et sa réplication.

(c) Ainsi les effecteurs RalF et DrrA (SidM) recrutent Arf1 et Rab1 au phagosome. La protéine SNARE Sec22b contrôlant la fusion du phagosome avec des vésicules de l'hôte est également recrutée. Ces effecteurs (et peut être d'autres) permettent au phagosome d'intercepter des vésicules dérivées du réticulum qui normalement sont destinées à l'appareil de Golgi.

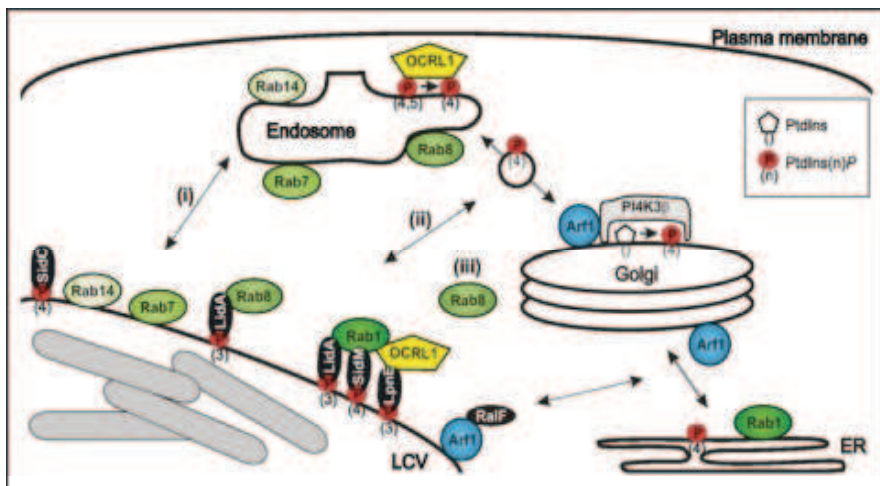
(d) Les effecteurs SdhA et SidF inhiberaient la mort de la cellule hôte et l'effecteur LubX (e) ubiquitine la protéine Clk1.

(f) Le phagosome ainsi modifié est entouré de ribosomes (et contient des marqueurs du réticulum). A un stade plus tardif, LepB permettrait d'éliminer Rab1 du phagosome (LCV).

(g) Le phagosome ainsi modifié permet la multiplication des cellules bactériennes.

(h) A la fin du cycle *Legionella* est capable de sortir de la cellule hôte grâce aux effecteurs LepA et B dont le rôle dans cette libération reste flou.

B



B. Détail des étapes précoces de l'infection (Urwyler *et al.*, 2009).

Le phagosome de *Legionella* bien qu'il évite la fusion avec les lysosomes est capable d'interagir avec la voie endosomale comme en témoigne la présence de marqueurs comme la petite protéine G Rab7 à la surface de la vacuole. Pour manipuler le métabolisme des phosphoinositides (PI), le phagosome acquiert également à sa surface une inositol polyphosphate 5-phosphatase (IP5P) Dd5P4 de *Dictyostelium* dont l'homologue nommé OCRL1 (« oculocerebrorenal syndrome of Lowe ») chez les cellules de mammifère est impliquée dans le transport rétrograde de vésicules des endosomes vers le trans golgi (TGN). Le phagosome recrute également la protéine G Rab8 qui localisée aux endosomes permet la fusion de ces vésicules avec des vésicules du transgolgi et Rab14 localisée aux lysosomes. L'acquisition de marqueurs de la voie endosomale (Rab8 et OCRL1) par le phagosome se ferait soit par (i) une fusion directe entre le compartiment endosomal et phagosomal (ii) par une interception de vésicules transitant entre les endosomes et le Golgi ou (iii) par l'acquisition des marqueurs dans le cytosol. Des effecteurs sont impliqués dans le remaniement de la vacuole tel que LidA qui interagissant avec Rab8 favorise l'activation de Rab1 par un autre effecteur SidM/DrrA un facteur d'échange ou GEF. Outre la voie endosomale le phagosome interagit également avec la voie de sécrétion en acquérant des marqueurs du réticulum tels que la calnexine et la calréticuline. Cette interaction dépend de l'activité des petites protéines G telles que Arf1 et Rab1 : Arf1 est activée par le facteur d'échange RalF et Rab1 peut être activée par SidM qui fonctionne également comme un inhibiteur de protéines G de par son activité GDI (« GDP dissociation inhibitor »).

Les effecteurs interagissent avec les PI que sont : Pi(4)P (cas de SidC, SidM) ou PI(3)P (cas de LpnE et LidA). Cette interaction permettrait leur ancrage à la membrane du phagosome (la modification des PI sur la phagosome permettrait la fixation séquentielle d'effecteurs suivant l'étape du cycle) mais permettrait également de manipuler des voies de signalisation ou le trafic intracellulaire de l'hôte via la mobilisation de PI clefs de certaines voies.

à quel point *Legionella* manipule son hôte : en début d'infection (faible dose de bactéries) l'activation de signaux antiapoptotiques permettrait de maintenir en vie la cellule hôte afin de permettre dans un premier temps la réplication. Suite à la réplication, le nombre de cellules bactériennes augmentant (forte dose de bactéries) causerait la mort de la cellule hôte par effet cytotoxique.

Au moins deux effecteurs chez *Legionella* ont été identifiés comme facteurs anti-apoptotiques.

a. L'effecteur SdhA

Le premier de ces facteurs SdhA, identifié initialement comme important pour la multiplication intracellulaire, interfère avec la voie de signalisation des caspases conduisant à l'apoptose selon un mécanisme peu connu. Ainsi, en l'absence de SdhA on observe une augmentation de l'activité des caspases ainsi qu'une libération du cytochrome C dans le cytosol, un signal capable de déclencher la voie des caspases. Cependant, certaines observations effectuées en présence d'un inhibiteur de caspases (certaines cellules sont encore altérées) suffisent à prouver que SdhA agirait via d'autres mécanismes différents de la stimulation des caspases pour aboutir à la mort de la cellule hôte (Laguna *et al.*, 2006). De plus il semble que SdhA n'agisse pas eul pour inhiber complètement la voie des caspases.

b. L'effecteur SidF

Le second facteur SidF, identifié par Luo et Isberg dès 2004, joue également un rôle significatif dans la protection de la cellule hôte contre l'apoptose (Luo & Isberg, 2004). Ainsi, les essais TUNELS ont permis de révéler que 14 h après l'infection, 22% de cellules infectées avec le mutant *ΔsidF* étaient apoptotiques, contre près de 6% avec la souche non délétée.

Un système double-hybride a été développé pour capturer des protéines de l'hôte capables de fixer SidF. Cette approche a permis d'identifier deux protéines de la famille Bcl2 impliquées dans la mort cellulaire : BNIP3 et Bcl-rambo. Banga *et al* ont également observé une diminution importante de l'apoptose (environ 27%) de cellules MCF-7 lorsque SidF et Bcl rambo y étaient co-exprimés comparé à l'apoptose uniquement induite par Bcl-rambo (Banga *et al.*, 2007). Ce résultat, corrélé aux observations précédentes, a permis de suggérer que SidF exerçait son action anti-apoptotique en ciblant Bcl-rambo (une activité très certainement localisée dans la partie C-terminale de la protéine SidF) (Laguna *et al.*, 2006).

2.3.4.8. Conclusion

Même si elle reste inachevée, l'étude de divers effecteurs et la caractérisation de leur fonction révèle l'étendue des stratégies utilisées par la bactérie *Legionella* pour survivre et se répliquer dans sa cellule hôte (Figure 34). Au-delà du cas de *Legionella*, les études sur les bactéries pathogènes intracellulaires met en lumière le rôle important joué par les systèmes de sécrétion. Ces systèmes capables de sécréter ou d'injecter des effecteurs dans la cellule hôte s'avère essentiel à la virulence bactérienne.

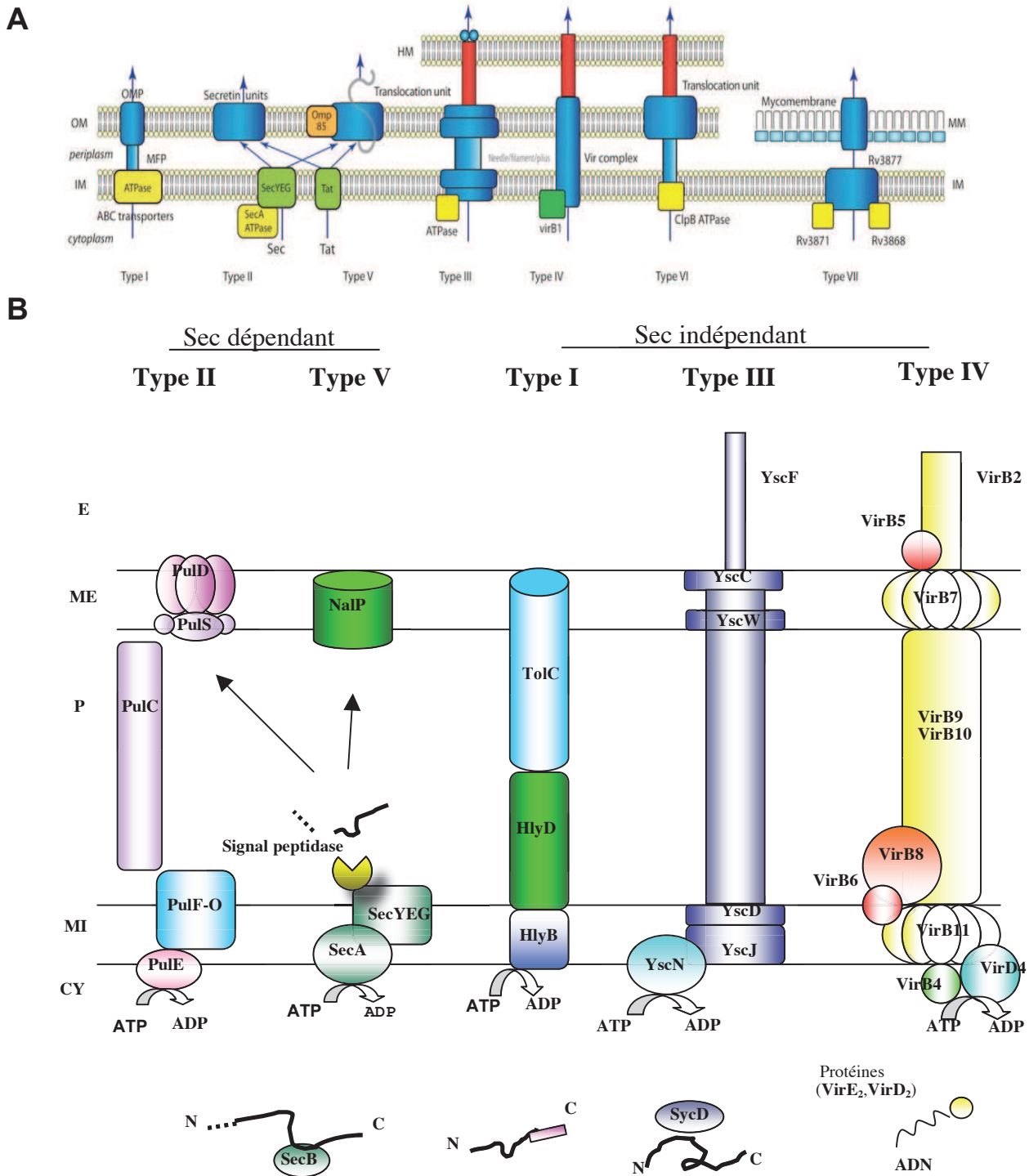


Figure 35. Les systèmes de sécrétion bactériens. A. Représentation schématique des sept systèmes de sécrétion connus (Tseng *et al.*, 2009) : le type I forme un canal continu compte 3 protéines et fonctionne grâce à l'énergie fournie par l'ATPase de la membrane interne ; les types II et V effectuent une sécrétion en deux étapes car le substrat est d'abord adressé au périplasm par le système Sec ou Tat avant de gagner le pore de la membrane externe ; les types III, IV et VI peuvent délivrer des protéines effectrices dans une cellule hôte et enfin le système VII caractérisé chez *Mycobacterium spp.* permet de délivrer des protéines à travers l'enveloppe bactérienne. B. Détail de systèmes de sécrétion principaux (Remaut & Waksman, 2004) : de type I (Hly) de l' α -hémolysine d'*Escherichia coli*, de type II (Pul) de *Klebsiella oxytoca*, de type III (Ysc) de *Yersinia spp.*, de type IV (VirB) d'*Agrobacterium tumefaciens* et de type V (NalP et TspA) de *Nisseria meningitidis*. Les systèmes de type II et V sont dit Sec dépendants : dans ce cas, la protéine sécrétée possède une séquence N-terminale (représentée en pointillés) clivée par une signal peptidase. Une protéine exportée via le système de type II peut également emprunter la voie Tat. Dans le cas de la sécrétion de type V la protéine peut former (type Va) ou non (type Vb) le canal de translocation. Dans le cas du système de type I, la reconnaissance de la protéine à sécréter met en jeu une séquence C-terminale (rectangle violet).

HM : « host membrane » ; **OM** : « outer membrane » ; **IM** : « inner membrane » ; **MM** : « mycobacterial membrane » ; **OMP** : « outer membrane protein » ; **MFP** : « membrane fusion protein » ; **CY** : Cytoplasme, **MI** : Membrane interne, **P** : Périplasm, **ME** : Membrane externe, **E** : Milieu extracellulaire, **C** : extrémité COOH, **N** : extrémité NH₂.

IV Le rôle clé des complexes multiprotéiques de l'enveloppe bactérienne

Les membranes exercent des fonctions vitales à la survie cellulaire. Elles forment une barrière sélective contrôlant le mouvement de protéines et de sucres grâce à des transporteurs dont certains sont très spécifiques. Chez les bactéries à Gram négatif, du fait de la complexité de l'enveloppe cellulaire (double membrane), le mouvement de substrats (protéines ou autres composés) dépend de machineries complexes. Certaines de ces machineries multiprotéiques sont impliquées dans la virulence des bactéries. Les plus étudiées sont les systèmes de sécrétion assurant le transport des protéines et les pompes d'efflux impliquées dans le rejet de composés toxiques.

L'étude de mutants incapables de se multiplier dans les phagocytes a permis d'identifier les gènes impliqués dans cette survie intracellulaire. Nombre de ces gènes codent pour des systèmes de sécrétion qui permettent d'injecter les protéines bactériennes nécessaires à la virulence directement dans le cytosol de la cellule infectée. Ces systèmes de sécrétion sont également impliqués dans l'invasion des cellules épithéliales et jouent un rôle essentiel dans des étapes clés du processus infectieux des bactéries pathogènes.

L'accent sera mis sur deux types de systèmes de sécrétion présents chez des bactéries pathogènes intracellulaires : le système de sécrétion de type III de *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Typhimurium (que nous nomerons *S. Typhimurium* par la suite) qui est l'un des mieux caractérisés à ce jour et le système de type IV de *L. pneumophila* qui est indispensable pour établir une vacuole propice à la multiplication du pathogène à l'intérieur de la cellule hôte.

1. Les différentes classes de systèmes de sécrétion

Les systèmes de sécrétion sont très répandus dans le monde bactérien. Il s'agit de transporteurs actifs classés en sept types (types I à VII) et se composant de protéines qui forment un pore permettant l'exportation de molécules diverses (ADN, toxines, enzymes) à travers l'enveloppe bactérienne (Remaut & Waksman, 2004) (Saier *et al.*, 2008).

Dans le cas des bactéries à Gram négatif, les substrats de ces systèmes doivent franchir la membrane interne et la membrane externe soit en une étape (transports de types I, III, et IV), soit en deux étapes (types II et V) comme le montre la Figure 35. Les systèmes de type VI et VII moins connus ouvrent un nouveau champ d'étude.

1.1. Sécrétion en deux étapes (« two partner system secretion »)

Dans les systèmes de type II et V, les protéines à sécréter sont transportées en deux étapes.

1.1.1. Les systèmes de type II

Les systèmes de type II sont la principale voie de sécrétion d'enzymes lytiques chez les bactéries (Sandkvist, 2001). Ils permettent la sécrétion d'enzymes pectiques et de cellulases par *Erwinia*, d'élastase, de phospholipase et d'exotoxines par *Pseudomonas* et de

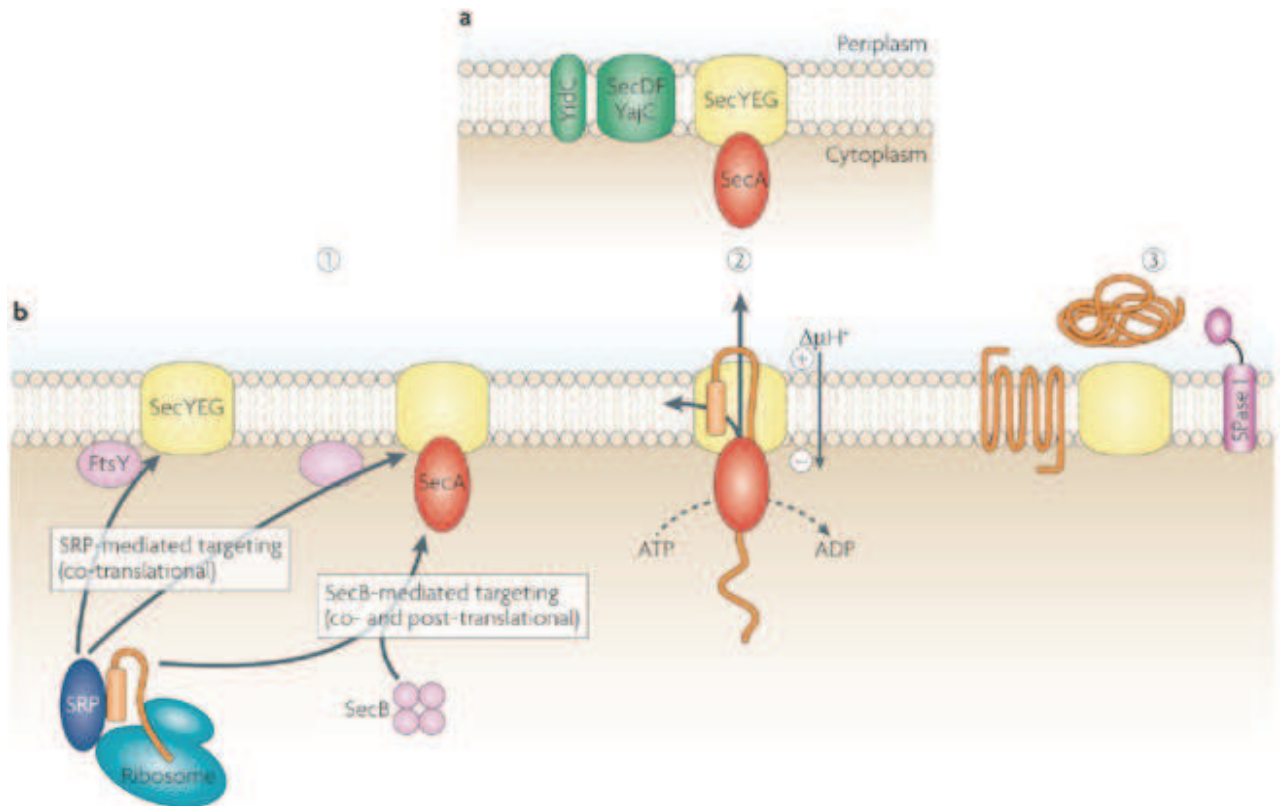


Figure 36. Le mécanisme de sécrétion via le système Sec (Papanikou *et al.*, 2007).

a. Les composants du système Sec. Le système Sec est un complexe de protéines comprenant : le canal de sécrétion formé par les protéines SecYEG, l'ATPase SecA fournissant l'énergie nécessaire au transport et des protéines accessoires (SecDFYajC).

b. Le mécanisme de sécrétion du cytosol vers le périplasma.

① Les protéines transitant via le système Sec possèdent une séquence signal (préprotéine) et sont adressées au complexe SecYEG pendant la traduction via la liaison à la SRP (« signal recognition particle ») ou après traduction via la liaison à SecB. On parle de sécrétion co-ou post-traductionnelle respectivement.

② Les pré-protéines adressées via la SRP ou via SecB sont ensuite sécrétées via le canal formé dans la membrane interne par le complexe SecYEG. FtsY et SecA sont des récepteurs pour la SRP et SecB respectivement. Le processus de sécrétion nécessite de l'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP via l'ATPase SecA.

③ Le clivage de la séquence signal par une signal peptidase (SpaseI) permet de libérer la protéine mature qui s'insère ensuite dans la membrane interne ou est libérée dans le périplasma.

pullulanase par *Klebsiella*. La sécrétion via le système de type II se déroule en deux étapes : la protéine traverse d'abord la membrane cytoplasmique puis est ensuite adressée à un transporteur localisé dans la membrane externe afin d'être exportée hors de la cellule. Au niveau de la membrane cytoplasmique, la protéine est d'abord prise en charge par un des deux systèmes connus sous les noms de systèmes Sec et Tat. Il s'agit de complexes multiprotéiques qui permettent le passage des protéines à travers la membrane interne afin d'atteindre le périplasme.

1.1.1.1. La première étape : la sécrétion vers le périplasme

a. Système Sec

La sécrétion dite « sec dépendante » ou voie générale de sécrétion a été décrite pour la première fois chez *E. coli*. Elle fait intervenir le système Sec localisé dans la membrane interne qui comprend une ATPase, une protéine chaperon et une peptidase (Figure 36). Suite à leur traduction, les protéines à exporter sont tout d'abord prises en charge par la protéine cytoplasmique SecB. SecB qui est une protéine chaperon va adresser la protéine à exporter dans sa conformation native à l'ATPase SecA, localisée dans la membrane cytoplasmique. Il a été démontré que les protéines destinées à être exportées possèdent une séquence signal en position N-terminale conservée (séquence signal composée d'acides aminés hydrophobes : alanine, valine, leucine phénylalanine). L'insertion de ce peptide signal sur la face interne de la membrane cytoplasmique s'effectue grâce à la protéine SecA. SecA est en effet capable de s'associer à un transporteur composé des protéines SecYEG et fournirait l'énergie nécessaire au passage de la protéine via son activité ATPase. Au delà de son rôle de chaperon en association avec SecB et de la fourniture d'énergie, SecA, de par sa structure, pourrait également participer à la formation du canal de sécrétion en association avec les protéines SecG et SecE (Desvaux *et al.*, 2004) (Economou, 1999) (Stephenson, 2005) (Papanikou *et al.*, 2007).

Suite à la sécrétion via le complexe SecYEG, le peptide signal qui a servi à la reconnaissance de la protéine et à son adressage au système Sec est clivé par l'action d'une signal peptidase (signal peptidase I et II, LepB). La protéine mature ainsi clivée est libérée dans l'espace périplasmique.

Il a été démontré que l'ATP ne serait pas la seule source d'énergie requise. En effet, en présence de mutations ponctuelles dans SecY, la sécrétion dépend alors de la force proton motrice. La force proton motrice stimulerait le transport et pourrait jouer un rôle déterminant dans la sécrétion des parties C-terminales des protéines natives adressées au système Sec. Par ailleurs, tous les composants de l'appareil Sec ne sont pas toujours présents : par exemple chez *L. pneumophila* SecG est absent (Albert-weissenger *et al.*, 2006).

b. Système Tat

Le second système de translocation pouvant fonctionner avec les systèmes de type II au

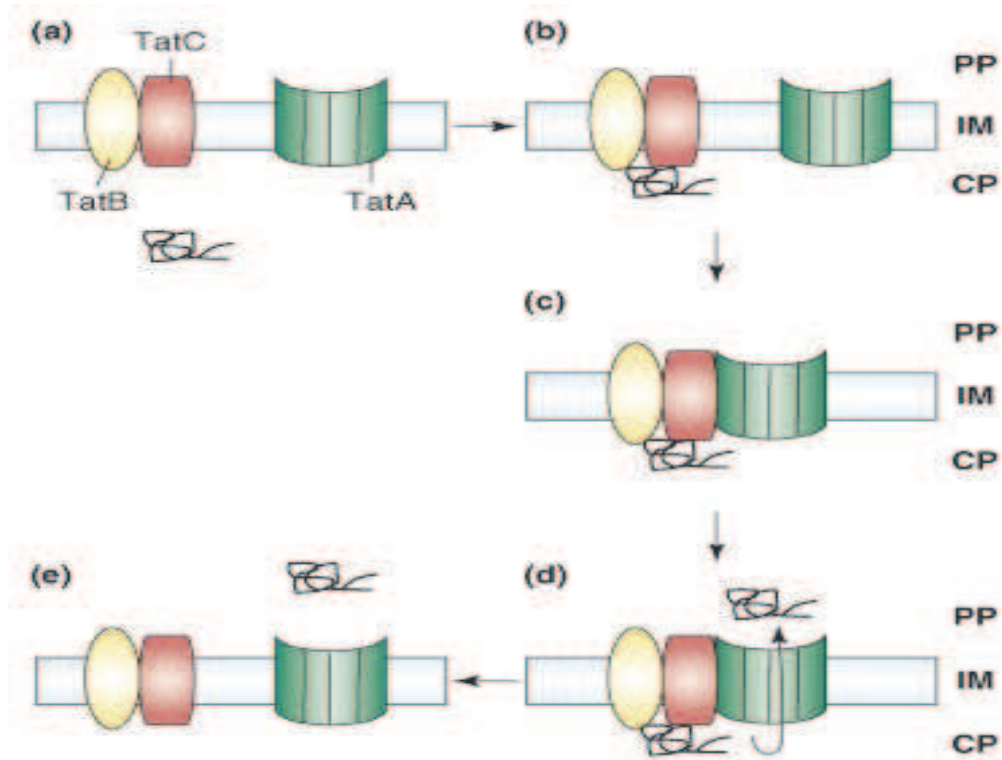


Figure 37. Schéma illustrant le fonctionnement de la machinerie de sécrétion Tat (De Buck *et al.*, 2008).

- (a) La protéine multimérique TatA et le complexe TatBC formant le système Tat sont localisés dans la membrane interne.
- (b) La première étape consiste en la reconnaissance du motif « twin-arginine » dans la séquence signal de la protéine empruntant cette voie de translocation. Cette reconnaissance a lieu au niveau de TatB et TatC.
- (c) Cette reconnaissance induit l'association entre TatA et le complexe TatB/C suivant un processus nécessitant l'énergie provenant de la force proton-motrice.
- (d) La protéine est ensuite sécrétée via le canal formé par le multimère TatA du cytoplasme (CP) vers le périplasme (PP).

cours de la première étape est le système dit Tat (« Twin arginine translocation »). Son nom vient du fait que la protéine adressée au système Tat possède dans son domaine N-terminal une séquence signal à motif conservé qui comprend de façon caractéristique, deux résidus arginines consécutifs ou motif « twin arginine » ((S/T)RRXFLK). La principale différence avec le système Sec résulte dans le fait que la protéine est repliée dans le cytosol avant d'être transportée par le système Tat qui permet son passage au travers de la membrane cytoplasmique (Muller & Klosgen, 2005) (Voulhoux *et al.*, 2001) (Natale *et al.*, 2008).

Le système Tat (Figure 37) consiste en trois ou quatre protéines codées par les gènes *tatBCD* et *tatE* chez *E. coli*. L'organisation en opéron ne reflète pas nécessairement une co-transcription comme ce qui est le cas chez *L. pneumophila* où la transcription de *tatC* est indépendante de celle de *tatB* Albert-Weissenberger *et al.*, 2006). Dans ce système, la protéine repliée est d'abord reconnue par la protéine TatC. Au niveau structural, la protéine TatC se compose de six domaines transmembranaires et constitue également un canal à proton qui fournirait la force proton-motrice nécessaire à la sécrétion à travers ce système. Les protéines repliées passent ensuite par le canal transmembranaire formé par les monomères de TatA. On pense qu'à ce stade TatB servirait d'interface entre le canal à protons TatC et le canal TatA.

Suite à la sécrétion, et comme dans le système Sec, la séquence signal est clivée dans l'espace périplasmique. Les protéines transportées via le système Tat sont impliquées dans le métabolisme énergétique. Il s'agit par exemple d'enzymes rédox chez *E. coli* comme la nitrate reductase NapA, la formate deshydrogenase FdnGHI, la dimethylsulfoxyde reductase DmsABC et de la triméthylamine N-oxyde reductase TorA.

La plupart des protéines utilisant cette voie fixent un cofacteur avant de traverser la membrane cytoplasmique. On peut citer les hydrogénases, les formate deshydrogenases et autres protéines incluant les protéines non redox et certaines protéines membranaires utilisant cette voie. Certains facteurs de virulence peuvent également passer via le système Tat telle que la phospholipase C qui contribue aux effets cytolitiques, hémolytiques et cytotoxiques de *M. tuberculosis* vis-à-vis de son hôte (De Buck *et al.*, 2008).

1.1.1.2. La seconde étape : l'adressage à la membrane externe

Le substrat clivé est ensuite adressé au transporteur de la membrane externe. Par exemple dans le système Pul de *Klebsiella oxycota*, la protéine périplasmique de liaison PulC permet de transduire l'énergie récupérée au niveau de la membrane interne vers le canal de la membrane externe (Remaut & Waksman, 2004).

1.1.1.3. Les particularités du système de type II (Isp) de *Legionella*

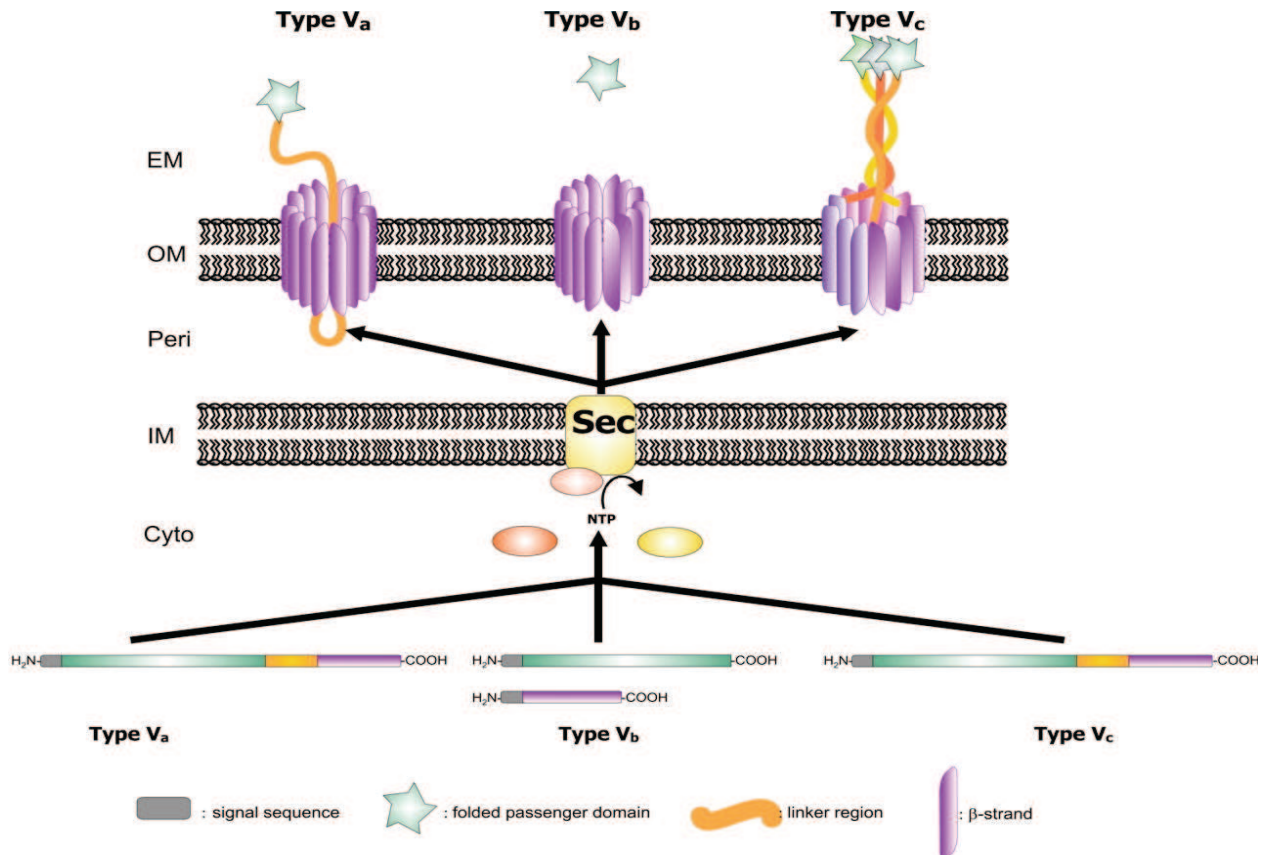
L'étude du système de sécrétion de type II de *Legionella* a apporté de nouvelles informations sur l'étendue et la contribution d'un tel appareil à divers aspects de la physiologie, de la sécrétion, de l'écologie et de la pathogénie bactérienne (Ciancotto, 2009). Les études ont démarrés avec la découverte qu'un mutant au niveau de composants clefs de l'appareil de sécrétion de type II prédit (mutant *lspGH* altéré pour les protéines G et H composant le pilus de l'appareil de sécrétion) ne sécrétait plus certaines protéines (Hales *et al.*, 1999). Par la suite diverses approches venant de l'analyse *in silico* des génomes des souches de *Legionella* séquencées et de l'analyse d'activités enzymatiques de mutants du système de sécrétion de type II à permis de déduire l'existence d'un répertoire potentiel de protéines substrats (entre 25 et 60 protéines) (Debroy *et al.*, 2006). Ce répertoire constitue

l'un des plus grand mis à ce jour chez les bactéries. La plupart de ces substrats passeraient par le système Sec mais il a été montré que la phospholipase C (PlcA) passe par le système Tat. Il semblerait que ces protéines seraient sujettes à un clivage via une métalloprotéase lors de leur sécrétion. De manière intéressante, certains des substrats du système du type II pourraient transiter via d'autres systèmes de sécrétion : c'est le cas par exemple la protéinase LegP identifiée comme substrat du système de type II par des analyses protéomiques et qui, par la suite a été aussi identifiée comme substrat du système de type IV Dot/Icm de *Legionella* (De Felipe *et al.*, 2008). Mais, les particularités du système de type II de *Legionella* ne s'arrêtent pas là. En effet, il s'agit du premier cas où l'implication d'une protéine à activité peptidylproline cis-trans-isomérase (PPIase), la protéine Mip, dans la sécrétion est démontrée. L'altération de Mip réduit l'activité par exemple de la phospholipase C PlcA (DebRoy *et al.*, 2006). Il en a été déduit que Mip pourrait agir sur les substrats et les convertir pour les rendre actifs d'un point de vue enzymatique. Concernant les nombreuses enzymes sécrétées (peptidases et protéases) un nombre élevé d'enzymes possédant des domaines protéiques eucaryotes est retrouvé. La plupart des ces protéines n'a d'ailleurs aucune simillarité avec des substrats de systèmes de type II, ouvrant la voie à la découverte de nouveaux substrats et donc de nouvelles fonctions de cet appareil de sécrétion. Enfin, il a été démontré que le système de type II participe à la virulence de *Legionella in vitro* chez le macrophage, mais également *in vivo* dans un modèle d'infection animal (Rossier *et al.*, 2004). Certains des effecteurs délivrés par le système de type II seraient importants dans la virulence comme la métalloprotéase ProA ou la ribonucléase SnrA, premier exemple du rôle joué par une ribonucléase dans un processus d'infection (Rossier *et al.*, 2008) (Rossier *et al.*, 2009). Le rôle d'une ribonucléase reste encore spéculatif mais on pense qu'elle permettrait de générer des nucléotides, qui en plus des acides amenés par la protéase, fourniraient des nutriments à la bactérie. Une autre hypothèse serait l'implication des deux types d'enzymes dans la dégradation de certaines protéines et acides nucléiques de l'hôte pouvant influencer la croissance du micro-organisme. Si de nombreux autres effecteurs ont été invalidés pour tester leur influence lors de l'infection *in vivo*, seul le rôle de ChiA, une chitinase s'est avéré nécessaire dans la persistance au niveau des poumons (DebRoy *et al.*, 2006). Le rôle d'une chitinase dans la virulence n'ayant jamais été démontré auparavant son rôle lors de l'infection reste à éclaircir. Mais la chose la plus frappante chez *Legionella* reste la participation du système de sécrétion de type II dans la sécrétion d'un surfactant (Stewart *et al.*, 2009). Ce surfactant qui apparaît sous la forme d'un film translucide sur milieu de croissance gélosé permet à la bactérie de glisser de façon passive sur les surfaces. Bien que le surfactant n'ait pas été identifié, ce type de mobilité serait important dans le contexte de la dispersion au sein d'un biofilm ou en contexte infectieux afin de coloniser de nouveaux endroits.

1.1.2. Le système de sécrétion de type V

La sécrétion de type V se déroule également en deux étapes. Elle fait intervenir dans un premier temps le système Sec pour la translocation à travers la membrane cytoplasmique. La seconde étape permet de distinguer 3 sous-classes suivant que : le transporteur est une protéine indépendante insérée dans la membrane externe (sécrétion de type Vb) ou que la protéine à exporter forme elle-même son canal de transport (autotransport type Va et Vc) (Figure 38). La distinction entre les type Va et Vc est discutable en ce sens qu'elle repose sur le fait que la protéine à sécréter adopte une forme oligomérique particulière dans le type Vc, par exemple dans le cas de l'adhésine YadA de *Yersinia*. Les protéines sécrétées via ce système sont généralement de grande taille 90-200 kDa et souvent associées à la virulence : protéases, toxines, adhésines, invasines (Henderson *et al.*, 1998, Henderson *et al.*, 2004) (Thanassi *et al.*, 2005).

A



B

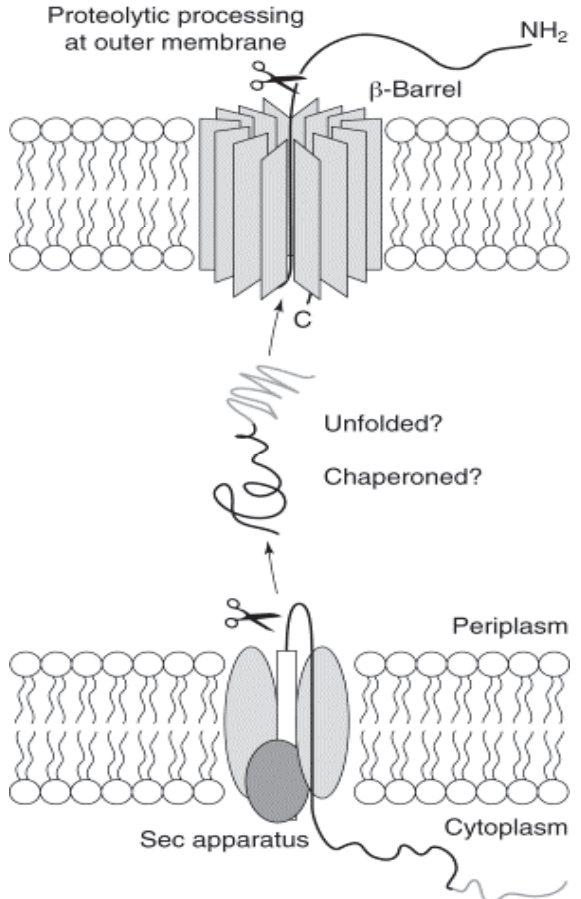


Figure 38. La sécrétion de type V.
A. Les trois sous-classes de sécrétion de type V (Henderson *et al.*, 2004). La protéine à sécréter possède divers domaines fonctionnels (séquence signal, domaine passager, linker et feuillet β) et est exportée suivant deux modes : la protéine forme elle-même le pore de sécrétion (autotransport de type Va et Vc) ou passe par un pore formé par une autre protéine (type Vc). La sécrétion de type Vc diffère légèrement du type Va en ce sens que les protéines adoptent une conformation oligomérique.
B. Autotransport (Henderson *et al.*, 1998). Dans le cas de l'autotransport, après passage par le système Sec et le clivage de la séquence signal, le domaine en feuillet β de la protéine forme un pore dans la membrane externe permettant le passage du domaine passager de la protéine. Un second clivage au niveau de la région « linker » permet de libérer le domaine passager du pore de translocation pour l'export.

L'autotransport a été étudié en détail. En effet, suite au passage via le système Sec et au clivage de la séquence signal, la protéine à exporter, alors dans le périplasme, est capable de former elle-même le canal de sécrétion pour son export hors de la cellule. L'analyse des séquences de ces protéines a révélé la présence de trois domaines : un domaine N-terminal contenant la séquence signal, un domaine C-terminal conservé et caractérisé par la présence de feuillets β et entre les deux un domaine dit domaine « passager » (ou passager) riche en hélices α . Lors de la sécrétion à l'extérieur de la cellule, c'est le domaine C-terminal qui forme un canal en feuillets β propre à laisser passer le reste du peptide et notamment le domaine « passager ». Ce n'est que suite à ce passage que bien souvent un clivage s'opère entre le transporteur en feuillets β et le reste de la protéine permettant la libération du domaine « passager » hors de la cellule. Un exemple de ce type de système est fourni par la sécrétion de la protéine IgA1 chez *N. gonorrhoeae* ou de la peptidase NalP de *N. meningitidis*. Dans le cas des autotransporteurs, la sécrétion dans le périplasme pourrait faire intervenir un autre système que le système sec, le système SRP pour « Signal recognition particle » (Ex : Hbp).

1.2. Systèmes de sécrétion en une étape

Contrairement aux systèmes précédents, les systèmes de type I, III et IV forment un canal continu entre les deux membranes.

Les systèmes de type III et IV sont certainement les mécanismes de sécrétion les plus étudiés. Ils permettent à la bactérie d'injecter des protéines nécessaires à la virulence ou effecteurs dans leur cellule eucaryote cible en formant un pore dans sa membrane. Ces systèmes de sécrétion sont donc très représentés chez les bactéries pathogènes.

1.2.1. Les systèmes de type III

Les systèmes de type III mettent en jeu une vingtaine de protéines dont beaucoup sont des homologues des composants de la voie de biosynthèse des flagelles. La similarité fonctionnelle avec le système flagellaire a été explorée en détail et les données de la phylogénie incitent aujourd'hui à penser que les systèmes de type III auraient évolué sur la base des systèmes flagellaires.

Dans les systèmes de type III, la protéine à sécréter est reconnue par une protéine chaperon, nommée SycD dans le cas de *Yersinia spp.*, puis emprunte un complexe multiprotéique formant un canal ressemblant à une aiguille (Journet *et al.*, 2005) (Tampakaki *et al.*, 2004) (Ghosh, 2004) (Mota *et al.*, 2005). Cette structure en aiguille dont la base est homologue au corps basal flagellaire est capable de s'insérer dans la membrane des cellules eucaryotes cibles pour délivrer localement les protéines responsables de l'adhésion de la bactérie à la surface cellulaire (*E. coli* entéro-pathogènes ou EPEC), de l'entrée des bactéries dans les cellules non phagocytaires (*Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*) ou bien impliquées dans la résistance à la lyse par les macrophages (Blocker *et al.*, 2003) (Macnab, 2004). Nous détaillerons un archétype de système de sécrétion de type III à travers l'exemple de *Salmonella*.

1.2.1.1. Le système de sécrétion de type III de *Salmonella*

Les bactéries du genre *Salmonella*, couramment responsables de gastro-entérites, ont la propriété de franchir la barrière intestinale puis de se propager vers d'autres organes. Cette bactérie induit son internalisation dans les cellules épithéliales grâce à l'injection de protéines par l'appareil de sécrétion de type III Inv/Spa, également appelé « l'injectisome ».

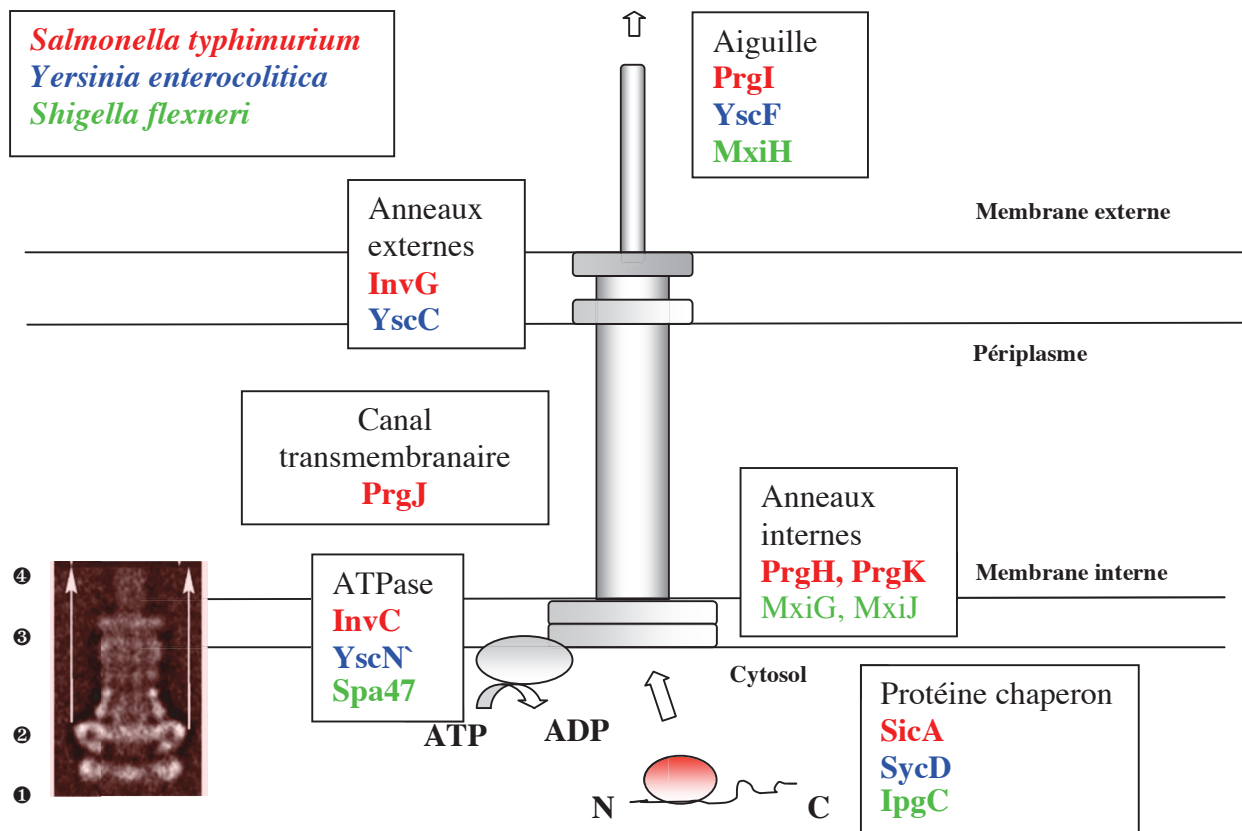


Figure 39. L'appareil de sécrétion de type III Inv/Spa de *Salmonella* (Mota et al., 2005).

Les protéines homologues retrouvées dans les systèmes de sécrétion de type III de *Yersinia* et de *Shigella* sont figurées en bleu et en vert respectivement dans la légende. Le cliché de microscopie électronique (Marlovits et al., 2004) permet de distinguer les différents éléments de ce complexe multiprotéique : ① paire d'anneaux interne, ② canal transmembranaire, ③ paire d'anneaux externe et ④ début de « l'aiguille ».

1.2.1.2. Structure et organisation du système Inv/Spa

La première visualisation de l'appareil de sécrétion Inv/Spa en microscopie électronique a été rapportée en 1998 (Kubori *et al.*, 1998). Depuis, des études (Marlovits *et al.*, 2004) ont permis de caractériser son architecture composée de deux parties (Figure 39) :

(i) La base, cylindrique est composée de deux paires d'anneaux localisés dans les deux membranes bactériennes. La paire d'anneaux de la membrane interne est composée des protéines PrgH et PrgK. La seconde paire d'anneaux associée à la membrane externe est composée de la protéine InvG de la famille des sécrétines. Les études de microscopie électronique révèlent que cette base cylindrique est creuse et qu'elle est traversée par un canal transmembranaire composé de la protéine PrgJ.

(ii) Ce canal et la base cylindrique qui la supporte sont reliés à une structure protéique (PrgI) de type « aiguille » observable à la surface des bactéries et dont la taille, variant entre 45 et 80 nm, est contrôlée par la protéine InvJ (Kubori *et al.*, 2000). En plus des protéines structurales de l'appareil de sécrétion, un autre ensemble de protéines conservées inclut des ATPases qui peuvent fournir l'énergie nécessaire à la sécrétion et une protéine chaperon. Des homologues de ces différentes protéines sont retrouvées dans les appareils de sécrétion de *Shigella* et *Yersinia* comme le montre la Figure 39.

1.2.1.3. Organisation génétique

L'appareil de sécrétion de type III de *Salmonella* est codé par des gènes regroupés dans des régions nommées îlots de pathogénicité ou PAI (« pathogenicity islands ») (Schmidt & Hensel, 2004). Ces régions, présentes chez les bactéries pathogènes, sont caractérisées par leur contenu en bases GC différent du reste du génome bactérien et la présence, dans certains cas, d'éléments génétiques mobiles. Ceci laisse penser qu'ils auraient été acquis via un transfert horizontal (Dobrindt *et al.*, 2004). Ces îlots peuvent être chromosomiques (*Salmonella*, *E. coli*, *Pseudomonas*) ou portés par des plasmides (*Yersinia*, *Shigella*).

Les gènes de l'îlot chromosomique SPI1 (« *Salmonella* pathogenicity island ») codant pour l'appareil de sécrétion Inv/Spa ont été identifiés via l'étude de mutants non-invasifs c'est-à-dire incapables d'envahir les cellules épithéliales *in vitro* et *in vivo*. Cette région de 40kb (Figure 40) regroupe plus de 30 gènes et se caractérise par son contenu en bases GC de 42% (contre 52% observé dans le reste du génome, (Schmidt & Hensel, 2004)).

L'organisation des gènes composant l'îlot SPI1 a été déterminée (Lostro & Lee, 2001). Elle repose sur 3 unités de transcription : il s'agit des ensembles *invFGEABCIJ-spaOPQRS*, *sicA-sipBCDA-sicP/sptP* et *prgHIJK*. Les gènes *inv/spa* et *prgHIJK* codent pour des composants structuraux de l'appareil de sécrétion alors que les gènes *sipBCDA* et *sptP* codent pour des protéines libérées par cet appareil de sécrétion. Quatre gènes, *invF*, *hilA*, *hilC* et *hilD* codent pour des protéines régulatrices.

1.2.1.4. Condition d'expression des gènes SPI1 de *Salmonella*

L'influence des facteurs environnementaux sur l'expression des gènes de l'îlot SPI1 a été étudiée en utilisant des fusions transcriptionnelles de gènes. Ces études montrent que l'expression de ces gènes est induite *in vitro* à faible concentration en oxygène, à concentration osmotique élevée et à pH légèrement basique (pH 8). Mais, contrairement aux gènes codant pour les autres systèmes de sécrétion de type III comme ceux de *Yersinia* et de *Shigella*, l'expression des gènes du système *inv/spa* ne dépend pas de la température (Hueck, 1998).

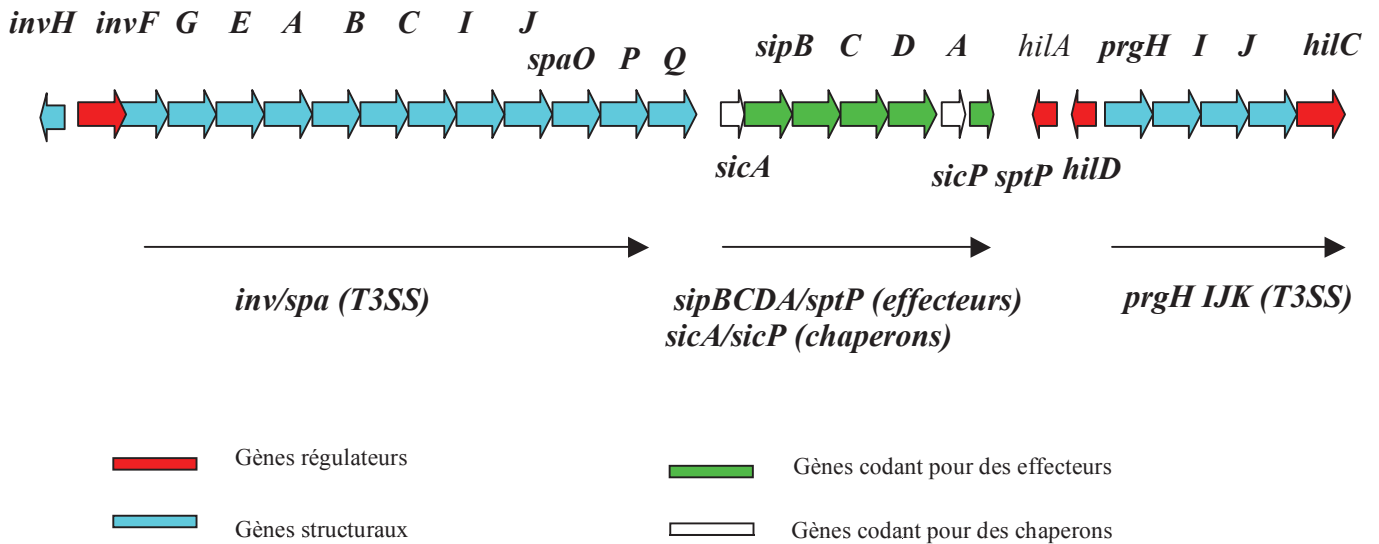


Figure 40. Organisation génétique de la région codant pour l'appareil de sécrétion de type III chez *Salmonella* (Loströh & Lee, 2001).

Deux unités de transcription de cet îlot (*inv/spa* et *prgHIJK*) codent pour les composants structuraux de l'appareil de sécrétion de type III (T3SS). La troisième (*sic/sip*) code pour des protéines sécrétées via ce système et des chaperons.

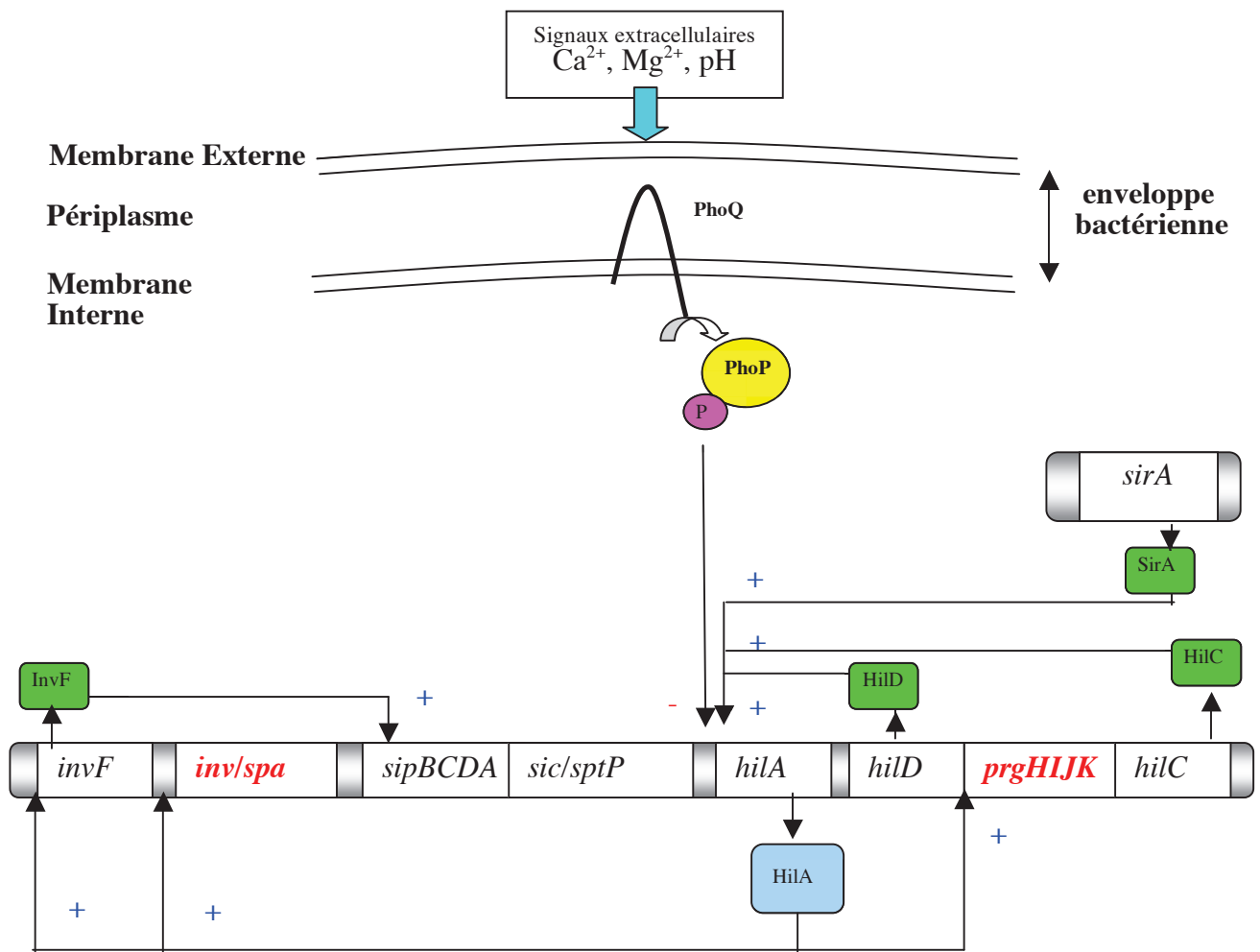


Figure 41. Régulation de l'expression des gènes de l'îlot SPI1 de *Salmonella* (Schmidt & Hensel, 2004).

Les gènes codant pour les éléments structuraux du système de sécrétion de type III sont indiqués en rouge.

+ Régulation positive, - Régulation négative, P : Phosphate.

Des régulateurs transcriptionnels ont été identifiés dont deux d'entre eux, SirA et PhoP, sont codés en dehors de cette région (Figure 41). HilA est le principal inducteur de l'expression des gènes de la région SPI1. Ce facteur de transcription se lie aux sites d'initiation de la transcription des gènes *invF* et *prgH* pour activer l'expression des gènes *prgHIJK* et *inv/spa* codant pour l'appareil de sécrétion. La transcription du gène régulateur *hilA* est elle-même contrôlée positivement par la protéine SirA et les protéines HilC et HilD capables de se lier à la région promotrice de ce gène et négativement par la protéine PhoP en réponse à des facteurs environnementaux. PhoP fait partie du système à deux composants PhoP/ PhoQ. Elle est activée après une phosphorylation par la kinase PhoQ en fonction des variations de pH et des carences en ions divalents tels que le calcium ou le magnésium. Ce système prend tout son sens dans la stratégie d'infection de *Salmonella*. Après l'invasion des cellules épithéliales mettant en jeu les gènes *inv/spa*, la bactérie est phagocytée par les macrophages. A l'intérieur du phagosome, la situation de carence rencontrée, notamment la faible disponibilité en ions divalents comme le calcium, active PhoQ puis PhoP qui réprime l'expression des gènes SPI1 mais peut activer l'expression des gènes de l'îlot SPI2 (Hansen-Wester & Hensel, 2001) codant pour un second système de sécrétion de type III impliqué dans l'infection des macrophage

1.2.2. Les systèmes de type IV

Les systèmes de type IV permettent le transport de deux types de macromolécules aussi différentes que sont l'ADN et les protéines. Ces systèmes participent au transfert d'ADN lors de la conjugaison (système Tra d'*E. coli*), à l'acquisition d'ADN extérieur via les systèmes de compétence naturelle et ont une importance primordiale pour la virulence de certaines bactéries (Figure 42 et Tableau 3). Ce sont eux qui assurent notamment l'export du plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* codant des gènes de virulence vers les cellules végétales de la plante à infecter. C'est également un système de type IV, le système *Dot/Icm* qui permet à *Legionella* de sécréter des protéines qui lui permettent de détourner le trafic intracellulaire de son hôte eucaryote lors de l'infection.

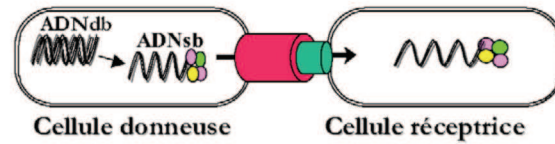
1.2.2.1. Transfert d'ADN vers une autre cellule

Le système VirB qui participe à la virulence d'*Agrobacterium tumefaciens* est certainement le mieux caractérisé à ce jour (Lavigne *et al.*, 2006). Il permet à *Agrobacterium* de transférer le plasmide Ti vers la plante à infecter : Ce plasmide porte des gènes intervenant dans la synthèse de facteurs de croissance et la perturbation du cycle cellulaire des cellules de la plante cible. Les plantes infectées développent alors une excroissance visible connue sous le nom de tumeur du collet (« crown gall »).

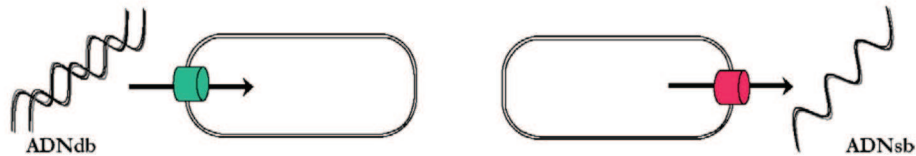
Le système de sécrétion à l'origine du transfert de cet ADN, le système VirB a été caractérisé d'un point de vue structural (Figure 43). Il s'agit d'un complexe composé de 11 protéines codées par les gènes *vir* et comprenant :

- (i) les trois ATPases de la membrane interne VirB4, VirB11 et VirD4 qui assurent la spécificité de reconnaissance du substrat et fournissent l'énergie nécessaire au transport,
- (ii) les protéines formant le canal transmembranaire ou core (VirB1, VirB3 et VirB6 à VirB10) pour le passage du substrat,
- (iii) les protéines VirB2 et VirB5 formant le pilus extracellulaire, une structure d'adhésion à la cellule végétale, de forme filamenteuse.

A. Conjugaison bactérienne



B. Compétence et Libération d'ADN



C. Sécrétion d'effecteurs.

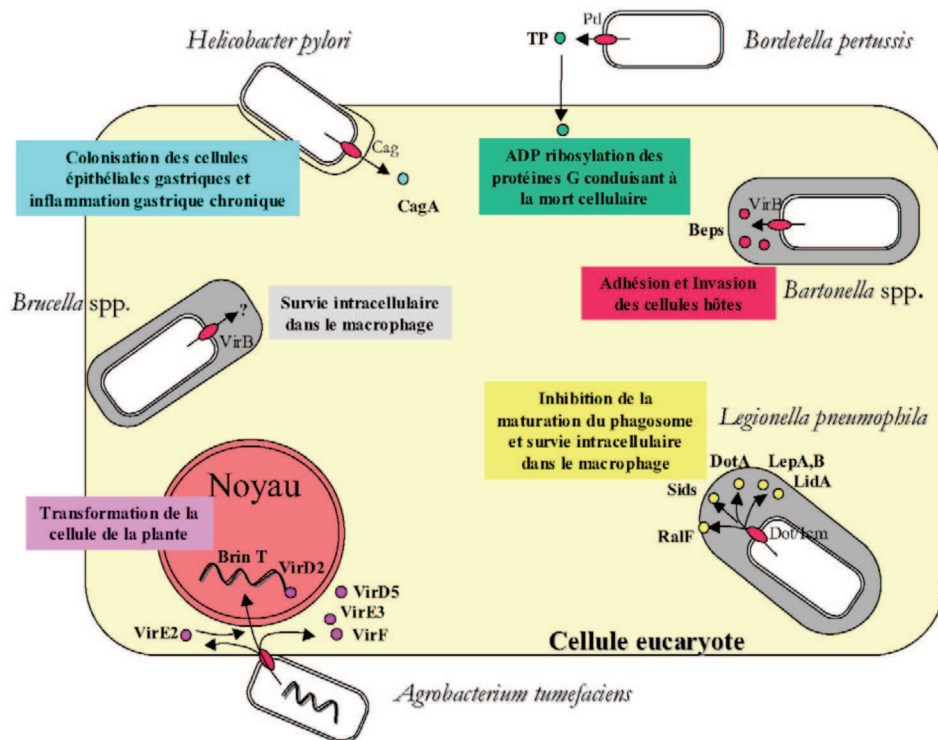


Figure 42. Les différents rôles joués par les systèmes de sécrétion de type IV bactériens (Lavigne *et al.*, 2006). Chez les bactéries, les systèmes de type IV participent à la conjugaison via la libération d'ADN dans une autre bactérie ou d'autres cellules, à la « compétence et à la libération d'ADN » pour l'échange d'ADN avec le milieu extracellulaire indépendamment de tout contact avec des cellules cibles, à la sécrétion d'effecteurs délivrant l'ADN ou des protéines aux cellules eucaryotes durant l'infection.
ADNdb : ADN double brin, **ADNsb** : ADN simple brin.

Tableau 3. Les différents systèmes de sécrétion de type IV et leurs substrats identifiés à ce jour (Lavigne *et al.*, 2006) .

Espèces bactériennes	T4SS ^a	Substrats	Altérations de l'hôte ou de la cellule cible
Conjugaison			
<i>Escherichia coli</i> plasmide F(IncF)	Tra	ADN simple brin lié à une protéine pilote	Échange génétique
<i>Escherichia coli</i> RP4 (IncP)	Trb	en 5'	Échange génétique
<i>Escherichia coli</i> R388 (IncW)	Trw		Échange génétique
<i>Shigella</i> Collb-P9 (IncI)	Tra		Échange génétique
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> ^b	VirB		Échange génétique–Gale du collet
<i>Legionella pneumophila</i> ^b	Dot–Icm		Échange génétique
Compétence et libération d'ADN			
<i>Campylobacter jejuni</i>	Cjp–VirB	ADN double brin	Intégration d'ADN
<i>Helicobacter pylori</i>	ComB		Intégration d'ADN
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Tra	ADN simple brin	Compétence d'ADN
Translocation d'effecteurs			
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	VirB	ADN-T, VirD2, VirE2, VirF, VirE3, VirD5	Gale du collet
<i>Helicobacter pylori</i>	Cag	CagA	Gastrite, Ulcère peptique
<i>Bordetella pertussis</i>	Ptl	Toxine pertussique	Coqueluche
<i>Legionella pneumophila</i>	Dot–Icm	RalF, DotA, Sid, LepA, LepB, LidA, SdeC...	Légionellose
<i>Brucella spp.</i>	VirB	Inconnu	Brucellose
<i>Bartonella spp.</i>	VirB, Trw	Bep	Angiomatose, Maladie des griffes du chat
<i>Actinobacillus</i> . ^c	MagB	Inconnu	Périodontose
<i>Ehrlichia spp.</i> ^c	VirB	Inconnu	Éhrlichiose
<i>Wolbachia spp.</i> ^c	VirB	Inconnu	Altérations sexuelles de l'hôte
<i>Rickettsia spp.</i> ^c	–	Inconnu	Typhus, Fièvre boutonneuse méditerranéenne
<i>Xylella fastidiosa</i> ^c	VirB	Inconnu	Maladie de la feuille desséchée–Sclérose des agrumes panachés
<i>Coxiella burnetii</i> ^c	Dot–Icm	Inconnu	Fièvre Q

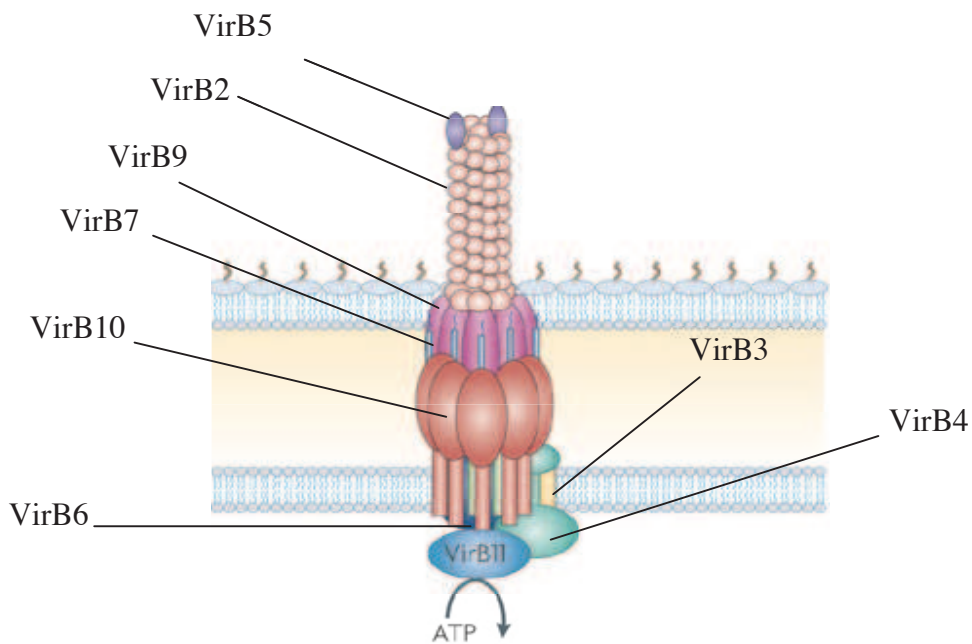


Figure 43. Architecture de l'appareil de sécrétion de type IV d'*Agrobacterium tumefaciens* (Fronzes *et al.*, 2009).

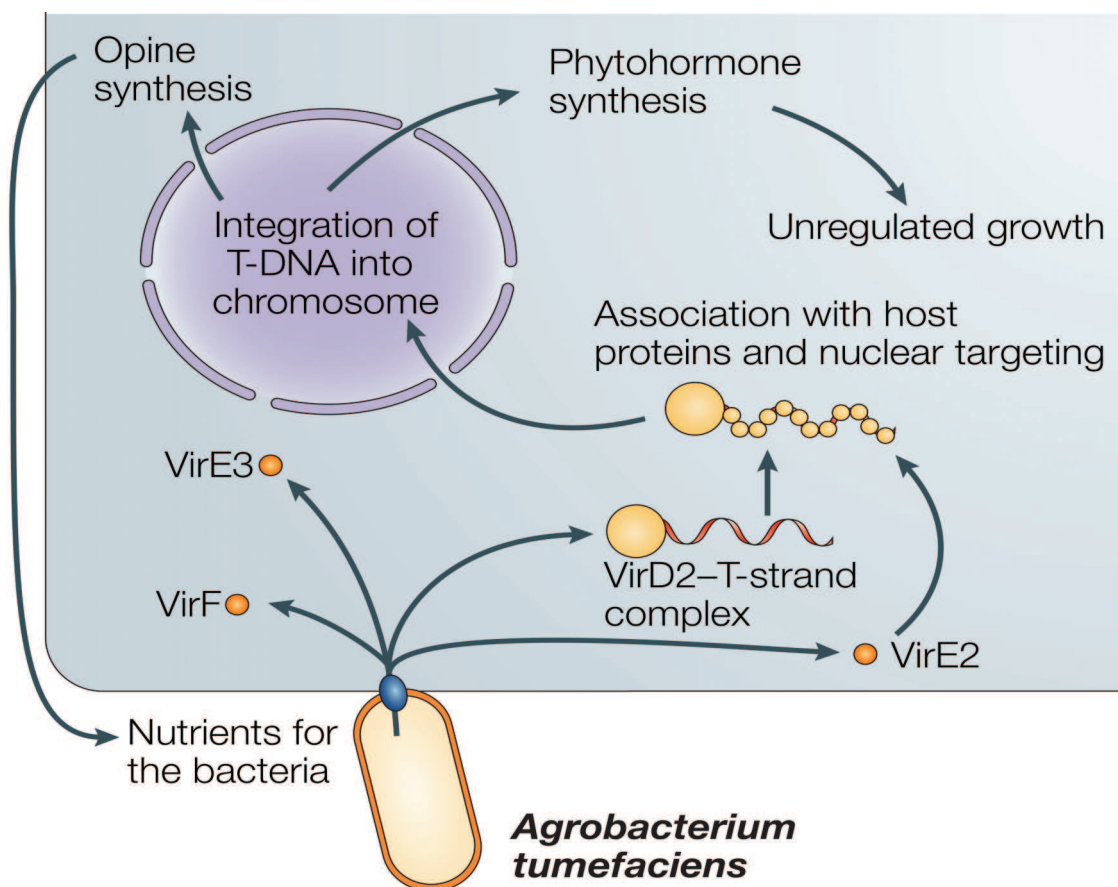


Figure 44. Schéma représentant le transfert d'ADN dans la plante lors d'une infection et les conséquences (Cascales & Christie, 2003).

Lors de l'infection d'une plante, *Agrobacterium* injecte via son système de sécrétion de type IV des protéines et de l'ADN. Cela a pour conséquence d'induire la synthèse d'opines et la production d'une tumeur à travers de l'activation de la synthèse des phytohormones.

Avant d'être transféré à la cellule hôte via le système de type IV (Figure 44), l'ADN à transférer est pris en charge par d'autres protéines ne faisant pas partie de l'appareil structural. Par exemple, le plasmide Ti, après avoir été linéarisé par la relaxase VirD2, est ensuite adressé à la protéine de couplage VirD4 pour le transfert via le système de type IV (Cascales & Christie, 2003). Les protéines de couplage des systèmes de type IV (ou T4CP pour « Type IV secretion coupling protein ») jouent un rôle important dans l'adressage des effecteurs à l'appareil de sécrétion. Le système de sécrétion d'*Agrobacterium* ressemble fortement à un autre système de transfert d'ADN bactérien : le système Tra d'*E. coli* impliqué dans les transferts conjugatifs de plasmides, notamment les plasmides à large spécificité d'hôte des groupes IncN, IncP ou IncW et le plasmide conjugatif F (groupe IncF). Ainsi les deux systèmes assurent le transfert d'un complexe ADN simple brin-protéines d'une bactérie donneuse vers une cellule receveuse (bactérie ou cellule eucaryote). Renforçant cette liaison, de fortes homologies ont été retrouvées entre les protéines Tra et protéines du système VirB.

1.2.2.2. Compétence ou transfert d'ADN vers le milieu extracellulaire

Certaines bactéries sont dites compétentes c'est-à-dire qu'elles sont capables de capturer de l'ADN exogène, présent dans le milieu extracellulaire (Maruyama *et al.*, 2006). Les bactéries équipées de tels systèmes possèdent une plasticité de leur génome et peuvent acquérir de nombreux déterminants génétiques assurant par exemple une plus grande résistance à des stress environnementaux. Ainsi les bactéries *C. jejuni* et *H. pylori* sont capables d'importer de l'ADN en provenance du milieu extérieur via leurs systèmes respectifs, Cjp-VirB et ComB. Mais le cas le plus intéressant se trouve chez la bactérie *Neisseria gonorrhoeae*. Cette bactérie est non seulement capable d'acquérir de l'ADN exogène mais également de libérer de l'ADN dans le milieu extérieur (Hamilton *et al.*, 2005) (Alvarez-Martinez & Christie, 2009). La capture de cet ADN par d'autres bactéries leur permettrait ensuite d'acquérir des variations génétiques au niveau de facteurs de virulence comme les pilis ou les protéines de surface. D'un point de vue évolutif on pense aujourd'hui que ces systèmes ont évolué afin de promouvoir des variations génétiques favorisant l'échappement aux défenses de l'hôte lors d'une infection.

1.2.2.3. Sécrétion d'effecteurs protéiques dans la cellule hôte

Ces systèmes sont essentiels à la virulence de nombreuses bactéries pathogènes de l'homme mais aussi des animaux au rang desquels on retrouve *Brucella*, *H. pylori* et la bactérie *Legionella* (Christie & Vogel, 2000) (Yeo & Waksman, 2004) (Llosa *et al.*, 2009) (Christie & Cascales, 2005) Nous aborderons plus en détail le système de sécrétion de type IV de *Legionella* qui lui permet la sécrétion d'effecteurs impliqués dans le détournement du trafic intracellulaire de l'hôte afin d'établir la vacuole de répllication.

a. Le système de sécrétion de type IV (type IVb) de *Legionella pneumophila*

Legionella est une bactérie hydrotellurique présente dans l'eau et le sol où elle parasite les amibes (Segal *et al.*, 2005). L'inhalation d'aérosols contenant cette bactérie peut provoquer chez l'homme la maladie des légionnaires, se traduisant par une pneumopathie grave due à la persistance et à la multiplication bactérienne dans les macrophages pulmonaires. Cette bactérie possède deux systèmes de sécrétion de type IV (Segal *et al.*, 2005). Le premier système, nommé Dot/Icm, lui permet d'échapper aux mécanismes

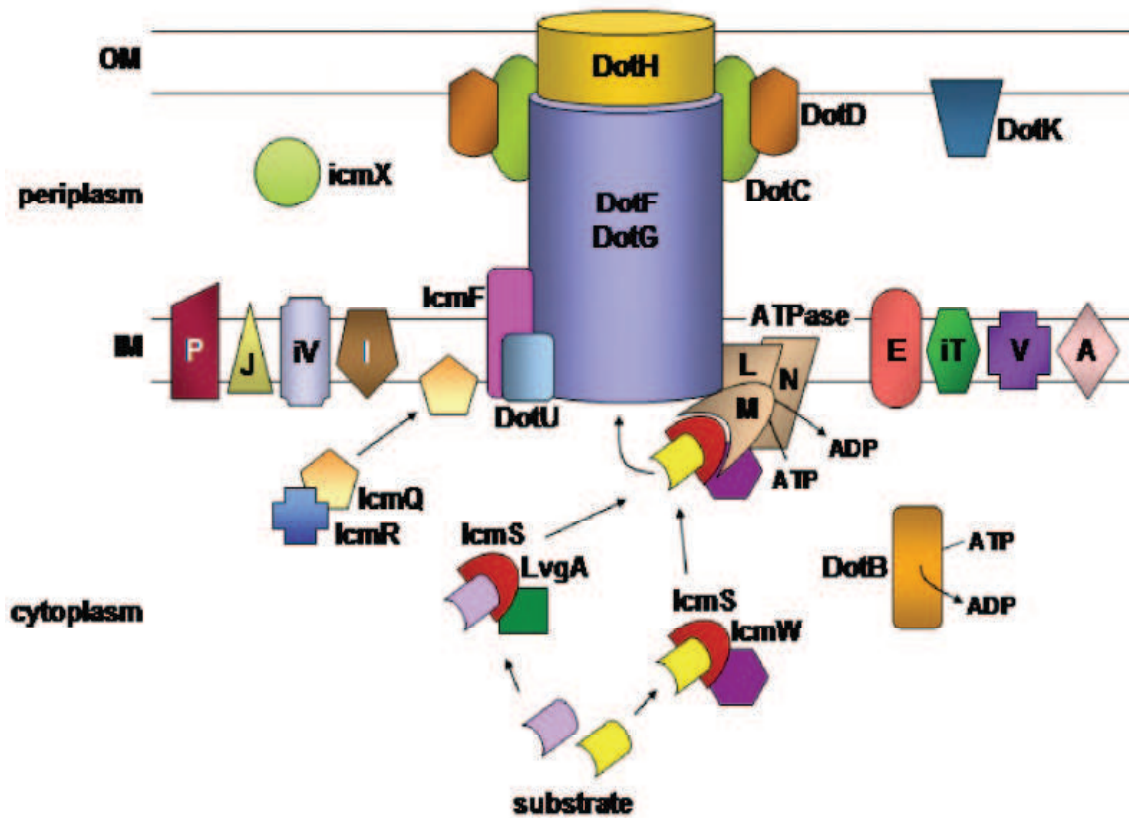


Figure 45. Structure de l'appareil de sécrétion Dot/Icm de *Legionella pneumophila* (Isberg *et al.*, 2009). Cette représentation schématique dérive des résultats d'étude de la stabilité d'une protéine en l'absence d'une autre suite à une délétion. Les lettres seules se réfèrent aux protéines Dot.

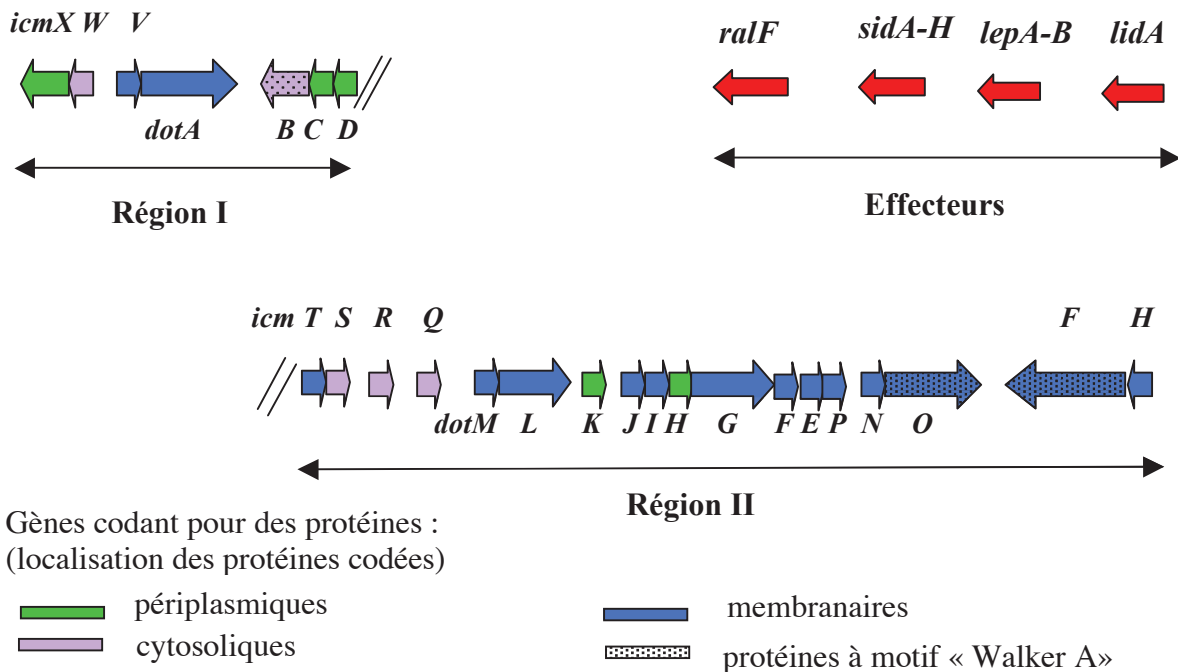


Figure 46. Organisation des gènes *dot/icm* codant pour l'appareil de sécrétion de type IV chez *Legionella* (Sexton & Vogel, 2002).

Ces gènes sont organisés en deux régions (Région I et Région II). Les gènes codant pour les protéines sécrétées (effecteurs) sont localisés en dehors de ces deux régions comme le gène *ralF* (voir § II).

bactéricides des cellules phagocytaires. Le second système, est appelé Lvh (*Legionella* Vir Homologues) en raison de sa grande homologie avec le système VirB d'*Agrobacterium* (Sexton & Vogel, 2002). Il peut coopérer avec le premier système pour le transfert de plasmides conjugatifs mais il ne semble pas nécessaire à la pathogénie (Segal *et al.*, 1999). Le système Dot/Icm de *Legionella pneumophila* peut également délivrer des protéines (Sid, RalF, LidA, LepA/B) à l'intérieur des cellules parasitées (macrophages, amibes). Ces protéines, dont certaines possèdent des domaines eucaryotes, comme par exemple RalF, participent à la virulence (cf paragraphe 2.3.4.).

b. Structure et organisation du système de type IV Dot/Icm de *Legionella*

Cet appareil de sécrétion, de façon similaire au pilus du système de sécrétion d'*Agrobacterium*, forme une structure filamenteuse observable en microscopie électronique (Watarai *et al.*, 2001). On pense qu'il s'agirait d'un complexe multiprotéique (Figure 45) comprenant près de 26 protéines participant à la sécrétion des effecteurs. Isberg *et al.* ont proposé une architecture de cet appareil de sécrétion (Figure 45) et ont établi plusieurs groupes de protéines suivant leur fonction et leur localisation (Isberg *et al.*, 2009).

Au sein du cytoplasme, le substrat serait reconnu par l'un des deux complexes IcmS-LvgA ou IcmS-IcmW avant d'être présenté à l'appareil de sécrétion. L'interaction avec IcmS ou IcmW a été utilisée lors d'études afin d'identifier des substrats sécrétés. Cette interaction rappelle fortement celle existant entre la protéine chaperon et son substrat au sein des systèmes de sécrétion de type III (Figure 45).

Au niveau de la membrane interne, le complexe substrat-IcmS ou substrat-IcmW se lierait ensuite au complexe membranaire formé par les protéines DotL-DotM-DotN. Cette interaction a été suggérée par le fait que l'absence d'IcmS ou IcmW déstabilise les protéines DotL-N. Au sein de ce complexe, la protéine DotL présente une forte similarité avec la protéine VirD, l'ATPase du système d'*Agrobacterium* qui lie le substrat à sécréter. La structure cristallisée d'une de ces ATPases présente au sein du système de sécrétion de type IV de *H. pylori* semble indiquer que le passage du substrat se ferait à travers le canal formé par l'anneau hexamérique de la protéine. De manière assez similaire, on penserait que le substrat passerait par DotL probablement en interagissant d'abord avec les autres protéines associées DotM et DotN.

Une fois reconnue, la protéine substrat transiterait via un canal formé par les cinq protéines DotC, DotD, DotF, DotG et DotH afin d'être finalement sécrétée dans la cellule hôte. DotF et DotG formeraient la partie du canal ancrée à la membrane interne et traversant l'espace périplasmique alors que DotH serait la partie du canal insérée dans la membrane externe de la bactérie. Les protéines DotC et DotD sont quant à elles des lipoprotéines insérées dans la membrane externe.

D'autres protéines, les protéines accessoires, seraient également impliquées mais de façon indirecte dans le processus de sécrétion. Ainsi IcmF et DotU assureraient le renouvellement (ou « turn over ») des protéines composant l'appareil de sécrétion comme DotG et DotH. On sait également que le complexe cytosolique IcmQ-R joue un rôle essentiel dans la sécrétion mais sa fonction reste pour le moment obscure (il n'y a pas d'interaction avec les autres composants membranaires de l'appareil de sécrétion).

c. Organisation des gènes *dot/icm*

L'étude de mutants incapables de se multiplier dans les macrophages a permis de localiser deux régions du chromosome impliquées dans la virulence, d'une vingtaine de kilobases chacune. Ces gènes, au nombre de 26 (Figure 46) ont reçu le nom de *dot* (« defect in organelle trafficking ») ou *icm* (« intracellular multiplication »). Le système de gènes *dot/icm* présente une remarquable homologie avec les gènes du système conjugatif *tra* du plasmide Col1b-P9 de *Shigella flexneri* (18 gènes homologues, (Sexton & Vogel, 2002)). De plus, deux gènes, *dotG* et *dotB* sont des homologues des gènes *virB10* et *virB11* codant pour le système de sécrétion de type IV d'*Agrobacterium*. Ces gènes sont organisés en 11 unités de transcription (*icmWX*, *icmV-dotA dotBCD* dans la région I et *icmTS*, *icmR*, *icmQ*, *dotML*, *dotK*, *dotJIHGFEP*, *dotNO*, *icmHF* dans la région II).

d. Condition d'expression des gènes *dot/icm* de *Legionella*

La plupart des données concernant la régulation des gènes *dot/icm* codant pour le système de sécrétion de type IV chez *Legionella* proviennent des études de fusions avec le gène rapporteur *lacZ* codant pour la β -galactosidase d'*E. coli* (Segal *et al.*, 2005). Ces études ont permis de montrer que le gène *icmR* contient un site de fixation reconnu par CpxR, un régulateur faisant partie d'un système à deux composants qui peut augmenter d'un facteur 10 l'expression de ce gène. Le régulateur CpxR active aussi l'expression des deux autres unités de transcription (*icmV-dotA* et *icmWX*), mais de façon moindre. Un second régulateur de réponse, LetA, induit également l'expression des gènes *dot/icm* (5 unités de transcription) mais cet effet reste mineur. Les données recueillies ne permettent pas de mettre en lumière un régulateur prédominant. Ceci a permis de supposer une expression constitutive de ce système de sécrétion. Néanmoins, d'autres études ont rapidement permis de penser que le contrôle de la sécrétion s'exerce au niveau de la synthèse des effecteurs libérés puisque l'expression des gènes codant pour les protéines RalF, LidA et SidC et bien d'autres effecteurs est induite en phase stationnaire de croissance (Luo & Isberg, 2004). Ceci a donc impliqué de trouver un régulateur commun contrôlant l'expression de ces gènes. Très rapidement l'analyse des séquences en amont de ces gènes a permis de mettre en évidence l'existence d'une séquence consensus (cTTAATatT) reconnue par le régulateur de réponse d'un système à deux composants, PmrA. Des résultats expérimentaux ont alors appuyé cette analyse (Zusman *et al.*, 2007). En effet, l'expression des gènes codant les effecteurs était réduite en l'absence de PmrA. De plus, des mutants invalidés au niveau du gène *pmrA* se sont révélés être déficient dans la multiplication intracellulaire confirmant que PmrA contrôlait bien l'expression de gènes essentiels à la virulence comme ceux codant les effecteurs.

1.2.3. Les systèmes de type I

Les systèmes de type I (Holland *et al.*, 2005) correspondent à des transporteurs de type ABC (« ATP Binding Cassette ») qui utilisent l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP. Par exemple, l'appareil de sécrétion Hly de l' α -hémolysine, une toxine produite par une forme pathogène d'*E. coli*, comprend trois protéines :

(i) Une ATPase (HlyB) localisée dans la membrane interne qui fournit l'énergie nécessaire au fonctionnement du transporteur et permet la reconnaissance du substrat à transporter au niveau de son domaine C-terminal. D'un point de vue structural, cette ATPase est composée de deux domaines transmembranaires et de deux domaines cytoplasmiques hydrolysant l'ATP et très conservés.

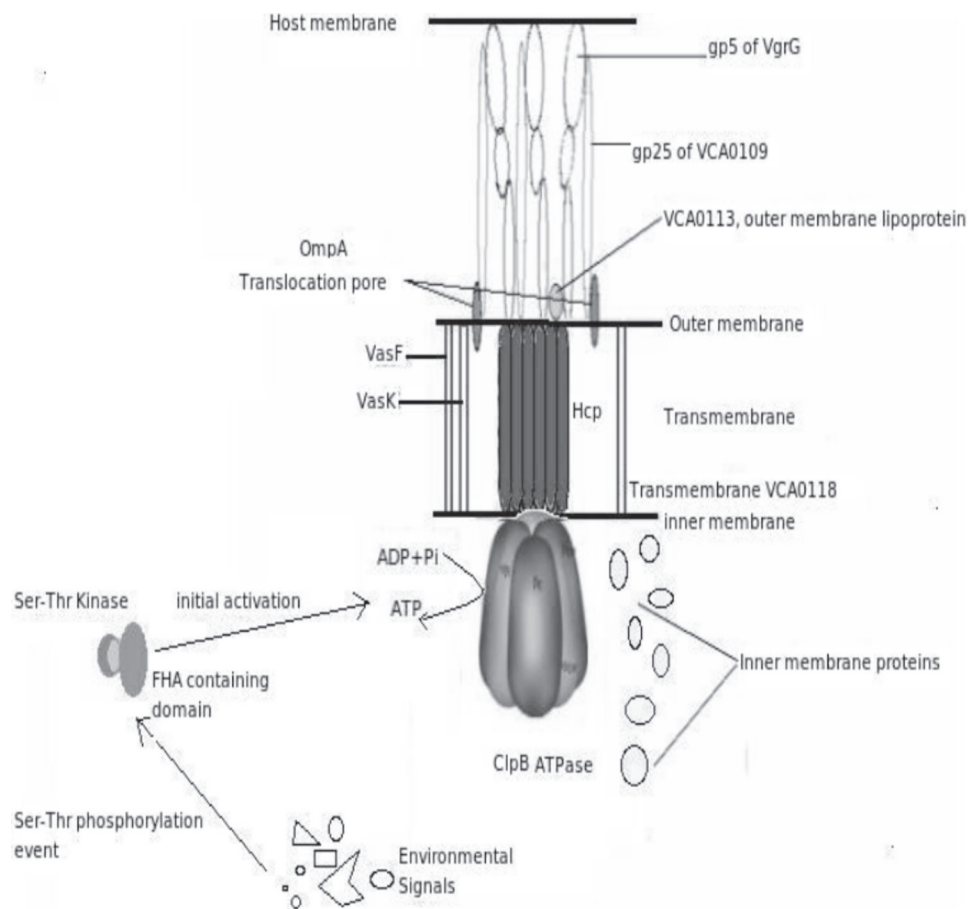


Figure 47. Modèle de système de sécrétion de type VI proposé par Shrivastava *et al.* (Shrivastava & Mande, 2008).

(ii) Un transporteur de la famille protéique des MFP (« membrane fusion protein ») localisé dans le périplasma (HlyD) qui assure la jonction entre les deux membranes.

(iii) Un canal transmembranaire (TolC) enchassé dans la membrane externe qui permet de sécréter la toxine au voisinage de la cellule eucaryote cible.

Des particularités peuvent exister chez certaines bactéries : ainsi alors que dans la plupart des systèmes de type I le gène codant pour la toxine exportée via l'appareil de sécrétion est situé en amont du gène codant pour le transporteur ABC du système, ce n'est pas le cas chez *L. pneumophila* (Jacobi *et al.*, 2003).

1.2.4. Sécrétion de type VI et VII :

1.2.4.1. Le système de sécrétion de type VI :

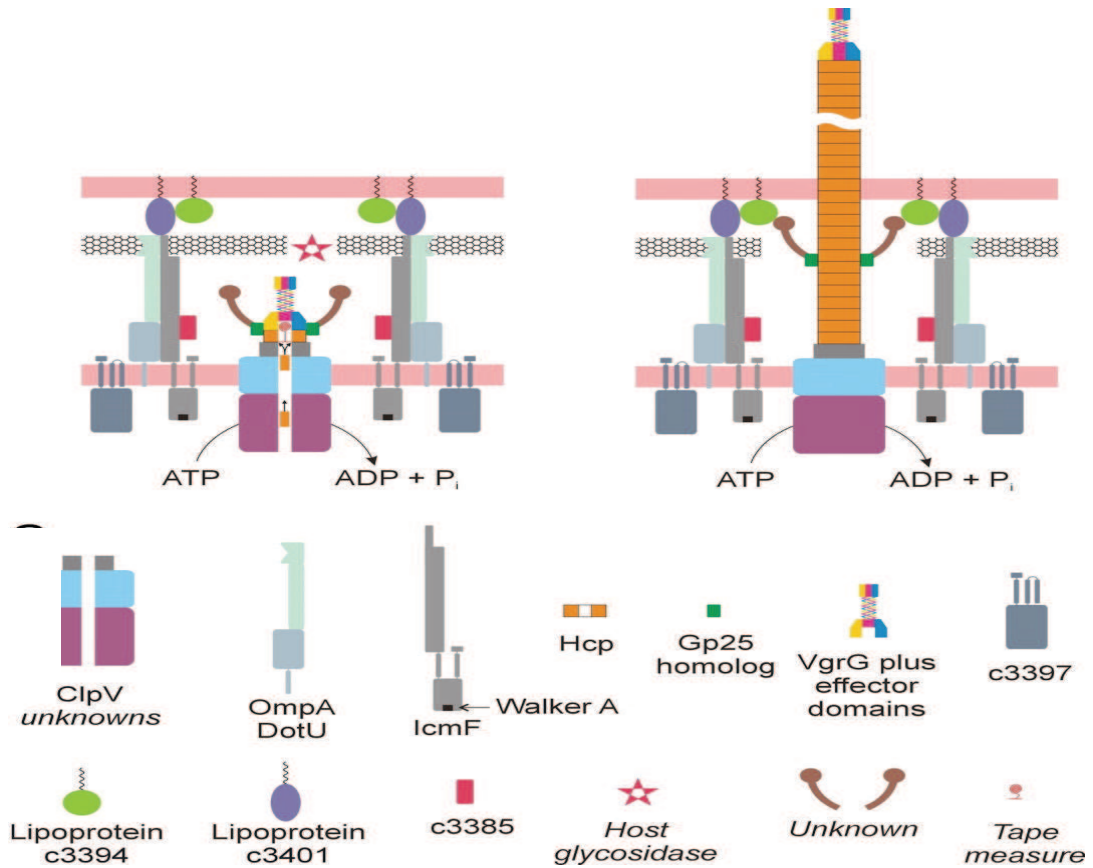
Ce nouveau système de sécrétion a émergé dès 2006 à travers les études de Mekalanos *et al.* bien que des expériences réalisées auparavant aient fourni les premières preuves de l'existence de ce système (Bingle *et al.*, 2008). Mekalanos *et al.* se sont intéressés aux protéines Hcp (« Haemolysin-coregulated protein ») et à trois autres protéines (protéines VgrG1-3 pour « Val-Gly repeats ») sécrétées par *Vibrio cholerae*. Ils ont constaté que les gènes codant pour ces protéines, les gènes *vasA-L* (« virulence associated secretion ») sont regroupés au sein d'un opéron codant près de 15 protéines et est requis pour la cytotoxicité contact dépendante chez les macrophages et les amibes.

L'absence de systèmes de type III ou IV chez cette souche mais également le fait que les protéines sécrétées n'avaient pas un signal de sécrétion connu (séquence hydrophobe en N-terminal) leur a permis de suggérer l'existence d'un nouveau système de sécrétion, nommé système de sécrétion de type VI. Les fonctions des protéines sécrétées et la structure de l'appareil de sécrétion restent encore peu connues. Cependant, certains résultats laissent suggérer que le système de type VI à l'image des systèmes de type III et IV permettrait de délivrer des effecteurs dans la cellule eucaryote hôte. En effet, la protéine VgrG1 sécrétée par le système de sécrétion de type VI de *Vibrio* peut lier l'actine *in vitro* grâce à son domaine C-terminal ACD (« actin cross linking domain ») et cette activité a été détectée dans le macrophage après internalisation de la bactérie (Ma *et al.*, 2009). De plus, les protéines VgrG peuvent former un complexe pouvant être un appareil de sécrétion d'effecteurs.

Les « clusters » de gènes codant pour les systèmes de sécrétion de type VI possèdent des homologues du système Dot/Icm de *Legionella*. Notamment, la présence d'un homologue de IcmF est caractéristique de ces opérons et est utilisé pour identifier des systèmes de type VI chez d'autres bactéries. Les systèmes de type VI incluent aussi un homologue de DotU. Ainsi, chez *Vibrio*, la protéine VasK (1181 aa) est similaire à IcmF (973 aa) de *Legionella*, de même VasF (257 aa) est similaire à IcmH (261 aa). Sur la base de ces homologies on a pu découvrir que les systèmes de type VI étaient présents chez de nombreuses bactéries et participaient à la virulence de *Pseudomonas aeruginosa* (système HIS-1), de *Aeromonas hydrophila*, *E. coli* (EAEC : *E. coli* Enterroaggrégatif), *Edwardsiella tarda* (système EVP opéron de 16 gènes) et *Burkholderia mallei* (prolifération dans les macrophages) (Filloux *et al.*, 2008).

A l'heure actuelle, si la fonction des effecteurs identifiés reste spéculative, nombre d'analyses extensives ont été menées sur des génomes pour établir l'architecture de l'appareil de sécrétion. Celles-ci ont conduit à établir deux modèles en 2008. Le premier, qui présente un appareil similaire au système de sécrétion de type III, est basé sur des approches multiples (identification de séquences orthologues, motifs conservés, domaines, familles, structures 3D, étude des îlots génomiques, phylogénie et interactions protéines-protéines) et a permis d'établir des groupes de protéines (protéines de membrane externe, de membrane interne et à

A



B

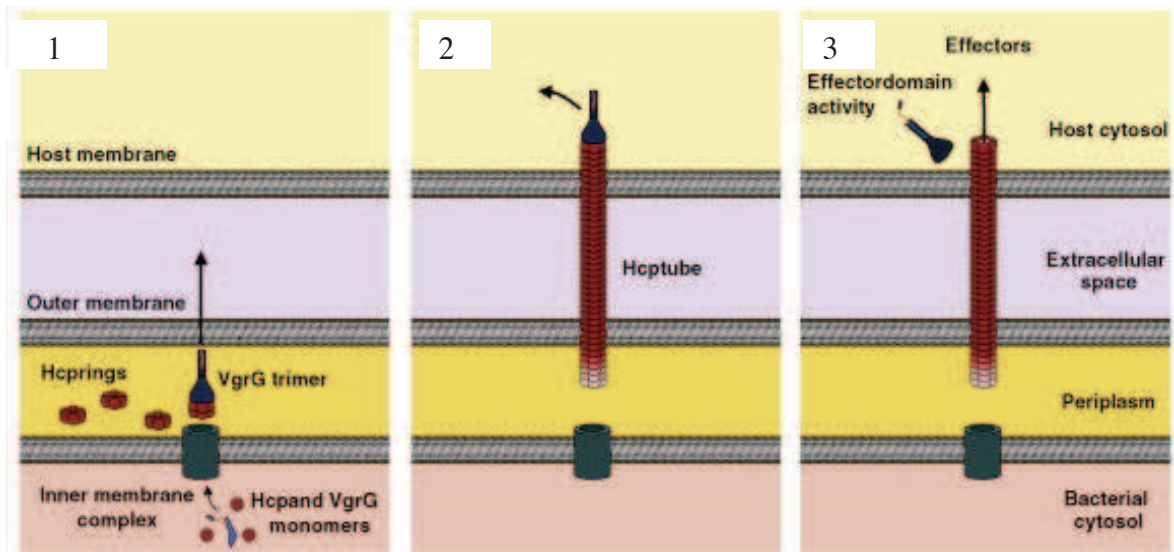


Figure 48. La structure et l'assemblage de l'appareil de sécrétion de type VI.

A. Modèle de l'assemblage assez spéculatif de l'appareil de sécrétion de type VI réalisé à partir d'étude sur les interactions protéines-protéines, des topologies membranaires prédites et de la localisation subcellulaire (Leiman *et al.*, 2009). En dessous apparaît le nom des protéines constituant le système de sécrétion : les protéines dont le nom est en italique sont hypothétiques (pas encore identifiées dans l'appareil de sécrétion de type VI mais supposées nécessaires).

B. Modèle de sécrétion par l'appareil de type VI du domaine effecteur de VgrG 1 (Pukatzi *et al.*, 2009). Les monomères Hcp et VgrG sont exportés dans le périplasm à travers un complexe multiprotéique putatif de la membrane interne. Une fois dans le périplasm, les monomères de Hcp forment des anneaux hexamériques qui s'ancrent au trimère VgrG. (b) Les anneaux Hcp s'assemblent près de VgrG pour créer un tube s'allongeant qui pousse à travers la membrane. La structure en pilus s'allonge à travers la bicouche lipidique. (c) VgrG expose son domaine effecteur au cytosol de l'hôte, lui permettant d'interagir avec des molécules de l'hôte cibles pour affecter les fonctions cellulaires de l'hôte. Si VgrG se détache de l'appareil de sécrétion de type VI, cela laisserait un tube Hcp qui pourrait maintenant agir comme un conduit pour délivrer des effecteurs dans le cytosol de l'hôte.

localisation périplasmique) et de proposer un modèle de leur interaction (Shrivastava & Mande, 2008). Ainsi, dans ce modèle (Figure 47), suite à la détection de signaux non connus, la protéine VCAO112, via son domaine FHA, activerait une sérine thréonine kinase déclenchant ainsi l'assemblage de l'appareil de sécrétion. Cet appareil se composerait d'un canal permettant la translocation d'effecteurs et formé par les protéines Hcp, VCA0109 et VgrG. Hcp qui est un hexamère formerait la partie du canal présente entre les deux membranes, externe et interne, alors que VgrG, de structure trimérique, formerait une aiguille à la surface bactérienne capable d'atteindre la membrane de la cellule hôte. A ce niveau VCA0109 est capable d'interagir avec le domaine gp5 des monomères de VgrG et contribue à former la partie émergée de l'appareil de sécrétion bactérien. D'autres protéines, logées dans la membrane interne, participeraient également à la structure de cet appareil (protéines VCA0108,-0111,-0114,-0119,-0121,-0122). On pense que ces protéines joueraient un rôle dans la stabilisation du complexe formé par l'appareil de sécrétion et auraient des activités importantes dans le fonctionnement de ce système. Suite à l'assemblage de tous ces composants la protéine ClpB, une protéine chaperon et ATPase de structure hexamérique, interagirait avec la protéine Hcp pour hydrolyser l'ATP, ce qui fournirait l'énergie nécessaire à la sécrétion des effecteurs. VasK et VasF (protéines de la famille icmF) auraient des rôles accessoires. Ces deux protéines participeraient à l'adhérence à la cellule hôte via notamment une réorganisation de la surface cellulaire bactérienne. De plus, VasK participerait aussi à la reconnaissance du signal, ce qui stimulerait la sécrétion. Finalement, les effecteurs (Hcp ; VgrG) aidés en cela par les lipoprotéines associées à la membrane externe comme VCA0113, passeraient à travers le pore de sécrétion formé par la porine OmpA.

Le second modèle (Figure 48) proposé par Leiman *et al.*, repose sur des données de cristallographie, biochimiques et des analyses bioinformatiques révélant que trois composants du système de sécrétion de type VI de *Vibrio* possèdent des homologies avec les protéines gp composant la queue du phage T4 (Figure 49) (Leiman *et al.*, 2009). Ainsi, d'un point de vue structural, le domaine N-terminal de la protéine VgrG possède une remarquable similarité avec le complexe gp5-gp27 bien que n'ayant que 13 % d'identité de séquence avec ces protéines. De même la structure de Hcp 1 rappelle celle de gp27. Au niveau biochimique, Hcp3 peut polymériser pour former un tube à l'image de la protéine gp19 composant la queue du phage T4. Cette polymérisation en tube n'est pas sans rappeler les systèmes de type II et IV où le filament externe transporte des sous-unités de base (piline) qui polymérisent à sa surface pour permettre au fur et à mesure son extension. Toutes ces données ont donc permis de suggérer que l'appareil de sécrétion de type VI serait proche structurellement mais aussi fonctionnellement de la queue du phage T4 qui permet à ce virus d'injecter des protéines et de l'ADN dans sa cellule hôte.

Ainsi, à l'image de l'appareil basal (« baseplate ») qui est nécessaire à l'initiation de la polymérisation du tube, on suppose que les protéines CplV et les homologues de IcmF et DotU s'associeraient à la membrane interne pour permettre le transport des protéines VgrG, Hcp, EvpA et une protéine « gp25-like » au niveau du périplasme via un processus nécessitant l'hydrolyse de l'ATP. Toutes ces protéines formant la structure de base homologue à celle retrouvée pour la queue du phage T4 permettrait ensuite d'initier la polymérisation de la protéine Hcp en un tube par ajout de monomères successifs au sein du périplasme (Figure 48). Ce tube s'allongerait jusqu'à atteindre la membrane de la cellule hôte et la traverser pour délivrer dans le cytosol de l'hôte le domaine effecteur C-terminal de VgrG. Des spéculations concernent la possibilité que d'autres substrats reconnus par CplV transitent via le canal formé par la protéine Hcp. De plus on ne sait pas si la seule force de polymérisation à elle seule serait suffisante pour pénétrer la membrane de la cellule hôte ou si, à l'image du phage T4, une contraction est nécessaire.

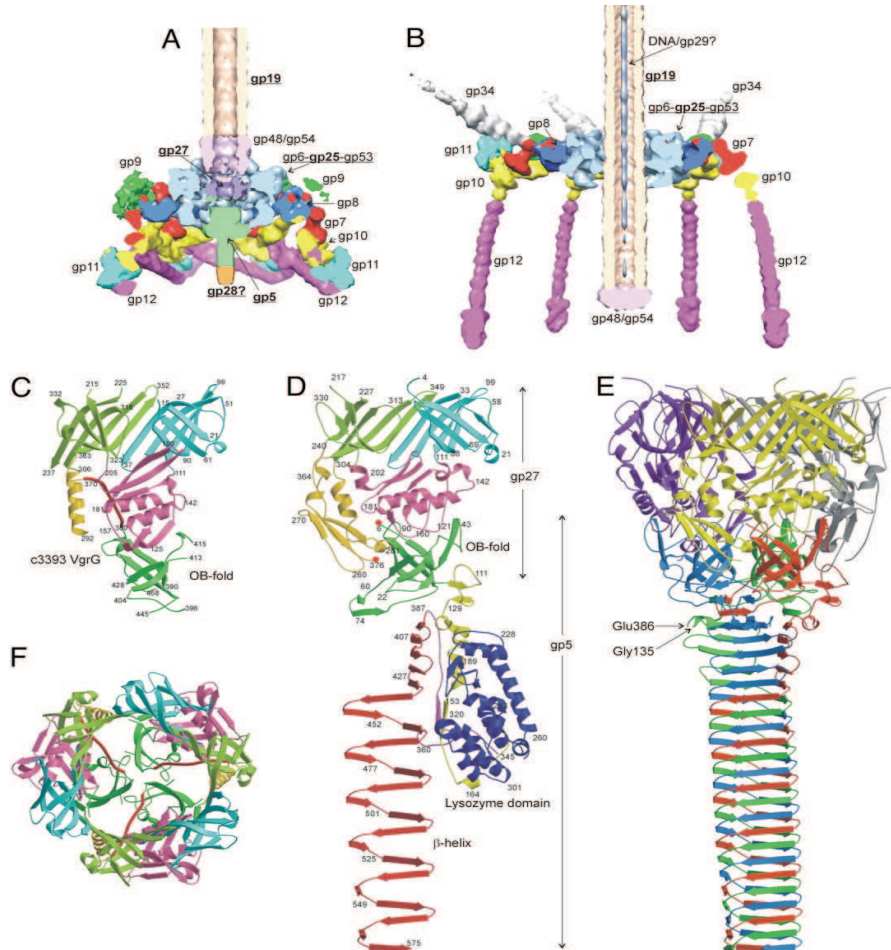


Figure 49. Structure de l'appareil basal (« baseplate ») du phage T4 et comparaison avec la protéine VgrG de *E.coli* et ses homologues chez le phage T4, gp5 et gp27 (Leiman *et al.*, 2009).

La reconstitution de l'assemblage de l'appareil structural du phage T4 avant (A) et après (B) l'attachement à la cellule hôte. Les protéines sont indiquées avec leur numéro de gènes respectifs. Les protéines du système de sécrétion de type VI sont mises en évidence en gras et soulignées. (C) La structure cristallisée de VrgG révélant différents domaines : le domaine en tube gp27 (en cyan et vert clair), le fragment de la chaîne polypeptidique connectant les modules gp27 et gp5 (un tube rouge épais). (D) Les structures de gp5 et gp27. Les extrémités des chaînes polypeptidiques de gp5 et gp27 fusionnées dans la structure de VgrG sont mises en évidence avec des points rouges. (E) Un modèle de l'assemblage de VgrG ressemblant à l'assemblage gp5-gp27. (F) Vue par-dessus de la structure cristallisée du trimère VrgG.

1.2.4.2. Le système de sécrétion de type VII

Le système de type VII a été découvert en analysant le génome de souches de *Mycobacterium* atténuées en virulence et utilisées en tant que souche vaccinale (BCG) (DiGiuseppe Champion & Cox, 2007) (Simeone *et al.*, 2009). La comparaison avec d'autres souches de *Mycobacterium* a permis de montrer que ces souches vaccinales possédaient une délétion d'une région génétique appelée locus RD1 (« region of difference 1 »). L'analyse bioinformatique de la région RD1 qui était capable de compléter la souche vaccinale pour la virulence a permis d'identifier un « cluster » de gènes codant pour des protéines sécrétées comme ESAT-6 et CFP-10, des protéines membranaires et des ATPases d'un appareil de sécrétion nommé ESX-1.

Il a par la suite montré que le système ESX-1 participait à la virulence et à l'activité hémolytique chez *Mycobacterium marinum* et à la conjugaison chez *Mycobacterium smegmatis*. Chez *Mycobacterium*, il existe jusqu'à cinq systèmes de sécrétion homologues à ESX-1 chez la même bactérie. Outre les mycobactéries, il a été découvert d'autres systèmes de sécrétions de type VII chez les bactéries *Staphylococcus aureus* et *Bacillus anthracis*. Bien qu'il n'y ait pas d'homologies de séquences entre les composants du système ESX-1 et des systèmes de sécrétion connus, certains parallèles ont été établis d'un point de vue fonctionnel avec le système de type IV. Sur la base des données expérimentales d'interaction protéine/protéine concernant la sécrétion des protéines ESAT-6 et CFP-10 et de la localisation prédite des autres protéines, deux modèles assez similaires ont été établis : le modèle de Champion *et al.* (DiGiuseppe Champion & Cox, 2007) et le modèle de Abdallah *et al.* (Abdallah *et al.*, 2007) (Figure 50).

Dans ces modèles, le dimère ESAT6 et CFP-10 serait reconnu grâce à la séquence signal C-terminale portée par CFP-10 par la protéine cytosolique Rv3871. Rv3871 interagirait ensuite avec la protéine Rv3870 localisée au niveau de la membrane interne afin de constituer une ATPase que l'on suppose fournir l'énergie au système de sécrétion (Figure 50). Le complexe Rv3871-3870 formerait une cavité centrale (anneau hexamérique) chargée d'accueillir le substrat et de l'adresser au canal de sécrétion logé dans la membrane cytosolique et formé par la protéine Rv3877 qui possède de nombreux domaines transmembranaires. La protéine serait ensuite adressée à la paroi mycobactérienne par des protéines non identifiées pour assurer la sécrétion des protéines en dehors de la cellule.

2. Les systèmes d'efflux de composés toxiques, un mécanisme de résistance aux drogues

Il existe deux types de composés pouvant être toxiques pour la bactérie : les biocides (antiseptiques et désinfectants) et les antibiotiques (McDonnell & Russell, 1999). Suivant la dose et le mécanisme d'action, ces composés peuvent tuer (effet bactéricide) ou inhiber la croissance bactérienne (effet bactériostatique). Les cibles d'action des antibiotiques sont très spécifiques : le métabolisme, la synthèse des acides nucléiques (ADN, ARN), la synthèse des protéines, la membrane ou d'autres composants de l'enveloppe cellulaire. Cette action peut être très fine : par exemple, les quinolones qui agissent sur l'ADN gyrase pour inhiber la synthèse des acides nucléiques. Au contraire, les mécanismes d'action des biocides sont beaucoup moins spécifiques, touchant pour l'essentiel à l'enveloppe cellulaire bactérienne ou des molécules sans qu'il y ait spécificité réelle de la cible. On peut, à titre d'exemple, citer le cas du crystal violet ou du bromure d'éthidium qui sont des agents capables de s'insérer entre les bases de l'ADN.

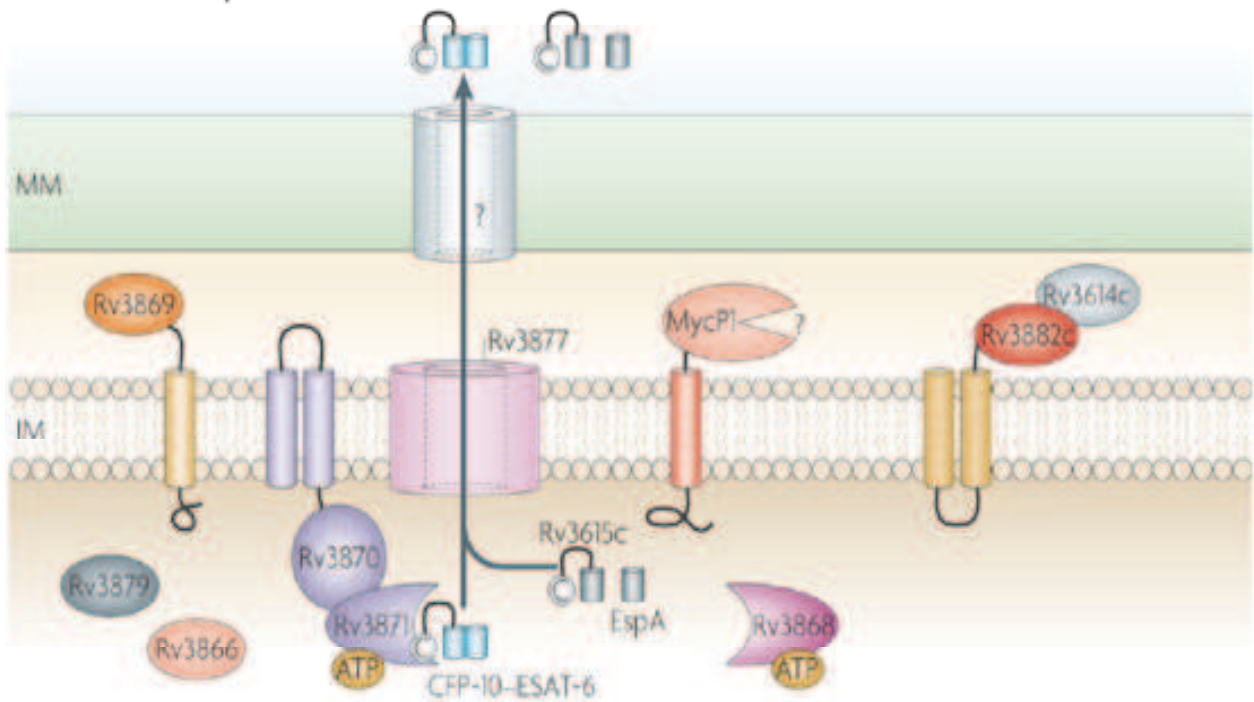


Figure 50. Modèle de structure et de fonctionnement de l'appareil de sécrétion de type VII « ESX-1 » de *Mycobacterium* (Abdallah *et al.*, 2007).

La sécrétion de Rv3616c (aussi connue sous le nom de EspA) est co-dépendante de la présence du complexe ESAT-6-CFP-10. Le complexe ESAT-6-CFP10 est reconnu par la protéine Rv3871 qui lie la queue C-terminale de CFP-10. Rv3871 lui-même est associé à la membrane interne (IM) via son interaction avec Rv3870. Le canal de translocation dans la membrane interne est probablement formé par Rv3877 du fait de la présence de plusieurs domaines transmembranaires. Cependant, il n'a pas été identifié quelle protéine (ou protéines) forment le canal dans la membrane mycobactérienne (MM). La protéine Rv3868 similaire aux protéines chaperon serait impliquée dans la biogénèse de la machinerie de sécrétion. La fonction de la protéase MycP1 est essentielle, mais on ne sait pas pourquoi étant donné qu'aucune protéine clivée suite à la sécrétion par EsX-1 n'a été identifiée.

Certaines espèces bactériennes sont naturellement résistantes (résistance naturelle) à un antibiotique, d'autres peuvent acquérir cette résistance par transfert génétique. Le mode d'acquisition de ces gènes varie, mais le transfert génétique peut s'effectuer entre deux cellules bactériennes appartenant ou non à la même espèce. Ce type de transfert de gènes appelé aussi transfert horizontal de gène permet à la bactérie vivant en communauté (biofilm) de remanier en permanence son génome et d'acquérir des résistances à différents composés ou multirésistance. De plus, ce mécanisme permet à la bactérie d'acquérir des gènes à partir de cellules eucaryotes. Ainsi on pense que bon nombre de gènes codant les effecteurs des systèmes de sécrétion permettant à la bactérie pathogène de détourner des mécanismes de l'hôte possédant des domaines de type eucaryote ont été acquis via un transfert horizontal.

Il existe bon nombre de vecteurs permettant à ces transferts de se réaliser notamment les plasmides et/ou les transposons. Les plasmides portant les gènes de résistance peuvent être véhiculés par transduction ou conjugaison. Au sein de la bactérie hôte le plasmide peut s'intégrer ou non au niveau du chromosome de l'hôte par recombinaison. Ces plasmides peuvent eux-même porter des éléments génétiques mobiles codant pour un système de résistance (ou transposon) et qui peuvent s'intégrer sur un chromosome ou sur un plasmide résident de la bactérie réceptrice. Des transposons conjuguatifs capables à la fois de transposition et de conjugaison sont connus chez les bactéries à Gram positif et anaérobies stricts. Les plasmides peuvent aussi porter des intégrons, systèmes spécialisés dans l'intégration et l'acquisition de cassettes de gènes de résistance. En raison de cette transférabilité, les résistances par acquisition de gènes sont prédominantes en clinique. D'autres types de résistance acquises, beaucoup plus rares, proviennent de mutations chromosomiques concernant par exemple le gène codant pour la protéine cible de l'antibiotique.

Enfin, un système de transfert horizontal très répandu dans le règne bactérien est la compétence naturelle.

2.1. Mécanismes de résistance aux drogues

Chez les bactéries, plusieurs stratégies permettent de résister aux drogues (Figure 51) : l'inactivation du composé toxique, la réduction de la perméabilité membranaire, la modification ou la surexpression de la cible et l'expression de pompes d'efflux empêchant l'accumulation intracellulaire de la drogue (Poole, 2002) (Nikaido, 2009) (Denyer & Maillard, 2002).

2.1.1. Diminution de perméabilité

La résistance naturelle des bactéries à Gram négatif à de nombreux antibiotiques hydrophobes (pénicillines G, macrolides, glycopeptides, acide fusidique) est due, pour une part, à l'imperméabilité de leur membrane externe vis-à-vis de ces molécules. En effet, la membrane externe des bactéries à Gram négatif recèle des canaux qui forment des pores permettant aux molécules hydrophiles de petite taille de traverser la membrane : ce sont les porines. Ces porines permettent également le passage de nombreux antibiotiques. Ainsi la porine OmpF permet le passage de fluoroquinolones, les β -lactamines, les tétracyclines, chloramphénicol, sulfamides et des aminosides.

On comprend alors que des mutations chromosomiques entraînant la réduction ou la disparition de certaines porines voire la modification de certaines porines, sont à l'origine d'une diminution de la perméabilité aux antibiotiques hydrophiles et donc de l'apparition d'une résistance. On peut citer le cas des résistances de *P. aeruginosa* aux imipénèmes qui sont dues à des mutations entraînant la perte de la porine OprD2.

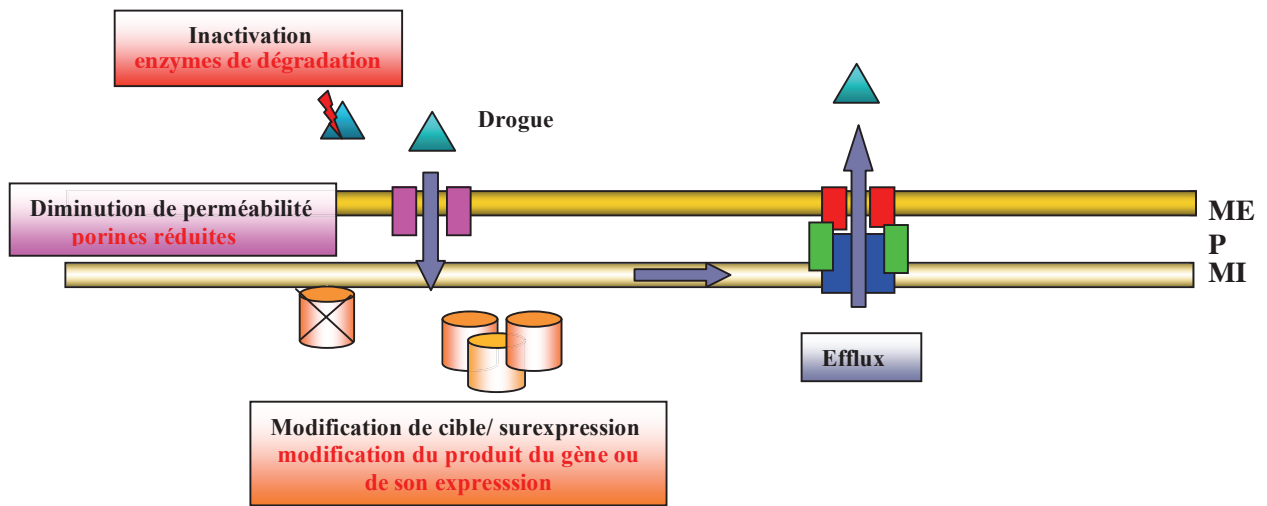


Figure 51. Les mécanismes de résistance aux drogues.
 ME : Membrane Externe, MI Membrane interne, P : Périsplasme.

2.1.2. Inactivation enzymatique

Ce mécanisme de résistance probablement le plus répandu permet à la bactérie de détruire le composé toxique en modifiant sa structure pour le rendre inactif grâce à une enzyme spécifique. Il s'agit d'un mécanisme de résistance courant contre l'action des aminoglycosides (kanamycine, tobramycine et amikacine) inactivés par modification et les β -lactames (penicilline, ampicilline, cephalosporines et carbapénèmes comme impénèmes) inactivés par des enzymes lytiques.

2.1.2.1. Inactivation par des enzymes lytiques : le cas des β -lactames

En clinique, la résistance naturelle aux β -lactames d'un grand nombre de bactéries à Gram négatif est essentiellement due à la production de β -lactamases. Ces enzymes à activité hydrolytique sont capables d'ouvrir le pont β -lactame caractéristique des β -lactamines, et de ce fait inactivent l'antibiotique. Suivant leur mécanisme d'action, elles ont été divisées en plusieurs classes : les enzymes de type sérine protéase (classe A, C et D) et les métalloenzymes (classe B).

Parmi ces enzymes, les β lactamases de type TEM (classe A) sont parmi les plus répandues chez les souches cliniques contenant des plasmides de résistance : l'enzyme TEM-1 explique plus de 90 % des cas de résistance à l'ampicilline chez *E. coli*. Des mutations affectant le site actif de ces enzymes peut élargir leur spectre d'action en donnant naissance à des β -lactamases à spectre élargi ou ESBL (« extended spectrum β -lactamases ») .

2.1.2.2. Inactivation par modification : le cas des aminoglycosides

Les aminoglycosides, au contraire, sont inactivés par une modification enzymatique ayant pour conséquence la réduction de la charge positive de cet antibiotique polycationique. Parmi les enzymes capables de modifier ces composés, on retrouve celles capables de phosphorylation : ce sont les aminoglycosides-phosphotransférases (APH), d'acétylation comme les acétyl- transférases (AAC), et d'adénylation adényl- ou nucléotidyltransférases (AAD ou ANT).

2.1.3. Altération de cible

D'autres composés (synthétiques) comme les fluoroquinolones ne peuvent pas être inactivés par voie enzymatique. Dans ce cas, la stratégie de résistance va consister en une modification de la cible. Par exemple, la résistance aux fluoroquinolones est essentiellement due à des mutations concernant l'enzyme cible, la topoisomérase. De même, il a été observé plusieurs modifications concernant les protéines bactériennes de liaison à la pénicilline (PLP). Ces enzymes bactériennes qui participent à l'assemblage du peptidoglycane, sont la cible d'une classe d'antibiotiques, les β -lactamines, capables de les inactiver. Une modification au niveau de cette cible peut rendre la bactérie résistante à cette famille d'antibiotiques. Chez les staphylocoques par exemple, on observe la production d'une nouvelle PLP possédant une affinité réduite pour les β -lactamines et codée par le gène chromosomique *mecA*.

Tableau 4. Pompes d'efflux impliquées dans la résistance bactérienne aux antibiotiques chez des bactéries d'intérêt médical (Cattoir, 2004).

Pompe	MFP/OMF ^a	Organisme	Antibiotiques substrats ^b
Pompe	MFP/OMF ^a	Organisme	Antibiotiques substrats ^b
Major Facilitator Superfamily (MFS)			
12 segments transmembranaires (12 TMS)			
BcrA	<i>B. cepacia</i>	TC, Nal	
Blt		<i>B. subtilis</i>	FQ
Bmr		<i>B. subtilis</i>	C, FQ
CmlA		<i>P. aeruginosa</i>	C
EmeA		<i>E. faecalis</i>	FQ, Ery, L, Nov
Lde		<i>L. monocytogenes</i>	FQ
LmrP		<i>L. lactis</i>	TC, M ^{14, 15} , L
MdfA		<i>E. coli</i>	C, TC, AG, Ery, Rif, FQ
MdrL		<i>L. monocytogenes</i>	Ctx, ML
MefE		<i>S. pneumoniae</i>	M ^{14, 15}
NorA		<i>S. aureus</i>	C, FQ
PmrA		<i>S. pneumoniae</i>	FQ
MefA		<i>S. pyogenes, S. agalactiae, streptocoques craux, streptocoques C et G</i>	M ^{14, 15}
Tap		<i>M. fortuitum, M. tuberculosis</i>	TC, AG
TetA-E		Entérobactéries, <i>Pseudomonas, Vibrio, Aeromonas...</i>	TC
TetH		<i>Pasteurella, Mannheimia</i>	TC
14 segments transmembranaires (14 TMS)			
EmrB ^c	EmrA / TolC	<i>E. coli</i>	Nal
MdeA		<i>S. aureus</i>	QAC, Vir, Novo
QacA, B		<i>S. aureus</i>	QAC
TetK-L		<i>Staphylococcus, Streptococcus, Enterococcus, Listeria, Bacillus, Clostridium, Mycobacterium</i>	TC
VceB	VceA	<i>V. cholerae</i>	Nal
Small Multidrug Resistance family (SMR)			
EmrE		<i>E. coli</i>	TC, QAC
EmrE		<i>P. aeruginosa</i>	AG
Mmr		<i>M. tuberculosis</i>	Ery
QacE		Bactéries à Gram négatif	QAC
QacE δ 1		Bactéries à Gram positif et négatif	TC, QAC, Sul, Gm
Smr		<i>S. aureus</i>	QAC
SugE		<i>E. coli</i>	QAC
Resistance-Nodulation cell Division family (RND)			
AcrB	AcrA / TolC	<i>E. aerogenes</i>	C, TC, FQ, Nov
AcrB	AcrA / TolC	<i>E. coli</i>	C, TC, Nal, FQ, β L, Nov, Ery, Fus, Rif
AcrB	AcrA / ?	<i>H. influenzae</i>	Nov, Ery, Rif
AcrB	AcrA / AcrC	<i>K. oxytoca, K. pneumoniae</i>	FQ
AcrB	AcrA / TolC	<i>S. Typhimurium</i>	C, TC, Nal, FQ, β L, Nov, Ery, Fus, Rif
AcrD	AcrA / ?	<i>E. coli</i>	AG, Fus, Nov
AcrF	AcrE / TolC	<i>E. coli</i>	TC, β L, Nov, Ery, Fus, Rif
AdeB	AdeA / AdeC	<i>A. baumannii</i>	C, TC, FQ, AG, Ery, Nov, Tmp
AnrB	AnrA / OprA	<i>B. pseudomallei</i>	AG, ML
ArpB	ArpA / ArpC	<i>P. putida</i> ^d	C, TC, Carb, Nov, Ery, Sm
BpeB	BpeA / OprB	<i>B. pseudomallei</i>	Ery, Gm, Sm
CeoB	CeoA / OpcM	<i>B. cepacia</i>	C, Cip, Tmp
CmeB	CmeA / CmeC	<i>C. jejuni</i>	C, TC, FQ, Amp, Ctx, ML, Nal, Rif
MdtBC	MdtA / MdtC	<i>E. coli</i>	β L, Nov
MepB	MepA / MepC	<i>P. putida</i> ^d	TC, β L, Nov, Ery
MexB	MexA / OprM	<i>P. aeruginosa</i>	C, TC, FQ, β L*, Nov, ML, Tmp, Sul
MexD	MexC / OprJ	<i>P. aeruginosa</i>	C, TC, FQ, C ₄ G, ML, Nov, Tmp
MexF	MexE / OprN	<i>P. aeruginosa</i>	C, FQ, Tmp, Ipm ^e
MexK	MexJ / OprM	<i>P. aeruginosa</i>	TC, ML
MexY	MexX / OprM	<i>P. aeruginosa</i>	TC, ML, AG
MtrD	MtrC / MtrE	<i>N. gonorrhoeae</i>	TC, Pén, Ery, Azi, Rif, Nov, Cip
SmeB	SmeA / SmeC	<i>S. maltophilia</i>	AG, β L, FQ
SmeE	SmeD / SmeF	<i>S. maltophilia</i>	TC, Ery, FQ
TtgB	TtgA / TtgC	<i>P. putida</i> ^d	C, TC, Amp
XepB	XepA / XepC	<i>P. gingivalis</i>	Rif

2.1.4. L'efflux

Les stratégies de résistance précédemment évoquées permettent à la bactérie de résister à un large spectre de composés antimicrobiens. Cependant, les bactéries multirésistantes possèdent au sein de leur enveloppe des machineries plus complexes permettant de rejeter les composés toxiques : ce sont les pompes d'efflux. Celles-ci pourraient également jouer un rôle primordial dans la virulence en effluant des antimicrobiens de l'hôte au cours de l'infection.

2.1.4.1. Les cinq classes de système d'efflux

Les protéines d'efflux jouent un rôle important dans la résistance intrinsèque et acquise des bactéries aux drogues (Poole, 2004) (Cattoir, 2004) (Van Bambeke *et al.*, 2003) (Poole, 2005) (Van Bambeke *et al.*, 2000). Chez *E. coli* par exemple, il existe plus de 37 protéines d'efflux (putatives ou déjà caractérisées) répertoriées à ce jour (Nishino & Yamaguchi, 2001). De nombreux analogues de ces pompes ont été identifiés chez d'autres bactéries (Tableau 4). Il s'agit en fait de protéines de la membrane interne (ou IMP : « inner membrane protein ») regroupées en cinq familles (familles MFS, RND, MATE, SMR et ABC) et fonctionnant selon deux mécanismes (Figure 52) :

- la protéine de la membrane interne expulse le composé toxique dans le périplasme qui peut ensuite diffuser vers l'extérieur via les porines (familles SMR/MATE/MFS)
- la protéine de la membrane interne forme un complexe avec une protéine périplasmique (MFP) et une protéine de la membrane externe (OMF) créant ainsi un canal pour expulser le composé toxique directement à l'extérieur de la cellule (ABC/RND/MFS).

Pour la famille MFS, les deux types d'organisation peuvent être observés.

a. Famille MFS

Les protéines de la famille MFS (« major facilitator superfamily ») correspondent à des protéines de transport ubiquitaires qui outre l'efflux des drogues permettent le transport de sucres et d'intermédiaires métaboliques. Ces protéines contenant 12 à 14 domaines transmembranaires utilisent la force proton motrice pour expulser les composés grâce à un système antiport H^+ (Law *et al.*, 2008).

MFS à 14 segments transmembranaires

Premières à être décrites au sein de cette classe, les pompes QacA et QacB de *Staphylococcus aureus* assurent l'efflux actif de biocides et de colorants (Figure 53). Le chlorure de benzalkonium, le bromure d'hexadécyltriméthylammonium (CTAB) et le bromure d'éthidium comptent parmi les substrats de ces deux pompes. Mais, si les deux protéines possèdent une remarquable similarité de structure (14 domaines transmembranaires), seule QacA est capable d'effluer des composés dicationiques comme la chlorhexidine. La comparaison de séquence avec QacB et la mutagenèse dirigée (menée par Paulsen *et al.* ; (Paulsen *et al.*, 1996)) ont révélé que cette spécificité de QacA reposait sur la seule présence d'un résidu aspartate au sein du domaine transmembranaire 10. Brown *et al.* ont de plus démontré que l'expression de QacA était subordonnée au répresseur transcriptionnel QacR (Brown & Skurray, 2001).

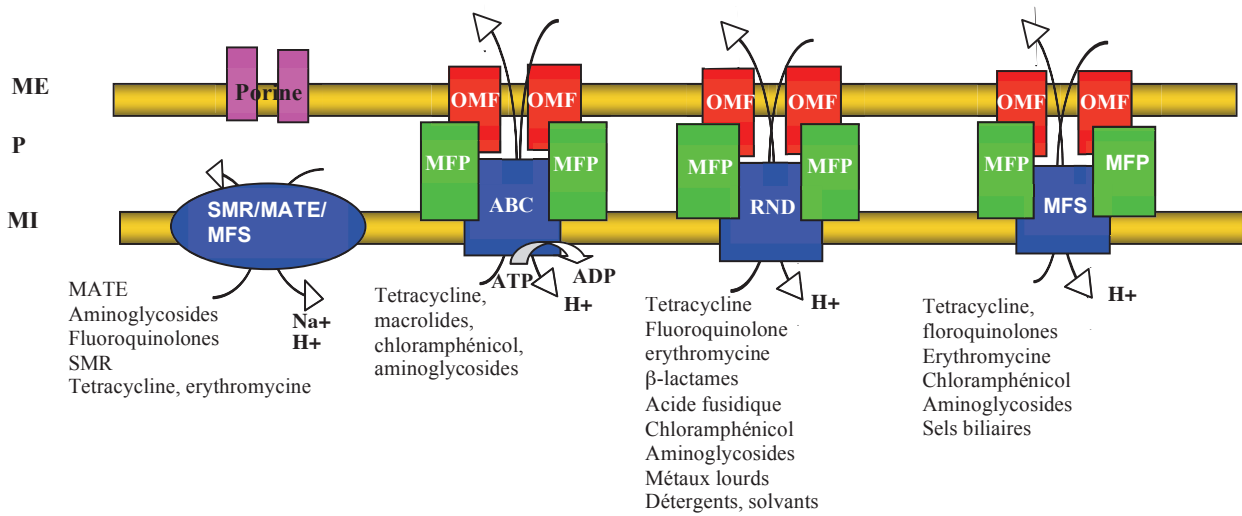


Figure 52. Les cinq familles de systèmes d'efflux chez les bactéries à Gram négatif (Poole, 2004).

Les cinq familles de protéines d'efflux sont ici représentées : protéines de la famille **SMR** : Petite protéine conférant des multirésistances (« **S**mall **M**ultidrug **R**esistance »), **MATE** : protéine d'export des composés toxiques et drogues (« **M**ultidrug **A**nd **T**oxic **C**ompound **E**xtrusion **F**amily »), **ABC** : transporteur dépendant de l'énergie fournie par l'ATP (« **A**T**P** **B**inding **C**assette family »), **RND** : protéine impliquée dans les résistances, la nodulation et la division cellulaire chez les bactéries (« **R**esistance **N**odulation cell **D**ivision ») et **MFS** : protéine facilitante (« **M**ajor **F**acilitator **S**uperfamily »). Les systèmes à trois composants comprennent en plus une protéine de membrane externe ou **OMF** (« **O**uter **M**embrane **F**actor ») et une protéine périplasmique liée à la membrane interne ou **MFP** (« **M**embrane **F**usion **P**rotein »).

ME : Membrane Externe, **MI** Membrane interne, **P** : Périplasme.

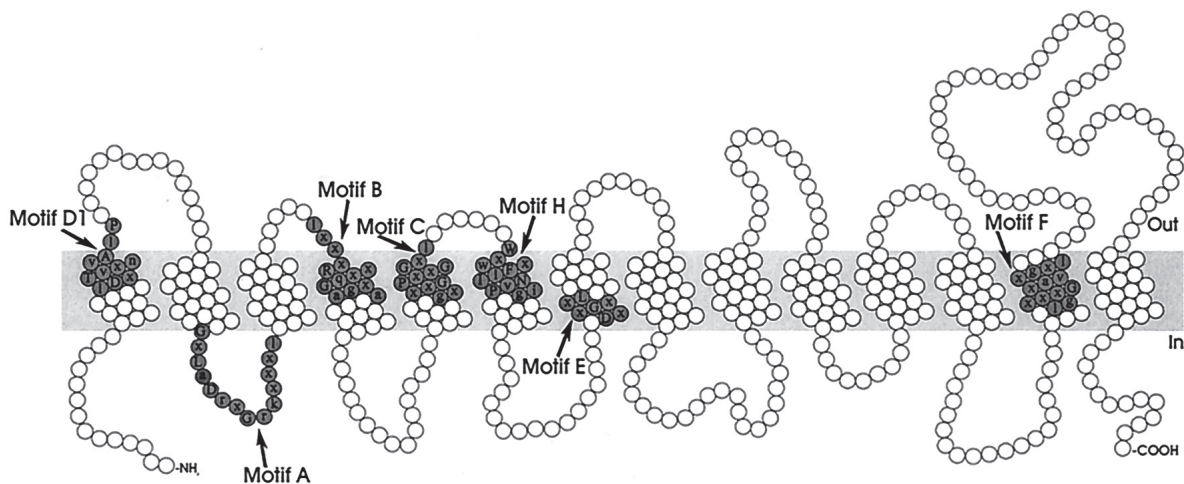


Figure 53. Modèle structural des transporteurs de type MFS à 14 domaines transmembranaires (Putman et al., 2000).

Motifs : **A** : GxLaDrxGrkxx(x)l ; **B** : lxxxRxxqGxgaa ; **C** : gxxxGPxxGGxl ; **D1** : lDxTvxnVAIP ; **E** : DxxGxxL ; **F** : lxxxxGxavxgx1 ; **H** : WxwxFlINvPig. x représente un acide aminé quelconque et les lettres représentant les acides aminés sont en majuscule (lorsque l'acide aminé est présent dans plus de 70% des séquences) ou en minuscule (lorsque l'acide aminé est présent dans plus de 40% des séquences).

EmrB chez *E. coli* est un autre transporteur de drogues à avoir été caractérisé au sein de cette classe et contribue à l'efflux :

- du CCCP ou cyanide m-chlorophenylhydrazone, agent découplant qui annule la force proton motrice en dissipant les gradients de proton.
- d'antibiotiques comme l'acide nalidixique.

Chez les bactéries à Gram négatif, EmrB, qui est associé à la membrane interne, est capable d'interagir avec une protéine périplasmique, EmrA. L'association du complexe EmrB-A avec une protéine canal de la membrane externe comme TolC fournit à la bactérie une pompe traversant les deux membranes.

MFS à 12 segments transmembranaires

De loin la plus répandue au sein de la famille MFS, cette seconde classe regroupe des protéines d'efflux comprenant 12 hélices alpha transmembranaires (Figure 54).

Ainsi, NorA chez *S. aureus* appartient à cette classe et permet la résistance aux fluoroquinolones, aux colorants cationiques et aux inhibiteurs cationiques incluant la puromycine et le tétraphenylphosphonium (TPP). Au sein du génome de *Staphylococcus*, au moins deux autres homologues de NorA ont été répertoriés : il s'agit des gènes codant pour les protéines NorB et NorC. Largement étudiée, la pompe LmrP de *Lactococcus* participe à la résistance aux colorants cationiques, à la daunomycine, aux tétracyclines et aux macrolides. Des études utilisant des colorants marqués à la fluorescence ont permis de montrer que ces drogues étaient capturées à partir du feuillet interne de la bicouche lipidique (« vacuum cleaner »).

Bien que la structure de la plupart des protéines MFS reste largement prédite d'après les méthodes indirectes d'analyse de séquences et d'études topologiques, la structure en trois dimensions obtenue pour certaines protéines a permis une avancée significative dans la compréhension du mécanisme d'efflux de ces drogues.

La protéine EmrD (Yin *et al.*, 2006) qui confère à *E. coli* la résistance à des découplants au SDS et aux ammoniums quaternaires (QAC) a été cristallisée et sa structure comparée à celle d'autres cristaux obtenus avec des protéines de la famille MFS : GpIT, LacY et OxlT. EmrD comprend 12 hélices transmembranaires connectées entre elles par des boucles hydrophiles qui entourent le pore. Les extrémités N- (domaines transmembranaires TM1 à TM6) et C-terminales (domaines TM7-TM12) de la protéine qui présentent une faible homologie de séquence, ont la particularité d'être toutes les deux dans le cytosol (Figure 55). Ces deux extrémités auraient émergé d'un événement de fusion suivi d'une duplication génique.

Le pore permettant le transit de la molécule à effluer est hydrophobe, du à la présence d'acides aminés aromatiques bordant sa surface. Les composés avant de transiter par le pore seraient triés via un filtre de spécificité composé de deux régions (comprenant les hélices TM4 et TM5 et les hélices TM10 et TM11) et de certains acides aminés chargés positivement au sein du domaine transmembranaire TM4 (Arg, Asp et Glu).

Les données récoltées sur la structure de EmrD laissent à croire que la protéine subirait des changements conformationnels suite à la liaison du substrat. Suivant le mécanisme décrit analogue à celui de GpIT (« rocker switch ») les deux portions N et C terminales basculeraient ensemble afin d'exposer le composé à la face périplasmique. Ce composé serait ensuite pris en charge au niveau du périplasma pour être efflué hors de la cellule.

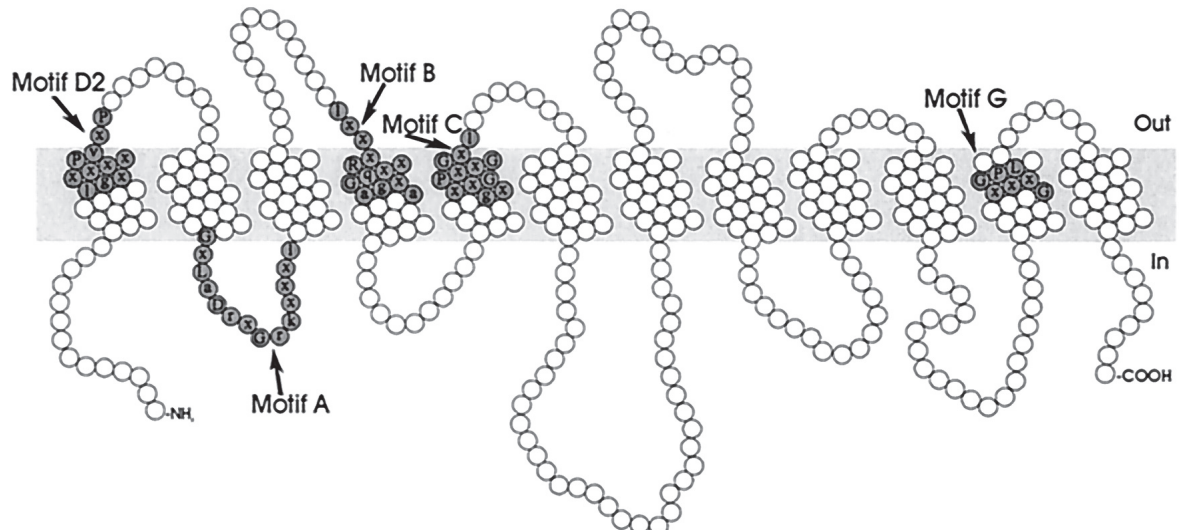


Figure 54. Modèle structural des transporteurs de type MFS à 12 domaines transmembranaires (Putman et al., 2000).

A : GxLaDrxGrkxx(x)l ; **B :** lxxxRxxqGxgaa ; **C :** gxxxGPxxGGxl ; **D2 :** lgxxxxxPvxP ; **G :** GxxxGPL.
 x représente un acide aminé quelconque et les lettres représentant les acides aminés sont en majuscule (lorsque l'acide aminé est présent dans plus de 70% des séquences) ou en minuscule (lorsque l'acide aminé est présent dans plus de 40% des séquences).

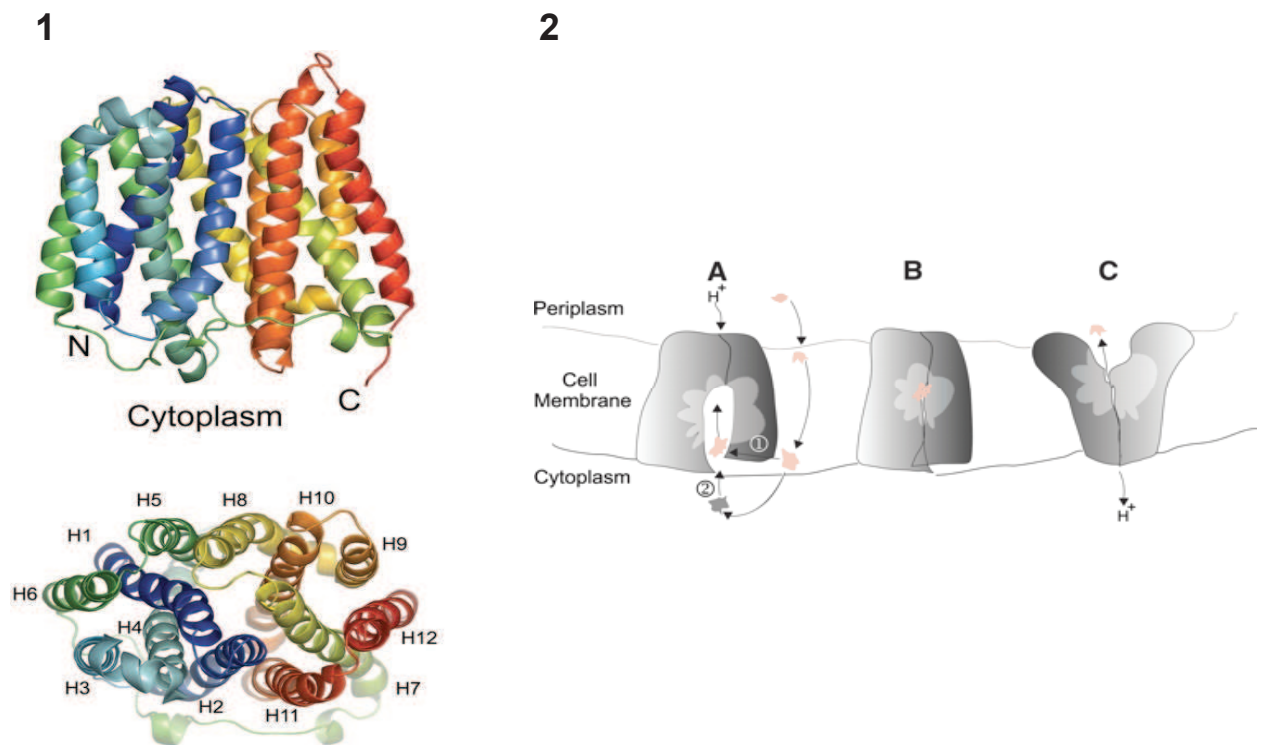


Figure 55. Structure et modèle de fonctionnement de la pompe EmrD chez *E.coli* (Yin et al., 2006).

1. Modèle de la structure de EmrD : EmrD s'organise autour de 12 hélices α transmembranaires. Une vue de la face cytosolique du transporteur met en évidence une symétrie quasi parfaite entre les domaines N et C terminaux.

2. Mécanisme très probable pour le transport de drogues hydrophobes par EmrD. A. Sous sa première conformation, EmrD expose sa cavité interne à la face cytosolique permettant à la drogue en provenance du cytosol ou du feuillet interne de la bicouche constituant la membrane interne, d'y accéder. B. La drogue reconnue au niveau de la poche hydrophobe située au sein de la cavité interne induit, de par sa liaison, un changement de conformation. Cette transition conformationnelle conduit le transporteur à exposer sa cavité contenant la drogue du côté du périplasm pour libérer la drogue (C).

b. Famille MATE

Les transporteurs de la famille MATE (« multidrug and toxic compound extrusion ») ont une topologie membranaire analogue à celle des pompes MFS (12 à 14 domaines transmembranaires), mais l'énergie nécessaire provient d'un système antiport Na^+ (Kuroda & Tsuchiya, 2009) (Figure 56).

Au sein de cette famille NorM de *Vibrio parahaemolyticus* est le premier transporteur à avoir été identifié. Il s'agissait aussi du premier transporteur multidrogue couplé au sodium à avoir été rapporté dans le monde biologique. Classifié de manière erronée au sein de la famille MFS, ce n'est que bien plus tard que Brown *et al.* ont suggéré que NorM appartenait à une nouvelle famille appelée MATE. Cet antiport Na^+ qui confère la résistance à la norfloxacine, au bromure d'éthidium et à certains aminoglycosides, possède 12 régions transmembranaires.

c. Famille SMR

Les protéines de la famille SMR (« small multidrug resistance ») sont les plus petites protéines d'efflux connues avec seulement 4 domaines transmembranaires (Figure 57). Ces protéines, dépendant de la force proton motrice, interviennent notamment dans l'efflux des ammoniums quaternaires présents dans les antiseptiques et les désinfectants.

A l'heure actuelle, 3 sous-classes de SMR ont été décrites : la sous famille SMP (« small multidrug protein ») comprenant la plupart des protéines impliquées dans la multirésistance aux drogues, les protéines de la sous-classe SUG (« suppressor of GroEL proteins »), dont l'accumulation supprime les effets de mutations dans *groEL* (Bay *et al.*, 2008). GroEL est une protéine chaperon qui aide au repli correct des protéines, repli essentiel à leur activité. Ainsi chez *K. pneumoniae*, GroEL assiste au repli de nitrogénases telles que la protéine MoFe intervenant dans la réduction du diazote par la bactérie (Greener *et al.*, 1993). Une mutation dans *groEL* a des effets sur l'accumulation de la nitrogénase sous sa forme native, mais également sur le niveau de synthèse des monomères constituant la nitrogénase via une interaction entre GroEL et l'activateur transcriptionnel NifA. Un autre phénotype associé à des mutations dans *groEL* est la non-lyse de cellules infectées par le phage T4. SugE est capable de supprimer ces effets chez *K. pneumoniae*. Par la suite, il a été démontré que SugE chez *E. coli* participait à la résistance aux drogues en transportant notamment des ammoniums quaternaires (Chung & Saier, 2002). Enfin, la sous-classe PSMR (« paired smr proteins ») comprenant des SMR qui fonctionnent par paires pour conférer la résistance à certains composés antimicrobiens. Appartenant à la première sous-classe, la pompe QacC/D de *S. aureus* fut l'une des premières SMR à être identifiée. La pompe EmrE présente chez *E. coli* et cristallisée a été largement étudiée. Des mutagénèses dirigées ont permis de montrer qu'un résidu glutamate en position 14 au sein du premier domaine transmembranaire est essentiel dans le transport des drogues. Ce résidu glutamate est impliqué dans la liaison directe du substrat et du proton : il s'agit du site primaire actif de la protéine. Outre ce résidu, d'autres acides aminés conservés formant la poche hydrophobe participent de la liaison du substrat même s'ils ne le fixent pas directement.

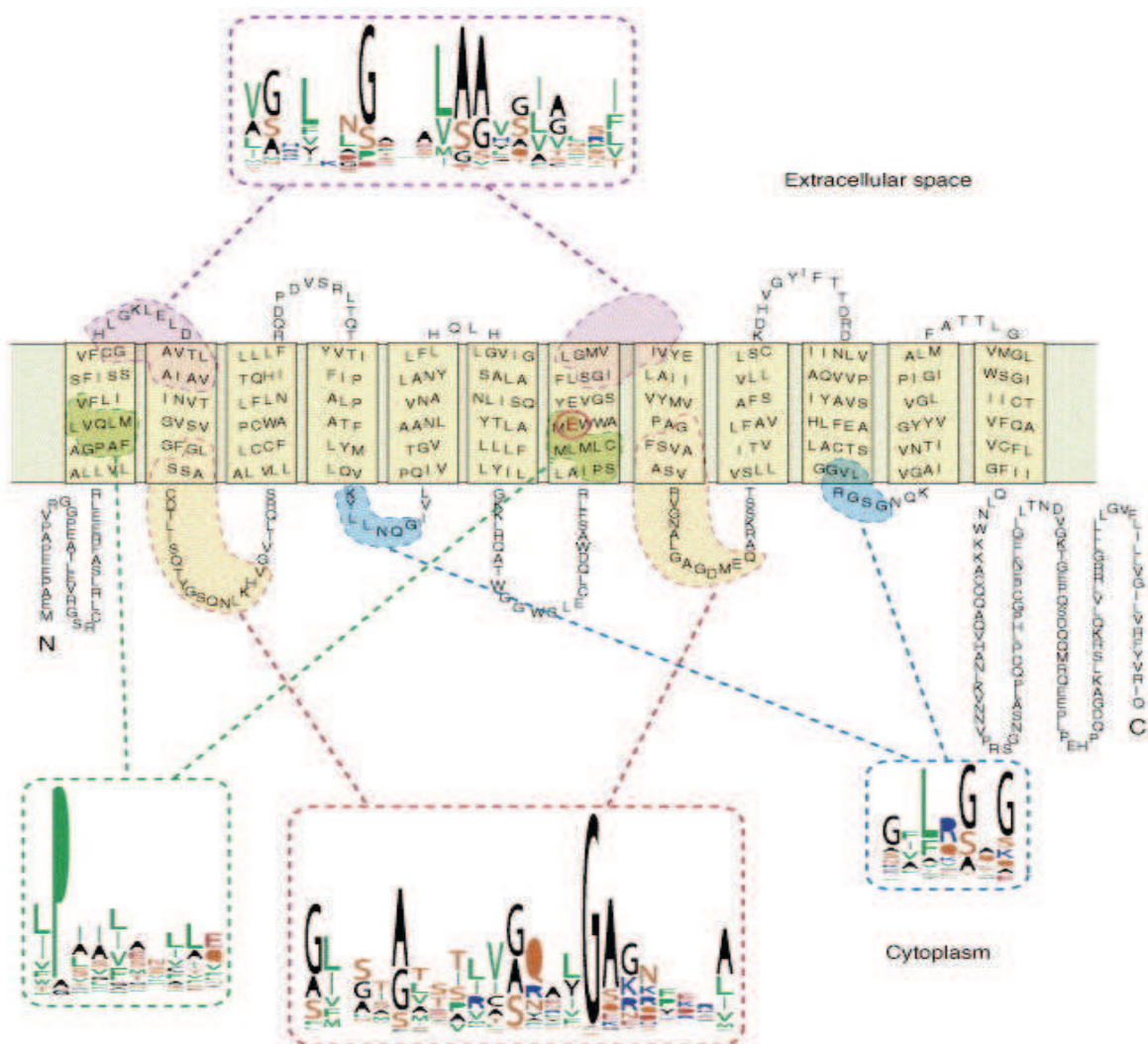


Figure 56. La structure secondaire typique des transporteurs de type MATE (Omote *et al.*, 2006).

Ici est représentée la structure de la protéine MATE 1 humaine contenant 12 domaines transmembranaires. Les régions qui sont conservées sont encadrées par des pointillés et colorées. Les séquences conservées se trouvent dans les domaines transmembranaires (indiquées en vert dans les domaines transmembranaires 1 et 7) ; au sein des boucles extracellulaires reliant les domaines transmembranaires (en violet entre les domaines transmembranaires 1 et 2 ainsi qu'entre les domaines 7 et 8) et au sein des boucles cytosoliques reliant les domaines transmembranaires (indiquées en orange entre les domaines transmembranaires 2 et 3 et entre les domaines transmembranaires 8 et 9 ou en bleu entre les domaines transmembranaires 4 et 5 et entre les domaines 10 et 11). La taille de chaque acide aminé indique le degré de conservation du résidu.

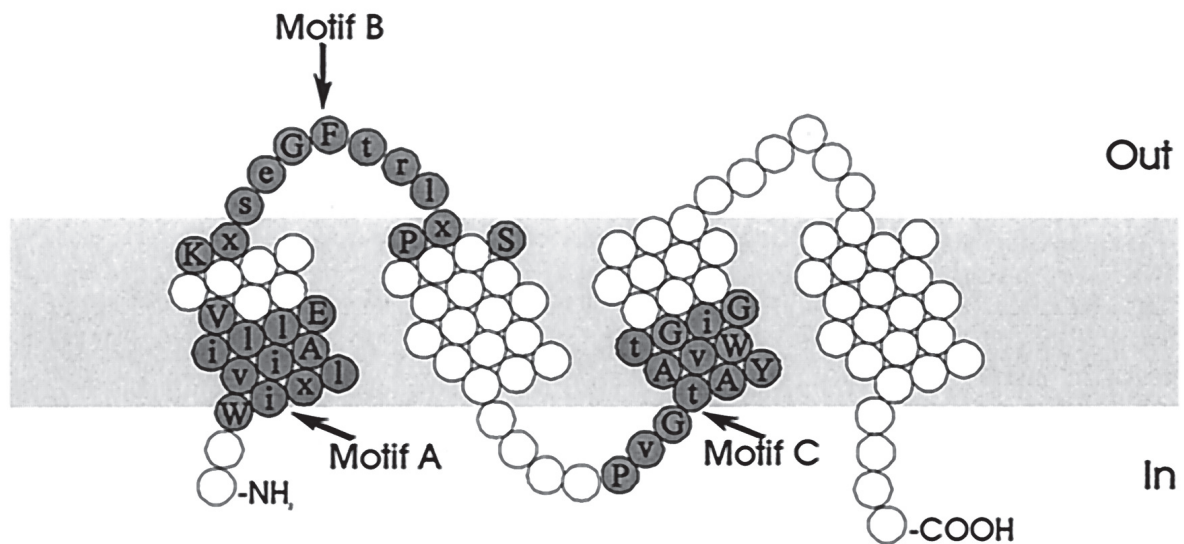


Figure 57. Structure générale des transporteurs de la famille SMR (Putman et al., 2000).

Motifs : A : WixlviAilLEV ; B : KxseGFtrlxPS ; C : PvGtAYAvWtGIG. x représente un acide aminé quelconque et les lettres représentant les acides aminés sont en majuscule (lorsque l'acide aminé est présent dans plus de 70% des séquences) ou en minuscule (lorsque l'acide aminé est présent dans plus de 40% des séquences).

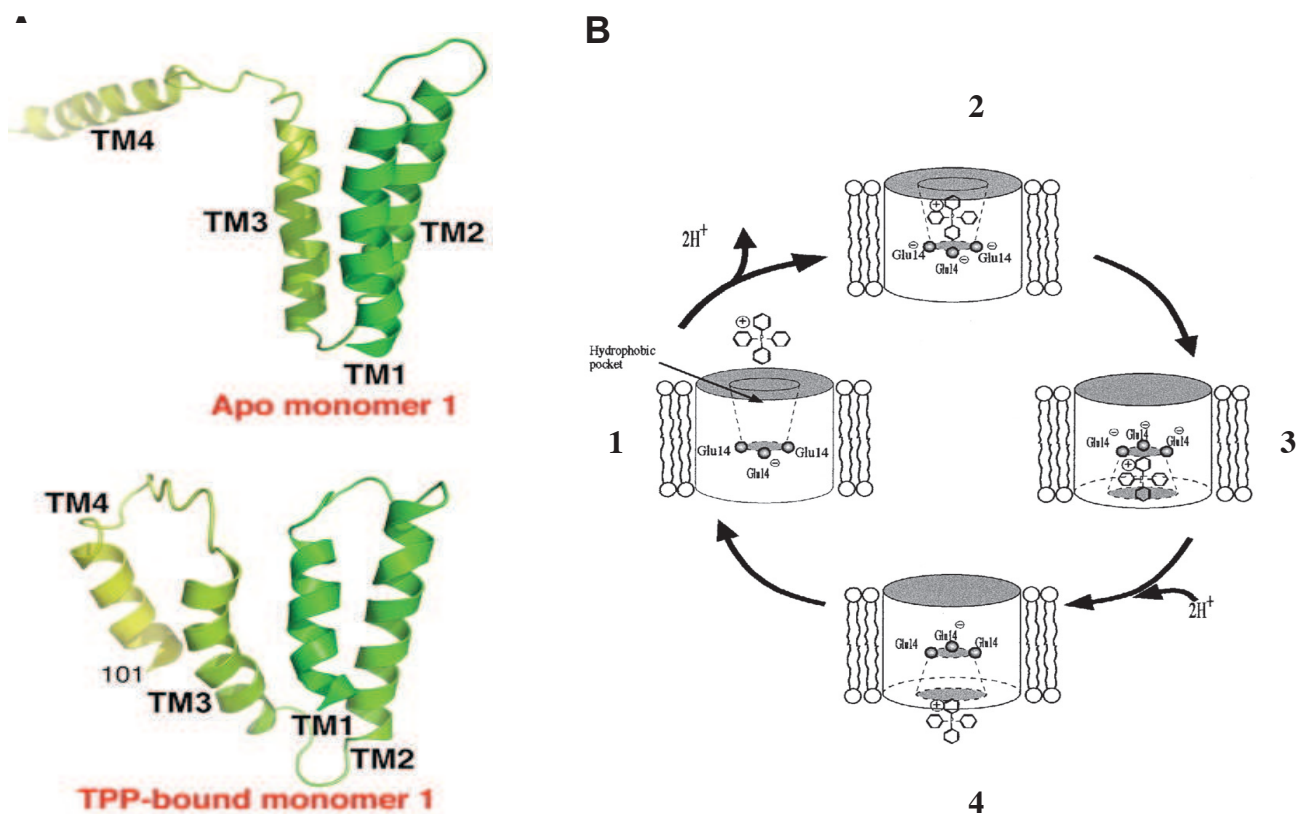


Figure 58. Structure et mécanisme de fonctionnement de EmrE.

A. Structure de EmrE dans sa forme liée ou non au TPP (Chen *et al.*, 2007).

B. Mécanisme de fonctionnement de EmrE (Muth & Schuldiner, 2000). Ce modèle présente un cycle catalytique assez schématique. 1. EmrE présente une poche de liaison hydrophobe composée de résidus clés dans l'interaction (Glu14). L'arrivée du substrat chargé au niveau de cette poche entraîne une libération de deux protons au niveau du triplet glutamate de la poche de liaison. 2. Le substrat peut alors se lier via des interactions électrostatiques avec les groupes carboxyles chargés négativement des groupes glutamate. 3. S'ensuit alors un changement de conformation (peu connu) permettant l'exposition de la poche de liaison à la face opposée de la membrane. 4. Le mouvement de deux protons vers la poche de liaison permet le retour à l'état d'origine et la libération de la drogue.

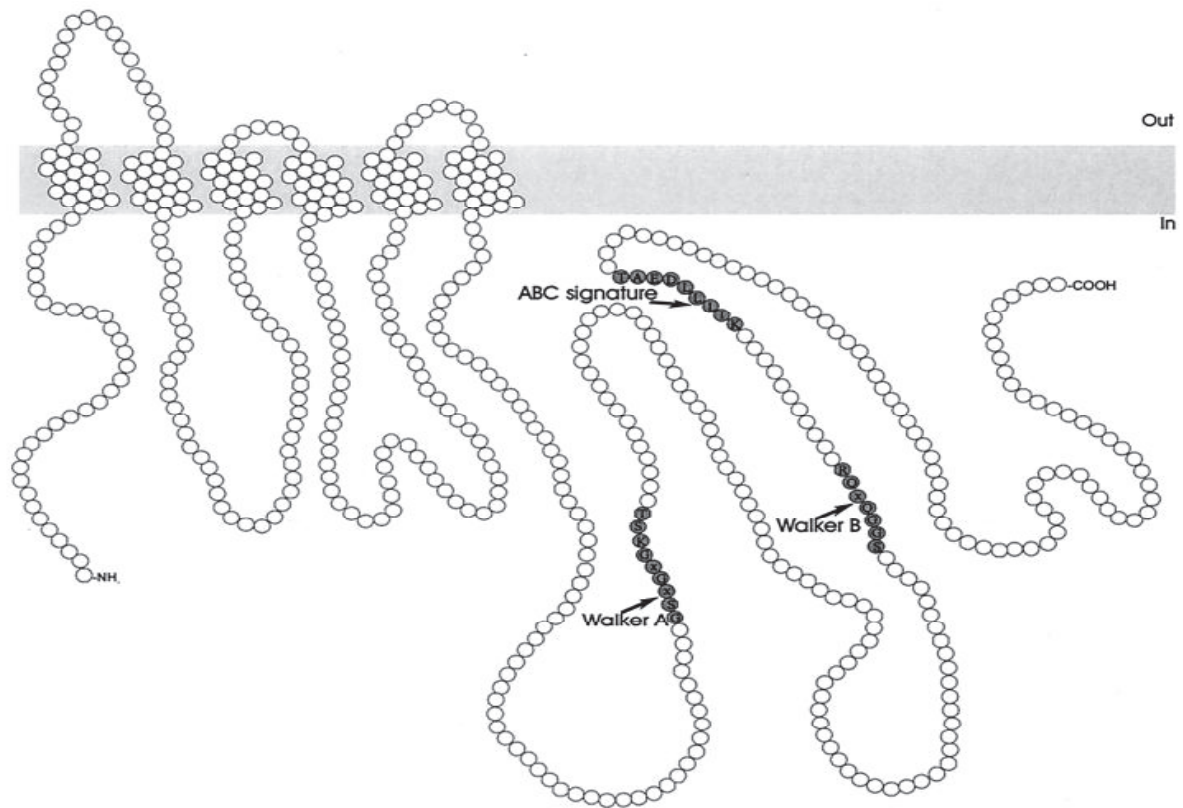


Figure 59. Structure des transporteurs de la superfamille ABC (Putman *et al.*, 2000).

Ici structure de LmrA de *Lactococcus lactis* avec 6 hélices transmembranaires et le domaine NBD contenant les motifs Walker A et B et la séquence signature ABC.

ABC signature : LSGGQ ; **Walker A** : GXXGXGKS/T ou X = acide aminé quelconque; **Walker B** : $\phi\phi\phi\phi D$ où ϕ résidus hydrophobe.

Muth *et al.* ont proposé un modèle de transport des drogues par EmrE basé sur les données disponibles (Figure 58) (Muth & Schuldiner, 2000). Dans ce modèle (qui suppose EmrE sous forme de trimère) la drogue pénètre tout d'abord dans la poche hydrophobe qui est exposée à la face cytosolique. Au sein de cette poche le résidu glutamate du site primaire perd un proton et à la place se fixe la drogue chargée positivement. Un changement conformationnel induit suite à cette fixation permet la fermeture de la poche enfermant la drogue pour permettre son exposition sur la face périplasmique. Des protons du périplasma peuvent alors librement atteindre la poche de liaison où se trouve la drogue causant la « reprotonation » du résidu glutamate et la libération de la drogue dans le périplasma.

d. Famille ABC

Contrairement aux transporteurs précédents, les pompes de la famille ABC (« ATP-Binding Cassette ») utilisent l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP (Figure 59). La structure des transporteurs ABC comprend un domaine transmembranaire et un domaine de liaison au nucléotide ou domaine NBD (« nucleotid binding domain »). Le domaine transmembranaire de la plupart des transporteurs se compose de 12 hélices α (6 hélices par monomère). Le domaine NBD se compose de deux sous-domaines : le domaine catalytique et le sous-domaine en hélices α qui est unique aux transporteurs de la famille ABC. Le domaine catalytique comprend deux feuillets β et 6 hélices α où sont localisés les motifs caractéristiques Walker A (GXXGKGKS/T ou X = acide aminé quelconque) et Walker B ($\phi\phi\phi\phi$ D où ϕ résidu hydrophobe). Le domaine en hélices se compose de 3 ou 4 hélices et du motif signature ABC aussi connu sous le nom de motif LSGGQ.

Chez les bactéries, il existe deux types de transporteurs ABC :

- les transporteurs ABC de type procaryote (« prokaryotic-type ») qui permettent l'import de molécules. C'est le cas du transporteur BtuCD permettant l'import de la vitamine B12 chez *E. coli*. Dans ce cas une protéine liant le substrat (ou « substrate binding protein » SBP) périplasmique chez les bactéries à Gram négatif (BtuF pour le système BtuCD) ou extracellulaire chez les bactéries à gram positif est chargé d'amener le substrat au transporteur (Davidson & Chen, 2004) (Moussatova *et al.*, 2008) (Langton *et al.*, 2005).

- les transporteurs ABC de la seconde classe (« eukaryotic-type ») ont de fortes similarité avec des transporteurs eucaryotes et participent à l'efflux. Ainsi les transporteurs LmrA, MsbA et Sav1866 présents respectivement chez les bactéries *Lactococcus*, *E. coli* et *Staphylococcus* partagent de remarquables identités de structure avec la P-glycoprotéine humaine (P-gp) qui participe à l'efflux de drogues anticancéreuses chez l'Homme (Choudhuri & Klaassen, 2006).

Dans certains cas un domaine régulateur peut être présent comme c'est le cas dans le domaine NBD de MalK. L'étude de structures cristallisées de ces protéines a permis d'émettre un modèle dit de cycle catalytique (« nucleotid catalytic cycle ») où la liaison de l'ATP puis son hydrolyse au sein du domaine NBD serait à l'origine de changements conformationnels des domaines transmembranaires (Figure 60). Le mécanisme de couplage entre ces deux phénomènes semble cependant peu connu.

L'obtention de structures cristallisées du transporteur MsbA (Figure 60.B) a permis d'établir un mécanisme de transport en trois étapes : la pompe, non liée au substrat expose sa poche de liaison au niveau du cytosol. La liaison du substrat à cette poche entraînerait une rotation des domaines NBD avec la formation du dimère NBD capable de lier l'ATP (étape 1). La drogue qui gagne le feuillet externe de la bicouche lipidique (étape 2) est enfin libérée suite à l'hydrolyse de l'ATP (étape 3).

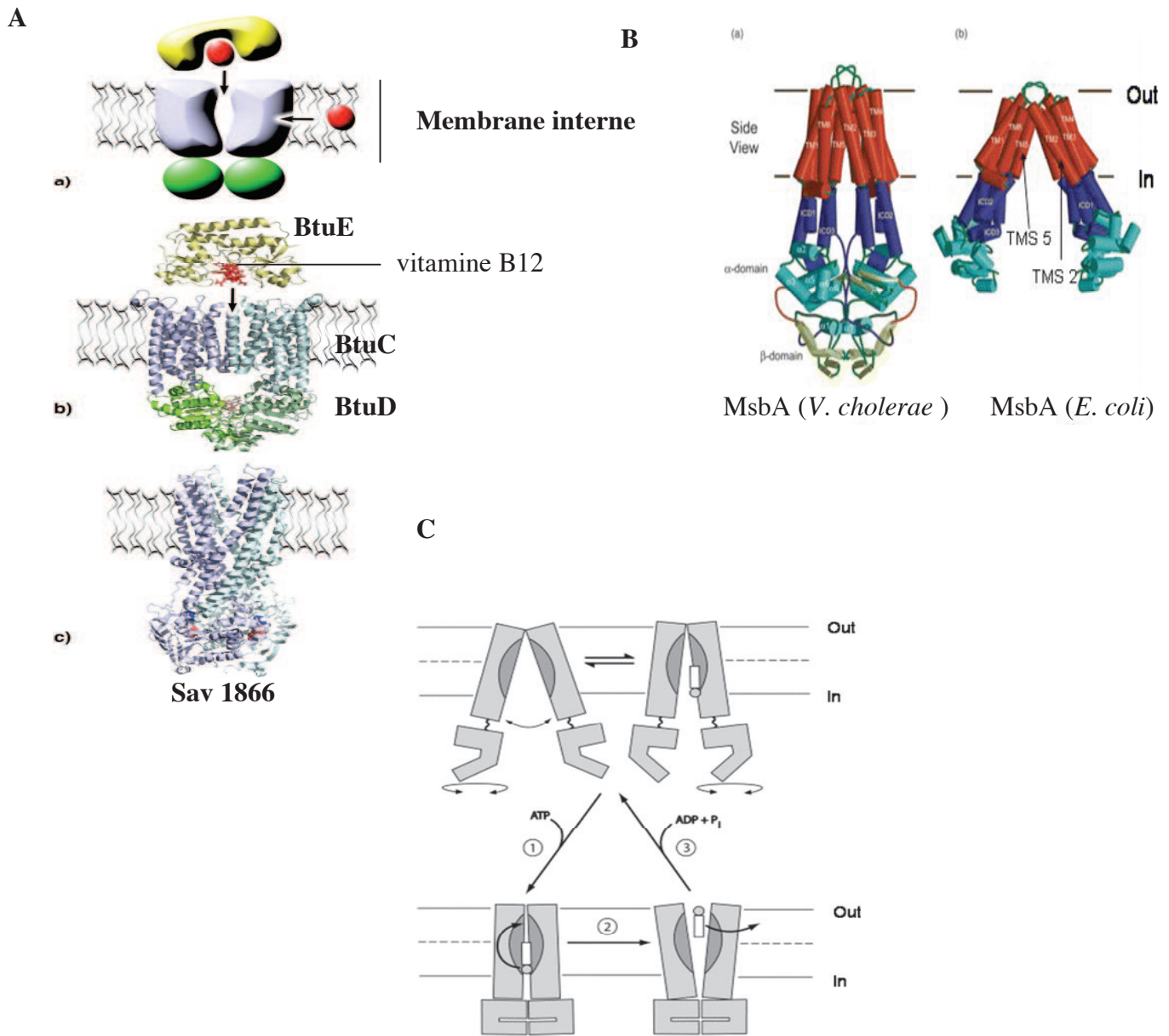


Figure 60. Structure et mécanisme de transport des pompes de la famille ABC.

A. Architecture générale des transporteurs ABC (Moussatova *et al.*, 2008). a) Les transporteurs de la famille ABC comprennent deux domaines transmembranaires (bleu) et deux domaines de liaison au nucléotide (NBD pour « nucleotid binding domain » en rouge). Le substrat arrive au transporteur soit à partir de la membrane soit en provenance du périplasm. Dans le second cas, des protéines lient le substrat (jaune) et le délivrent au transporteur. b) Structure du transporteur BtuCD chez *E. coli*. Ce transporteur de la famille ABC est composé de 4 chaînes polypeptidiques et permet l'import de la vitamine B12 qui lui est acheminée par la protéine de liaison périplasmique BtuE. c) Structure de Sav1866. Cette protéine, composée de 2 chaînes polypeptidiques est impliquée dans l'efflux de drogues. Elle capture la drogue au niveau de la bicouche lipidique. Les transporteurs BtuCD et Sav1866 représentent 2 types d'organisation retrouvées chez la plupart des transporteurs de la famille ABC.

B. La comparaison de la structure de MsbA de *V. cholerae* (a) et de MsbA de *E. coli* (b) (Langton *et al.*, 2005). La comparaison de la structure de ces 2 transporteurs impliqués dans l'efflux de drogues met en évidence deux conformations différentes adoptées par le transporteur à l'origine du modèle de transport proposé dans la figure C.

C. Mécanisme de transport de la pompe MsbA de *V. cholerae* (Langton *et al.*, 2005). Sous sa conformation non liée au substrat, la pompe MsbA expose sa poche de liaison au niveau de la face cytosolique. Suite à la liaison au substrat, il y a rotation des domaines NBD ce qui permet la formation du dimère NBD qui lie le nucléotide (ATP) ①. La drogue passe ensuite au niveau du feuillet externe de la bicouche lipidique ②. L'hydrolyse de l'ATP permet alors un changement de conformation du dimère NBD qui permet la libération de la drogue ③.

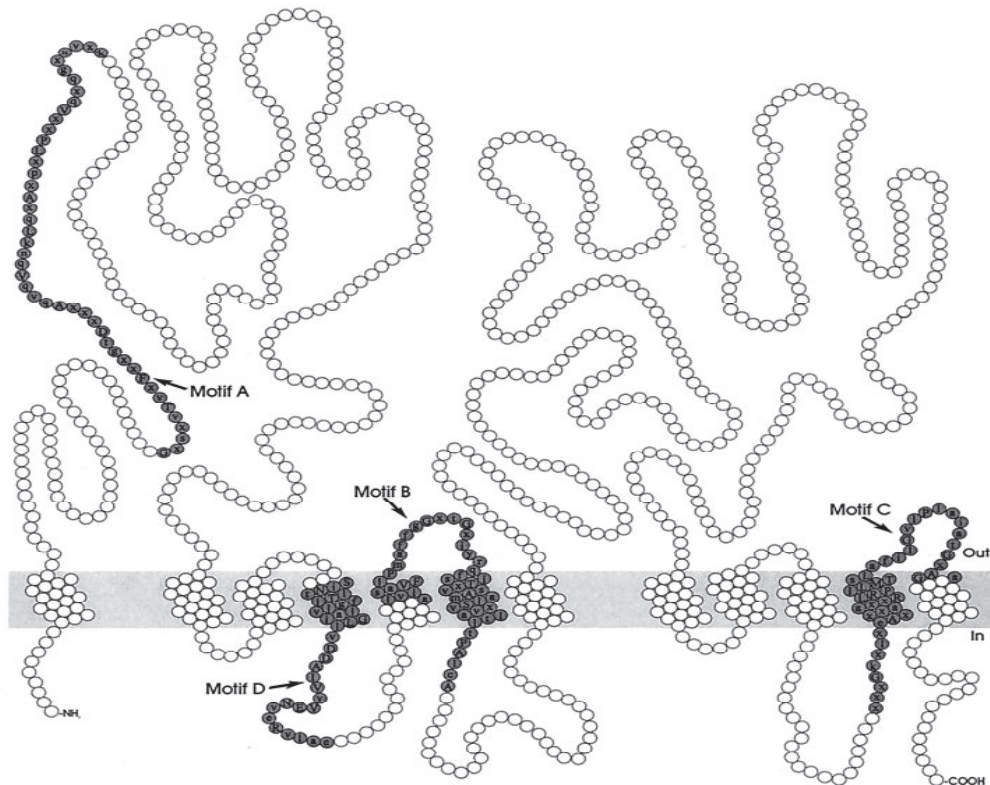


Figure 61. Structure des transporteurs de la famille RND (Putman *et al.*, 2000).

Motifs :

A : GxsxvTvxFxxgtDxxxAqvqVqnkLqxApxLPxxVqxqgxxvzk;

B : alvlsaVFIPmaffgGxtGxiyrqfsiTxvsAmalSvxvaltltpAlcA;

C : xxxGkxlxeAxxxaaxxRLRPILMTsLafilGvIPlaiatGxAGA

D : SiNtlTlfglvlaiGLlvDDAIVvVENveRvlae

x représente un acide aminé quelconque et les lettres représentant les acides aminés sont en majuscule (lorsque l'acide aminé est présent dans plus de 70% des séquences) ou en minuscule (lorsque l'acide aminé est présent dans plus de 40% des séquences).

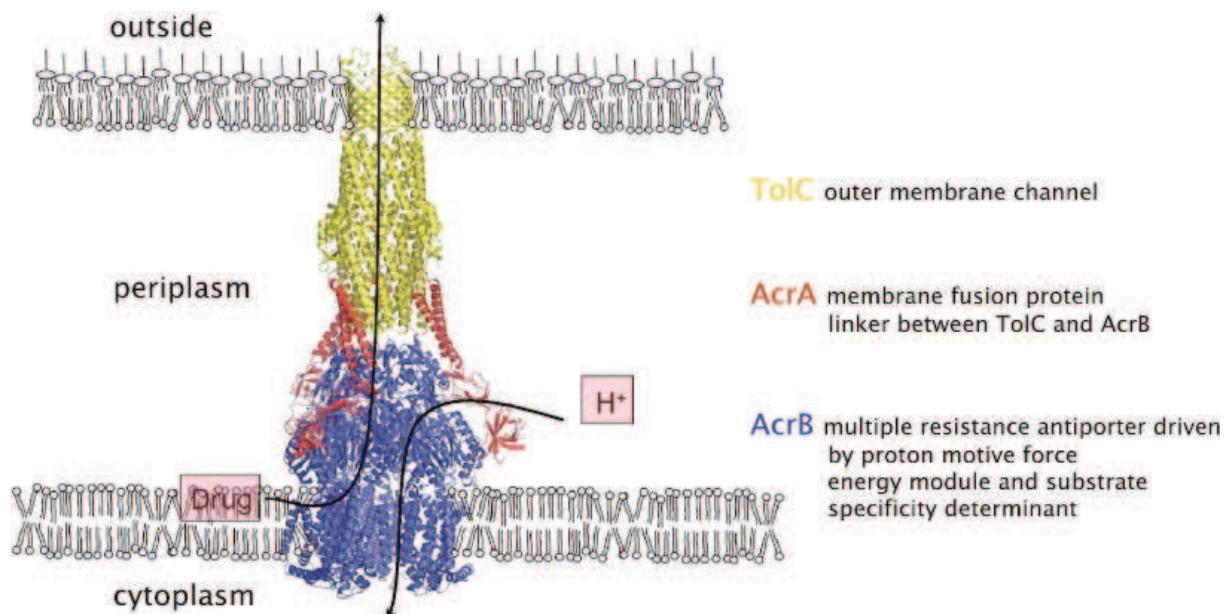


Figure 62. Représentation schématique de la pompe tripartite AcrA/AcrB/TolC de *E. coli* (Pos, 2009). Résultant des études structurales (cristallisation) et des études d'interaction protéine/protéine, ce modèle présente l'assemblage de la pompe AcrA/B-TolC qui comprend la protéine AcrB (RND) ancrée à la membrane interne (en bleu), la protéine périplasmique AcrA (MFP, en rouge) et la protéine de membrane externe TolC (OMF, en jaune). La drogue, capturée au niveau du feuillet externe de la membrane cytosolique, est reconnue au niveau de AcrB puis emprunte le conduit formé par AcrA au niveau périplasmique avant d'atteindre le canal TolC au niveau de la membrane externe. L'énergie est fournie par la force proton motrice grâce à AcrB qui effectue la transduction d'énergie.

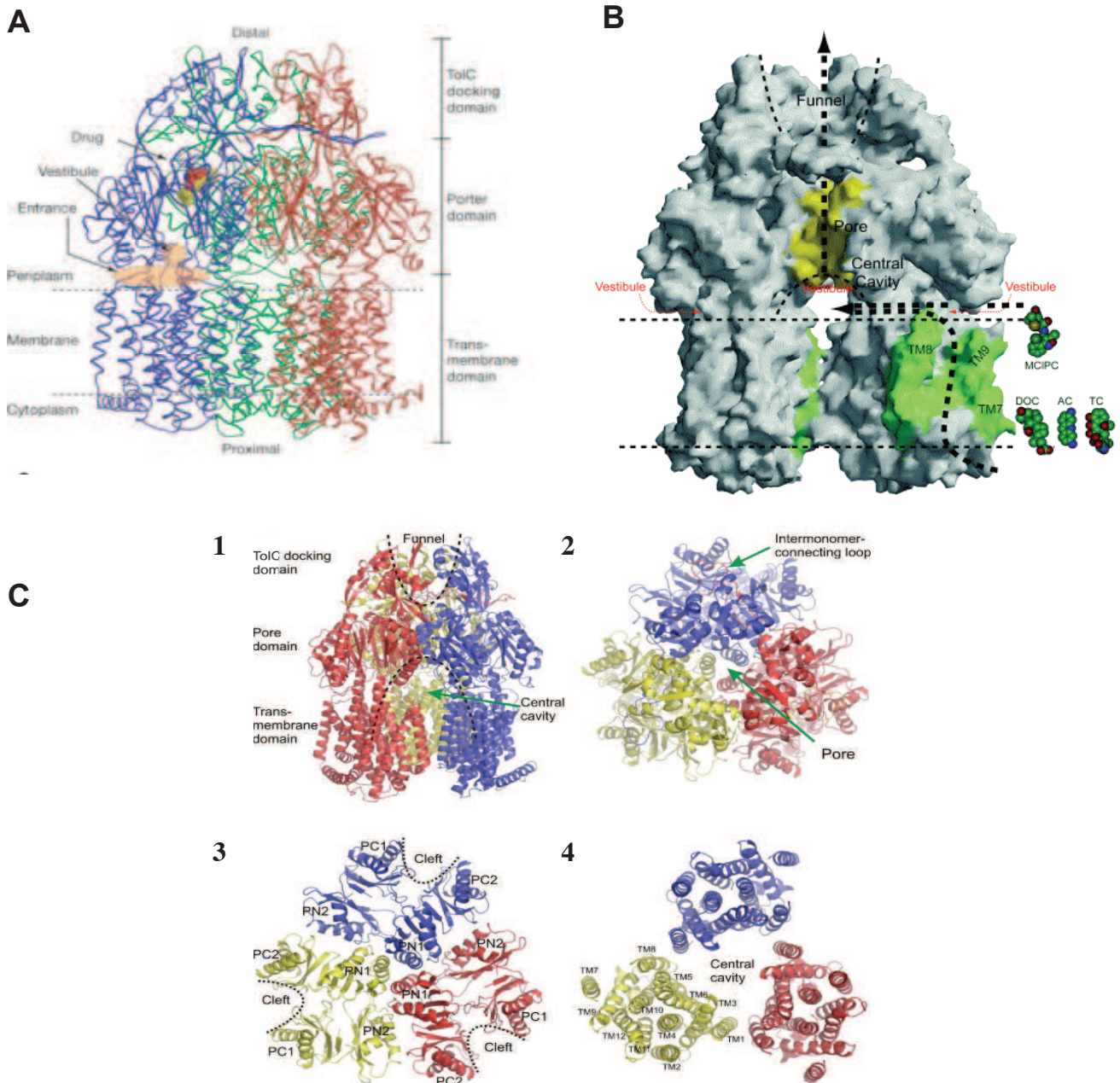


Figure 63. Structure de AcrB.

A. Structure de AcrB lié à la minocycline (Murakami *et al.*, 2006). AcrB présente 3 domaines principaux : un domaine transmembranaire (« transmembrane domain »), un domaine porteur (« porter domain ») permettant l'accès de la drogue à la cavité centrale via un vestibule et le domaine d'ancrage à TolC (« TolC docking domain »). Les domaines porteur et d'ancrage à TolC se projettent dans le périplasm. Le canal qui parcourt le domaine d'ancrage à TolC conduit à un pore étroit dans le domaine porteur qui débouche au niveau de la cavité centrale.

B. Structure de AcrB en 3 dimensions obtenue avec le logiciel GRASP et présentant la voie empruntée par certaines drogues (Murakami & Yamaguchi, 2003). DOC : Déoxycholate, AC : acriflavine, TC : tetracycline, MIPIC : cloxacilline. Les drogues pénètrent au sein d'un vestibule qui débouche sur la cavité centrale qui conduit au pore central communiquant avec TolC.

C. Structure de AcrB détaillée (Pos, 2009) :

1- Structure générale de la forme trimérique de AcrB. **2- Vue par-dessus du domaine périplasmique.** Les monomères sont liés entre eux par des boucles et entourent le pore central permettant le passage de la drogue. **3- Vue par-dessus du domaine porteur avec les sous-domaines PN1, PN2, PC1 et PC2.** Les poches latérales (« cleft ») entre les sous-domaines PC1 et PC2 sont supposées héberger AcrA. Le pore central est formé par trois hélices α , données par les sous-domaines PN1 de chaque monomère AcrB. **4- Vue par-dessus du domaine transmembranaire.** Les domaines transmembranaires 4 (TM4) et 10 (TM10) sont entourées par 10 autres hélices transmembranaires. Les hélices transmembranaires de chaque monomère délimitent une large cavité centrale.

e. Famille RND

Enfin, les protéines de la famille RND (« résistance nodulation cell division »), les plus représentées, fonctionnent grâce à la force proton motrice et possèdent une topologie caractéristique reposant sur une organisation en 12 domaines transmembranaires et la présence de 2 larges boucles extracytoplasmiques dont l'homologie suggère une duplication génique ancestrale (Figure 61). C'est le cas par exemple, chez *E. coli* où le complexe AcrA/AcrB/TolC composé de la protéine AcrB de type RND, de la protéine périplasmique AcrA (MFP) et de la protéine de la membrane externe TolC (OMF) forme un canal capable d'effluer un ensemble de substrats aussi variés que les antibiotiques (β -lactames, macrolides, chloramphénicol et fluoroquinolones), des solvants organiques, des acides gras, le bromure d'éthidium et des détergents (SDS).

2.1.4.2. La pompe AcrA/AcrB/TolC : l'archétype des systèmes d'efflux

La pompe AcrA/AcrB/TolC est l'archétype des pompes d'efflux (Figure 62). Découverte chez *E. coli*, elle se compose de trois protéines : une protéine de la membrane interne (IMP), AcrB fournissant l'énergie pour le transport, une protéine membranaire de fusion AcrA (MFP) qui assure l'assemblage et la stabilisation du complexe et une protéine localisée à la membrane externe, la protéine TolC qui forme un canal permettant l'efflux des drogues hors de la cellule.

Depuis sa découverte, d'importants progrès ont été faits concernant sa structure, son mécanisme de fonctionnement et les gènes codant les différentes protéines constituant cette pompe (Lomovskaya *et al.*, 2007).

2.1.4.3. Structure des trois composants de la pompe AcrA/AcrB/TolC

a. AcrB fournit l'énergie

Les multiples données de la cristallographie ont permis d'établir la structure de la protéine AcrB, mais également de proposer un mécanisme de fonctionnement pour l'efflux.

AcrB est une protéine membranaire (1049 acides aminés) qui s'associe en trimère au sein du système d'efflux AcrA/AcrB/TolC (Figure 63). L'ancrage de chaque monomère à la membrane interne est assuré par un domaine en hélices α composé de douze traversées membranaires. Le second domaine de la protéine est périplasmique : il se compose d'une région permettant l'ancrage de TolC (« TolC docking domain ») et d'une région comportant un pore central (domaine « porter »). La cavité accueillant la protéine TolC forme un entonnoir débouchant sur le pore central du domaine « porter ». Le domaine porter serait à l'origine de l'interaction avec la protéine périplasmique AcrA. Son pore central de très petit diamètre puisqu'il ne permet pas le passage de drogues à l'état normal est formé par trois hélices, chacune fournie par un des monomères de AcrB. Trois vestibules à l'interface du monomère localisé juste au-dessus du plan membranaire conduit vers la cavité centrale. Il semble en plus, que AcrB, d'après les données cristallographiques, capture non seulement la drogue au niveau du cytosol mais également au niveau du périplasma car un site a été identifié (Yu *et al.*, 2005) (Elkins & Nikaido, 2003). La structure asymétrique de AcrB a permis de mieux comprendre le fonctionnement de la pompe AcrA/AcrB/TolC et de proposer un mécanisme (Seeger *et al.*, 2006).

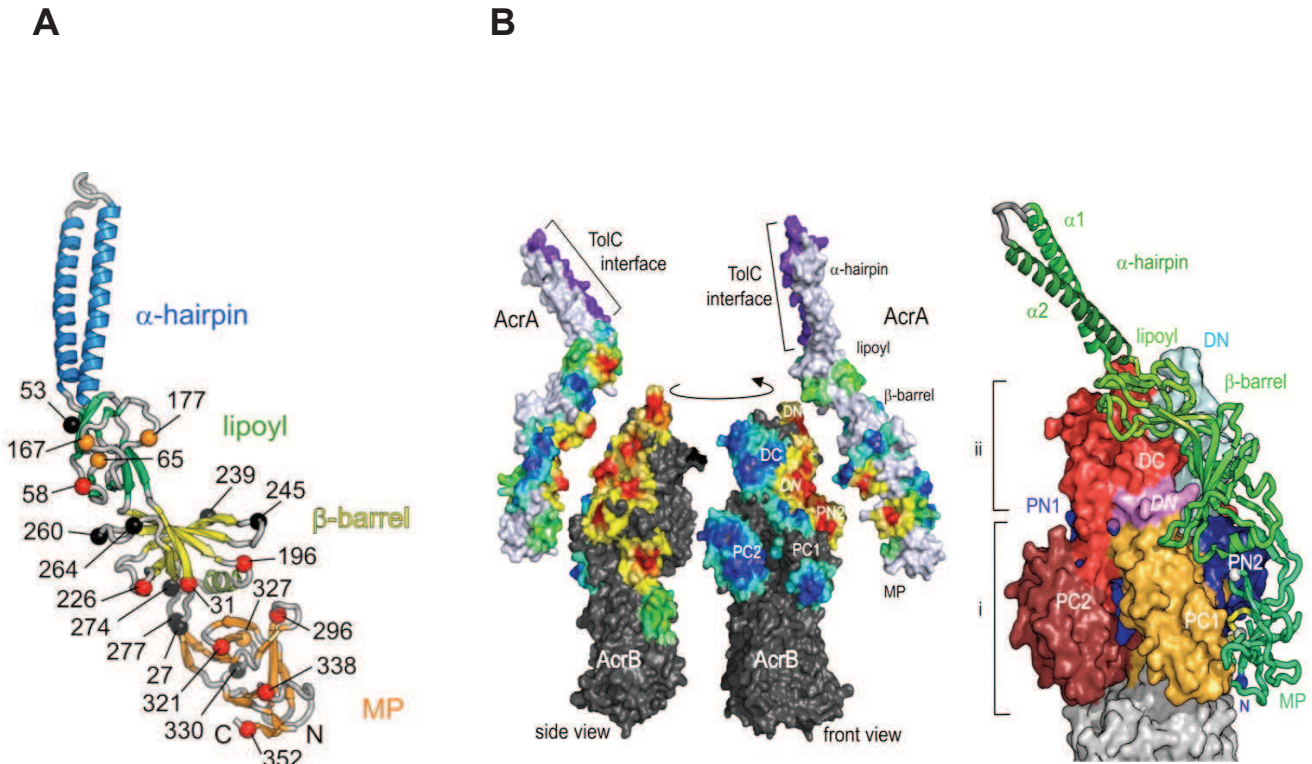


Figure 64. Structure de AcrA (Symmons *et al.*, 2009).

A. Structure de AcrA. La structure de AcrA révèle la présence de plusieurs domaines : un domaine en hélice α structuré en « épingle à cheveux » (« α -hairpin »), le domaine « lipoyl », un domaine en tonneau β et le domaine membranaire proximal (MP : « membrane proximal ») qui est lié au tonneau β par une région « linker » (« β -ribbon linker »).

B. Modélisation de l'interaction entre AcrA et AcrB. Cette modélisation permet de voir que l'interaction avec AcrB implique le domaine « lipoyl » et le domaine en tonneau β . Le domaine en hélice α est libre pour l'interaction avec TolC alors que le domaine membranaire proximal (MP) permettrait un ancrage à la membrane interne via l'interaction avec les phospholipides membranaires.

b. AcrA, la protéine de fusion

La structure de la protéine AcrA a été établie d'après les données de la cristallographie. Il s'agit d'une lipoprotéine à localisation périplasmique qui possède un point d'ancrage à la membrane interne via son extrémité N-terminale riche en acides gras (Figure 64). Cette protéine serait composée de trois domaines : un domaine en tonneau β composé de six feuillets β anti-parallèles et d'une hélice α courte, un domaine lipoyl central assemblé à partir de deux motifs lipoyl chacun composé de 4 feuillets β , séparés par un domaine en épingle à hélices α qui est un petit peu plus large dans AcrA que dans MexA. Les données biochimiques et génétiques disponibles montrent que le domaine en épingle hautement flexible interagit avec les hélices périplasmiques de la protéine de la membrane externe alors que le domaine en tonneau β interagit avec la protéine RND. Dans le cas de AcrA, Symmons *et al.* ont pu modéliser l'interaction entre AcrA et le domaine périplasmique de AcrB (Figure 64). Cette interaction mettait en jeu le domaine lipoyl et le domaine en tonneau β de AcrA. De ce fait, le domaine en épingle à cheveux (« α -hairpin ») serait libre pour interagir avec le canal périplasmique de TolC. AcrA s'avère ainsi essentiel d'un point de vue structural pour assurer et stabiliser la formation d'un canal continu entre AcrB et TolC au niveau périplasmique. A ce jour, 3 structures cristallisées de MFP sont disponibles : la protéine MexA de *Pseudomonas* (résidus 20-300) qui a été cristallisée indépendamment par Akama (Akama *et al.*, 2004) et Higgins (Higgins *et al.*, 2004) et la structure de AcrA (résidus 45-312). Bien que très similaires en apparence, la protéine MexA présente une plus petite épingle que AcrA. Dans les deux protéines, la partie C-terminale dont l'on pense qu'elle formerait un minidomaine n'était pas présente et c'est le seul élément structural de l'assemblage tripartite qui attend sa découverte. Cette région pourrait aussi être impliquée dans l'interaction avec AcrB. L'analyse de AcrA laisse penser à un rôle du domaine C-terminal et notamment des résidus 290-357 dans l'interaction avec AcrB.

c. TolC, une protéine de membrane externe

Il s'agit d'une protéine relativement conservée. D'un point de vue évolutif, on pense que TolC aurait pu résulter d'une duplication ancestrale étant donnée la superposition structurale parfaite des domaines N et C-terminaux. Il faudra attendre la cristallisation de la protéine pour comprendre que cette protéine homotrimérique formant un canal long de 140 angströms possède une architecture unique au sein des protéines de la membrane externe. La cristallographie aux rayons X à la résolution de 2.1 Å a ainsi révélé la présence de deux domaines (Figure 65) :

- un domaine ressemblant aux porines enchassé dans la membrane externe (domaine « porine-like ») (Wiener, 2000).

- un domaine périplasmique essentiellement composé par des hélices α . Au centre de ce canal, on trouve le domaine dit équatorial qui forme une ceinture composée à la fois d'hélices α et β . Le domaine « porine-like long » de 40 Å est structuré en un canal unique formé de 12 feuillets β antiparallèles, chaque monomère de TolC contribuant à 4 feuillets β . Contrairement à ce que l'on peut voir au sein des autres porines, les trois monomères constituant TolC ne forment pas trois canaux distincts mais participent à la formation d'un seul et même canal. De plus, ce canal, du moins pour la partie enchassée dans la membrane externe, est ouvert de façon constitutive et n'est pas obturé par un domaine « plug » (FhuA ou FepA) ou par la présence de boucles extracellulaires (OmpA) (Figure 66). Les petites boucles extracellulaires flexibles de TolC qui se projettent à l'extérieur de ce canal sont impliquées dans la fixation des colicines et des bactériophages.

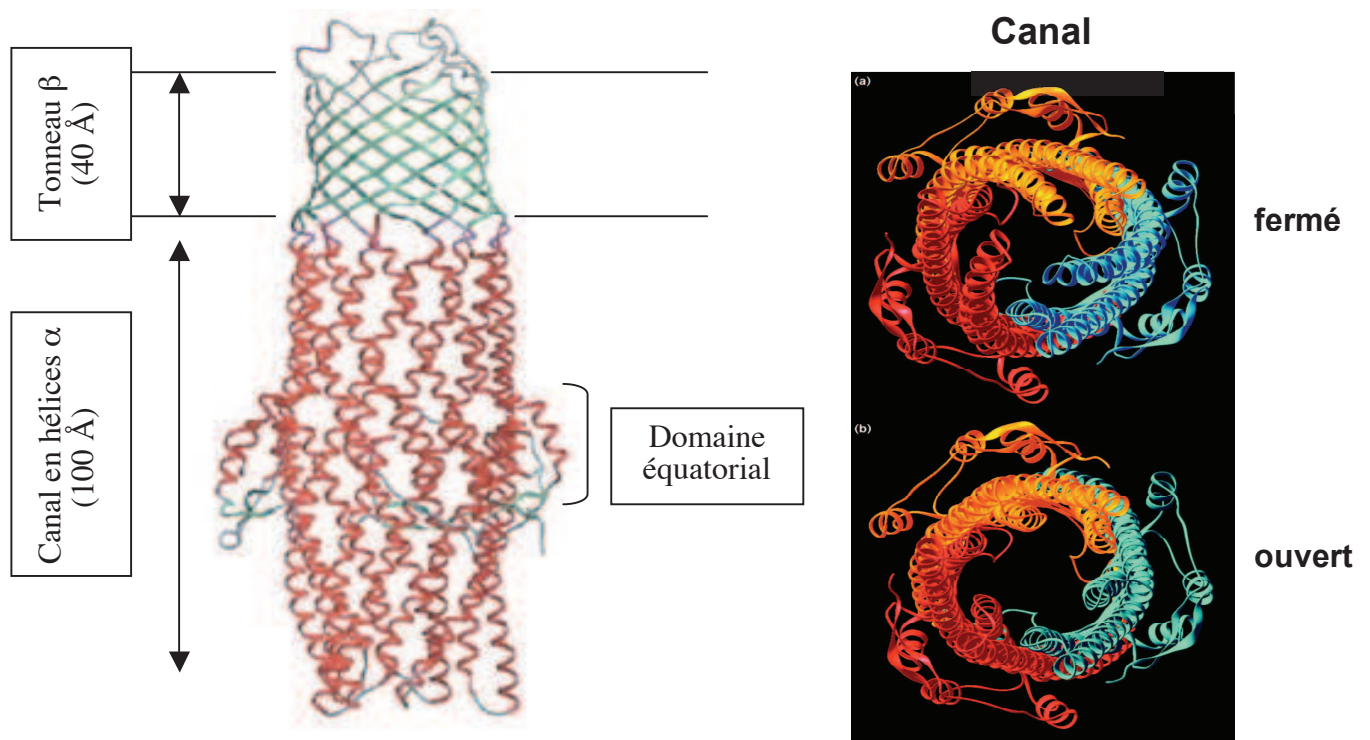


Figure 65. Structure de TolC.

A. TolC (Lomovskaya *et al.*, 2007). TolC comprend un tonneau en feuillet β formant un pore dans la membrane externe et un large canal périplasmique en hélices α (hélices α en rouge et feuillet β en vert).

B. Vue du côté périplasmique de l'entrée du canal (Wiener, 2000). Sont représentées les formes ouvertes et fermées du canal.

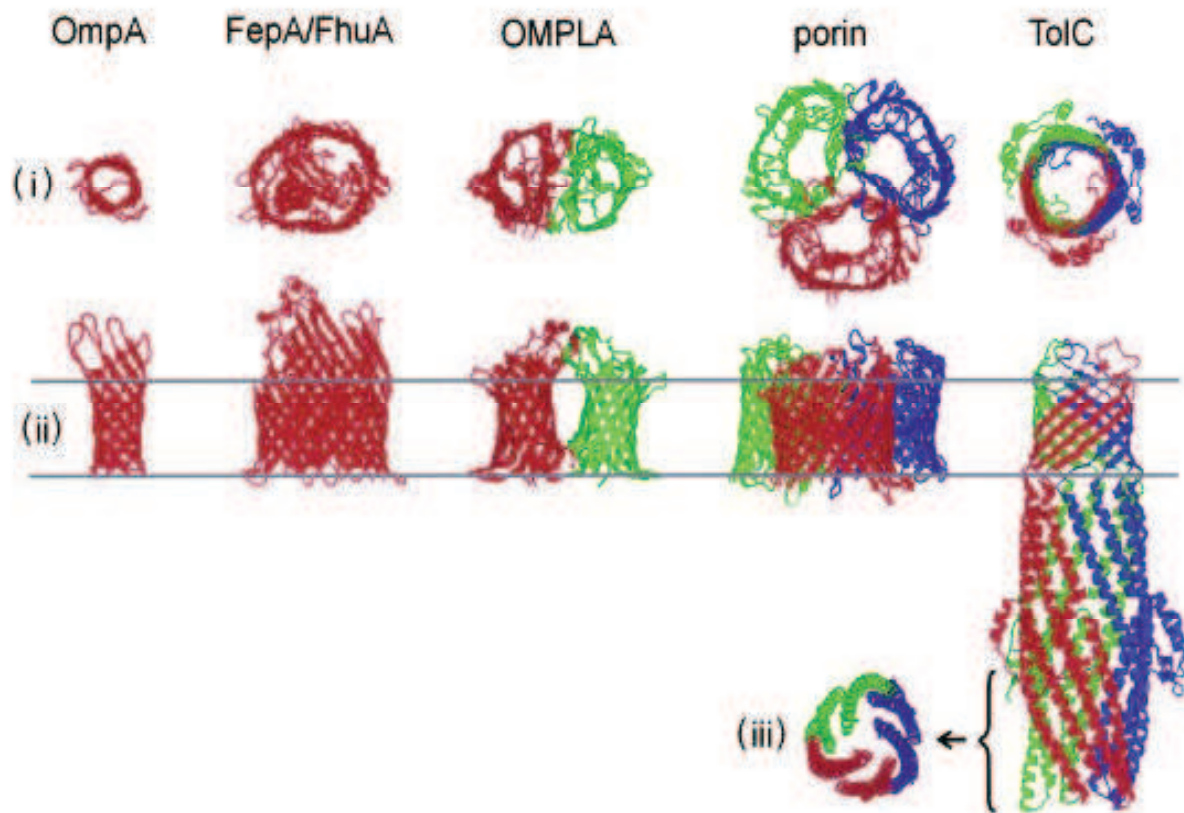


Figure 66. Les structures de protéines de membrane externe bactériennes (Andersen *et al.*, 2000).

(i) Vue par dessus des protéines de la membrane externe. TolC est un exemple particulier où un canal est formé par 3 sous-unités. (ii) Vue des protéines ancrées à la membrane externe. (iii) Vue de l'entrée du canal périplasmique : les 3 couleurs différentes (vert, bleu et rouge) distinguent chacun des monomères.

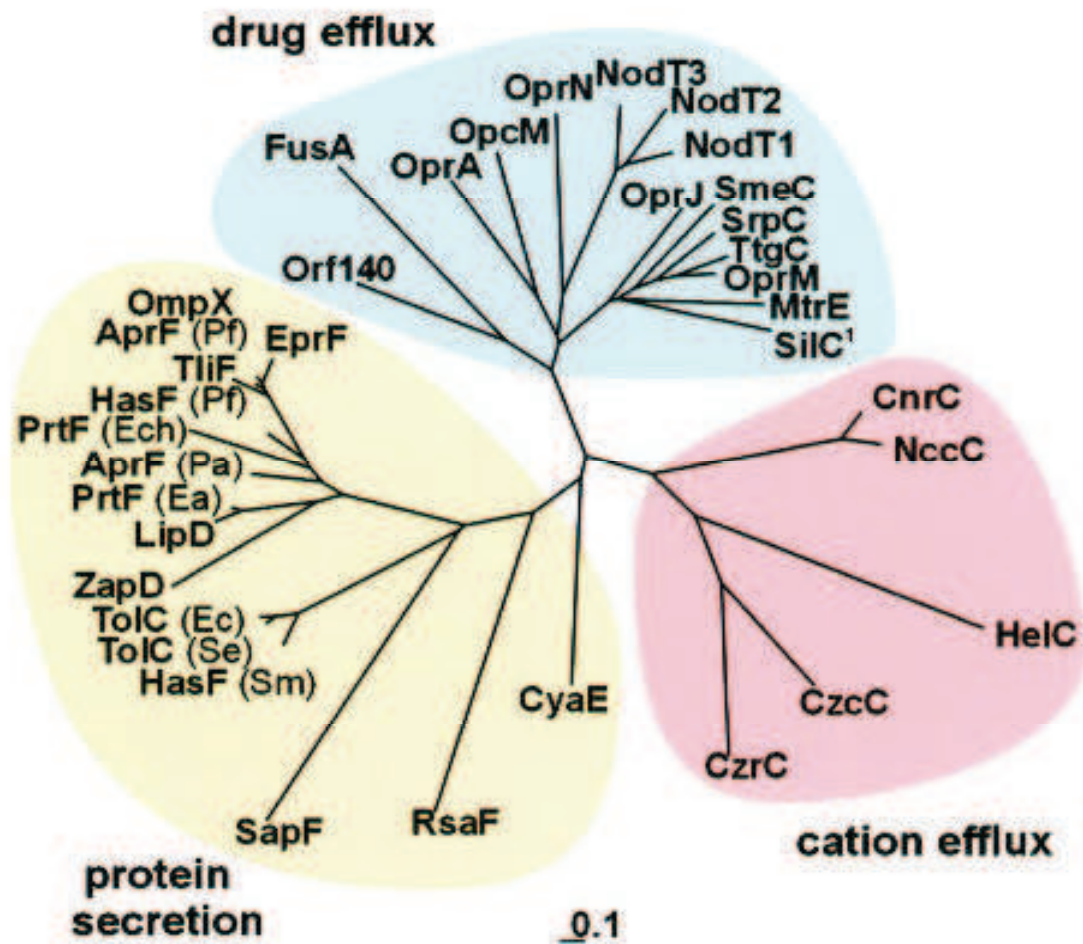


Figure 67. Arbre phylogénétique des protéines appartenant à la famille TolC (Andersen *et al.*, 2000).

Les 36 homologues de TolC bactériens dont la plupart ont été caractérisés fonctionnellement. *Abréviation* : **Ea** : *Erwinia Amylovora*, **Ec** : *E. coli*, **Ech** : *Erwinia chrysanthemi* ; **Se** : *Salmonella enteritidis*, **Sm** : *Serratia marescens*, **Pa** : *Pseudomonas aeruginosa* ; **Pf** : *Pseudomonas fluorescens*. ¹SilC serait une exception au sous-groupe car il est impliqué dans l'efflux de métaux. L'échelle 0,1 indique une différence résultant en la substitution de 0,1 nucléotide.

Mais, la plus grande différence de TolC avec les autres porines de la membrane externe résulte dans la présence d'un domaine périplasmique prolongeant le domaine porine. Ce domaine (140 Å) caractéristique est composé de 12 hélices α (4 hélices par monomère) se projetant dans le périplasma pour former un long canal. Deux types d'hélices forment cette partie périplasmique du canal : il y a de longues hélices atteignant les 100 Å, et des hélices plus petites (taille inférieure de moitié) qui se superposent entre elles au niveau de leurs extrémités. Entre les petites hélices, la chaîne polypeptidique se replie contribuant à la formation d'une sorte de ceinture ou bande autour du canal que l'on nomme domaine équatorial de par la position centrale qu'il occupe au niveau du canal. La base de ce canal périplasmique est obturée par des interactions entre des paires d'hélices (« coiled-coils ») ne laissant passer en temps normal que de petits ions. Mais lors d'un efflux, par exemple, ces interactions entre hélices vont se rompre pour permettre l'ouverture du canal à la base et donc le passage de la drogue à refouler hors de la cellule (Figure 65).

A l'origine, c'est l'isolement de mutants tolérants à la colicine et résistants à la lyse par les bactériophages qui a permis d'identifier le gène codant pour la protéine TolC. Par la suite on a découvert que la protéine TolC avait également d'autres rôles (Figure 67) intervenant notamment dans la résistance aux détergents, aux sels biliaires et aux solvants organiques et dans l'export de protéines comme les toxines et certaines enzymes intervenant lors de l'infection (Buchanan, 2001) (Andersen *et al.*, 2000).

2.1.4.4. Fonctionnement de la pompe AcrA/ AcrB/TolC

Tout commence avec la reconnaissance du substrat par AcrB. Les études se focalisant sur la structure de la protéine AcrB ont permis d'éclaircir le mécanisme permettant l'efflux des drogues via la pompe AcrA/AcrB/TolC. En effet, l'analyse de la structure de AcrB lié à des drogues comme la doxorubicine et la minocycline a révélé que, seul, un des monomères constituant la protéine fixait la drogue et que les autres avaient une conformation différente. Il a alors été suggéré que ces 3 conformations étaient successivement adoptées par chaque monomère de AcrB au cours d'un processus cyclique conduisant à libérer la drogue au sein de la partie périplasmique du canal formé par TolC. Ce modèle dit de « pompe péristaltique » et proposé par Murakami *et al.*, est dérivé du mécanisme rotationnel de la F1F0-ATPase (Murakami *et al.*, 2006) (Seeger *et al.*, 2006)

Au cours de ce processus, les monomères de AcrB adopteraient de façon cyclique une des trois conformations suivantes (Figure 68) :

1) Etat relâché (« loose » ; L) où le monomère lie la drogue mais avec une faible affinité. Ce site est fermé à TolC mais ouvert au périplasma apparemment prêt à accepter le substrat.

2) Cette liaison induirait ensuite un changement de conformation vers la forme liant la drogue avec une forte affinité (état « tight » ; T). Une poche hydrophobe est présente dans le monomère T mais pas dans les autres monomères. Cette poche serait une poche de liaison au substrat logé dans le domaine « porter ». Murakami *et al.*; ont montré la liaison de la minocycline, du 9-bromo-minocycline et de la doxorubicine à cette poche (Murakami *et al.*, 2006). Dans ce site, la poche de liaison à la drogue est plus petite et la chaîne de phénylalanine a été réalignée. De ce fait, la drogue ne peut pas y entrer ou y établir des interactions comme prédit pour un site de faible affinité (état L).

3) Etat ouvert (« open » ; O) où la drogue est relâchée et gagne le conduit périplasmique de TolC. Au sein de ce monomère le site « d'extrusion » est fermé au périplasma mais ouvert au domaine d'ancrage à TolC (« TolC docking domain ») suggérant un relâchement du substrat dans le canal de TolC pour sortir de la cellule.

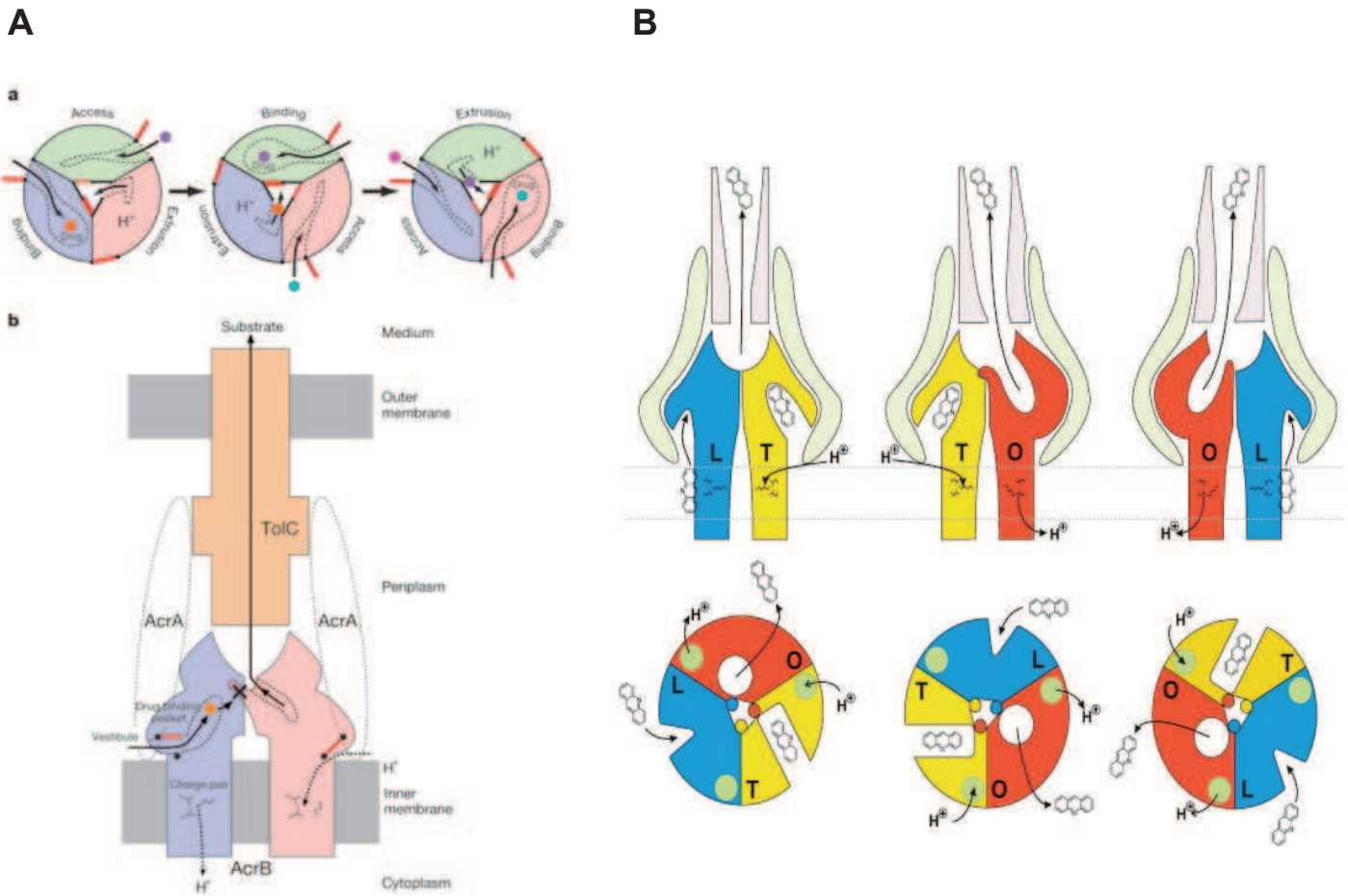


Figure 68. Mécanisme de fonctionnement de la pompe AcrA/AcrB/TolC.

A. Assemblage et fonctionnement de la pompe AcrA/B/TolC (Murakami et al., 2006).

Suivant le modèle établi actuellement, le fonctionnement de la pompe reposerait en grande partie sur la rotation de AcrB dont chaque monomère adopterait trois conformations différentes au cours du cycle catalytique. Lors de la première étape du cycle, un monomère lie le substrat au niveau de son domaine transmembranaire (état relâché ou « loose »). Un changement de conformation permet au substrat d'atteindre la poche de liaison hydrophobe (conversion à la conformation T ou « Tight »). La dernière transition conformationnelle, elle, permet de libérer la drogue dans le canal de AcrB afin de rejoindre TolC (conformation O ou « open »).

B. La transduction des changements conformationnels de AcrB vers TolC met en jeu AcrA (Pos, 2009).

Au sein de AcrB, les drogues empruntent des tunnels (flèches rouges) puis le canal de AcrB et enfin le canal de TolC pour rejoindre l'extérieur de la cellule. La transition de la forme T à O serait celle requérant la force proton motrice via la liaison d'un proton au niveau du domaine périplasmique de AcrB (zone dénommée « proton translocation site » dans la littérature et regroupant les acides aminés D407, D408 et K940). La libération du proton aurait lieu à la transition de la forme O à L. AcrA participerait à la transduction des changements conformationnels de AcrB vers TolC (flèches bleues) facilitant l'efflux de la drogue par le mouvement de TolC.

Pour la suite du processus, on pense que la liaison de la drogue à AcrB induirait une interaction avec la protéine périplasmique AcrA (Figure 69). AcrA aurait ensuite la faculté d'interagir via son domaine « lipoyl » avec les hélices composant le domaine périplasmique du canal TolC. Cette interaction aurait pour effet d'ouvrir le canal à sa base pour laisser passer le substrat qui sera finalement rejeté hors de la cellule. Actuellement, on pense que l'ouverture de l'entrée périplasmique du canal se ferait en deux étapes avec, dans un premier temps, une ouverture partielle via l'interaction entre AcrB et TolC, puis, dans un deuxième temps une ouverture totale du canal cette fois-ci médiée par AcrA.

Les questions restent néanmoins à éclaircir concernant le mode d'accès de la drogue à AcrB. L'observation des trois types de monomères a permis de lancer une réponse. En effet, 3 tunnels mènent à la poche de liaison de la drogue mais seulement 2 de ces tunnels sont disponibles dans les conformations T et L (Figure 70). Le troisième tunnel uniquement présent dans l'état ouvert O a été suggéré comme étant celui emprunté par la drogue pour gagner le conduit de TolC. Les deux autres tunnels serviraient donc en apparence à l'entrée de la drogue via le périplasma. Mais on pense qu'ils ont deux rôles différents selon un concept « d'essais/erreurs » : en effet selon cette idée la drogue pénétrerait via l'un des deux conduits (le plus surélevé), arriverait à la poche de liaison pour s'y lier et être sélectionné. La liaison correcte induirait un changement de conformation du monomère et donc la poursuite du cycle. Les drogues ne convenant pas emprunteraient le second tunnel pour être rejetées.

La seconde question concerne le mécanisme d'induction de ces changements conformationnels. Bien qu'analogue à l'ATPase F1F0, AcrB n'a pas de sous unité rotative et les changements conformationnels doivent être induits directement par les protons passant à travers la membrane (Figure 71). Trois résidus chargés conservés dans la famille RND (Asp407 Asp408 et Lys940), localisés dans le domaine transmembranaire de TolC et participant vraisemblablement au mouvement de proton sont essentiels pour la fonction de AcrB.

De ce fait comme pour les transporteurs ABC, l'énergie générée via le mouvement de protons serait transduite du domaine transmembranaire au domaine périplasmique de AcrB via des changements conformationnels.

2.1.4.5. Régulation de l'expression des gènes *acrA*, *acrB*, *tolC*

Si la pompe AcrA/AcrB/TolC est tripartite, la régulation s'exercerait principalement sur l'expression des gènes *acrAB* (Figure 72). Les gènes *acrAB* se trouvent au sein d'un opéron soumis à la répression via AcrR. Le gène *acrR* localisé (à 141 pb) en amont de l'opéron *acrAB* (et transcrit de façon divergente) code pour une protéine de 215 acides aminés qui possède des similarités structurales avec les répresseurs transcriptionnels de la famille TetR (Grkovic *et al.*, 2002) (Alekshun & Levy, 1999) (Randall & Woodward, 2002). Le domaine N-terminal de cette protéine contient un motif hélice tour hélice (HTH) alors que le domaine C-terminal serait un site de liaison aux drogues. Comme les membres de la famille TetR, on pense que la liaison de drogue au domaine C-terminal entraînerait des changements conformationnels libérant AcrR (de sa liaison à l'ADN au niveau d'un site opérateur) levant de ce fait la répression de AcrR. Outre cette régulation locale par AcrR, une régulation à distance est exercée par les activateurs transcriptionnels globaux de la famille AraC que sont MarA, SoxS et Rob.

MarA appartient au régulon *mar* découvert pour la première fois dans son implication dans la multirésistance aux drogues qui contrôle l'expression de nombreux gènes distants impliqués dans des processus aussi divers que la virulence, le métabolisme bactérien la formation des biofilms.

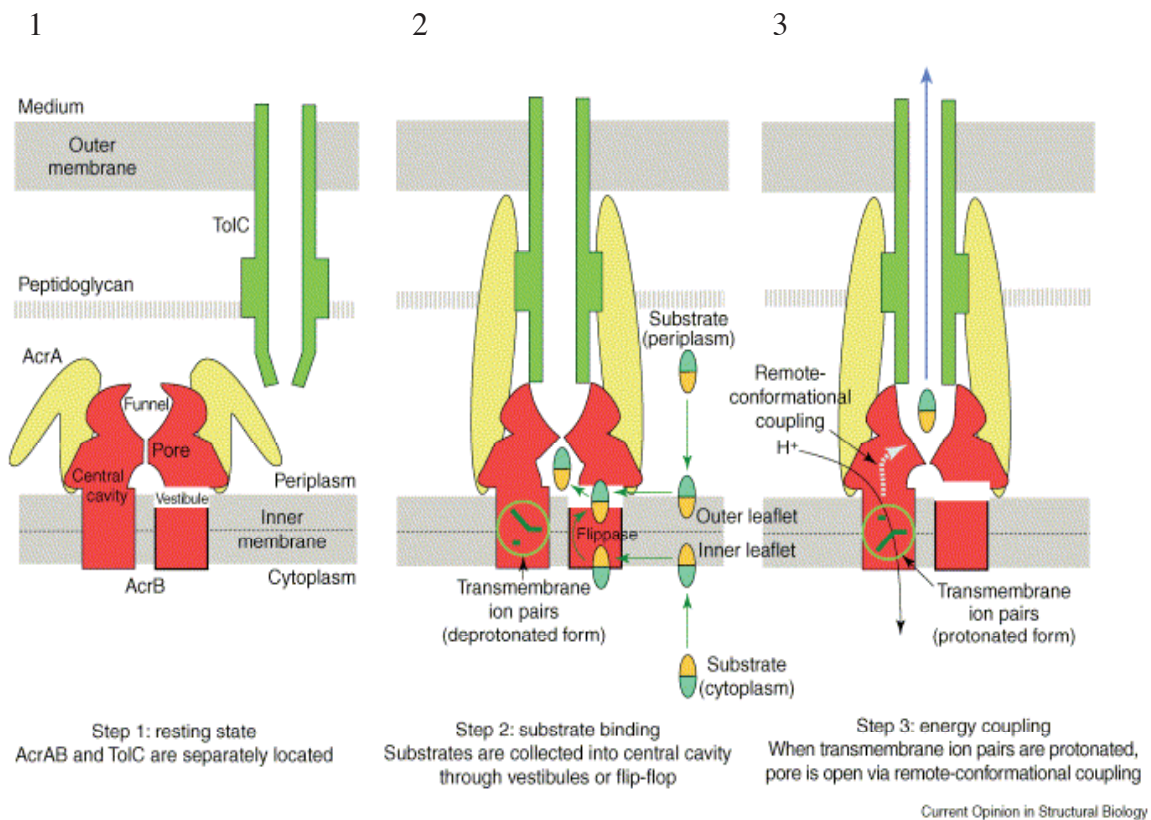


Figure 69. Un mécanisme proposé pour l'export de drogues via la pompe AcrA/B/TolC (Murakami & Yamaguchi, 2003).

1. AcrB et TolC seraient d'abord dissociés. Néanmoins AcrA interagirait déjà avec AcrB.
2. Lorsque AcrB lie une drogue, il y a un changement de conformation se traduisant par une modification du domaine d'ancrage à TolC qui permet cette fois une interaction entre AcrB et TolC. AcrA renforce l'interaction entre AcrB et TolC via une modification de sa forme.
3. Finalement, les protons (fpm pour force proton motrice) sont capturés et se fixent au niveau d'une région du domaine transmembranaire de AcrB présentant des interactions des domaines TM10 et TM4 entre résidus Asp et Lys (Asp407, Asp408 et Lys940). Cette protonation de AcrB a pour conséquence un changement de conformation permettant l'ouverture du pore et le passage de la drogue de la cavité centrale au canal de AcrB. La drogue a alors accès au conduit de TolC.

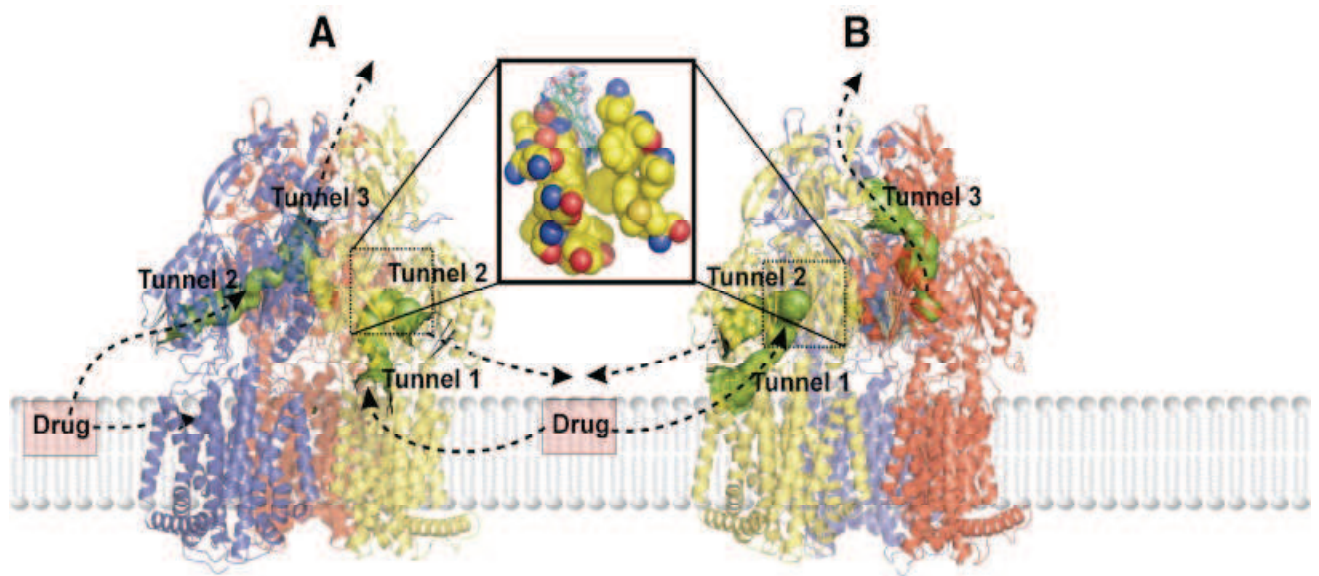


Figure 70. Représentation des 3 tunnels présents dans AcrB (Pos, 2009).

AcrB est représenté sous la forme trimérique (monomère sous la conformation L en bleu, sous la conformation T en jaune, et sous la conformation O en rouge). Les tunnels sont représentés en vert. L'agrandissement indique la poche de liaison hydrophobe au sien du monomère T. Cette poche comprend des résidus phénylalanine, valine, isoleucine et tyrosine.

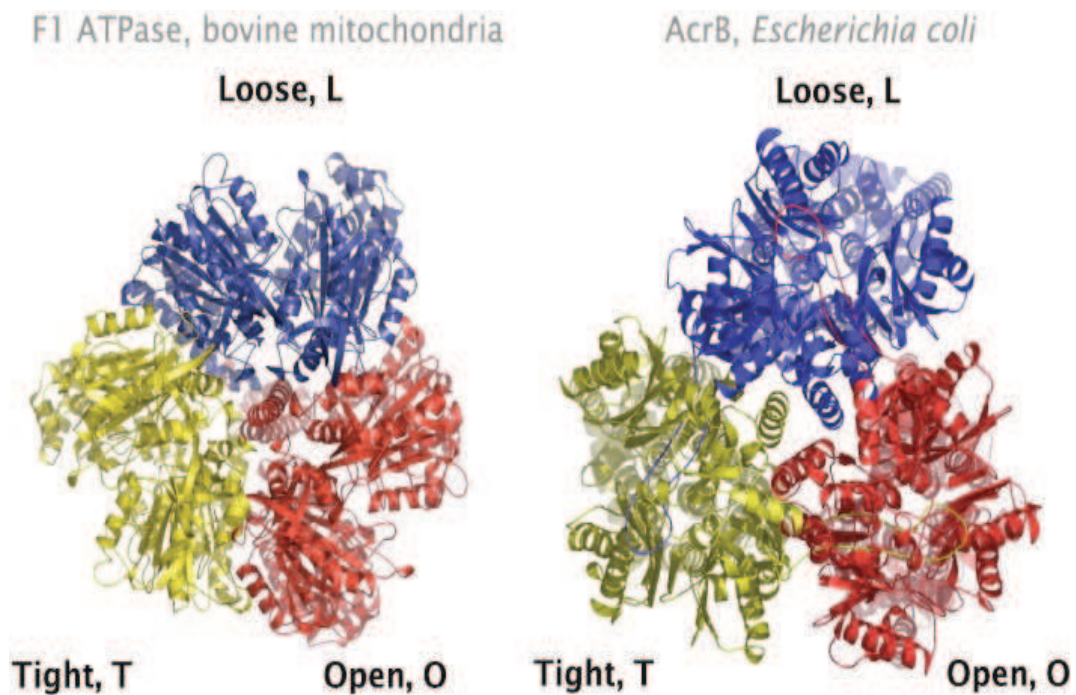


Figure 71. Les analogies structurales entre les sous-unités α/β de l'ATP synthase bovine F1F0 (vue du cytosol) et le domaine périplasmique de AcrB (vue du périplasme) (Pos, 2009) .

Les monomères adoptent chacun une des trois conformations différentes : « Loose » (L), « Tight » (T) et « Open » (O).

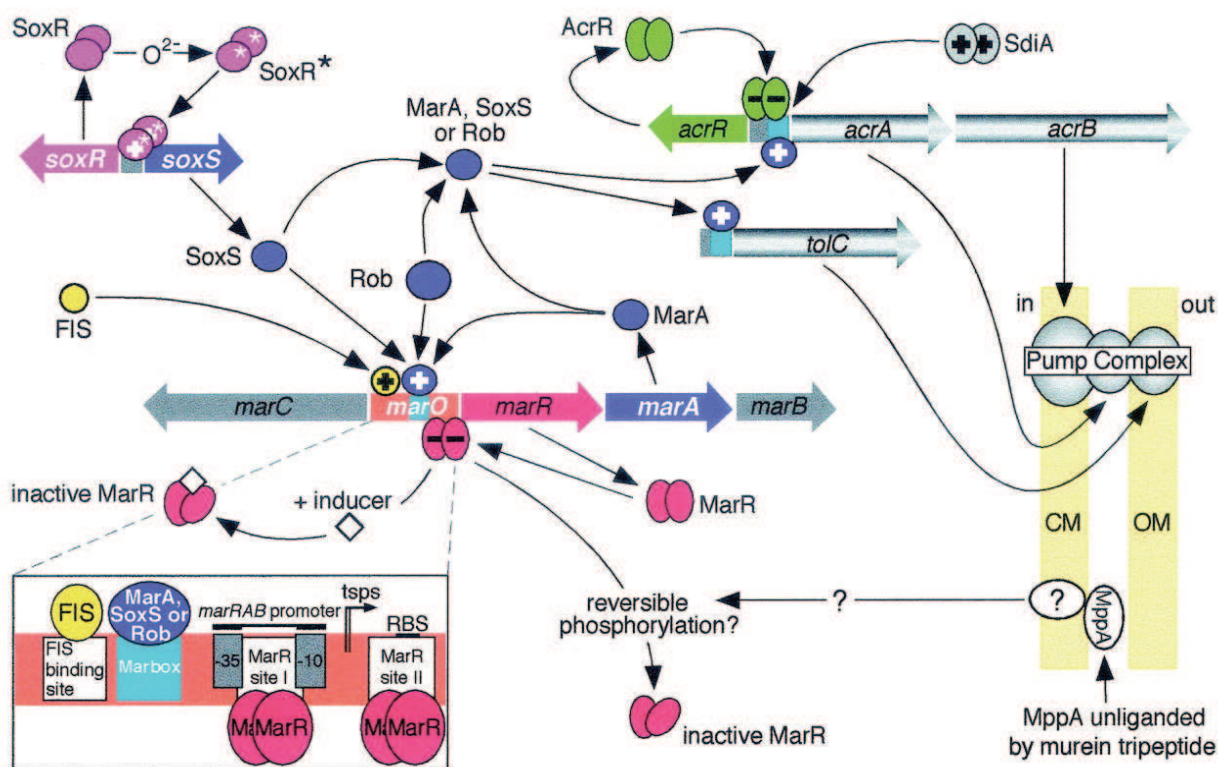


Figure 72. Représentation schématique des réseaux de régulation gouvernant l'expression des gènes *acrAB* et *tolC* chez *E.coli* (Grkovic *et al.*, 2002).

L'expression des gènes *acrB* et *acrA* peut être réprimée par la protéine AcrR ou activée via le régulateur SdiA impliqué dans la division cellulaire. Cependant, le contrôle de l'expression des gènes *acrAB* et *tolC* s'exerce principalement par les régulateurs globaux que sont MarA, SoxS et Rob. Ces protéines qui sont des activateurs transcriptionnels se lient au niveau de la séquence régulatrice (« marbox ») localisée en amont de ces gènes. Le niveau intracellulaire de MarA est lui-même contrôlé par le répresseur MarR, une protéine dimérique pouvant se lier à l'opérateur *marO* qui, ce faisant, réprime également sa propre expression (et celle de gènes constituant l'opéron *marRAB*). La liaison de composés inducteurs (losanges) comme le salicylate par MarR en plus d'une phosphorylation possible de MarR résultante d'une voie de signalisation impliquant la protéine de liaison périplasmique MppA, serait à l'origine d'un changement de conformation de MarR vers une forme ne pouvant pas lier l'ADN. De ce fait, la répression par MarR étant levée, la transcription de *marRAB* peut s'opérer. De plus, la protéine *marA* est produite et peut se lier à l'opérateur *marO* (« marbox ») pour activer la transcription des gènes *marRAB* et la transcription de son propre gène. MarA peut également se lier aux séquences régulatrices proches des promoteurs de gènes appartenant au régulon *mar* comme *acrAB* et *tolC* pour activer leur transcription. Les homologues de MarA, SoxS et Rob peuvent aussi se lier aux séquences régulatrices proches des promoteurs de gènes appartenant au régulon *mar* comme *acrAB* et *tolC* pour activer leur transcription. L'activation transcriptionnelle de *marRAB* par MarA, SoxS et Rob est favorisée par le régulateur FIS (jaune), une protéine activatrice. SoxS est produit après conversion de l'effecteur SoxR (magenta) en une forme active par les superoxydes (O_2^-). Rob comme SoxS, en plus d'agir positivement sur la synthèse de MarA peut également activer l'expression de certains gènes appartenant au régulon *mar* comme *acrAB*. Les sites de liaison des régulateurs au sein de *marO* sont représentés en détail : position des hexamères -35 et -10 du promoteur de *marRAB*, le site « ribosome binding site » ou RBS et les sites d'initiation de la transcription (tsp pour « transcription start points ») pour l'opéron *marRAB* sont indiqués.

Le locus *mar* est formé de deux unités transcriptionnelles chromosomiques divergentes :

- la première comprend *marC*;
- la seconde *marRAB* comprend le répresseur transcriptionnel *marR* l'activateur transcriptionnel *marA* et le gène codant pour la protéine *marB*. Entre les deux unités se trouve une région comprenant deux promoteurs divergents PmarI et PmarII chargés de contrôler l'expression de chaque opéron et le site opérateur *marO*. Chez *E. coli*, l'expression de l'opéron semble induite en présence de drogues comme la tétracycline, le chloramphénicol, le salicylate de sodium. En l'absence de ces inducteurs le répresseur *marR* se lie à l'opérateur *marO* (répétitions directes) empêchant la transcription de l'opéron *marRAB*. L'inactivation de MarR résulterait de la liaison avec des composés comme le salicylate de sodium et d'autres composés contenant l'anneau phénol. Une fois son expression induite, MarA contrôlerait de nombreux gènes sur le chromosome de *E. coli* : l'ensemble des gènes contrôlés fait partie du régulon *mar*. Au sein de ces gènes se trouvent les gènes *acrAB*, ce qui explique en partie les phénotypes de multirésistance aux drogues observés chez les mutants *mar*. De manière intéressante, il semble que MarA induirait sa propre expression. De plus d'autres activateurs induiraient l'expression de *marRAB* : il s'agit de SoxS et Rob.

2.1.4.6. Une coopération entre pompes à efflux

Devant le nombre important et l'extrême diversité des pompes à efflux repertoriées, Shuldiner *et al.* ont clairement soulevé la question de savoir si toutes avaient réellement comme fonction principale l'efflux et si certaines ne jouaient pas tout simplement le rôle de transporteur accessoire pour d'autres pompes. Deux études pionnières au sein des données de la littérature scientifique sont venues étayer leur point de vue.

Dans leur expérience Sulavik *et al.* ont effectué des délétions dans divers gènes codant pour des pompes à efflux et ont testé la sensibilité des mutants obtenus à 35 composés antimicrobiens incluant antibiotiques, détergents, antiseptiques et des colorants (Sulavik *et al.*, 2001). Nishino et Yanaguchi ont complété cette étude en testant l'effet de la surexpression de chacune de ces pompes (clonage sur un plasmide multicopie) sur la résistance de *E. coli* (Nishino & Yamaguchi, 2001).

Cette étude leur a permis d'identifier 20 gènes conférant la résistance à au moins un des 26 composés antimicrobiens testés. Ces deux études ont confirmé que le rôle majoritaire de la pompe AcrAB-TolC dans la résistance (intrinsèque) de ces cellules. Dans l'étude de Sulavik *et al.*, des mutants délétés pour les gènes *acrAB* deviennent plus sensibles à 29 des 35 composés testés. Dans l'étude de Nishino et Yanaguchi, l'expression plasmidique de *acrAB* conférait la résistance à 19 des 24 composés testés.

De ce fait, le rôle central de la pompe AcrA/AcrB/TolC laisse à penser à un rôle accessoire des autres pompes à efflux. En effet des délétions dans les autres gènes que ceux codant pour la pompe AcrA/AcrB/TolC n'ont pas d'effet dramatique sur les niveaux de résistance au bromure d'éthidium et à l'acriflavine par exemple comparé à la souche sauvage. De plus, des délétions multiples affectant d'autres gènes d'une même famille de pompe ne contribuent pas à augmenter la sensibilité de façon synergique. Une explication à cela serait une possible coopération entre divers transporteurs appartenant à des familles différentes pour l'efflux. Dans ce modèle, les pompes d'efflux membranaires à un composant (MFS, SMR...) transporterait les drogues dans le périplasma où elles seraient ensuite capturées par les pompes d'efflux tripartites pour finalement atteindre l'extérieur de la cellule. Ceci expliquerait pourquoi certaines pompes tripartites comme la pompe AcrA/AcrB/TolC peuvent capturer la drogue au niveau du périplasma.

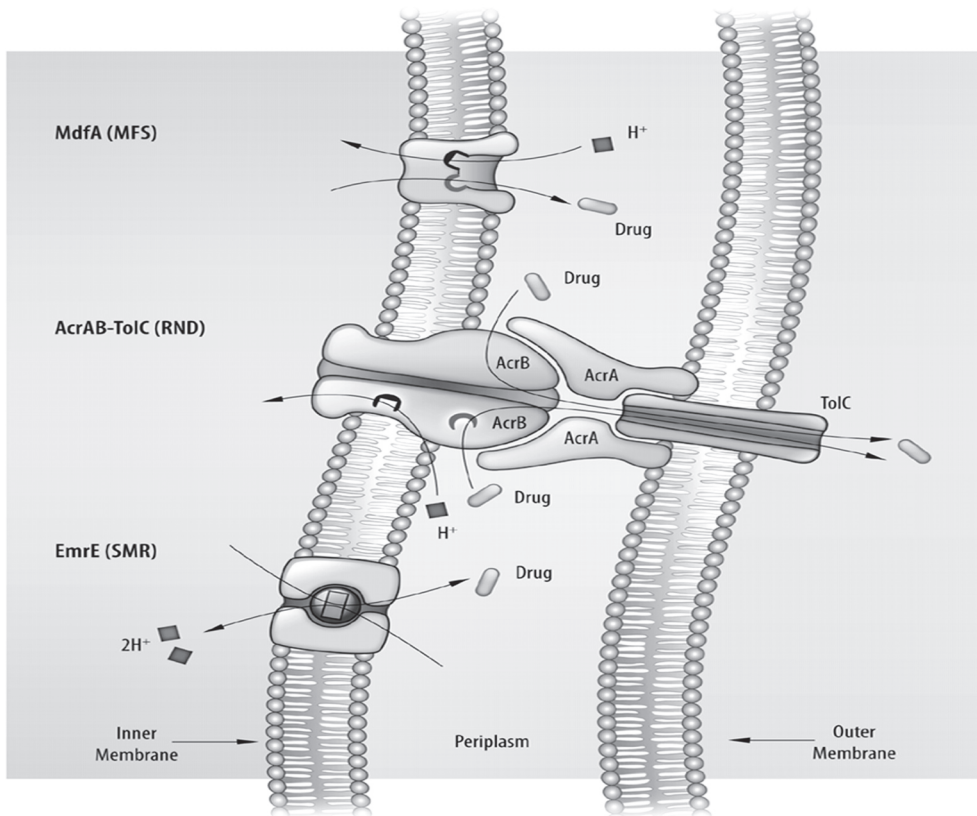


Figure 73. Un modèle de l'interaction entre la pompe AcrA/B/TolC et deux pompes à un composant EmrE et MdfA chez *E.coli* (Tal & Schuldiner, 2009). Les pompes à un composant, EmrE et MdfA permettent l'élimination des drogues du cytosol et leur transport au périplasm où la pompe AcrA/B/TolC le capture pour l'effluer hors de la cellule.

Les premières évidences sont venues de l'étude de la pompe EmrE. Exprimée de façon plasmidique chez *E. coli*, elle confère des résistances au bromure d'éthidium, à l'acriflavine et au violet de méthyle. Cependant, le niveau de résistance conféré par EmrE diminue chez une souche délétée pour *acrAB* suggérant une possible coopération entre les deux pompes. Dans leur étude Tal et Shuldiner ont un peu plus confirmé cette hypothèse (Tal & Schuldiner, 2009). Ils se sont intéressés à l'effet de délétions affectant plusieurs pompes sur la résistance à une seule drogue. Une double délétion des gènes *emrE* et *mdfA* codant pour deux transporteurs de la famille SMR et MFS (respectivement) qui partagent les mêmes substrats (acriflavine et bromure éthidium) a des effets conséquents sur la résistance des bactéries. Les doubles mutants présentent une diminution de la résistance à ces drogues à un niveau comparable à celui des mutants Δ *acrAB*. De plus, chez ces souches, le niveau de résistance conféré par AcrAB-TolC à l'acriflavine et au BET est considérablement réduit. Par contre, la résistance conférée par AcrAB à d'autres composés non partagés avec EmrE et MdfA (autre que acriflavine et BET) n'est pas altérée. Ces résultats appuient le concept d'un processus en deux étapes où les pompes à un composant comme EmrE et MdfA ne serviraient qu'à l'acheminement au périplasme de substrats de la pompe AcrA/AcrB/TolC (Figure 73).

Cet ensemble de pompes à un composant partageant pour certaines les mêmes substrats (même spécificité) fournit un réseau flexible mais solide permettant de refouler plusieurs composés différents.

2.1.4.7. Les autres rôles joués par les pompes d'efflux

L'efflux a longtemps été considéré comme mécanisme exclusif de la résistance aux antibiotiques. Ainsi, les cas de résistances cliniques aux antibiotiques dus de manière prédominante à l'expression de pompes d'efflux par les bactéries, correspondant à des pompes de la famille RND chez les bactéries à gram-négatif ou à des pompes de la famille MFS chez les bactéries à Gram positif. Ainsi, si la pompe AcrA/B/TolC seule ne suffit pas à rendre compte de la résistance clinique (il faut ajouter des mutations sur les cibles de l'antibiotique), la pompe tripartite MtrCDE confère à elle seule un niveau de résistance clinique aux pénicillines chez *N. gonorrhoeae*. Chez les bactéries à gram positif, on a constaté que isolats cliniques de *S. aureus* résistants aux fluoroquinolones surexprimaient le gène codant pour la protéine NorA, pompe d'efflux de la famille MFS (Pidcock, 2006).

Cependant, bien que leur rôle dans la résistance aux antimicrobiens est indéniable, de nombreuses preuves semblent démontrer que ces pompes d'efflux auraient d'autres substrats et participeraient à d'autres fonctions clés pour le micro-organisme comme la communication intercellulaire (« quorum sensing ») ou bien encore la pathogénie.

a. Pompes d'efflux et quorum sensing

Initialement décrit chez *Vibrio fischeri*, le « quorum sensing » (QS) est un mécanisme permettant à la bactérie de moduler l'expression de certains gènes en fonction de la densité de cellules bactériennes (Milton, 2006). Ainsi, *Vibrio fischeri* émet une luminescence visible qu'à forte concentration cellulaire. Les bases moléculaires sous-jacentes de ce mode de communication entre les cellules bactériennes a été décrit : il est établi aujourd'hui que les bactéries synthétisent et émettent des molécules à destination des cellules voisines en fonction de la densité de la population.

Chez les bactéries à Gram négatif, ces petites molécules sont nommées auto-inducteurs (AI). Le plus connu est l'acyl-Homosérine Lactone (acyl-HSL) qui, une fois synthétisé, diffuse à travers l'enveloppe bactérienne.

Lorsque la population bactérienne est importante la concentration en autoinducteur augmente, et, à forte concentration cet auto inducteur forme un complexe avec un facteur de transcription pour activer l'expression de gènes cibles. Dans le cas de *Vibrio*, ce complexe est formé par LuxR/3-oxo-C6-HSL. Les molécules de « quorum sensing » contrôlent ainsi la bioluminescence, l'expression de facteurs de virulence et l'entrée en phase stationnaire.

Mais, de manière intéressante, il semble que ces molécules de « quorum sensing » puissent être exportées via des pompes d'efflux membranaires. Cette hypothèse a été soulevée suite aux travaux de Yang *et al.* (Yang *et al.*, 2006). Ceux-ci ont démontré que les souches surexprimant les protéines d'efflux, AcrB ou NorE, atteignent une plus faible densité cellulaire au passage à la phase stationnaire. De plus des mutants *acrB* ou *norE* atteignent une plus forte densité cellulaire suggérant que dans ce cas la bactérie n'est plus capable d'exporter les auto inducteurs inhibant la multiplication des cellules.

Ces études ont été appuyées par les découvertes de Evans *et al.* (Evans *et al.*, 1998) qui ont montré que la pompe MexAB-OprM servait à transporter l'auto-inducteur PAI-1 (N-3-oxo-dodecanoyl-L-HCL), une homosérine lactone. Chez *Pseudomonas aeruginosa* PAI-1 est capable de se lier au régulateur transcriptionnel LasR pour activer l'expression de gènes situés sur le régulon *las* et codant pour des facteurs de virulence tels que l'élastase et l'exotoxine A. De ce fait, la réduction de virulence observée chez des souches surexprimant la pompe Mex peut être due à un efflux important de molécules de « quorum sensing » (et notamment PAI-1) importantes au niveau intracellulaire pour induire l'expression de gènes codant pour des facteurs de virulence.

Outre ce rôle indirect dans la virulence qui vient d'être décrit (via le transport de molécules de « quorum sensing »), on pense aujourd'hui que les pompes auraient un rôle plus direct en assurant la sécrétion de facteurs de virulence ou en effluant des composés antimicrobiens de la cellule hôte.

b. Pompes d'efflux et virulence

L'importance des pompes d'efflux dans la virulence a été démontré chez de nombreuses bactéries. Chez *Salmonella* la pompe AcrA/AcrB-TolC revêt une importance cruciale pour l'infection de souris permises BALB/c et pour la colonisation. Chez cette bactérie des pompes de diverses familles ont démontré leur importance dans la virulence (Buckley *et al.*, 2006) (Nishino *et al.*, 2006) (Virlogeux-Payant *et al.*, 2008) (Baucheron *et al.*, 2004). Des mutants de *Pseudomonas* invalidés pour les gènes codant la pompe MexAB-OprM sont déficients à causer une infection léthale chez des souris. L'idée de la sécrétion de facteurs de virulence via ces pompes a été amenée par les expériences de Hikarata *et al.* qui ont montré que des mutants de *Pseudomonas* altérés pour la pompe MexAB-OprM ne retrouvaient leur capacité d'infection et d'invasion de cellules épithéliales MDCK qu'après complémentation ou après ajout de surnageant de cultures de cellules infectées avec la souche sauvage (apport de facteurs de virulences sécrétés par la souche sauvage). On pense également que TolC et ses homologues (OprM entre autres chez *Pseudomonas*) qui est une protéine pléiotropique pouvant participer en tant que canal externe à des systèmes d'efflux et de sécrétion (sécrétion de type I) expliquerait certains défauts de virulence concernant les mutants de pompes d'efflux. En effet, la simple délétion du gène *tolC* chez *Francisella* est à l'origine d'un déficit d'infection chez la souris (Gil *et al.*, 2006).

L'un des rôles des pompes d'efflux dans la virulence pourrait être l'efflux d'agents antimicrobiens produits par l'hôte au cours d'une infection. Ainsi les phagocytes cibles de l'infection de certains pathogènes intracellulaires fabriquent des peptides antimicrobiens mais génèrent également des espèces réactives de l'oxygène aux propriétés bactéricides qui s'avèrent létales pour la bactérie enfermée dans la phagosome. De même au sein de

l'organisme la bactérie est exposée à des composés toxiques comme les sels biliaires et des acides gras produits au niveau de l'intestin. Refouler de tels composés s'avère donc être une stratégie intéressante pour la survie bactérienne.

Ainsi il a été montré que la pompe CmeABC de *C. jejuni* intervenait dans la résistance aux sels biliaires. De même la pompe AcrA/AcrB/TolC est essentielle à la résistance aux sels biliaires chez *Salmonella* ou *E. coli*. Les substrats des pompes sont également susceptibles d'induire l'expression des gènes codant pour les pompes à efflux. Les composants AcrAB semblent surexprimés en présence d'un acide gras (n-decanoate) chez *E. coli*. Shafer *et al.* ont également montré que la pompe d'efflux MtrCDE de *Neisseria* lui permettait de résister à des peptide antimicrobiens comme la protégrine-1 porcine et le peptide humain LL-37 appartenant à la famille des cathelicidines (Shafer *et al.*, 1998). Chez le pathogène des plantes, *Erwinia amylovora*, Burse *et al.* ont montré que AcrB avait un rôle dans la résistance aux agents antimicrobiens produits par la plante pour se défendre comme les flavonoïdes, les isoprénoïdes et les alkaloïdes (métabolites secondaires produits par la plante en réaction à l'infection) (Burse *et al.*, 2004).

Toutes ces études démontrent le rôle des pompes d'efflux dans la virulence et supposent que les agents antimicrobiens produits par l'hôte sont vraisemblablement les substrats « naturels » de ces pompes auxquelles nous avons longtemps assigné un rôle plus restreint dans la résistance aux antibiotiques utilisés en clinique ou aux drogues anticancéreuses. A l'origine, les pompes d'efflux semblent avoir été un instrument efficace pour la survie de la bactérie au sein de prédateurs de l'environnement (amibes à activité phagocytaires présentes dans les sols et les eaux) et pour la communication intercellulaire (« quorum sensing »).

V Conclusion

Dans cette course aux armements, diverses stratégies ont été élaborées soit par l'hôte soit par le pathogène. Du côté de l'hôte ce sont tous les mécanismes de défense immunitaire présents chez les organismes complexes et dans une moindre mesure les molécules antimicrobiennes dans le cas d'hôtes unicellulaires comme les amibes. Du côté du pathogène, on observe des stratégies variées développées notamment chez les bactéries pour éviter la reconnaissance par le système immunitaire lorsqu'elles sont à l'extérieur des cellules de l'organisme. La manipulation de l'organisme hôte peut aller plus loin car les bactéries peuvent pénétrer dans les cellules de l'organisme et les exploiter à leur propre compte pour assurer leur survie et leur multiplication. C'est ainsi le cas de la bactérie *Legionella* qui, en détournant le trafic intracellulaire des macrophages humains empêche sa dégradation par la voie lysosomiale assurant ainsi sa multiplication dans un environnement riche en nutriments. Comme d'autres bactéries, *Legionella* utilise des systèmes de sécrétion pour délivrer des effecteurs à l'intérieur de la cellule hôte. Ceux-ci rendent compte du détournement du trafic intracellulaire de l'hôte, préalable à la multiplication bactérienne. Cependant on ne peut exclure le rôle d'autres complexes multiprotéiques dans la virulence bactérienne. Impliqués dans la résistance aux drogues, les systèmes d'efflux semblent également nécessaires à la virulence. S'il existe des hypothèse concernant le rôle des pompes à efflux dans la virulence bactérienne, la manière dont ils y participent reste peut décrite.

Dans le cas de *Legionella* par exemple s'il existe un lien entre le phénotype infectieux et une augmentation de résistance constatée par Barker *et al.* aucune autre étude n'envisage d'étude approfondie de ces mécanismes de résistance. C'est dans cette optique que nous avons axé notre étude sur le lien entre résistance aux drogues et la virulence dans l'espoir d'éclaircir la nature de ce lien. Dans une première partie de ce manuscrit est exposé mon travail concernant la recherche d'homologues aux protéines de pompes d'efflux chez *L. pneumophila* ainsi que la construction d'un certain nombre de mutants. Dans une seconde partie est abordée l'analyse phénotypique des mutants construits : pour valider la fonctionnalité des protéines d'efflux ciblées nous avons testé la résistance aux drogues des mutants invalidés puis nous avons étudié leur virulence. L'étude d'un mutant montrant à la fois un défaut de virulence et une sensibilité aux drogues pronocée est plus détaillée. Ce mutant fait l'objet d'un travail plus approfondi à l'origine de notre première publication sur *Legionella*. Enfin une approche transcriptomique présentée en partie III a été menée afin d'étudier le niveau d'expression des gènes de pompes d'efflux potentielles dans différentes conditions.

PARTIE RESULTATS

I. Invalidation des gènes codant pour des pompes à efflux chez *L. pneumophila* Lens

1. Recherche bioinformatique

Avant d'initier les études *in vivo* des mécanismes de multi-résistance chez *Legionella*, un travail d'identification de protéines participant à des systèmes d'efflux a été réalisé par une approche bioinformatique au laboratoire à partir des trois génomes de *Legionella* disponibles à ce moment là (souches Lens, Paris et Philadelphia).

1.1. Préliminaire : origine de la recherche bioinformatique

Bien que le premier cas de legionellose ait été reporté en 1976, il a fallu attendre plus de 20 ans pour que la séquence des génomes de souches de legionelles soit disponible. Les séquences complètes de *Legionella* déposées ont apporté une avancée décisive pour l'étude des bases génétiques de la virulence (Cazalet *et al.*, 2004). La séquence du génome de deux souches de *Legionella pneumophila*, l'une responsable d'une épidémie en France (Lens) et l'autre endémique (Paris) et d'une troisième souche séquencée aux Etats-Unis (Philadelphia) ont été déposées et sont disponibles sur le site de l'Institut Pasteur (<http://genolist.pasteur.fr/LegioList/>) (Cazalet *et al.*, 2004) (Chien *et al.*, 2004). Ces trois souches appartiennent au sérotype 1 responsable de plus de 84% des cas de legionellose chez l'Homme. La souche Paris est une souche dite endémique : alors que les autres souches sont responsables d'une épidémie dans une région limitée, la souche Paris a été associée à des cas de legionellose partout en France et peut être même en Europe. Elle a été responsable de 12,7% des cas de legionellose en France et de 33% des cas dans la région parisienne entre janvier 1998 et décembre 2002 (Aurell *et al.*, 2003) (Cazalet *et al.*, 2004). La deuxième souche, Lens, avait causé entre novembre 2003 et janvier 2004 l'épidémie la plus importante connue en France avec 86 cas et 17 morts, épidémie dont l'origine fut attribuée à une tour aérofrigorifère de l'usine pétrochimique de Noroxo à Harnes (Prevotat *et al.*, 2008). La troisième souche est dérivée de la souche identifiée en 1976 lors de l'épidémie de Philadelphie, épidémie qui fut à l'origine de la découverte de cette maladie et du facteur associé. Cette épidémie survenue en 1976 a affecté 182 participants d'un congrès de la Légion américaine à Philadelphie (Fields *et al.*, 2002). La comparaison des génomes a permis de montrer l'extrême plasticité de *Legionella* : chacune des 3 souches possède environ 10 % de gènes qui lui sont spécifiques, ce qui est relativement important pour 3 bactéries de la même espèce. Ainsi, entre la souche Lens et la souche Paris, par exemple, ce ne sont pas moins de 280 gènes chromosomiques (10%) pour Lens et 428 gènes (14%) pour la souche Paris qui leur sont spécifiques (Cazalet *et al.*, 2004). De plus, chacune des souches possède un ou plusieurs plasmides spécifiques (dont certains portent des gènes potentiellement impliqués dans la virulence comme les gènes *lvh* du plasmide pP36 de *L. pneumophila* Paris (Doleans-Jordheim *et al.*, 2006)) ce qui augmente la différence entre les trois génomes. Enfin, n'oublions pas les autres éléments génétiques mobiles (transposons...) dont les signatures retrouvées indiquent des remaniements génétiques à plus grande échelle pouvant impliquer des échanges avec d'autres bactéries.

Mais le plus frappant a été l'identification de 62 gènes codant pour des protéines ayant des motifs eucaryotes. Beaucoup interviendraient dans des interactions protéines/protéines (motifs « coiled-coil ») d'autres ont des fonctions spécifiques comme facteur d'échange ou protéine kinase. Tout cela signifie que *Legionella* pourrait manipuler son hôte en détournant des voies de signalisation ou des voies de trafic intracellulaire lors de l'infection. Dans notre cas, nous nous sommes intéressés au rôle potentiel de pompes d'efflux dans la virulence de *Legionella*. Dans l'étude de Cazalet *et al.* (Cazalet *et al.*, 2004), il est fait état que les gènes *cadA1*, *ctpA*, *copA* et *copA2* codant pour des pompes à efflux dépendant de l'ATP sont induit au cours d'une infection dans les macrophages. De plus, l'hypothèse d'un possible lien entre virulence et résistance aux drogues avait émergé dès les études de Barker *et al.* montrant une augmentation de la résistance à certaines drogues (antibiotiques, biocides) des legionelles en phase transmissive, suite à la lyse de sa cellule hôte *Acanthamoeba castellanii* (Barker *et al.*, 1995). Cette corrélation observée entre le phénotype infectieux et l'augmentation de résistance aux drogues nous a conduit à étudier un mécanisme contribuant de façon majeure à cette résistance chez de nombreuses espèces bactériennes : les pompes à efflux.

Il a donc fallu tout d'abord identifier des gènes codant pour des pompes à efflux potentielles d'après les séquences déposées, un travail qui a été réalisé avec fanny COFFIN et christophe GILBERT.

1.2. Les étapes de la recherche bioinformatique

A des fins d'identification de gènes codant pour des pompes à efflux potentielles une étude bioinformatique a été menée. Cette analyse, faite sur les séquences de protéines traduites à partir des génomes des trois souches alors disponibles (Lens, Paris et Philadelphia) a été menée en plusieurs étapes en prenant comme base une protéine représentative de chaque famille de pompe d'efflux connue :

1- Choix d'une protéine représentative par famille de pompes à efflux. Ces protéines caractérisées dans la littérature quant à leur caractéristique et à leur profil de drogues effluées ont été répertoriées (Poole, 2004). Une protéine représentative par famille de pompes à efflux a été sélectionnée. Ces protéines correspondent aux protéines de la membrane interne (IMP) qui confèrent la spécificité des pompes et qui permettent dans le cas des composants de pompes tripartites de caractériser la famille d'efflux :

- AcrF (*E. coli*) a été choisi comme modèle pour la famille RND.
- EmrE (*E. coli*) pour famille SMR
- McbF (*E. coli*) pour la famille ABC
- EmrD (*E. coli*) pour la famille MFS.

D'autres protéines sont les MFP et les OMF, les protéines périplasmiques et de la membrane externe, respectivement. Ces dernières peuvent s'associer aux IMP pour composer des pompes tripartites. Nous avons choisi comme protéines de point de départ de la recherche :

- TolC (*E. coli*) pour les OMF.
- AcrA (*E. coli*) pour les MFP.

Tableau 5. Protéines d'efflux potentielles identifiées par l'approche bioinformatique.

OMF : « outer membrane factor » ; **IMP** : « inner membrane protein » ; **MFP** : « membrane fusion protein » ;
RND : « Resistance and nodulation cell division » ; **pb** : paires de base.

Souche <i>L.pneumophila</i>	Lens	Paris	Philadelphia
Gènes			
Taille du génome	3 345 687 pb	3 503 610 pb	3 397 754 pb
Gènes codants	2947	3077	3004
Protéines			
Protéines participant potentiellement à des systèmes d'efflux	116	124	126
Dont :			
De la membrane externe (OMF)	12	15	15
Du périplasme (MFP)	16	19	18
De la membrane interne (IMP)			
type RND (homologues à AcrF)	7	11	10
type ABC (homologues à McbF)	38	35	40
type MFS	38	37	37
type SMR	18	7	6
type MATE	0	0	0
porines	0	0	0

2- Recherche de séquences homologues dans les banques de données. Pour cela, l'algorithme d'alignement BlastP (« basic local alignment search protein tool ») a permis d'aligner la protéine représentative à l'ensemble des protéines non-redondantes présentes dans les banques de données. Cet alignement a été restreint au γ -protéobactéries auxquelles appartient *Legionella*. L'alignement itératif PSI-BLAST a également été utilisé dans une deuxième analyse. Dans cette approche, les protéines ayant le meilleur « score » (dans notre cas, E value = 0,005) sont d'abord alignées (alignement BLAST). Le programme établit un profil basé sur les alignements locaux significatifs trouvés (c'est-à-dire conservation d'un acide aminé en une position donnée) ; cela se traduit par la création d'une matrice PSSM (« position specific scoring matrix ») dont la valeur est d'autant plus haute que l'acide aminé est conservé pour une position donnée. Un autre alignement via BLAST est alors mené en tenant compte de la valeur de la matrice PSSM. Les itérations sont menées jusqu'à ne plus avoir de nouvelles protéines identifiées.

3- Toutes les protéines identifiées ont été alignées grâce à ClustalW (seuil E value = 10^{-2}) qui permet de plus une visualisation de ces alignements.

4- A partir de l'alignement un arbre phylogénétique a été établi (1000 séquences au maximum).

5- Dans chaque arbre les protéines de *Legionella* ont été identifiées.

6- Pour chaque groupe de protéines de *Legionella*, les protéines proches voisines (protéines de *Legionella* exclues) ont été alignées.

Ceci a permis l'établissement de séquences protéiques consensus. Ceci conduit par exemple à obtenir 5 séquences consensus dans le cas de TolC comme point de départ pour réaliser une recherche restreinte aux génomes de *Legionella*.

7- Chaque séquence consensus a ensuite été utilisée pour rechercher des homologues dans une banque protéique contenant l'ensemble des protéines des trois souches de Legionelles.

8- Les protéines de *Legionella* issues de chaque comparaison (E value supérieure à 10^{-2}) ont été alignées entre elles.

Un arbre phylogénétique a été construit (5 arbres pour TolC). Ceci a permis de visualiser les protéines présentes dans les trois souches ou absentes chez 1 ou 2 souches.

9- Chaque groupe de protéines issu de ces arbres finaux (1 à 3 protéines) a ensuite été soumis à une comparaison de séquences (Blast ou PSI-Blast) contre les banques générales afin d'identifier la protéine présentant la plus proche homologie.

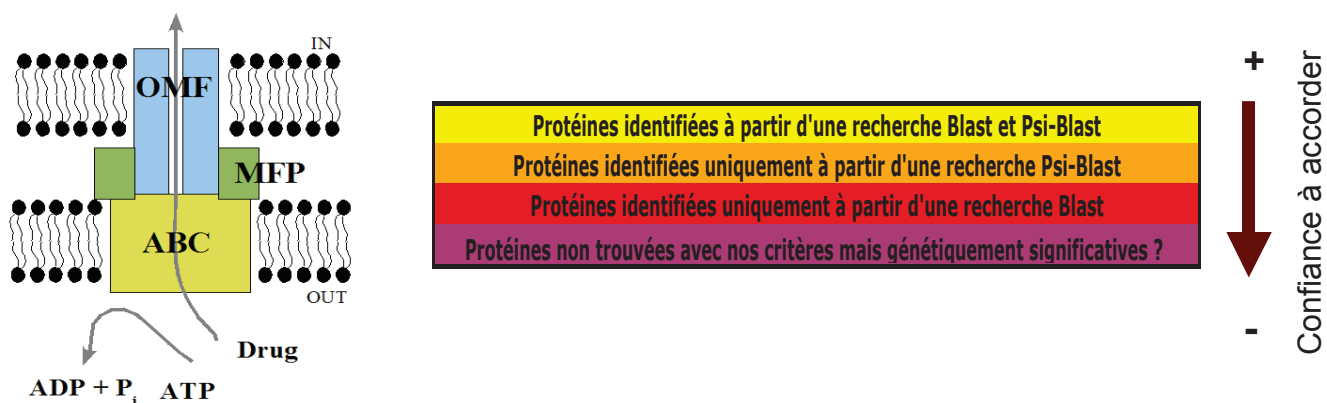
1.3. Résultats de la recherche bioinformatique

De ces études, il ressort que chez les souches Lens, Paris et Philadelphia, il a été répertorié 116, 124 et 126 protéines, respectivement, pouvant participer à des mécanismes d'efflux (Tableau 5). Ces protéines appartiennent à l'un des trois types de protéines pouvant participer à un système d'efflux :

- les protéines de la membrane interne ou IMP qui fournissent l'énergie à l'efflux (ex : AcrB dans le cas de la pompe AcrA/AcrB/TolC).

Tableau 6. Tableau regroupant les associations de protéines pouvant participer à une pompe d'efflux de la famille ABC.

Les numéros se réfèrent aux numéros des gènes tels qu'indiqués sur le site <http://genolist.pasteur.fr/LegioList/>. Ces gènes codent pour les protéines d'efflux potentielles identifiées par l'approche bioinformatique. Les couleurs indiquent l'échelle de confiance à accorder à la prédiction.



	Cytoplasmic Membrane ABC (<=>McbF)		Periplasmic Space MFP (<=>AcrA)	Outer Membrane OMF (<=>ToIC)	System
	identifiant	identifiant	identifiant	identifiant	
Lens	lpl2849	lpl2850	lpl2851	lpl2852	
Paris	lpp2989	lpp2990	lpp2991	lpp2992	
Phi	lpg52843116	lpg52843117	lpg52843118	lpg52843119	
Lens		lpl278	lpl279	lpl280	HlyB/MsbA
Paris		lpp283	lpp284	lpp285	
Phi		lpg52840479	lpg52840480	lpg52840481	
Lens	lpl697	lpl696	lpl695	lpl699	
Paris	lpp715	lpp714	lpp713	lpp719	
Phi	lpg52840897	lpg52840896	lpg52840895	lpg52840899	
Lens	lpl880	lpl881	lpl882	-	
Paris	lpp911	lpp912	lpp913	-	
Phi	lpg52841085	lpg52841086	lpg52841087	-	
Lens	lpl217	lpl216	lpg218	-	
Paris	-	-	-	-	
Phi	-	-	-	-	
Lens		lpl1510	lpl1509	-	
Paris		lpg1473	lpp1474	-	
Phi		lpg52841745	52841747	-	

- les protéines périplasmiques ou MFP qui assurent la continuité du canal entre la membrane interne et la membrane externe (ex : AcrA).

- les protéines de la membrane externe ou OMF qui forment un pore pour l'efflux des drogues hors de la cellule.

Il est apparu au cours de l'étude que certaines protéines pouvaient ne pas être présentes chez une souche mais pas chez une autre (efflux spécifique dans souche). Il est à noter qu'aucune porine de structure classique chez les bactéries à Gram négatif, ni de protéine de la famille MATE n'ont été retrouvées. Suivant l'identification, différents niveaux de confiance ont été accordés : les protéines les plus significatives correspondent à celles identifiées par analyse Blast et PSI-Blast.

L'analyse *in silico* nous indique également que certaines protéines sont codées par des gènes adjacents. Ainsi les gènes codant pour une protéine de membrane externe (OMF), une protéine périplasmique (MFP) et une protéine de membrane interne (IMP) sont quelquefois retrouvés adjacents, suggérant qu'il s'agit là de trois gènes d'un opéron codant pour trois composants d'une pompe tripartite. Cependant, rien ne permet de dire, à l'heure actuelle, si les trois gènes appartiennent réellement à un opéron (pas de promoteur annoté ou clairement caractérisé en amont d'un des trois gènes). D'autres groupes comprenant des gènes codant l'IMP et la MFP mais sans OMF ont été identifiés. Etant donné le rôle pléiotrope des OMF comme TolC il n'est pas étonnant qu'une OMF s'associerait à divers couples IMP-MFP afin de former des pompes d'efflux tripartites où participer à des systèmes de sécrétion (système de type I). Ceci semble être appuyé par le fait que certains gènes codant pour des OMF sont souvent retrouvés isolés, comme c'est le cas pour *tolC* chez *E.coli*.

Les résultats de la recherche bioinformatique ont été regroupés sous forme de tableaux (tableau 6 à 10) :

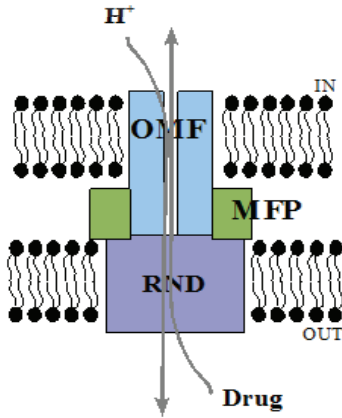
- les tableaux 6 à 8 regroupent les protéines composant des pompes à efflux de la famille ABC, RND et MFS. Il s'agit de cas où le gène codant pour une protéine de membrane interne appartenant à l'une des trois familles d'efflux est adjacent à une protéine périplasmique (MFP). Dans certains cas le troisième gène codant pour la protéine de membrane externe (OMF) est présent juste après la MFP suggérant que la présence d'une pompe à efflux tripartite complète ;

- le tableau 9 regroupe une série d'associations de gènes codant pour une MFP à proximité du gène codant pour une OMF : on ne peut pas déterminer la famille de la pompe potentielle étant donné que le gène codant pour l'IMP n'est pas présent au voisinage;

- Enfin, le tableau 10 regroupe les gènes codant pour des protéines qui sont « orphelines » c'est-à-dire dans aucun gène codant pour un autre composant de pompe à efflux (gènes codant pour une OMF, une MFP ou une IMP) n'est retrouvé à proximité immédiate. Par exemple des gènes codant pour des protéines de la membrane externe (OMF) sont retrouvés isolées. Ceci laisse penser que ces protéines fonctionneraient comme un canal non spécifique pouvant s'associer à un ensemble MFP/IMP pour permettre l'efflux. C'est par exemple le cas de TolC dans son rôle pléiotrope car cette protéine peut s'associer à AcrA/B pour l'efflux de drogues mais aussi à HlyB/D pour la sécrétion de l'hémolysine chez *E. coli*. Afin d'étudier le rôle des pompes à efflux chez *Legionella* il nous a paru opportun d'axer l'étude sur une souche. Cette approche ouvre une possibilité d'élargissement par la suite en confirmant leur rôle chez les autres souches et en élargissant après l'étude aux pompes spécifiques non retrouvées dans notre isolat. Nous avons pour cela choisi la souche *Legionella pneumophila* Lens, choix motivé par l'aspect « agressif » de cette souche en terme de virulence chez l'Homme.

Tableau 7. Tableau regroupant les associations de protéines pouvant participer à une pompe d'efflux de la famille RND.

Les numéros se réfèrent aux numéros des gènes tels qu'indiqués sur le site <http://genolist.pasteur.fr/LegioList/>. Ces gènes codent pour les protéines d'efflux potentielles que nous avons identifiées par l'approche bioinformatique



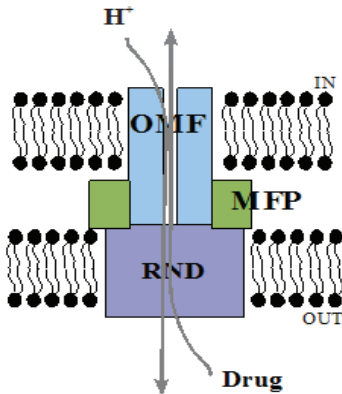
Protéines identifiées à partir d'une recherche Blast et Psi-Blast
Protéines identifiées uniquement à partir d'une recherche Psi-Blast
Protéines identifiées uniquement à partir d'une recherche Blast
Protéines non trouvées avec nos critères mais génétiquement significatives ?

+
↓
Confiance à accorder
-

	Cytoplasmic Membrane RND (<=>AcrF) identifiant	Periplasmic Space MFP (<=>AcrA) identifiant	Outer Membrane OMF (<=>ToIC) identifiant	System
Lens Paris Phi	lpl2434 lpp2580 lpg52842720	lpl2435 lpp2581 lpg52842721	lpl2436 lpp2582 lpg52842722	AcrA/AcrB HlyB/HlyD MexE/MexF AcrE/AcrF
Lens Paris Phi	- lpp77 -	- lpp78 -	- lpp79 -	AcrE/AcrF
Lens Paris Phi	- lpp2351 lpg52841263	- lpp2352 lpg52841262	- lpp2353 lpg52841261	metal efflux pump
Lens Paris Phi	lpl2063 lpp2073 lpg52842348	lpl2064 lpp2074 lpg52842349	lpl2065 lpp2075 lpg52842350	metal efflux pump
Lens Paris Phi	lpl1046 lpp2371 lpg52841242	lpl1045 lpp2372 lpg52841241	lpl1044 lpp2373 lpg52841240	metal efflux pump
Lens Paris Phi	- lpp2361 lpg52841254 lpg52841330	- lpp2362 lpg52841253 lpg52841329	- lpp2363 lpg52841252 lpg52841328	metal efflux pump
Lens Paris Phi	lpl2104 lpp2130 lpg52842391	lpl2103 lpp2129 lpg52842390	- - -	AcrA/AcrB HlyB/HlyD MexE/MexF AcrE/AcrF
Lens Paris Phi	lpl757 lpp786 lpg52840957	lpl758 lpp787 lpg52840958	- - -	AcrA/AcrB HlyB/HlyD MexE/MexF AcrE/AcrF
Lens Paris Phi	- lpp2880 -	- lpp2879 -	- - -	AcrA/AcrB HlyB/HlyD MexE/MexF AcrE/AcrF
Lens Paris Phi	lpl1976 lpp1981 lpg52842217	- - -	- - -	SecF
Lens Paris Phi	lpl1977 lpp1982 lpg52842218	- - -	- - -	SecD

Tableau 8. Tableau regroupant les associations de protéines pouvant participer à une pompe d'efflux de la famille MFS.

Les numéros se réfèrent aux numéros des gènes tels qu'indiqués sur le site <http://genolist.pasteur.fr/LegioList/>. Ces gènes codent pour les protéines d'efflux potentielles que nous avons identifiées par l'approche bioinformatique.



Protéines identifiées à partir d'une recherche Blast et Psi-Blast
Protéines identifiées uniquement à partir d'une recherche Psi-Blast
Protéines identifiées uniquement à partir d'une recherche Blast
Protéines non trouvées avec nos critères mais génétiquement significatives ?

+
↓
Confiance à accorder
↓
-

	Cytoplasmic Membrane MFS (<=>EmrD) identifiant	Periplasmic Space MFP (<=>AcrA) identifiant	Outer Membrane OMF (<=>ToIC) identifiant
Lens	lpl2359	lpl2362	
Paris	lpp2505		
Phi	lpg52842647		
Lens	lpl2438	lpl2435	
Paris	lpp2584	lpp2581	
Phi	lpg52842724	lpg52842721	
Lens	lpl2062	lpl2064	
Paris	lpp2072	lpp2074	
Phi	lpg52842347	lpg52842349	
Lens	lpl2439	lpl2435	lpl2436
Paris	-	lpp2581	lpp2582
Phi	lpg52840317	lpg52842721	lpg52842722
Lens	-	lpl310	lpl308
Paris	-	lpp327	lpp325
Phi	lpg52842275	lpg52840512	lpg52840510

Tableau 9. Tableau regroupant les associations de deux protéines MFP/OMF.

Les numéros se réfèrent aux numéros des gènes tels qu'indiqués sur le site <http://genolist.pasteur.fr/LegioList/>. Ces gènes codent pour les protéines d'efflux potentielles que nous avons identifiées par l'approche bioinformatique.

	Periplasmic Space MFP (<=>AcrA) identifiant	Outer Membrane OMF (<=>ToIC) identifiant
Lens	lpl473	lpl472
Paris	lpp497	lpp496
Phi	lpg52840675	lpg52840674
Lens	lpl310	lpl308
Paris	lpp327	lpp325
Phi	lpg52840512	lpg52840510
Lens	lpl15	lpl18
Paris	lpp15	lpp18
Phi	lpg52840271	lpg52840274

Tableau 10. Tableau regroupant les protéines orphelines.

Les numéros se réfèrent aux numéros des gènes tels qu'indiqués sur le site <http://genolist.pasteur.fr/LegioList/>. Ces gènes codent pour les protéines d'efflux potentielles que nous avons identifié par l'approche bioinformatique.

Homologue à...								
	ToIC Ecoli => OMF	AcrF Ecoli => RND	AcrA Ecoli => MFP	EmrE Ecoli => SMR	McbF Ecoli => ABC		EmrD Ecoli => MFS	
Lens	lpl736	lpl1976	lpl473	lpl595	lpl814	lpl1240	lpl2160	lpl1388
Paris	lpp754	lpp1981	lpp497	lpp613	lpp838	lpp1240	lpp2187	lpp1608
Phi	lpg52840936	lpg52842217	lpg52840675	lpg52840795	lpg52841010	lpg52841508	lpg52842447	lpg52841866
Lens	lpl858	lpl1977	lpl15	lpl2507	lpl887	lpl2163	lpl2424	lpl1222
Paris	lpp889	lpp1982	lpp15	lpp2637	lpp918	lpp2190	lpp2570	lpp1222
Phi	lpg52841063	lpg52842218	lpg52840271	52842790	52841092	lpg52842450	lpg52842709	lpg52841446
Lens	lpl965		lpl507	-	lpl121	lpl2080	lpl2359	lpl1288
Paris	lpp996		lpp531	lpp2405	lpp136	lpp2091	lpp2505	lpp1289
Phi	lpg52841169		lpg52840711	-	52840377	lpg52842366	lpg52842647	lpg52841565
Lens	lpl18		lpl1793	lpl2401	lpl2596	-	lpl325	lpl645
Paris	lpp18		lpp1792	lpp2545	lpp2723	-	lpp347	lpp661
Phi	lpg52840274		lpg52842056	52842689	52842875	lpg52842277	lpg52840528	lpg52840847
Lens	lpl472			lpl1797	lpl1797	-	lpl1277	lpl398
Paris	lpp496			lpp2621	lpp1796	-	lpp1278	lpp422
Phi	lpg52840674			-	52842060	lpg52842278	lpg52841554	lpg52840602
Lens				lpl1167	lpl531	lpl1783	lpl2753	lpl2382
Paris				lpp1161	lpp555	lpp1782	lpp2900	lpp2529
Phi				52841393	52840738	lpg52842046	lpg52843037	-
Lens				lpl2469	lpl1693	-	lpl1356	lpl1619
Paris				lpp2617	lpp1694	-	lpp1360	lpp1624
Phi				52842756	52841956	lpg52843141	lpg52841635	lpg52841881
Lens				-	lpl1148	-	lpl1590	lpl1060
Paris				-	lpp1143	-	lpp1410	lpp1082
Phi				lpg52841209	lpg52841375	lpg52841746	lpg52841684	lpg52841297
Lens				lpl2210	lpl427	lpl239	lpl1278	lpl1278
Paris				lpp2238	lpp451	lpp239	lpp1279	lpp1279
Phi				lpg52841497	lpg52840629	lpg52840432	lpg52841555	lpg52841555
Lens				lpl2024	lpl1982	lpl1355	lpl315	lpl315
Paris				lpp2029	lpp1987	lpp1359	lpp334	lpp334
Phi				lpg52842263	lpg52842223	lpg52841634	lpg52840518	lpg52840518
Lens				lpl872	lpl740	lpl688	lpl499	lpl499
Paris				lpp903	lpp758	lpp706	lpp523	lpp523
Phi				lpg52841077	lpg52840940	lpg52840889	lpg52840702	lpg52840702
Lens				lpl728	lpl1407	lpl689	lpp2314	lpp2314
Paris				lpp747	lpp1586	lpp707	lpp2314	lpp2314
Phi				lpg52840929	lpg52841844	lpg52840890	lpp2314	lpp2314
Lens				lpl719	lpl637	lpl585	lpl2314	lpl2314
Paris				lpp738	lpp653	lpp604	lpp2457	lpp2457
Phi				lpg52840919	lpg52840839	lpg52840784	lpg52842599	lpg52842599
Lens				lpl867	lpl1408	lpl1855	lpl1171	lpl1171
Paris				lpp898	lpp1585	lpp1860	lpp1165	lpp1165
Phi				lpg52841072	lpg52841843	lpg52842111	lpg52841397	lpg52841397
Lens				lpl431	lpl2211	lpl675	lpl1627	lpl1627
Paris				lpp455	lpp2239	lpp692	lpp1633	lpp1633
Phi				lpg52840633	lpg52842498	lpg52840875	lpg52841890	lpg52841890
Lens				-	lpl1193	lpl674	lpl292	lpl292
Paris				-	-	lpp691	lpp308	lpp308
Phi				lpg52840440	-	lpg52840874	lpg52840493	lpg52840493
Lens				lpl1830		lpl1780	lpl2474	lpl2474
Paris				lpp1833		lpp1779	lpp2623	lpp2623
Phi				lpg52842089		lpg52842043	lpg52842761	lpg52842761
Lens						lpl1416	lpl464	lpl464
Paris						-	lpp488	lpp488
Phi						-	lpg52840666	lpg52840666

1.4. Gènes cibles retenus pour la construction de mutants chez *L. pneumophila* Lens

1.4.1. Résultats de l'étude bioinformatique chez la souche Lens

La souche Lens a la particularité d'être un isolat clinique responsable de cas signalés en France. Peu étudiée, elle présente la caractéristique de ne posséder qu'un seul plasmide endogène, ce qui peut faciliter les manipulations génétiques.

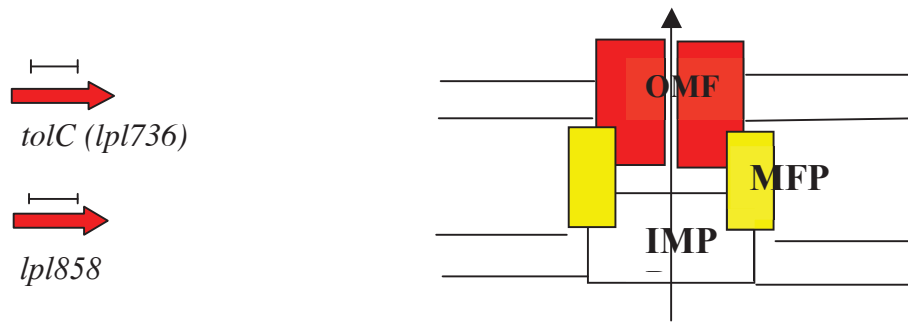
L'approche bioinformatique réalisée du génome *L. pneumophila* Lens a montré qu'il existe des gènes codant pour des protéines potentielles pouvant participer à des systèmes d'efflux. Celles-ci sont localisées dans la membrane externe (protéines homologues à TolC d'*E. coli*), dans le périplasma (protéines homologues à AcrA par exemple) ou dans la membrane interne (protéines homologues à AcrB par exemple). Ainsi chez la souche Lens, 116 protéines ont été identifiées grâce à cette approche, ce qui représente environ 4 % des protéines totales codées dans le génome de cette souche (Tableau 5). On constate qu'aucune protéine de type MATE ou de type porine n'a pu être identifiée via cette procédure. Ce résultat peut paraître surprenant, mais à ce jour une seule protéine semble avoir été annotée comme une porine chez *Legionella*, la protéine OmpS (Hoffman *et al.*, 1992). L'analyse de la structure potentielle de cette protéine ne semble pas correspondre aux structures de porines classiques et aucune publication ne rend compte de résultat en accord avec la fonction de porine. La structure des protéines de type porine ou MATE chez *Legionella* est peut-être trop particulière et difficile à identifier par homologie de séquence. Il sera certainement nécessaire de compléter cette étude par une analyse axée sur des motifs protéiques plutôt que sur des séquences de protéines complètes.

A partir des résultats obtenus par l'analyse bioinformatique, l'étude de l'organisation génétique des régions codant pour les protéines identifiées nous a permis de regrouper certaines protéines dans des systèmes complets potentiels : par exemple, une protéine de la membrane interne/ une protéine MFP périplasmique/ une protéine OMF de la membrane externe formant une pompe à efflux complète. De plus, nous avons identifié aussi des systèmes semi-complets (2 protéines) et des protéines seules ou « orphelines », c'est-à-dire codées par des gènes ne faisant pas partie d'un opéron regroupant d'autres gènes codant pour des protéines d'efflux. En ce qui concerne la souche Lens, les protéines identifiées peuvent être répertoriées ainsi :

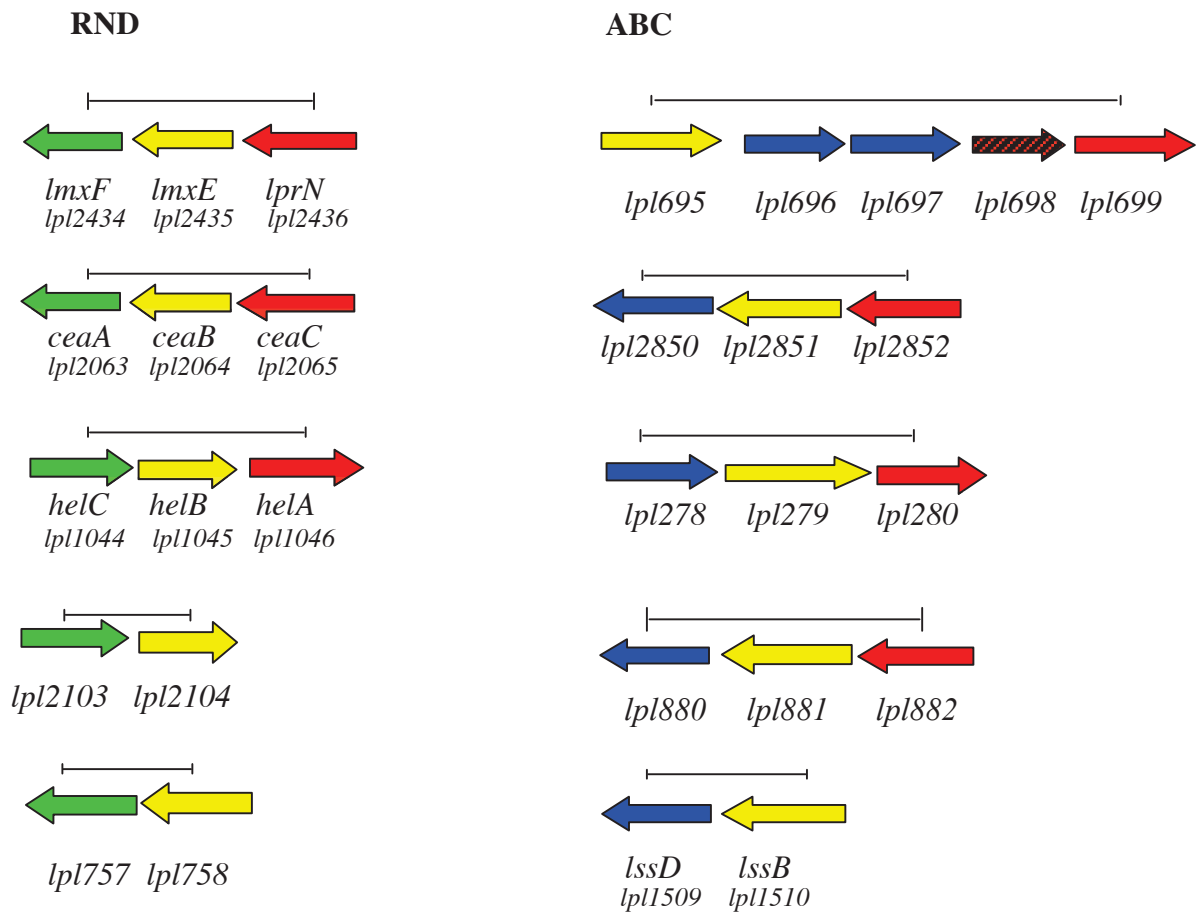
- 3 systèmes ABC/MFP/OMP complets (3 protéines)
- 3 systèmes ABC/MFP sans OMF (2 protéines)
- 2 systèmes MFS/MFP/OMF complets (3 protéines)
- 3 systèmes MFS/MFP sans OMF (3 protéines)
- 70 protéines orphelines, c'est-à-dire dont le gène codant n'est pas retrouvé dans une structure opéronique.

De manière étonnante, deux systèmes de type MFP/OMF ont ainsi été identifiés sans protéine de la membrane interne associée (au niveau de l'organisation génétique). Cela peut aussi refléter le fait qu'aucune des homologies utilisées dans notre procédure n'a permis d'identifier ces protéines, mais l'étude du gène en amont ou en aval n'a pas permis de proposer un gène codant pour une IMP dans ces deux cas.

Gènes codant pour des protéines de type TolC



Gènes codant pour des protéines de type :



■ Gènes codant pour des OMP

■ Gènes codant pour des MFP

■ Gènes codant des IMP de type RND

■ Gènes codant pour des IMP de type ABC

■ Gène annoté comme une perméase et ajouté comme cible

— Région nucléique remplacée par une cassette kan apportant la résistance à la kanamycine.

Figure 74. Gènes choisis pour l'inactivation chez *Legionella pneumophila* Lens de systèmes d'efflux potentiels. Tous les gènes ici présentés ne sont pas spécifiques à la souche Lens et ont des homologies avec des gènes retrouvés chez les souches Paris et Philadelphia.

1.4.2. Gènes retenus comme cibles pour l'inactivation et la construction de mutants de pompes à efflux chez *L. pneumophila* Lens

Afin d'initier l'étude et de valider notre approche plusieurs systèmes de pompes à efflux ont été retenus pour une inactivation au niveau génétique (Figure 74) :

- un unique gène (gènes « orphelin ») codant pour les protéines de type TolC et pouvant donc participer au fonctionnement de plusieurs mécanismes de multirésistance.
- opérons de 2 ou 3 gènes correspondant à un système semi-complet ou complet de pompe à efflux.

2. Construction des mutants chez *L. pneumophila* Lens

2.1. Choix des gènes à invalider

Nous avons décidé de construire des mutants de *L. pneumophila* Lens invalidés au niveau de gènes codant pour des protéines d'efflux. L'inactivation concerne (Figure 74) :

- 3 gènes lorsque l'on retrouve une organisation en opéron rassemblant côte-à-côte le gène codant pour une MFP suivi du gène codant pour une IMP. Dans ce cas, nous avons décidé d'invalider les trois gènes pour inactiver la pompe à efflux (ex : cas de la pompe à efflux potentielle codée par les gènes *helA*, *helB* et *helC* exprimant l'OMF, la MFP et l'IMP de la famille RND, respectivement). Il existe un cas particulier où nous avons invalidé 5 gènes (*lpl695-lpl696-lpl697-lpl698-lpl699*) car deux gènes codant pour une IMP de type ABC ont été identifiés (*lpl697* et *lpl696*) avec un indice de confiance différent (la protéine codée par *lpl696* a été identifiée par BLAST et psi-BLAST alors que la protéine codée par *lpl697* a été identifiée uniquement par BLAST). De plus, le gène *lpl698* au sein de l'opéron, non identifié par l'approche bioinformatique, pourrait coder pour une perméase de type ABC d'après l'annotation du génome.

- 2 gènes lorsque l'on retrouve une organisation rassemblant côte-à-côte le gène codant pour une MFP voisine du gène codant pour une IMP. Dans ce cas on pense que l'association MFP-IMP peut fonctionner avec une protéine de membrane externe (OMF) « orpheline » ou comme intermédiaire à l'acheminement de drogues dans le périplasme qui seront ensuite prises en charge par des systèmes d'efflux à trois composants (coopération entre pompes tripartites et pompes à efflux à deux composants);

- 1 gène lorsque le gène identifié code pour une protéine de membrane externe sans autre gène adjacent codant pour une MFP ou une IMP à proximité. Par exemple les gènes *lpl736* et *lpl858* codent pour les deux protéines plus proches homologues à TolC. Ces protéines pourraient former un canal pour l'export de drogues ou de protéines impliquées dans la virulence suivant le partenaire périplasmique auquel elles s'associent.

2.2. Stratégie d'inactivation

Pour invalider le ou les gènes que nous avons choisis nous avons adopté une approche privilégiant une recombinaison homologe (Figure 75). Dans ce cas, il s'agit d'amplifier par PCR les régions 5' et 3' du gène à invalider ou des deux gènes situés aux deux extrémités lorsqu'il s'agit d'invalider plusieurs gènes appartenant à un opéron. Les deux fragments sont ensuite ligaturés puis clonés dans un vecteur qui va servir à la recombinaison homologe : le plasmide p695. Il s'agit ensuite d'insérer une cassette de résistance à la kanamycine entre les deux fragments pour que, lors de la recombinaison chez *Legionella*, la région génomique délétée (un ou plusieurs gènes) soit remplacée par le gène de résistance. De

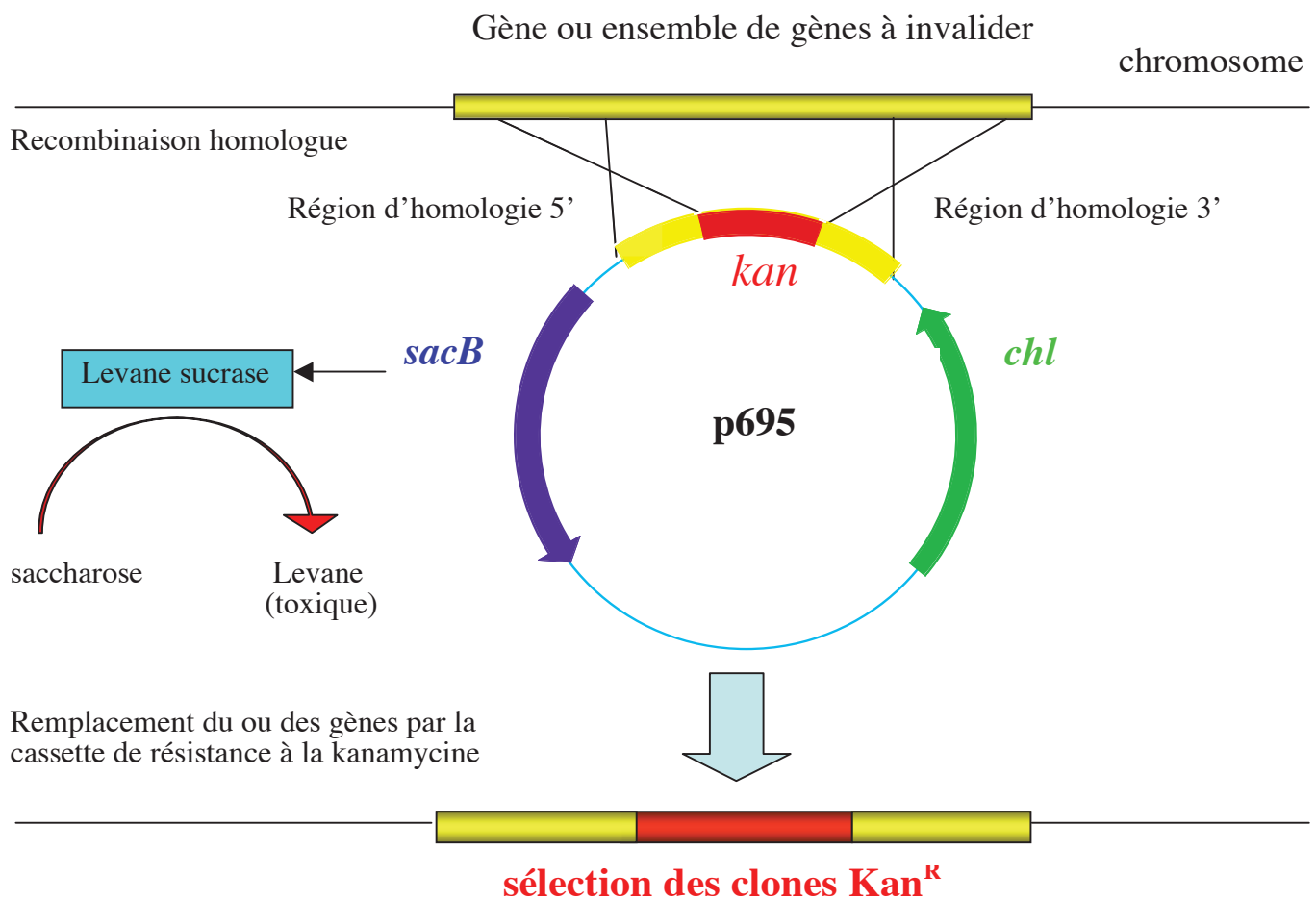


Figure 75. Stratégie d'inactivation des gènes chez *Legionella* par recombinaison homologue.

Le plasmide p695 utilisé pour la recombinaison possède : un gène de résistance au chloramphénicol (*chl*), un gène dit « suicide » (*sacB*) et un site permettant l'insertion de la construction comprenant les régions d'homologie 5' et 3' du gène à invalider ou des deux gènes situés aux extrémités lorsqu'il s'agit d'invalider un opéron. Entre les deux fragments d'homologie se situe une cassette de résistance à la kanamycine (*kan*). La première étape de la construction du plasmide s'effectue chez *E. coli*. Lors du transfert du plasmide chez *Legionella*, une recombinaison homologue peut se produire au locus concerné au niveau des régions d'homologie 5' et 3'. Le ou les gènes sont alors remplacés par la cassette de résistance à la kanamycine. Les recombinants sont ensuite sélectionnés par leur résistance à la kanamycine (clones Kan^R ce qui indique la présence de la construction), par leur sensibilité au chloramphénicol (perte du plasmide) et leur croissance en milieu gélosé supplémenté en saccharose. En effet, l'ajout de saccharose dans le milieu de croissance favorise la croissance des souches ayant perdu le plasmide car l'enzyme codée par le gène *sacB* la levane sucrase induite en présence de saccharose conduit à l'accumulation de levane qui est toxique pour la cellule bactérienne.

plus ce gène de résistance va être très intéressant pour la sélection des clones lors de la construction des mutants.

2.3. Vecteur utilisé

Le vecteur utilisé pour la recombinaison homologe est le plasmide p695 construit au laboratoire (Figure 76). Ce plasmide est dérivé du plasmide pCDPO5 utilisé par Pope *et al.* pour réaliser des mutagénèses aléatoires chez *Legionella* grâce à un transposon (dérivé du transposon Tn10) mais qui confère la résistance à la kanamycine (Pope *et al.*, 1994). Ce plasmide a la particularité d'être un vecteur de type suicide chez les bactéries à Gram négatif (Reyrat *et al.*, 1998). En effet, en présence de saccharose 5 % le produit de l'expression du gène *sacB* de *Bacillus subtilis* (Recorbet *et al.*, 1993) est une levane sucrase qui va produire du levane, polysaccharide, à partir du saccharose. La cellule bactérienne gram-négative s'empoisonne par accumulation de levane au sein du périplasme. Le plasmide p695 a été construit pour insérer les fragments permettant de réaliser les constructions nécessaires à la mutagenèse ciblée. Celui-ci est délété du fragment compris entre les deux sites de restriction NotI afin d'éliminer le transposon abritant la cassette kan et de pouvoir insérer les constructions à la place. Ce plasmide conserve la résistance au chloramphénicol.

2.4. Etape préliminaire chez *E. coli*

2.4.1. Stratégie d'amplification et résultats

2.4.1.1. Stratégie

Deux couples d'amorces P1/P2 et P3/P4 ont été dessinés de façon à amplifier les régions 5' et 3' des gènes à invalider (Figure 77). Des sites de restriction ont été dessinés au niveau de chaque amorce : des sites SallI (amorces P2 et P3) pour ligaturer les deux fragments amplifiés et des sites NotI (amorces P1 et P4) afin de cloner le fragment obtenu dans le plasmide p695.

Les étapes sont les suivantes :

- une première PCR permet d'amplifier les régions d'homologie 5'et 3' du ou des gènes à invalider.

- les deux fragments amplifiés sont digérés à l'aide de l'enzyme de restriction SallI puis sont ligaturés à l'aide de la T4 ligase.

- le produit de la ligature des deux fragments est soumis à une amplification par PCR. Les différents fragments obtenus suivant cette procédure et leur taille sont regroupés dans le tableau 13.

2.4.1.2. Résultats

Les fragments de PCR obtenus avec les gènes *lpl757*, *lpl758*, *lmxF*, *lprN*, *lpl2849*, *lpl2852*, *lpl2103*, *lpl2104*, *lssD*, *lssB*, *lpl880* et *lpl882* sont rapportées dans la Figure 95. Pour chaque amplification, nous avons obtenu un seul fragment (amplification spécifique) de la taille prédite en ciblant les gènes *lpl757* (région 5' du gène nommée '*lpl757*', 378 pb, colonne 1), '*lpl758*' (587 pb, colonne 2), '*lmxF*' (542 pb, colonne 3), '*lprN*' (498 pb, colonne 4), '*lpl2849*' (442 pb, colonne 5), '*lpl2852*' (623 pb, colonne 6), '*lpl2103*' (501 pb), '*lpl2104*' (608 pb), '*lssD*' (412 pb), '*lssB*' (570 pb), '*lpl880*' (263 pb) et '*lpl882*' (339 pb). De la même façon toutes les amorces dessinées pour les autres gènes ('*lpl278*' : 50 pb, '*lpl280*' : 687 pb, '*ceaA*' : 717 pb, '*ceaC*' : 621 pb,

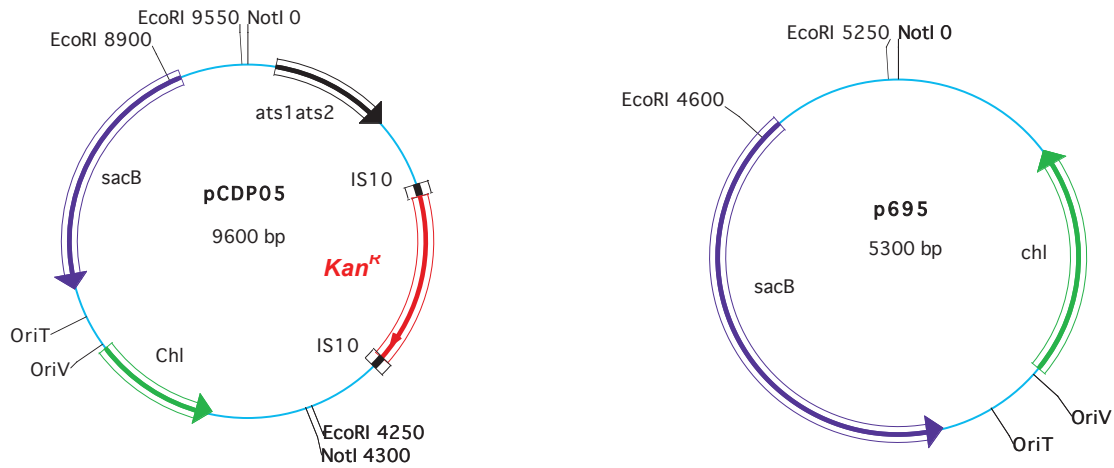


Figure 76. Carte des plasmides pCDPO5 (A) et p695 (B).

A. Carte publiée (Pope *et al.*, 1994) avec corrections apportées : un site EcoRI est déplacé avant le site NotI à 0 et le deuxième site NotI avancé par rapport à la carte originale.

B. Le plasmide p695 a été construit pour insérer les fragments permettant de réaliser les constructions nécessaires à la mutagenèse ciblée. Celui-ci est déléte du fragment compris entre les deux sites de restriction NotI afin d'éliminer le transposon Kan^R (avec les séquences de transposition) et de pouvoir insérer les constructions à la place.

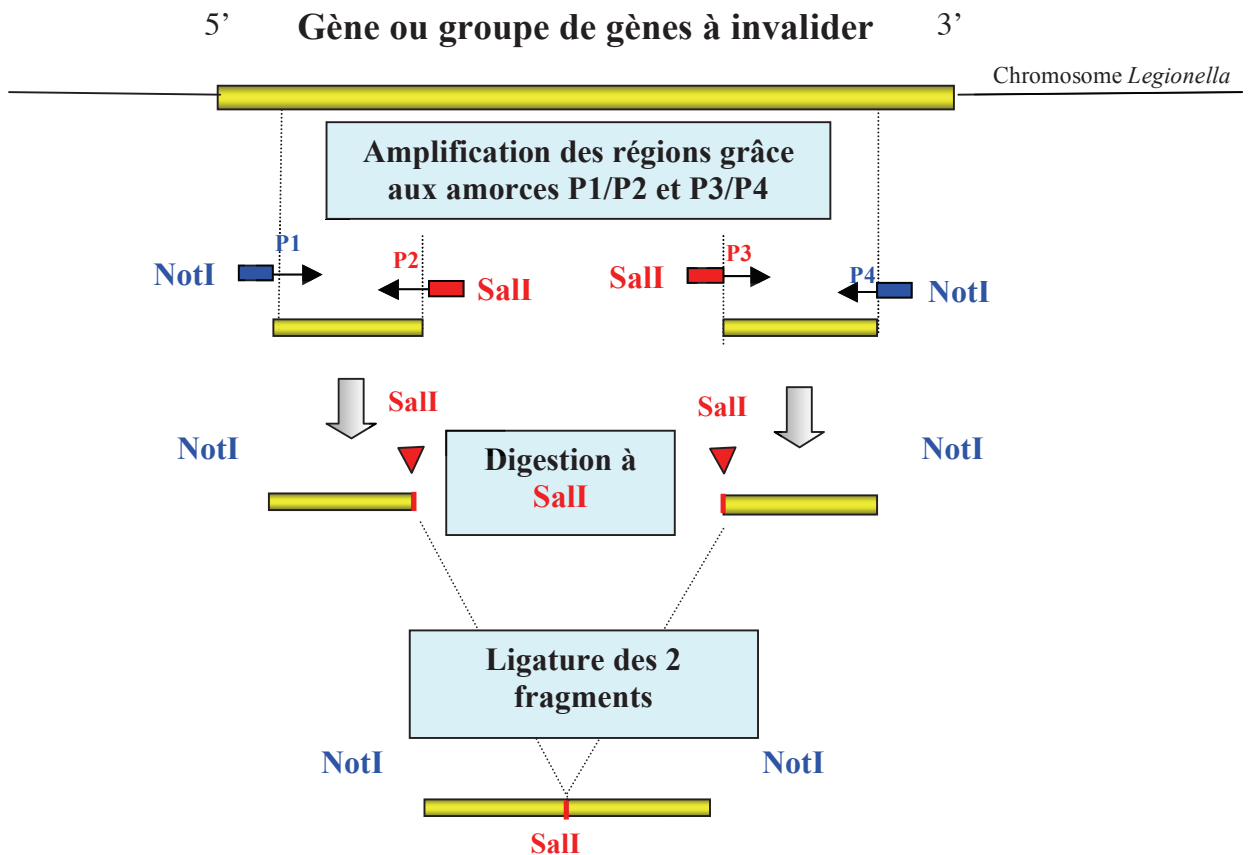


Figure 77. Démarche pour réaliser la construction contenant les deux régions d'homologie 5' et 3' du gène cible à invalider chez *Legionella*.

Tableau 11. Séquence des amorces P1, P2, P 3 et P4, position et taille des amplicons générés.

Les couples d'amorces P1/P2 et P3/P4 permettent d'amplifier deux fragments (dont la taille est indiquée dans la colonne amplicon) correspondant aux régions d'homologies 5' et 3' du ou des gènes à invalider. Les amorces possèdent des séquences ajoutées pour insérer un site de restriction à l'enzyme SalI (séquences en rouge) ou à l'enzyme NotI (séquences en Bleu). Les deux fragments ont ensuite été ligaturés après digestion à SalI.

pb : « paire de base ».

amorce	séquence (5'-3')	gène	Tm	Amplicon (pb)	Ligature (pb)
P1	CAAATTTTAC CGGGCCG CAAGTTGTTTGCG	<i>tolC</i>	69,5	516	1049
P2	CTTTGGCCTG GTCGAC TTTGCC	<i>tolC</i>	68	533	
P3	ATTTTCA GTCGAC CGAGTGAAAACT	<i>tolC</i>	67		
P4	GAATGAATCTTT CGGGCCG CACAGACATAC	<i>tolC</i>	67		
P1	AGGCGGCCG ggcatgattgctaaccg	<i>lpl858</i>	61,4	471	910
P2	ACGCGTCGAC gttctggtgatcccgag	<i>lpl858</i>	61,7	439	
P3	ACGCGTCGAC ccgctatcgaatcctgaatgg	<i>lpl858</i>	61,8		
P4	CAGCGGCCG cccgcatgacctgtattca	<i>lpl858</i>	61,1		
P1	AGGCGGCCG aaaacaaaagagctttcgctc	<i>880</i>	60,1	263	602
P2	ACGCGTCGAC agtcaagcgcaaccaggc	<i>880</i>	60,2	339	
P3	ACGCGTCGAC tcaaaagcatcaccctaaagg	<i>882</i>	60,5		
P4	AGGCGGCCG tgccatttttagcttattatcagg	<i>882</i>	60,9		
P1	AGGCGGCCG ttattgaaagaccgttctggc	<i>lmxF</i>	60,5	542	1048
P2	ACGCGTCGAC aaaaccaccacattccctactcc	<i>lmxF</i>	60,5	498	
P3	ACGCGTCGAC agtcgcaggcccgtcat	<i>lprN</i>	60,5		
P4	AGGCGGCCG cttgaggcaaatgattttcttg	<i>lprN</i>	60,6		
P1	AGGCGGCCG catcgctttggctgtgctg	<i>lpl2849</i>	60,2	442	1065
P2	ACGCGTCGAC atttgttggtgccaggctatcg	<i>lpl2849</i>	60,2	623	
P3	ACGCGTCGAC atccattgccatcgattaag	<i>lpl2852</i>	60		
P4	AGGCGGCCG tttaactgcccagtaatccagcg	<i>lpl2852</i>	60,6		
P1	AGGCGGCCG caattactggcaatcattcttattcctg	<i>lpl2103</i>	60,2	501	1109
P2	ACGCGTCGAC acttatttgccactgatggg	<i>lpl2103</i>	60,3	608	
P3	ACGCGTCGAC tcccggatacagttctgatgaag	<i>lpl2104</i>	60,5		
P4	AGGCGGCCG aacataaaacaaaggcgtaaagataagg	<i>lpl2104</i>	60,5		
P1	AGGCGGCCG gaccggttatcctggcg	<i>lpl757</i>	60,1	378	965
P2	ACGCGTCGAC ttgcaattggggtgaac	<i>lpl757</i>	60,5	587	
P3	ACGCGTCGAC tctaataattctttgaaggagtcattc	<i>lpl758</i>	60		
P4	AGGCGGCCG tggtatcactgtctgtatcgagtt	<i>lpl758</i>	60,1		
P1	AGGCGGCCG tgttattttatgggtctcttctgttt	<i>lssD</i>	60,7	412	982
P2	ACGCGTCGAC atacgtgattcatatagagacaattgatcc	<i>lssD</i>	60,3	570	
P3	ACGCGTCGAC ctaacgaaggaactattttgctgga	<i>lssB</i>	60,2		
P4	AGGCGGCCG ctctcaccgttaccagtc	<i>lssB</i>	60		
P1	AGGCGGCCG caaccactagtcagtattaatggagtcagc	<i>lpl696</i>	60,7	555	1150
P2	ACGCGTCGAC catagtcacaactccctctgg	<i>Lpl696</i>	60,1	595	
P3	ACGCGTCGAC gacataagggcaacagagaggc	<i>lpl699</i>	60,3		
P4	AGGCGGCCG gcggatgtttagggctacttga	<i>lpl699</i>	60,7		
P1	AGGCGGCCG cattattctttgttctgggtggt	<i>ceaA</i>	60,2	717	1338
P2	ACGCGTCGAC cttgcggactacaatcagtgtt	<i>ceaA</i>	60,6	621	
P3	ACGCGTCGAC ttaaaaatcgccctgatcgg	<i>ceaC</i>	60,1		
P4	AGGCGGCCG cattgctatcaccgttgccttg	<i>ceaC</i>	60,7		
P1	AGGCGGCCG aaacaatctcatccatcgga	<i>lpl278</i>	60,7	503	1190
P2	ACGCGTCGAC ggggataaaaatgatcaatagaatgc	<i>lpl278</i>	60,3		

Tableau 11 (suite)

P3	ACGCGTCGAC gtgaacaactggatcaatcaaggag	<i>lpl280</i>	60,1	687	
P4	AGGCGGCCGC tcttgtaaattgacttctgcattaatcc	<i>lpl280</i>	60,3		
P1	AGGCGGCCGC tcggtaccctttacttttaa	<i>helC</i>	60,4	411	1188
P2	ACGCGTCGAC agtttttggtcacttgatgcca	<i>helC</i>	60,9		
P3	ACGCGTCGAC cgccaagtctttatccctttacc	<i>helA</i>	60,4	777	
P4	AGGCGGCCGC tcatgaaagacgtaatacaaacctgg	<i>helA</i>	60,7		
P1	AGGCGGCCGC gcagatattcttctttgatgaactcctt	<i>Pho1</i>	60,8	159	420
P2	ACGCGTCGAC accagaaggccaaactgtttatga	<i>Pho1R</i>	60,3		
P3	ACGCGTCGAC gccacggcgcaaaaagtga	<i>Pho2</i>	60,9	261	
P4	AGGCGGCCGC cattctctccagtcttatgaaaagcat	<i>Pho2R</i>	60,5		

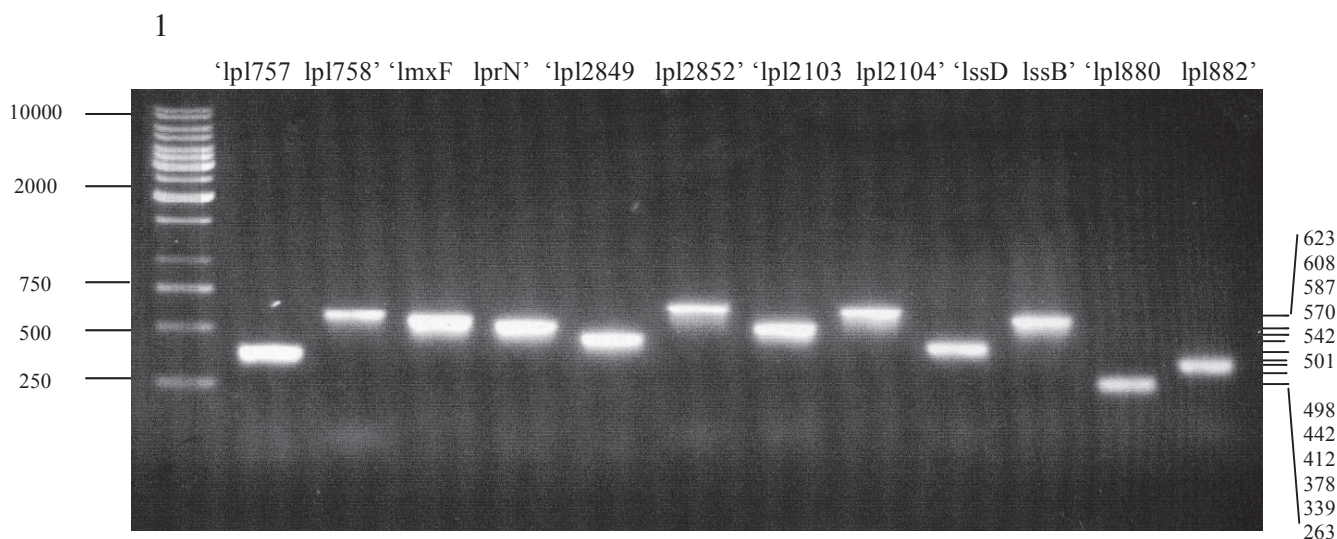


Figure 78. Electrophorèse sur gel des fragments PCR obtenus avec les amorces P1/P2 et P3/P4 fragments obtenus à partir de l'ADN chromosomique de *L. pneumophila* Lens.

Puits 1 : marqueur « GeneRuler™ 1kb DNA Ladder ». La taille des bandes en paires de bases est indiquée pour le marqueur et les fragments obtenus respectivement à gauche et à droite de la figure. A chaque fois une apostrophe placée avant ou après la désignation du gène indique le fragment obtenu avec le couple d'amorces P1/P2 amplifiant la région d'homologie 5' (par exemple 'lpl757 dans le cas de l'amplification de l'invalidation des deux gènes *lpl757* et *lpl758*) et le fragment obtenu avec le couple d'amorces P3/P4 amplifiant la région d'homologie 3' (*lpl758*' dans l'exemple précédent).

helA : 777 pb, *helC* : 411 pb, *lpl696* : 555 pb et *lpl699* : 595 pb) ont permis d'obtenir les fragments PCR attendus (résultat non montré).

Les amplicons générés ont été digérés par *Sall* car un site de restriction est présent dans les amorces P2 et P3 puis les régions 5' et 3' ont été ligaturés. Une seconde PCR a alors été réalisée sur le produit de la ligature (Figure 79). Encore une fois, nous constatons que les amplicons générés sur les ligatures des fragments générés précédemment (figure 95) sont bien de la taille attendue : '*lpl757-lpl758*' (965 pb), '*lmxF-lprN*' (1040 pb), '*lpl2849-lpl2852*' (1065 pb) avec en plus une bande aspécifique d'environ 450 pb, '*lpl2103-lpl2104*' (1109 pb), '*lssD-lssB*' (982 pb) et '*lpl880-lpl882*' (602pb). Les résultats de la PCR sur les autres ligatures ont aussi été validés ('*lpl278-lpl280*' : 1190 pb, '*ceaA-ceaC*' : 1338 pb, '*helA-helC*' : 1188 pb, '*lpl696-lpl699*' : 1150 pb). Chaque produit de PCR a été contrôlé par une digestion à *Sall* qui permet de libérer deux fragments (Figure 80) et de vérifier qu'ils sont en proportion équivalente.

Les digestions à *Sall* des PCR sur les ligatures suivantes ont donné des fragments de la taille attendue : '*lpl2849-lpl2852*' (fragments de 442 pb et 623 pb), '*lpl2103-lpl2104*' (501 pb et 608 pb), '*lssD-lssB*' (fragments de 412 pb et 570 pb) et '*lpl880-lpl882*' (263 pb et 339 pb). Les autres ligatures analysées par restriction sont aussi valides : '*lpl757-lpl758*' (378 et 587 pb), '*lmxF-lprN*' (542 et 498 pb), '*lpl2849-lpl2852*' (442 et 623 pb), '*lpl278-lpl280*' (503 et 687 pb), '*ceaA-ceaC*' (717 et 621 pb), '*helA-helC*' (777 et 411 pb) et '*lpl696-lpl699*' (555 et 595 pb). Les amplicons contrôlés sont prêts pour être clonés dans le vecteur p695 qui est répliquatif chez *E. coli* et *Legionella*.

2.4.2. Clonage des amplicons chez *E. coli*

Les amplicons subissent un traitement en deux étapes : clonage dans un vecteur d'*E.coli* puis insertion du gène de résistance à la kanamycine dans l'amplicon. Les fragments d'ADN obtenus après PCR sur la ligature ont été purifiés puis digérés par l'enzyme *NotI* (sites *NotI* introduits aux extrémités des amorces P1 et P4; voir Figure 82). Nous avons ensuite cloné ces fragments purifiés dans le site *NotI* du plasmide p695 déphosphorylé et transféré le plasmide hybride par électroporation dans la souche *E. coli* DH5 α . Les transformants, sélectionnés sur le milieu gélosé supplémenté en chloramphénicol, ont été analysés par extraction du plasmide puis par coupure à *NotI*. Le plasmide hybride est ensuite ouvert par digestion à l'enzyme de restriction *Sall* afin d'insérer le gène de résistance à la kanamycine, préalablement obtenu par PCR et digéré à l'aide de l'enzyme *Sall*. Le mélange de ligature réalisé a été introduit dans la souche *E.coli* DH5 α et les transformants ont été sélectionnés sur le milieu gélosé additionné de chloramphénicol et de Kanamycine. Les transformants résistants à la kanamycine et au chloramphénicol sont contrôlés par analyse de restriction des plasmides qu'ils abritent. Dans le cas du plasmide analysé en Figure 99 trois types de digestions ont été réalisées :

- une digestion à *NotI* permet de libérer la construction complète insérée dans le plasmide (gène de résistance à la kanamycine et les deux amplicons, 2373 pb, puits 3)
- une digestion à *Sall* permet de libérer le gène de résistance à la kanamycine (1264 pb, puits 4)
- une double digestion à *Sall* et à *NotI* permet de libérer les deux amplicons ('*lpl2103* et '*lpl2104*' (501 et 608pb respectivement, puits 5) correspondant aux régions 5' et 3' du gène cible.

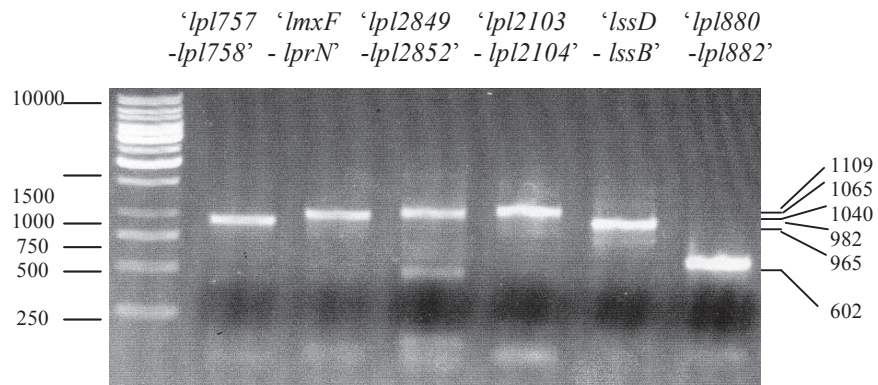


Figure 79. Electrophorèse sur gel des amplicons obtenus après PCR avec les amorces P1/P4 sur le produit de la ligation des fragments de PCR obtenus précédemment (voir Figure 78).

Sall

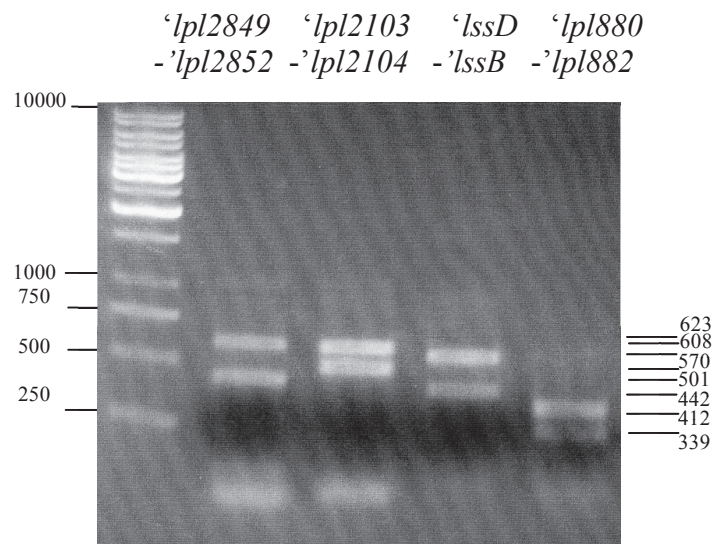


Figure 80. Electrophorèse sur gel après analyse de restriction à *Sall* des amplicons obtenus avec les amorces P1 et P4 : *'lpl2849 -lpl2852* (colonne 2), *'lpl2103-lpl2104* (colonne 3), *'lssD-lssB* (colonne 4) et *'lpl880 -lpl882* (colonne 5).

Colonne 1 : marqueur de taille « GeneRuler™ 1kb DNA ladder ».

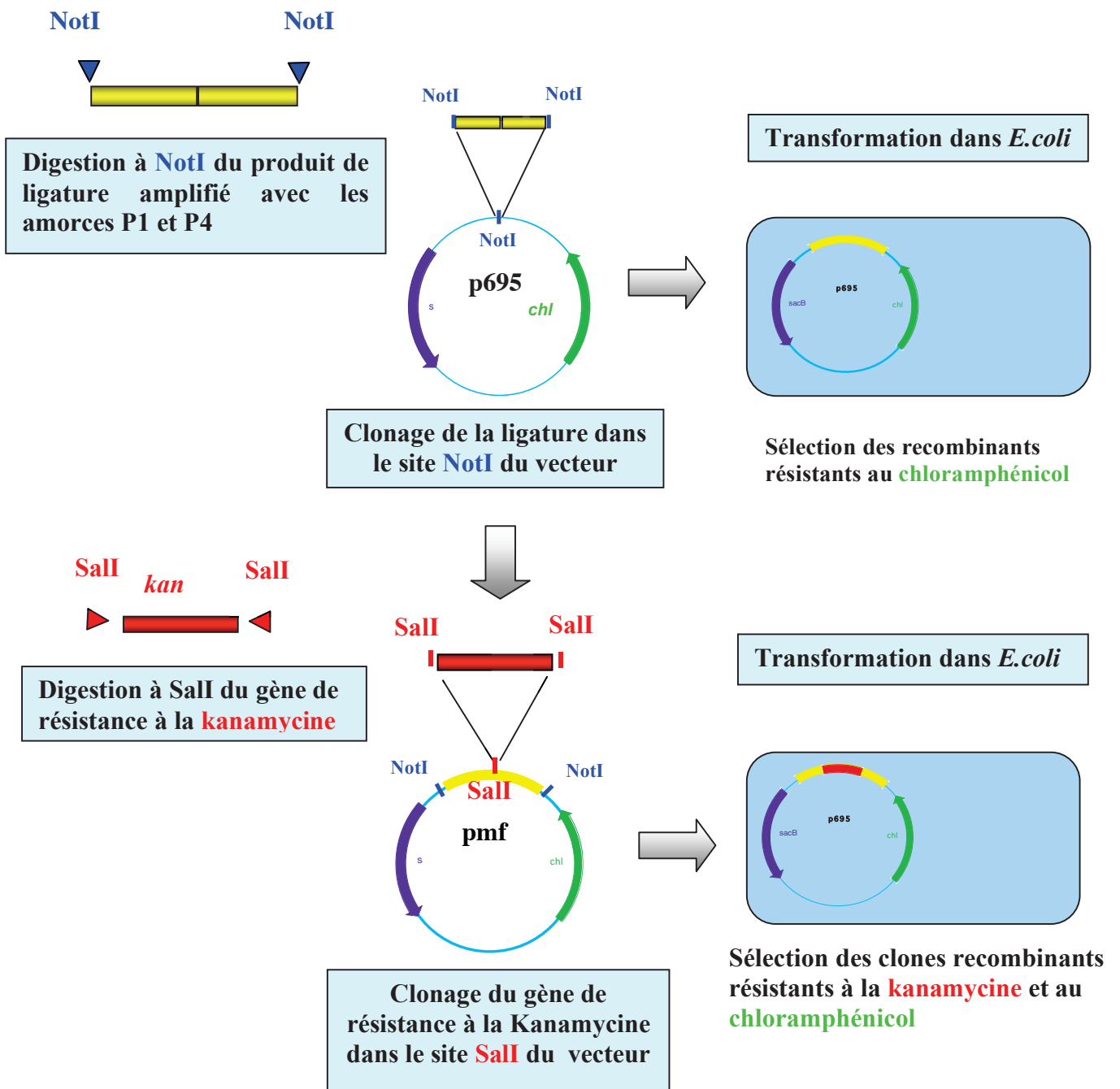


Figure 81. Etapes du clonage de la construction et amplifications chez *E.coli*.
chl : gène conférant la résistance au chloramphénicol, *kan* : gène conférant la résistance à la kanamycine.

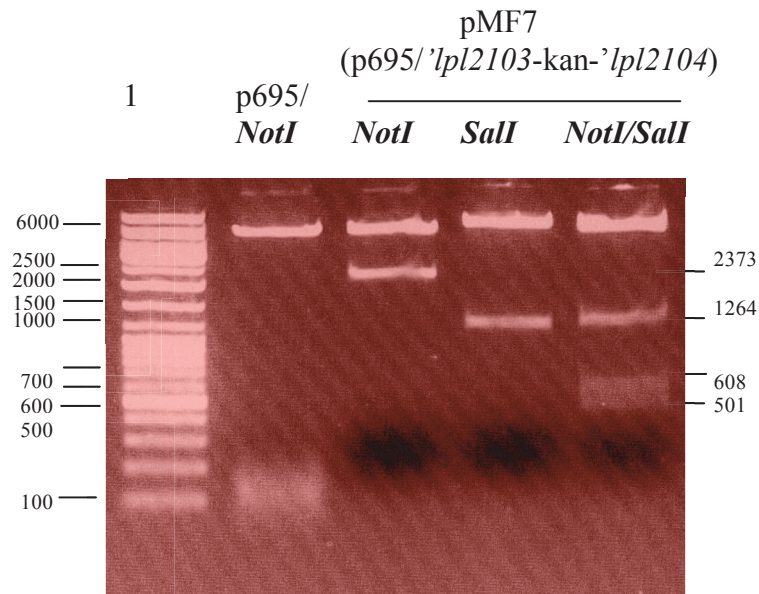


Figure 82. Electrophorèse sur gel après analyse de restriction du plasmide contenant la construction p695/'*lpl2103*-kan-'*lpl2104*' (plasmide pMF7) par une digestion à *NotI* (colonne 4) à *Sall* (colonne 5) et par une double digestion à *NotI* et à *Sall* (colonne 6).

Le vecteur p695, a également été linéarisé par un digestion à *Sall* (colonne 2). Puits 1 : marqueur « Gene ruler DNA ladder Mix ».

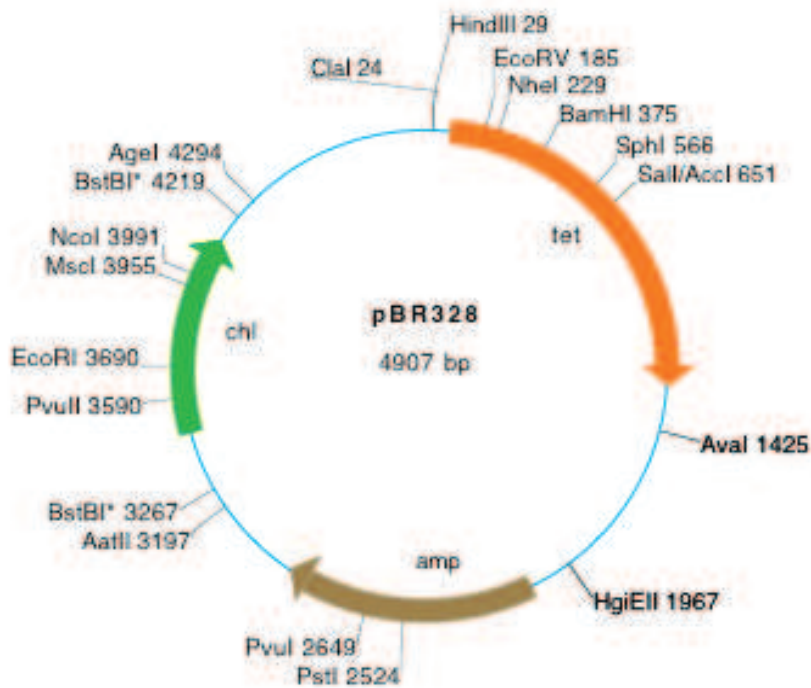


Figure 83. Carte du plasmide pBR328.

Le plasmide répliquatif pBR328 contient 3 gènes de résistance aux antibiotiques : le gène *chl*, le gène *tet* et le gène *bla* conférant la résistance au chloramphénicol, à la tétracycline et à l'ampicilline, respectivement.

Suivant cette procédure, nous avons donc construit 12 plasmides avec succès et qui sont conservés dans des souches *E. coli* répertoriées dans le tableau de la Fiche technique 1.

Pour chaque construction, 2 à 3 clones ont été mis en conservation, y compris les clones possédant les constructions intermédiaires (sans le gène de résistance à la kanamycine). Certaines souches possèdent la construction avec une cassette de résistance à la Kanamycine de type FRT (souches 13163 et 13161 et leurs clones dérivés) capable de s'exciser. Ce système très intéressant suppose une transformation avec un second plasmide portant la FLP recombinase (origine : levure) qui en reconnaissant les sites FRT est capable d'exciser la cassette. Cette technique pourra être mise en place ultérieurement afin de voir si elle est fonctionnelle chez *Legionella*, ce qui permettrait d'obtenir les mutants Kan^S.

2.5. Construction de mutants altérés pour des pompes à efflux potentielles chez *L. pneumophila* : étape chez *Legionella*

2.5.1. Mise au point d'un protocole de transformation de *Legionella*

La technique de transformation de *Legionella* décrite par Ciancotto et utilisée au Centre national de référence des Legionelles (CNRL) consiste à préparer des cellules compétentes à partir de culture bactérienne de trois jours sur milieu gélosé en boîte de pétri (Ciancotto & Fields, 1992). Nous avons choisi cependant de mettre au point une technique en partant de cellules bactériennes cultivées en milieu liquide.

Le plasmide pBR328 (portant un gène de résistance au chloramphénicol et testé comme réplicatif chez *Legionella*, Figure 83) a été transféré par électroporation dans des cellules bactériennes récoltées à différentes densités optiques (D.O : 0,4 ; 1 ; 1,8 et 2,5). Le plus grand nombre de transformants a été obtenu avec les cultures à 37°C dont la D.O. est comprise entre 1,6 et 1,8 (fin de phase exponentielle chez *Legionella*) et avec 1000 ng d'ADN du plasmide pBR328. Nous avons testé une culture à D.O : 1,8 en électroporant 100, 500 et 1000 ng de pBR328. Les cultures d'expression pures ou diluées au 1/10^e ont été étalées sur milieu gélosé et les colonies ont été comptées après une semaine d'incubation. Grâce à cette technique nous avons pu obtenir une « efficacité de transformation » de 2×10^3 colonies ou CFU/ μ g d'ADN plasmidique de pBR328. Les cellules préparées selon cette technique sont donc compétentes pour la transformation et la quantité de 1 μ g correspondant à la meilleure efficacité de transformation a été retenue pour l'électroporation des plasmides recombinants que nous avons construits, même si cette quantité peut paraître importante dans ce type de technique. Cependant, le plasmide pBR328 utilisé alors n'était peut-être pas optimal en terme de taux de transformants obtenus.

2.5.2. Obtention de mutants de *Legionella* ciblés

Les cellules compétentes de *Legionella* obtenues selon la technique mise au point ont été utilisées pour transférer les plasmides construits et extraits à partir d'*E. coli*. Le plasmide dans lequel tous les clonages ont été effectués a la particularité d'être un vecteur de type suicide chez les bactéries à Gram négatif, c'est-à-dire que nous avons la possibilité de contre sélectionner les cellules bactériennes qui l'abritent en ajoutant simplement du saccharose dans le milieu de culture gélosé. Cette caractéristique nous a permis de suivre une procédure en trois étapes pour obtenir les mutants de recombinaison de *L. pneumophila* :

1- transformation des cellules de *Legionella* selon notre technique avec les plasmides hybrides construits au laboratoire et sélection des transformants résistants au chloramphénicol (sélection des cellules bactériennes portant le plasmide);

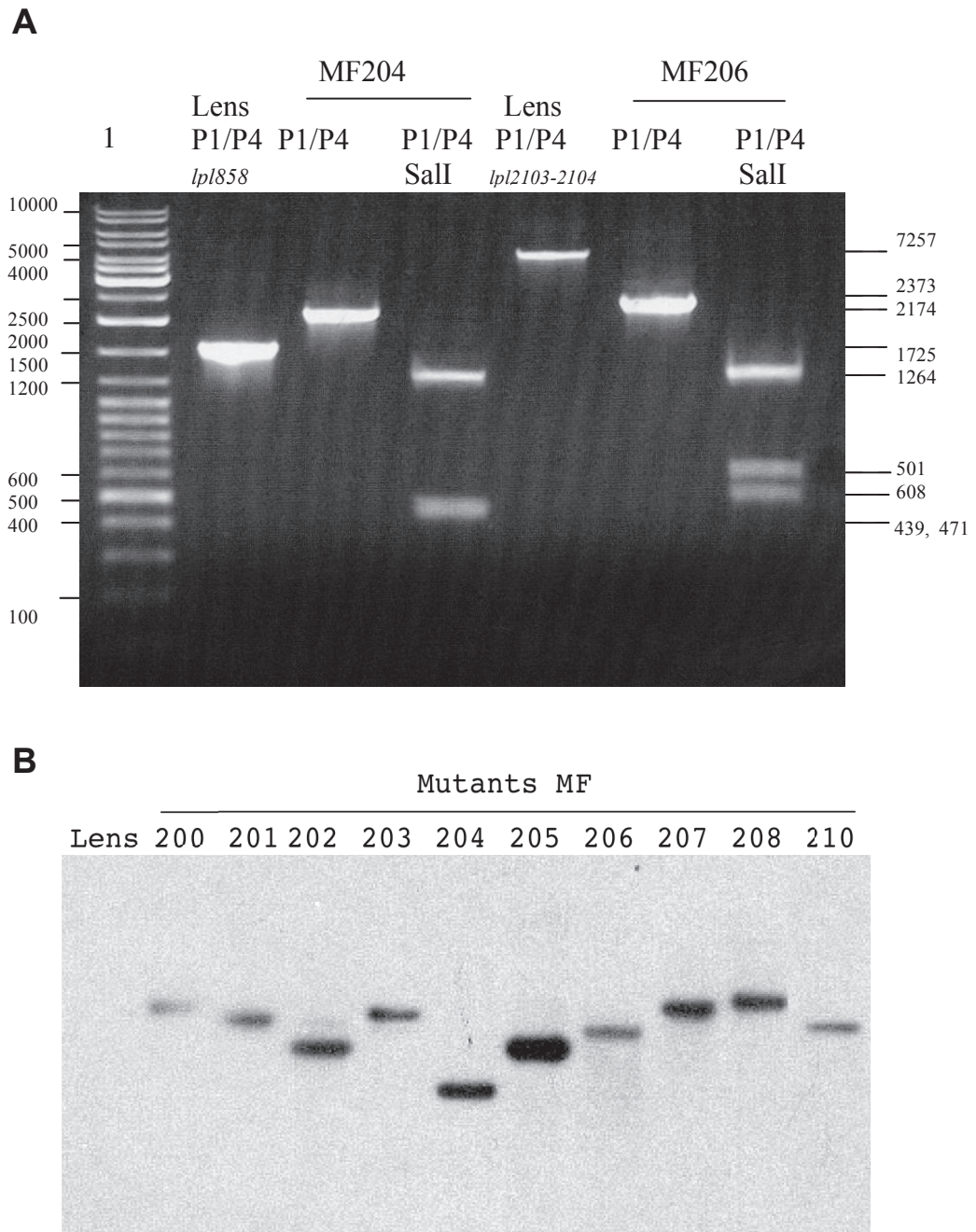


Figure 84. Analyse des mutants de *Legionella* obtenus.

A. Electrophorèse sur gel des amplicons obtenus sur l'ADN chromosomique des mutants MF204 et MF206 et analyses de restrictions par coupure des fragments obtenus à SalI. Amplifications P1/P4 sur le gène *lpl858* chez *L. pneumophila* et chez le mutant MF204 (puits 2 et 3) et sur les gènes *lpl2103-2104* chez Lens et le mutant MF206 (puits 4 et 5). Digestions à SalI des produits de PCR obtenus avec les mutants MF204 (puits 4) et MF206 (puits 7). Puits 1 : marqueur « Gene ruler™ DNA ladder mix ».

B. Contrôle par « southern blot » des mutants obtenus : L'ADN chromosomique de *Legionella* a été extrait puis digéré à BamHI et à BglIII. Les bandes révélées suite à l'hybridation avec la sonde Kan montrent pour chaque mutant une bande unique (un unique site d'insertion) et différente pour chaque mutant (insertion de la cassette à différents locus). Le chromosome de Lens est utilisé en contrôle négatif.

2- les transformants obtenus sont réisolés sur milieu gélosé supplémenté en kanamycine (sélection des cellules portant le plasmide recombinant)

3- les cellules recombinantes sont finalement sélectionnées par un réisolement sur un milieu gélosé additionné de saccharose et de kanamycine (sélection des cellules recombinantes par perte du plasmide en présence de saccharose), puis testées pour la perte de résistance au chloramphénicol par réplique.

En appliquant cette démarche nous avons réussi à obtenir nos mutants de systèmes d'efflux de *L. pneumophila* (souches MF200 à MF212 regroupées au sein de la fiche technique 1).

2.5.3. Contrôle de la construction génétique sur les chromosomes des mutants de *L. pneumophila*

La présence de la construction dans les recombinants sélectionnés sur milieu gélosé est contrôlée après amplification PCR de la région génétique altérée. Après extraction de l'ADN chromosomique, une PCR de contrôle a été réalisée avec les amorces P1 et P4. Chaque fragment de PCR obtenu a été digéré à *SalI* afin de vérifier la libération des deux fragments correspondant aux régions d'homologie 5' et 3' et du gène de résistance à la kanamycine (Figure 84. A).

Par exemple, l'amplicon obtenu en ciblant le gène *lpl858* (Figure 84.A) du mutant MF204 (2174 pb, puits 3) a une taille plus importante que celui observé chez la souche parentale *L. pneumophila* (1725 pb, colonne 2). En effet, la taille du gène invalidé est inférieure à la taille de la construction. De plus, une digestion à *SalI* de l'amplicon dans le cas de ce mutant (puits 4) permet de libérer le gène de résistance à la kanamycine (1264 pb) ainsi que les deux fragments très proches correspondant aux régions 5' et 3' du gène *lpl858* invalidé (471 et 439 pb respectivement). De même, le produit de PCR obtenu en amplifiant la séquence comprenant les gènes *lpl2103* et *lpl2104* (2373 pb, puits 6) chez le mutant MF206 donne un fragment de PCR de taille inférieure à celui observé avec la souche parentale (4257 pb, puits 5). La construction insérée peut être recoupée par digestion *SalI* (puits 7) libérant de même le gène de résistance à la kanamycine et deux fragments ligaturés en proportion équivalente (501 et 608 pb). Enfin, un séquençage des amplicons obtenus a été effectué pour les mutants M204, MF205 et MF206 et confirme l'insertion du gène de résistance à la kanamycine au bon locus. Les mutants obtenus par cette méthode sont donc ceux attendus car la recombinaison s'est faite au bon locus et la construction insérée correspond à celle espérée. Les recombinants obtenus peuvent par conséquent être analysés. Il est à noter qu'un mutant de contrôle a aussi été construit dans le gène codant pour une phosphatase alcaline. Il servira de témoin négatif dans l'analyse des phénotypes associés aux mutants de pompes à efflux.

Les recombinants ont également été contrôlés par « Southern blot » (révélation par « Southern blot » de bandes spécifiques en utilisant comme sonde le gène de résistance à la kanamycine, voir Figure 84. B). Pour toutes les souches mutantes dérivées de *Legionella pneumophila* Lens, un seul site d'insertion de la cassette kan a été identifié, confirmant ainsi la construction génétique attendue dans cette technique de mutagenèse. Les mutants obtenus chez *L. pneumophila* Lens sont regroupés dans le Tableau 12.

Tableau 12. Mutants invalidés chez *L. pneumophila* Lens.

Génomes *L. pneumophila* Lens et Paris disponible sur <http://genolist.pasteur.fr/LegioList/>; * mutant dans un autre gène qu'un système d'efflux

Mutant Lens	Type d'invalidation	Gènes invalidés chez Lens	Protéine potentielle codée (famille)	Gène homologue Philadelphia	Gène homologue Paris
MF200	opéron	<i>lpl2850</i> <i>lpl2851</i> <i>lpl2852</i>	IMP (ABC) MFP OMF	<i>lpg2923</i> <i>lpg2924</i> <i>lpg2925</i>	<i>lpp2990</i> <i>lpp2991</i> <i>lpp2992</i>
MF201	gène	<i>lpl736 (tolC)</i>	OMF	<i>lpg699</i>	<i>Lpp754</i>
MF202	opéron	<i>lpl880</i> <i>lpl881</i> <i>lpl882</i>	IMP(ABC) IMP(ABC) MFP	<i>lpg849</i> <i>lpg850</i> <i>lpg851</i>	<i>lpp911</i> <i>lpp912</i> <i>lpp913</i>
MF203	opéron	<i>lpl1509 (IssD)</i> <i>lpl1510 (IssB)</i>	MFP IMP (ABC)	<i>Lpg1517 (IssD)</i> -	<i>lpp1474 (IssD)</i> <i>lpp1473 (IssB)</i>
MF204	gène	<i>lpl858</i>	OMF	<i>lpg827 (tolC)</i>	<i>lpp889</i>
MF205	opéron	<i>lpl757</i> <i>lpl758</i>	IMP (RND) MFP	<i>lpg720</i> <i>lpg721</i>	<i>lpp786</i> <i>lpp787</i>
MF206	opéron	<i>lpl2103</i> <i>lpl2104</i>	IMP (RND) MFP	<i>lpg2177</i> <i>lpg2178</i>	<i>lpp2129</i> <i>lpp2130</i>
MF207	opéron	<i>lpl2434 (ImxF)</i> <i>lpl2435 (ImxE)</i> <i>lpl2436 (lprN)</i>	IMP (RND) MFP OMF	<i>lpg2512</i> <i>lpg2513</i> <i>lpg2514</i>	<i>lpp2580 (ImxF)</i> <i>lpp2581 (ImxE)</i> <i>lpp2582 (lprN)</i>
MF208	opéron	<i>lpl1044 (helC)</i> <i>lpl 1045 (helB)</i> <i>lpl1046 (helA)</i>	OMF MFP IMP (RND)	<i>lpg1006</i> <i>lpg1007</i> <i>lpg1008</i>	<i>lpp2373</i> <i>lpp2372</i> <i>lpp2371</i>
MF209	opéron	<i>lpl 2063 (ceaA)</i> <i>lpl 2064 (ceaB)</i> <i>lpl 2065 (ceaC)</i>	IMP (RND) MFP OMF	<i>lpg1029</i> <i>lpg1028</i> <i>lpg1027</i>	<i>lpp2373</i> <i>lpp2372</i> <i>lpp2371</i>
MF210	opéron	<i>lpl695</i> <i>lpl696</i> <i>lpl697</i> <i>lpl698</i> <i>lpl699</i>	MFP IMP (ABC) IMP (ABC) Perméase ABC OMF	<i>lpg658</i> <i>lpg659</i> <i>lpg660</i> <i>lpg661</i> <i>lpg662</i>	<i>lpp713</i> <i>lpp714</i> <i>lpp715</i> <i>lpp718</i> <i>lpp719</i>
MF211	gène	<i>lpl1818</i>	Phosphatase alcaline*	<i>lpg1852</i>	<i>lpp1819</i>
MF212	opéron	<i>lpl278</i> <i>lpl279</i> <i>lpl280</i>	IMP (ABC) MFP OMF	<i>lpg224</i> <i>lpg225</i> <i>lpg226</i>	<i>lpp283</i> <i>lpp284</i> <i>lpp285</i>

Tableau 13. Sensibilité de *L. pneumophila* Lens et des mutants invalidés vis-à-vis de différents composés toxiques

La concentration minimale inhibant 100% de la croissance bactérienne (MIC 100) a été évaluée après croissance sur BCYE additionné du composé à 30°C. Les lectures ont été effectuées jusqu'à 15 jours pour prendre en compte d'éventuels retards de croissance. **SDS** : Sodium dodécyl sulfate, **CTAB** : bromure d'hexadécyltriméthylammonium, **POL** : Polymixine B, **Benz** : Chlorure de Benzalkonium, **TET** : Tétracycline, **ERY** : Erythromycine, **DEO** : Déoxycholate, **NAL** : Acide Nalidixique, **NOR** : Norfloxacine, **BET** : Bromure d'éthidium, **ACR** : Orange Acridine, **BM** : Bleu de Méthylène, **R6G** : Rhodamine 6G, **Zn** : sulfate de zinc, **Ni** : sulfate de nickel, **Mn** : sulfate de manganèse.

Souche	Génotype	famille d'efflux	MIC 100 (µg/ml)																	
			SDS	CTAB	POL	BENZ	TET	ERY	NOV	DEO	NAL	NOR	BET	BM	ACR	R6G	Zn	Co	Ni	Mn
Lens	wt		0,125	50	0,16	100	400	0,5	6,25	100	5	12	100	100	400	50	400	200	800	100
MF200	<i>Δpl2849-2850-2851</i>	ABC	0,125	25	0,16	50	400	0,25	6,25	100	5	6	100	100	200	50	400	200	400	-
MF201	<i>Δpl736</i>	OMP	0,031	25	0,16	25	400	0,031	3,125	12,5	5	12	25	50	400	50	400	200	400	100
MF202	<i>Δpl880-881-882</i>	ABC	0,125	50	0,16	50	400	0,25	6,25	100	5	-	100	100	400	50	400	200	800	100
MF203	<i>ΔplssD-lssB</i>	ABC	0,125	50	0,16	50	400	0,25	6,25	100	5	6	100	100	400	50	400	200	800	100
MF204	<i>Δpl858</i>	OMP	0,125	50	0,16	100	200	0,25	6,25	100	5	6	50	100	400	25	400	200	800	100
MF205	<i>Δpl757-758</i>	RND	0,062	25	0,16	100	400	0,25-0,5	6,25	100	5	6	100	50	400	25	200	200	400	50-100
MF206	<i>Δpl2103-2104</i>	RND	0,125	25	0,16	100	400	0,25	6,25	100	5	3	100	100	400	50	400	200	800	100
MF207	<i>ΔplmxF-lmxE-lprN</i>	RND	0,125	50	0,16	100	200	0,25	6,25	100	5	6	100	100	400	50	200	200	800	100
MF208	<i>ΔplhelC-helB-helA</i>	RND	0,125	50	0,16	100	400	0,25-0,5	3,125	100	5	6	100	100	400	50	200	200	400	100
MF209	<i>ΔplceaA-ceaB-ceaC</i>	RND	0,125	50	0,16	50	400	0,25	3,125	100	5	6	100	100	400	50	400	200	800	100
MF210	<i>Δpl695-696-697-698-699</i>	ABC	0,125	50	0,16	50	400	0,25-0,5	3,125	100	5	3	100	100	400	25	400	200	400	100
MF211	<i>Δpl1818</i>	-	0,125	50	0,16	100	400	0,25-0,5	6,25	100	5	12	100	100	400	50	400	200	800	100
MF212	<i>Δpl278-279-280</i>	ABC	0,125	50	0,16	50	400	0,25	6,25	100	5	3	50	100	400	50	400	200	400	100

II Analyse phénotypique des mutants

L'analyse des mutants altérés pour des pompes à efflux potentielles vis-à-vis d'un panel de drogues a nécessité la mise au point d'une gamme de sensibilité chez la souche parentale *L. pneumophila* Lens. Une gamme de dilutions de différents antibiotiques et autres drogues a été testée chez la souche parentale afin de déterminer son seuil de sensibilité (inhibition de la croissance sur milieu gélosé additionné en drogue). Ce seuil est évalué grâce à la mesure de la CMI qui correspond à la plus faible concentration de drogue inhibant totalement la croissance bactérienne. Nous avons ensuite testé l'effet des mutations sur la virulence dans l'amibe, l'hôte naturel de *Legionella*.

1. Test de sensibilité aux drogues

Nous avons décidé de vérifier si les mutants obtenus étaient plus sensibles aux biocides. Le seuil de sensibilité est évalué grâce à la mesure de la CMI100 qui correspond à la plus faible concentration de drogue inhibant totalement la croissance bactérienne. Les résultats obtenus en MIC100 pour les différents mutants sont reportés dans le Tableau 13. Divers biocides correspondant à des composés utilisés classiquement dans la littérature et connus pour être des substrats de pompes d'efflux ont été testés, dont : des détergents (SDS, CTAB), des antibiotiques (Erythromycine, Novobiocine, Acide Nalidixique, Norfloxacine et Tétracycline), des colorants (Bleu de méthylène, Acridine Orange et Rhodamine), des ammoniums quaternaires (chlorure de benzalkonium), des agents intercalants (Bromure d'éthidium), des sels biliaires (déoxycholate de sodium) et des métaux lourds (Nickel, Zinc et Manganèse).

Il est intéressant de noter que le mutant MF201 présente le profil de sensibilité aux biocides testé le plus flagrant. Ce mutant présente une sensibilité accrue (2 à 16 fois plus sensible) à 11 des 17 composés testés. Cette sensibilité augmentée n'est pas due à un problème de croissance car les courbes de croissance réalisées montrent que ce mutant a la même cinétique de croissance que la souche sauvage (Figure 90 plus loin).

2. Tests de virulence

Dans le cadre de notre thématique nous nous sommes posés la question de savoir si les pompes à efflux que nous avons invalidées pouvaient participer à la virulence de *Legionella*. Les pompes à efflux pourraient être nécessaires au rejet des composés antimicrobiens délivrés par l'hôte au cours de l'infection (ex : peptides antimicrobiens). La bactérie *Legionella* a la particularité de pouvoir survivre dans les amibes présentes au niveau des sols et des eaux. Cette capacité de survie est notamment due à la sécrétion par *Legionella* d'effecteurs perturbant la phagocytose et contribuant à l'établissement d'une vacuole riche en nutriments pour la multiplication des cellules bactériennes. *Acanthamoeba castellanii*, à l'image de deux autres types de cellules eucaryotes (macrophages et *Dictyostelium*) fait office de modèle de choix pour l'étude de la virulence bactérienne en laboratoire. Deux techniques ont été utilisées pour évaluer la virulence de *Legionella* : une technique qualitative ou « plate test » et une technique quantitative reposant sur le dénombrement des cellules bactériennes après infection en plaque de culture 24 puits.

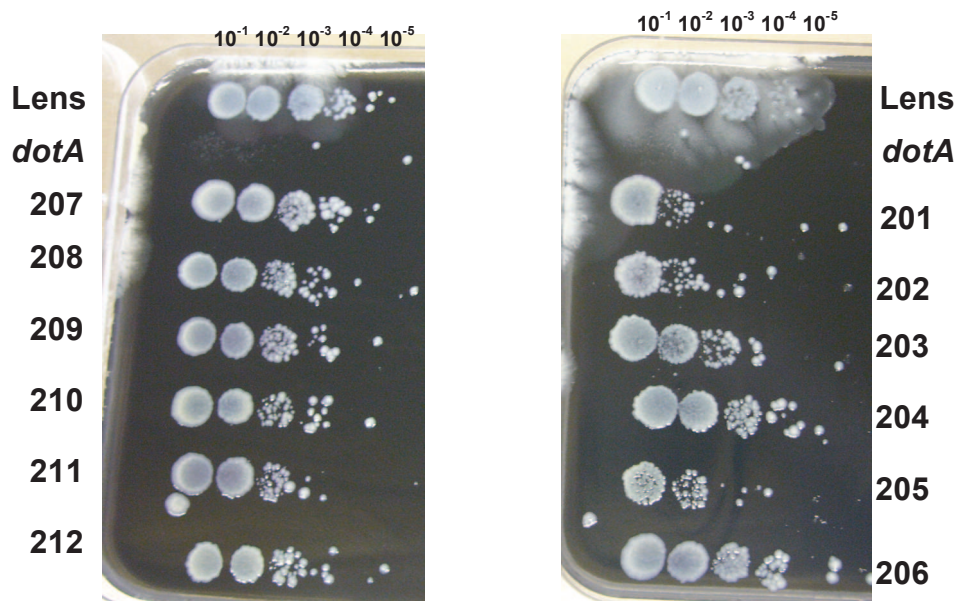


Figure 85. Résultats du test de virulence « APT » (« amoeba plate test ») sur les différents mutants.

Les dilutions de suspensions bactériennes sont déposées sur milieu gélosé BCYE recouvert d'un tapis d'amibes. Seules les cellules bactériennes virulentes, c'est-à-dire capables de lyser le tapis d'amibes peuvent alors atteindre le milieu gélosé qui est en dessous et donc se développer. En parallèle du témoin de virulence (souche parentale *Lens*) et du témoin d'avirulence (mutant *dotA*), les mutants (MF201 à M212), invalidés au niveau de gènes codant pour des pompes à efflux ont été testés.

2.1. « Plate test »

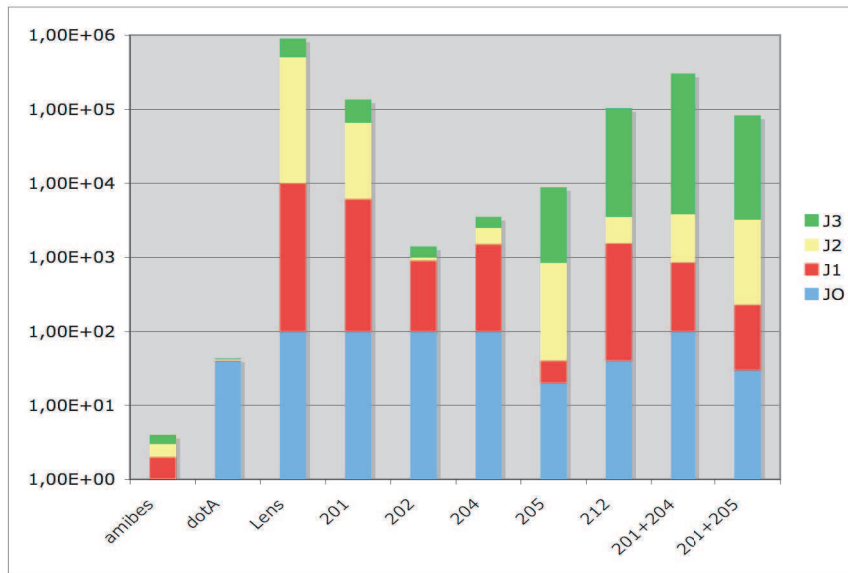
Pour tester la virulence de tous nos mutants il a semblé opportun de disposer d'un test rapide afin de déterminer le caractère plus ou moins virulent de nos souches. Pour cela nous avons décidé d'adopter le test de virulence chez *Acanthamoeba castellanii* ou test APT (« amoeba plate test »). Développé par Albers *et al.* pour l'étude du mutant *lpxB*, ce test consiste à étaler une suspension d'amibes sur un milieu de croissance gélosé assurant la croissance des legionelles (milieu BCYE) (Albers *et al.*, 2005). Des dilutions de suspension bactérienne sont ensuite déposées sur le tapis d'amibe. Seules les bactéries virulentes, c'est-à-dire capables de lyser les amibes, pourront se développer sous forme de colonies isolées car elles auront atteint le milieu gélosé. De plus, suivant la dilution à laquelle se développent les colonies on peut détecter des défauts de virulence plus ou moins prononcés. Pour contrôler la validité du test, les dilutions de suspensions bactériennes sont déposées en parallèle sur une boîte ne contenant pas des amibes afin de vérifier que les suspensions de bactéries sont bien homogènes du point de vue de la concentration. De fait toute différence observée en présence d'amibes sera due uniquement à une différence de virulence et non à un problème de concentration de la suspension bactérienne ou à une difficulté de croissance sur milieu BCYE d'une souche. Dans le cas de la souche parentale (Figure 85), on observe un développement des colonies jusqu'à la dilution 10^{-4} en présence d'amibes. Le mutant avirulent (souche LPL701), invalidé au niveau du gène *dotA*, codant pour une protéine structurale de l'appareil de sécrétion de type IV Dot/Icm ne se développe pas en présence d'amibe ce qui permet de valider le test de virulence. Mais si l'on constate que la plupart des souches sont aussi virulentes que la souche parentale, on constate que trois mutants sont altérés dans leur capacité d'infection. Il s'agit des mutants MF201, MF202 MF205 pour lesquelles une différence de 2 log est observée par rapport à la croissance de la souche parentale en présence d'amibes (croissance jusqu'à la dilution 10^{-2} alors que la souche parentale se développe à la dilution 10^{-4}).

Ces premiers résultats nous ont permis de discriminer parmi les mutants lesquels étaient les plus intéressants à étudier au niveau de la virulence. Les mutants MF201, MF202 et MF205 ont été étudiés en suivant les cellules libérées au cours de l'infection (technique quantitative développée au paragraphe 2.2 ci-après). Nous avons ajouté le mutant MF204 car le gène que nous avons invalidé chez ce mutant, le gène *lpl858*, code pour une protéine de membrane externe qui, comme TolC, pourrait être intéressante dans l'efflux de composés antimicrobiens par les cellules bactériennes lors de l'infection.

2.2. Infections en plaques de culture de 24 puits

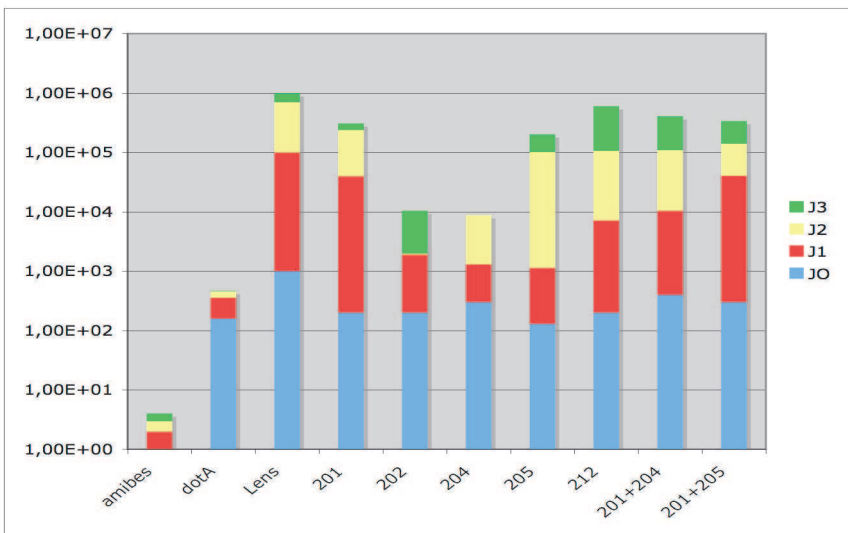
La seconde technique, quantitative, consiste à mettre en contact des cellules eucaryotes *A. castellanii*, en plaque de 24 puits, avec *Legionella* puis de suivre l'infection en numérant les bactéries extracellulaires (libérées dans le surnageant) par dilutions successives et dépôt sur milieu gélosé BCYE. Les infections ont été faites en variant le rapport entre la quantité de bactéries et le nombre de cellules d'*A. castellanii* : MOI 1 correspondant à 1 cellule bactérienne pour une cellule eucaryote, MOI 5 ou MOI 10. Le nombre de cellules bactériennes libérées suite à l'infection a été suivi à différents temps pour établir une cinétique : les temps J0 (premier jour de l'infection), J1 (un jour après l'infection), J2 et J3 ont été pris comme temps références. En effet, au bout de 72 heures, l'essentiel des cellules *A. castellanii* sont lysées signant la fin du processus d'infection. Les histogrammes et les photos de la Figure 86 permettent d'avoir une représentation graphique de la cinétique d'infection.

Bactéries libérées (UFC/mL)



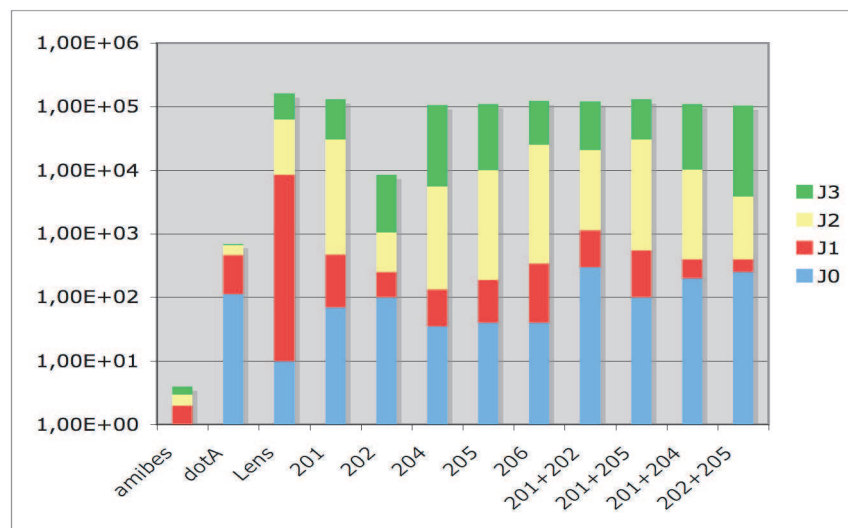
MOI 1

Bactéries libérées (UFC/mL)



MOI 5

Bactéries libérées (UFC/mL)

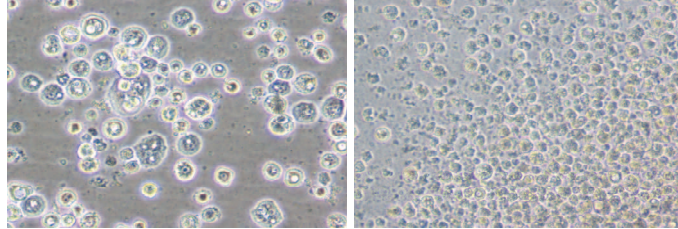


MOI 10

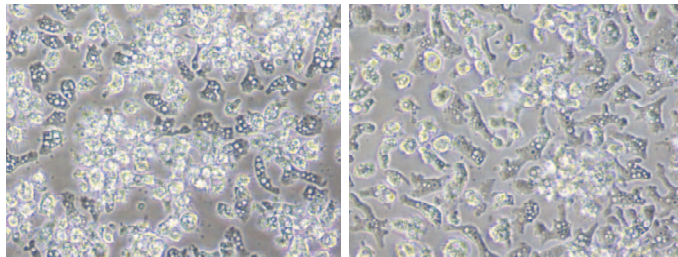
Figure 86. Etude de la virulence des mutants de *Legionella* chez *A. castellanii*.

A. Graphiques représentant le nombre de bactéries extracellulaires en UFC/mL (« unités formant colonies », représentées en ordonnées) en fonction des différents temps après infection d'*A. castellanii* : J0 (jour de l'infection), J1 (24 heures après infection), J2 (48 heures après infection) et J3 (72 heures après infection). Différents rapports d'infections ont été testés correspondant à 1 bactérie pour 1 amibe (MOI 1), 5 bactéries pour une amibe (MOI 5) ou 10 bactéries pour 1 amibe (MOI 10). Toutes les infections ont été réalisées en plaque de 24 puits.

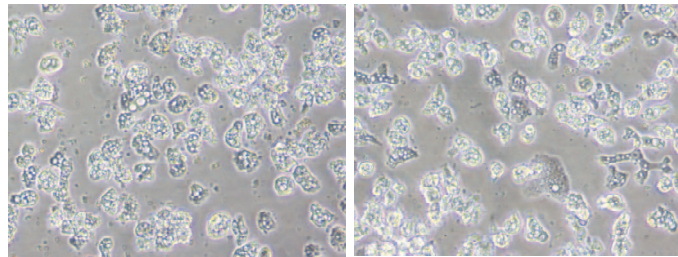
Lens



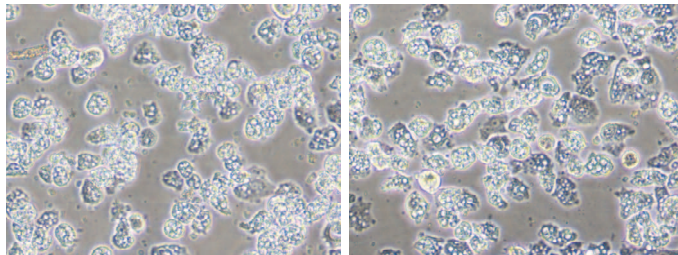
dotA



202



204



J+1

J+3

B Photos montrant le résultat d'observations en microscopie optique d'infections réalisées chez *A. castellanii* (grossissement X 20). Les observations ont été observées 24 heures (J+1) ou 72 heures après l'infection (J+3).

Au plus faible rapport d'infection (MOI 1), on observe que la souche parentale lyse le tapis d'amibes au bout de 72 heures après infection confirmant son caractère hautement infectieux. Au troisième jour la concentration en cellules bactériennes atteinte dans le puits est de 10^6 cellules/mL pour la souche parentale. Comme attendu, le mutant avirulent *dotA* présente un important déficit de virulence et ne se développe pas dans l'hôte *A.castellanii* (différence de 6 log observée avec la souche parentale après 3 jours d'infection). Si une différence d'environ 1 log est observée concernant la concentration de cellules bactériennes atteinte au bout de 72 heures après infection comparé à la souche parentale concernant les mutants MF201 et MF205, ce n'est en revanche pas le cas des deux autres mutants MF202 et MF204 qui présentent un défaut de virulence plus sévère (environ 2 log de différence observé pour ces deux mutants comparé à la souche sauvage à 72 heures). A des rapports d'infection plus élevés, la différence de virulence entre la souche parentale et les mutants MF201 et MF205 tend à s'estomper pour être quasi inexistante à MOI 10. Dans le cas des mutants MF202 et MF204 on observe le même phénomène : si une différence de 2 log est encore observée à MOI 5, seul le mutant MF202 conserve une différence de virulence de 1 log comparé à la souche sauvage à MOI 10.

2.3. Conclusion

A la vue des résultats, il semble que les mutants les plus intéressants à étudier soient les mutants MF201, MF202 et MF204. Le mutant MF201 est invalidé pour un gène très homologue à TolC, le mutant MF202 est invalidé pour les gènes codant les trois composants d'une pompe d'efflux potentielle de la famille ABC et le mutant MF205 est invalidé pour les gènes codant pour deux composants d'une pompe à efflux de type RND très similaires à AcrA et AcrB. Chez ce dernier mutant, un gène codant pour une protéine de membrane externe n'a pas été retrouvé au voisinage des deux autres gènes. On peut penser que les deux composants de cette pompe puissent s'associer à l'une des protéines de membrane externe retrouvées comme orphelines.

Dans l'optique de dresser un lien entre virulence et multirésistance nous avons confronté les résultats des tests de virulence aux résultats de tests de sensibilité aux drogues. Il s'est avéré que le mutant MF201, présentant un profil de sensibilité aux drogues fortement modifié (facteurs de sensibilité allant jusqu'à 16 fois) présentait également une virulence fortement altérée. Les mutants MF202 et MF204 ne présentaient que de faibles différences de résistance avec la souche sauvage. La corrélation retrouvée entre virulence et sensibilité aux drogues concernant le mutant MF201 nous a alors fortement incité à poursuivre concernant l'étude de ce mutant. Les résultats de ces travaux que je vais présenter maintenant font l'objet de la première publication du laboratoire sur la thématique *Legionella* (Ferhat *et al.*, 2009).

Evidemment, les mutants MF202 et 204 feront l'objet d'études ultérieures car leur faible virulence présente un intérêt certain, même si à ce jour, leur fonctionnalité dans l'efflux n'est pas apparue significative vis-à-vis des drogues que nous avons testées.

A.

>*L. pneumophila* Lens1lp10736|TolC: 455 aa - similar to outer membrane protein TolC

MRKSLFCWILTLGVSTH **VFA** **▼** **TD** LMDIYQQALENDTIFKEAYDNYMSSTEAI PQARAALYP
QVGLGSQAGRNYQDAVAGAFSANQYYGNYSWQVNASQALFNYQAWAKVAQAKASVCAAQA
SFNDAAQNLILRTAKAYFDVLFKADTLDFAEAKKRANKRQYDQATQRFQVGLDAITSVYE
AKAAYDQSIATVIAARNNQINQSENLRKLTNHVYETLAPLKDSKIPLVKPEPNDVNQWID
TGLKQNYKLYAAKYNLEVAKDNVKAISAGNWPVFSLQSNASQVHNNASGNTVFIPSKQTQ
ANIAIAMNFPVFQGLVQAQTRQAQYNFQSTSEKLEQTYRDVVNSRIAFNTITDGISKV
KADRQTVISVQNSLQSTEAQFEVGRTRTMVDVVNAQQRLFEAQEQLARDQYD **L**INSILTLK
YLAGTLNVNDLEQINSWLATTRVNGFSPVDNKTSK

B.

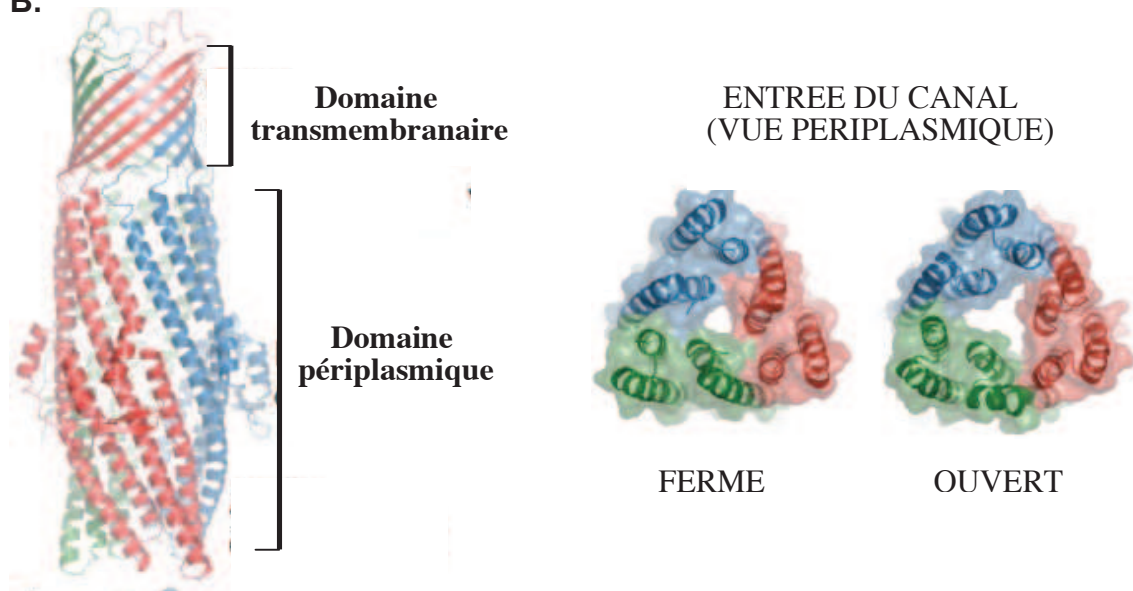


Figure 87. Séquence et structure de TolC

A. Séquence de la protéine TolC de *L. pneumophila* Lens.

Sont représentés : le site de clivage dans la séquence signal (encadré en rouge avec une flèche indiquant l'endroit où le clivage s'effectue), le résidu leucine Leu412 (surligné en vert) essentiel à l'activité de TolC chez *E. coli* et enfin les deux domaines pfam02321 qui forment des canaux trimériques retrouvés dans les protéines de la famille TolC.

B. Structure de TolC (Bavro *et al.*, 2008).

La protéine TolC, constituée par l'assemblage de trois monomères (représentés en vert, bleu et rouge), forme un canal permettant le passage des drogues à effluer. Ce canal comprend un domaine transmembranaire structuré en feuillets β antiparallèles et un domaine périplasmique structuré en hélices α . Chaque monomère contribue pour 4 feuillets β et 4 hélices α . A côté est représentée une vue périplasmique de l'entrée du canal à l'état ouvert ou fermé.

3. Analyse du mutant *tolC*

3.1. *Legionella pneumophila* code pour un homologue à TolC

Le gène *lpl736* de *L.pneumophila* Lens code pour une protéine annotée TolC sur le site <http://genolist.pasteur.fr/LegioList/>. De manière intéressante, ce gène est retrouvé chez la souche Paris (*tolC* : *lpp754*), Philadelphia (gène *lpg0699*) et la souche Corby (*tolC* : *LPC2595*) récemment séquencée. La protéine TolC de *Legionella* (Figure 87. A) compte 455 acides aminés et a une séquence proche de celle présente chez *E. coli* (471 acides aminés) comme en atteste l'identité de 36% retrouvée entre les deux protéines (alignement réalisé sur la banque colibri : <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>). Comme la protéine de *E. coli*, TolC chez *Legionella* possède un résidu Leucine en position C-terminale (leucine 412) essentiel à l'activité de la protéine. Plus que sa position, c'est le caractère hydrophobe de ce résidu qui est importante : la substitution de cette leucine par un résidu hydrophile (sérine) abolit l'activité de TolC chez *E. coli* comme la sensibilité à la colicine (ColE1), la résistance à la novobiocine et la sécrétion de l'entérotoxine (Yamanaka *et al.*, 2002). La protéine TolC codée chez *L. pneumophila* Lens contient une séquence signal (« leader ») prédite par le logiciel SignalIP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) avec un site de clivage localisé entre les résidus 20 et 21 (VFA/TD). Il s'agit par conséquent d'une protéine localisée au niveau de la membrane externe comme prédit avec le logiciel psortb (<http://www.psort.org/psortb/>). TolC comprend deux domaines pfam02321 formant des canaux trimériques permettant l'export de divers substrats chez les bactéries gram négatives (Marchler-Bauer *et al.*, 2007). Le canal trimérique est composé d'un tonneau fait de 12 feuilletts β qui traverse la membrane externe et d'un long canal fait d'hélices α qui se prolonge au niveau du périplasme (Figure 87.B, (Bavro *et al.*, 2008)). Ces domaines sont une partie des domaines retrouvés au sein de la famille TolC (COG1538) (Marchler-Bauer *et al.*, 2007).

3.2. Construction des souches pour l'étude du mutant *tolC*

Dans le but de déterminer le rôle de TolC chez *L. pneumophila* Lens, nous avons construit un mutant *tolC* suivant la technique de recombinaison homologue qui permet de remplacer le gène *tolC* par un gène de résistance à la kanamycine (Figure 88). Ce mutant, appelé MF201, a été contrôlé par PCR puis vérifié par « southern blot ». Pour étudier ce mutant nous avons construit la souche possédant le gène *tolC* sur un plasmide pour la complémentation, MF213, et la souche portant le même plasmide mais vide, la souche MF214. Pour effectuer la complémentation il a fallu utiliser un plasmide qui puisse rester stable chez *Legionella* en vue des tests phénotypiques que nous envisageons d'effectuer (en particulier la stabilité est nécessaire lors du suivi cinétique à long terme d'infections d'un hôte par *Legionella* afin d'étudier la virulence). Le plasmide que nous avons utilisé est le plasmide pML005 qui a été construit au laboratoire à partir du plasmide pUC18 suite à une mutagenèse dirigée (suppression d'un site BamH1; Figure 89). Cette mutation augmente la stabilité du plasmide chez *Legionella pneumophila* (Chen *et al.*, 2006). La stabilité du plasmide a été testée au laboratoire. Le plasmide s'est avéré stable en condition de culture comme en témoignent les extractions d'ADN plasmidique réalisées après 30 générations et en condition d'infection chez *A. castellanii*. Dans le second cas, la présence du plasmide a été suivie par observation de la bioluminescence émise par une cassette lux insérée dans le plasmide pML005. La cassette lux porte l'opéron *luxABCDE* utilisé pour la communication entre cellules bactériennes par bioluminescence chez *Vibrio fischeri* (Milton, 2006). Pour la complémentation, le gène *tolC* sous un promoteur constitutif (promoteur de la cassette de résistance à la kanamycine) a été inséré dans le plasmide pML005 (insertion entre les sites

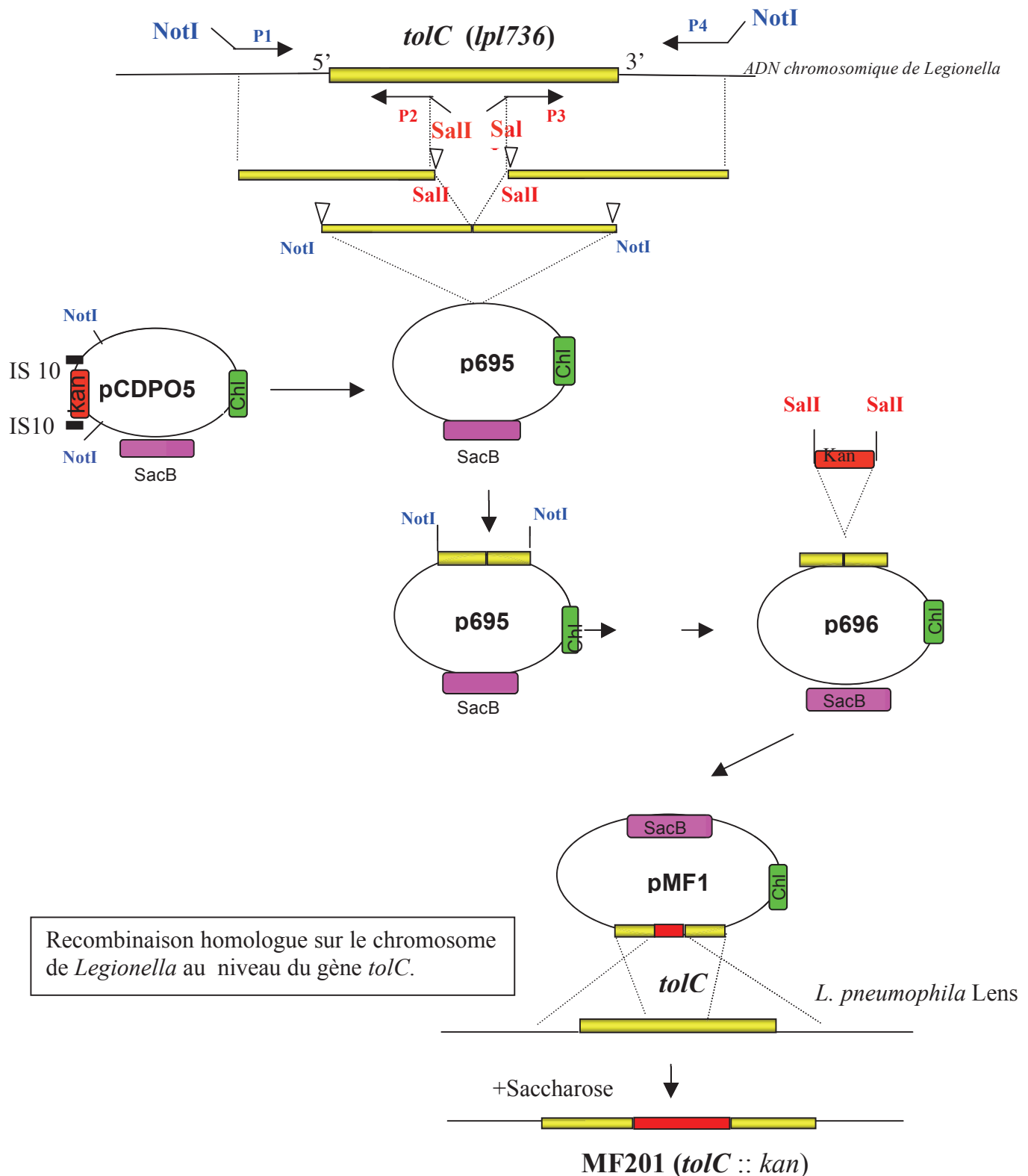


Fig 88. Représentation schématique de la stratégie utilisée pour la construction du mutant *tolC* chez *L. pneumophila* Lens. Kan : cassette de résistance à la kanamycine ; Chl : cassette de résistance au chloramphénicol ; *sacB* : gène suicide qui, induit en présence de saccharose, permet la synthèse de la levane sucrose un enzyme synthétisant le levane qui est toxique pour les cellules bactériennes gram-négatives portant le plasmide. Le plasmide utilisé pour la recombinaison homologue chez *Legionella* est le plasmide p695 qui est dérivé du plasmide pCDPO5 après délétion d'un fragment NotI contenant un transposon conférant une résistance à un antibiotique.

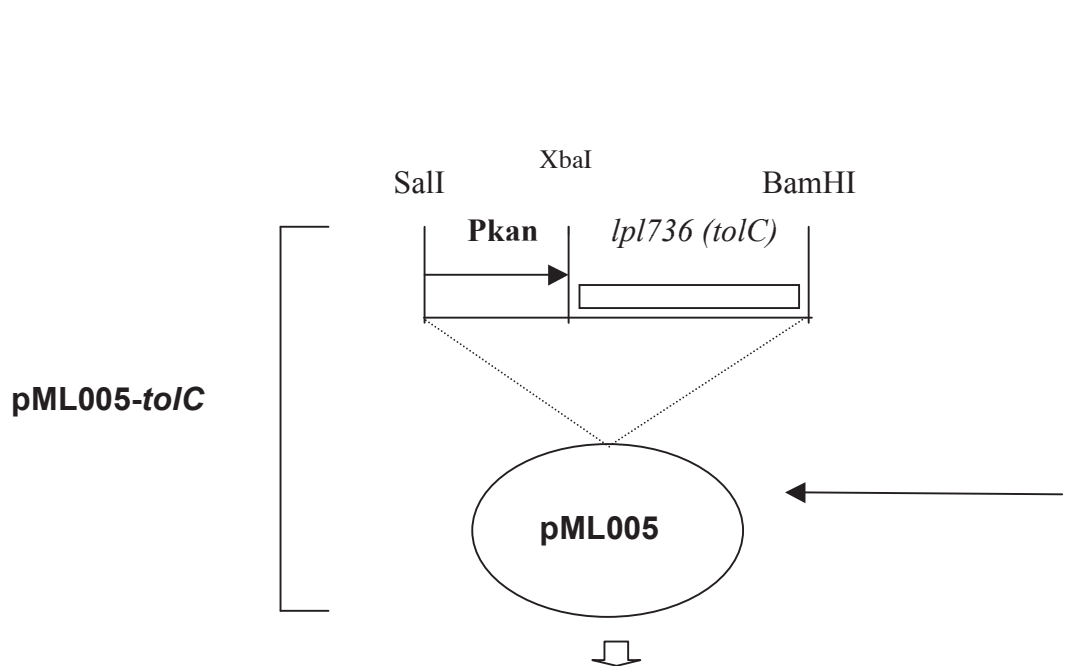
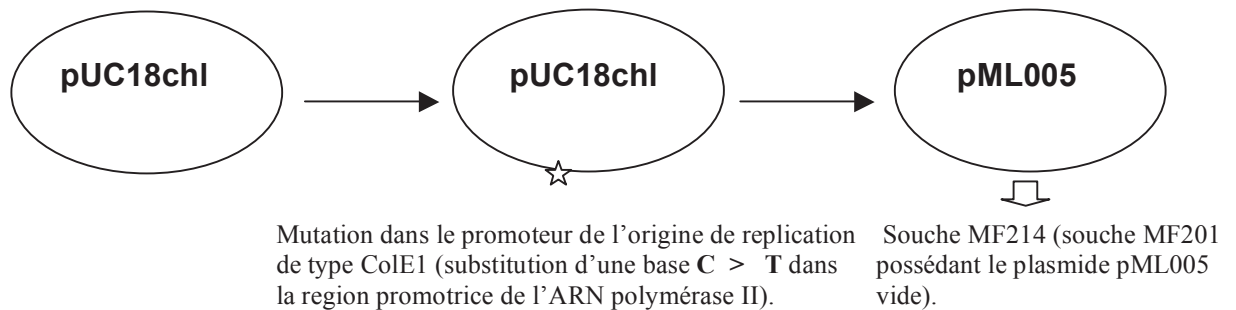


Figure 89. Représentation schématique montrant les étapes de la construction du plasmide permettant la complémentation du mutant *tolC* chez *L. pneumophila* Lens.

Le plasmide utilisé pour la complémentation a été construit à partir du plasmide pUC18 portant un gène de résistance au chloramphénicol. Ce plasmide possède une mutation dans le promoteur de l'origine de replication de type ColE1 (substitution d'une base C > T dans la region promotrice de l'ARN polymérase II) qui confère une stabilité au plasmide.

Tableau 14. Les différentes souches construites ainsi que les plasmides pour l'étude du mutant *tolC*.

Souche ou plasmide	Caractéristiques	Références
<i>L.pneumophila</i>		
Lp01	<i>L. pneumophila</i> Lens, souche parentale ("wild type strain")	CNRL, Lyon
MF201	Lp01 <i>tolC</i> ::Kan	Cette étude
MF213	MF201/pML005- <i>tolC</i>	Cette étude
MF214	MF201/pML005	Cette étude
LPL701	<i>dotA</i> ::Kan	Cette étude
Plasmides		
pUC18cm	pUC18 avec une cassette de résistance au chloramphénicol (Cm) à la place du gene <i>bla</i> .	Cette étude
pML005	Plasmide pUC18cm délété d'un site BstUI en position 1476 ce qui confère une stabilité au plasmide chez <i>Legionella</i> .	Cette étude
pML005- <i>tolC</i>	Plasmide pML005 possédant le gene <i>tolC</i> de <i>L. pneumophila</i> Lens sous le promoteur du gene de résistance à la kanamycine (l'insertion est faite entre les sites BamHI et SalI du plasmide).	Cette étude

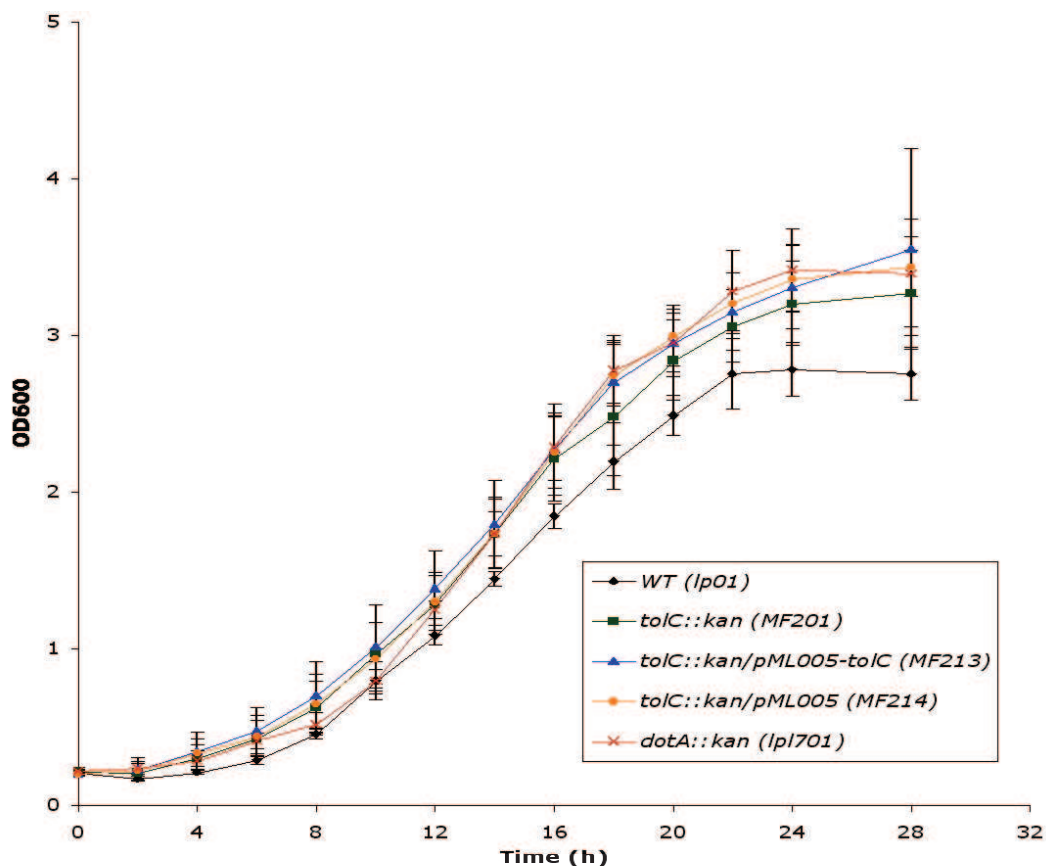


Figure 90. Courbes de croissance des souches de *Legionella* en milieu liquide (milieu LGM, voir matériel et méthodes).

Les courbes de croissance ont été établies en reportant les mesures de densité optique à 600 nm (OD600) effectuées par le lecteur de microplaques «quant» aux temps indiqués. Les croissances ont été effectuées à 30°C sous agitation et dans des plaques 24 puits. Les barres d'erreurs indiquent les écarts-types observés pour chaque point de la courbe.

BamH1 et SalI de pML005). Le plasmide contenant le gène *tolC* obtenu a été transformé chez la souche MF201 délétée pour le gène *tolC* afin d'obtenir la souche complémentée MF213. Le même plasmide vide a été transformé chez le mutant MF201 afin d'obtenir la souche MF214. La souche MF214 permettra de voir l'influence du plasmide seul sur les phénotypes observés. Le Tableau 14 regroupe l'ensemble des souches construites pour cette étude.

3.3. L'invalidation du gène *tolC* n'a pas d'effet sur la croissance

TolC étant une protéine de membrane externe, son absence peut perturber l'intégrité de l'enveloppe bactérienne avec des conséquences sur la division cellulaire comme c'est le cas chez *E. coli* (Lau & Zgurskaya, 2005). Nous avons donc établi la cinétique de croissance du mutant MF201 et l'avons comparée à celle de la souche sauvage *L. pneumophila* Lens nommée Lp01 (Figure 90). Pour cela, une plaque 24 puits a été inoculée avec une suspension bactérienne de façon à partir d'une valeur de densité optique de 0,2 à 600 nm. La plaque a été mise sous agitation à 37°C et la densité optique a été lue à chaque temps grâce à un lecteur de plaque. Les courbes de croissance obtenues indiquent que le mutant MF201 n'a pas de retard de croissance par rapport à la souche parentale Lp01 dans nos conditions de laboratoires. De plus, le plasmide pML005 sans l'insert *tolC* n'a pas d'influence néfaste sur la capacité de division des cellules bactériennes comme le montre la croissance de la souche MF214. De même, la souche complémentée MF213 se comporte comme les autres souches du point de vue de sa cinétique de croissance. Ces vérifications faites, nous pouvons caractériser phénotypiquement le mutant *tolC* afin de voir si la protéine TolC est fonctionnelle, c'est-à-dire si elle participe à la multirésistance aux drogues chez *L. pneumophila*.

3.4 TolC est impliqué dans la résistance aux drogues et au stress

3.4.1. TolC est impliqué dans la résistance aux drogues

3.4.1.1. Le mutant *tolC* est plus sensible aux drogues

La sensibilité aux drogues du mutant MF201 à diverses drogues a été testée pour 17 composés connus pour être toxiques pour les cellules bactériennes. La technique utilisée est la même que celle testée sur les autres mutants à savoir la dilution de drogues en milieu BCYE. Les drogues ont été choisies au sein de composés reportés comme étant des substrats de pompes à efflux bactériennes : des détergents (SDS, CTAB), des antibiotiques (erythromycine, novobiocine, acide nalidixique, norfloxacine et tétracycline), des colorants (bleu de méthylène, acridine orange et rhodamine), des ammoniums quaternaires (chlorure de benzalkonium), des agents intercalants (bromure d'éthidium), des sels biliaries (déoxycholate de sodium) et des métaux lourds (nickel, zinc et manganèse). Il est intéressant de constater que le mutant MF201 est plus sensible que la souche parentale à 11 des 17 composés testés avec une MIC diminuée d'un facteur 2 à 16 par rapport à la souche parentale (facteur 16 atteint dans le cas de l'érythromycine ; Tableau 15). Aucune sensibilité au cobalt, à la tétracycline, à l'acide nalidixique, à l'acridine orange, au zinc et au manganèse n'a été observée. De plus l'apport du gène *tolC* sur un plasmide permet de restaurer un niveau de sensibilité égal à celui observé dans le cas de la souche parentale. Cela signifie que la sensibilité aux drogues observée chez le mutant MF201 est bien due à la seule invalidation du gène *tolC*.

Tableau 15. Sensibilité aux drogues des souches de *L. pneumophila* (souche parentale et dérivées) après croissance sur milieu BCYE.

a. Les souches utilisées sont décrites précédemment (Tableau 11).

b. Les valeurs de MIC100 correspondent à la concentration minimale en drogue capable d'inhiber complètement la croissance bactérienne sur milieu gélosé BCYE. Les résultats ont été reproduits 3 fois.

SDS : Sodium dodécyl sulfate, **CTAB** : bromure d'hexadécyltriméthylammonium, **POL**, **BENZ** : Chlorure de Benzalkonium, **ERY** : Erythromycine, **DEO** : Déoxycholate, **NOR** : Norfloxacine, **EBT** : Bromure d'éthidium (« Ethidium bromide »), **MB** : Bleu de Méthylène (« Methylene blue »), **R6G** : Rhodamine 6G, **Ni** : sulfate de nickel, **WT** : « wild-type ».

Strain ^a	Genotype	MIC 100 (µg/mL) ^b										
		SDS	CTAB	ERY	BENZ	NOV	DEO	NOR	ETB	MB	R6G	Ni
Lp01	WT	0,125	50	0,5	100	6,25	100	12	100	100	50	800
MF201	<i>tolC::kan</i>	0,031	25	0,031	25	3,125	12,5	6	25	50	25	400
MF213	<i>tolC::kan/pML005-tolC</i>	0,125	50	0,5	100	6,25	100	12	100	100	50	800
MF214	<i>tolC::kan/pML005</i>	0,031	25	0,031	25	3,125	12,5	6	25	50	25	400
Lpl701	<i>dotA::kan</i>	0,125	50	0,5	100	6,25	100	12	100	100	50	800

3.4.1.2. La résistance aux drogues conférée par TolC passe par un mécanisme d'efflux

a. Principe

Nous savons que le bromure d'éthidium est une drogue transitant par les pompes à efflux dépendantes de TolC (Posadas *et al.*, 2007). Une méthode très intéressante consiste à suivre l'accumulation du bromure d'éthidium par fluorimétrie en présence ou en absence d'un agent capable d'inhiber le fonctionnement des processus nécessitant un gradient de proton, notamment les pompes d'efflux : le CCCP (carbonyl cyanide m-chlorophénylhydrazone). De ce fait, en présence de CCCP, l'inhibition de l'efflux a pour conséquence l'accumulation de BET au sein du cytoplasme. Cette accumulation conduit à l'action intercalante du BET dans l'ADN, ce qui provoque une augmentation de l'intensité de fluorescence et peut être suivi par fluorimétrie (Figure 91.A). Ce test permet donc de révéler l'existence d'un mécanisme d'efflux et a été utilisé avec succès pour étudier de nombreux systèmes d'efflux.

b. Mesure de l'efflux chez le mutant MF201

L'accumulation du bromure d'éthidium a été suivie par mesure de fluorescence chez la souche parentale et les souches dérivées MF201, MF213, MF214 (Figure 91. B). Chez la souche parentale Lp01, l'ajout de CCCP (2,5 mg/L) provoque une augmentation de la fluorescence signifiant une accumulation du bromure d'éthidium dans les cellules due à l'inhibition de l'efflux. En revanche, une augmentation importante de la concentration en bromure d'éthidium est observée chez le mutant MF201 en présence ou non de CCCP, chose non observée avec la souche complétement qui se comporte comme la souche sauvage (résultat non montré). Le fait que le CCCP ne joue pas sur le niveau d'accumulation du bromure d'éthidium chez le mutant MF201 signifie que des pompes à efflux faisant transiter le bromure d'éthidium et dépendantes de TolC sont déjà inactivées du fait de l'invalidation de *tolC*. De ce fait le bromure d'éthidium n'est pas efflué correctement suggérant que TolC participe à l'efflux du bromure d'éthidium. Ce résultat, combiné aux tests de sensibilités aux drogues, permet de dire que TolC participe de la résistance de *Legionella* aux drogues, et ce, par un mécanisme d'efflux.

3.4.2. TolC est impliqué dans la résistance aux stress

Que ce soit dans l'environnement (variations thermiques, de pH, osmotique, chimique des milieux) ou dans son hôte (acidification de la vacuole lors de la phagocytose), *Legionella* est soumise à de nombreux stress. La résistance à ces stress peut expliquer en partie la survie de *Legionella* dans des conditions drastiques (eaux chaudes sanitaires, tours aérorefrigérantes) et dans son hôte lors d'une infection. Nous avons donc testé notre mutant afin de savoir si TolC participait à la résistance aux stress chez *Legionella*. Pour cela, les cellules bactériennes ont été exposées de façon ponctuelle à divers agents stressants. Après une heure d'exposition, les bactéries survivantes ont été numérotées après dépôt sur milieu gélosé BCYE.

Après une exposition au bromure d'éthidium, la viabilité du mutant MF201 est réduite d'un facteur 18 comparée à celle de la souche parentale (Figure 109). Nous avons également observé une plus grande sensibilité au stress oxydant (H₂O₂) du mutant MF201 : la diminution de viabilité est de l'ordre d'un facteur 53 (p-value = 0,003) et d'un facteur 102 (p-value = 9 . 10⁻⁶) comparé à la souche parentale pour l'exposition à des concentrations en eau oxygénée de 177mM et de 221mM, respectivement.

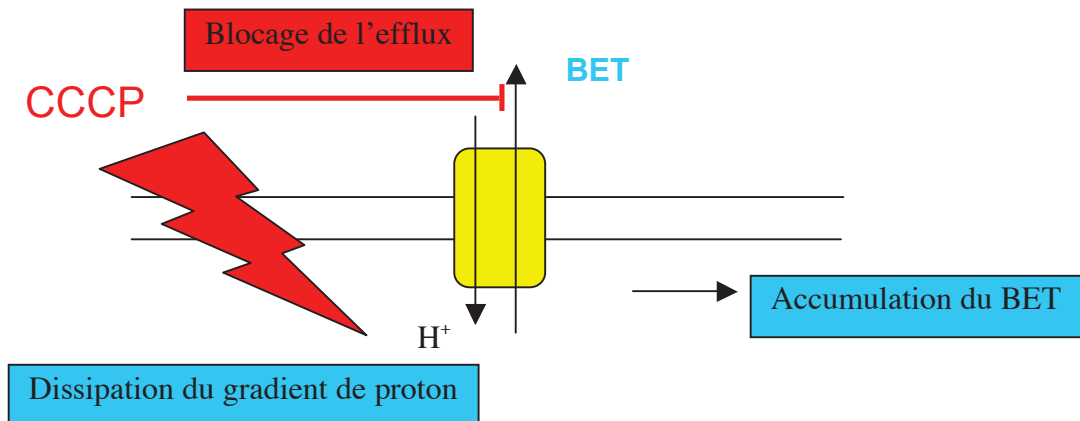
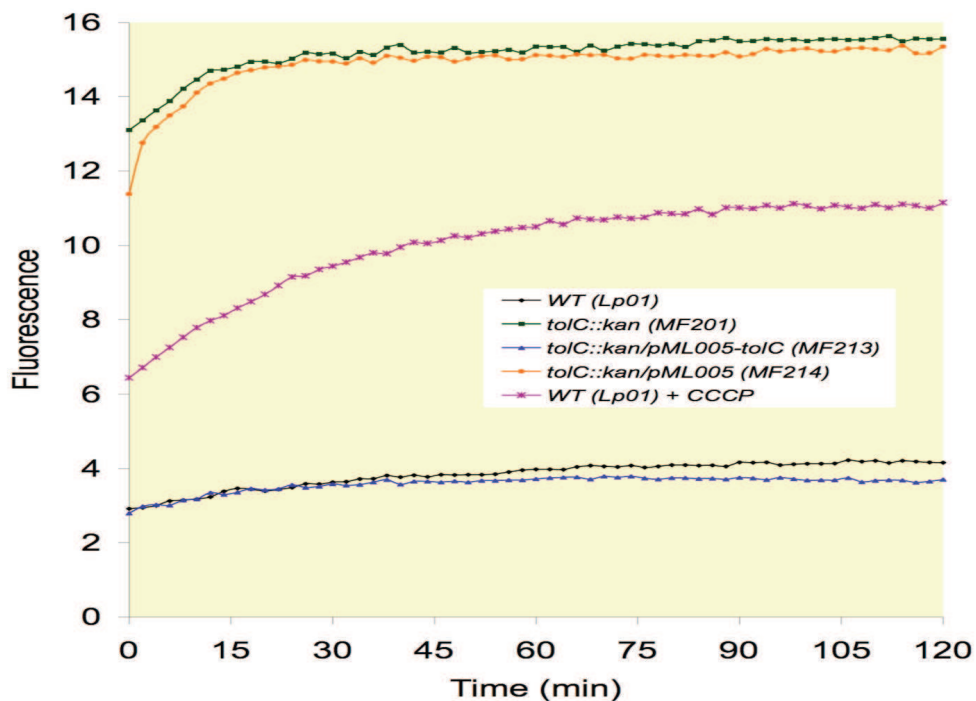
A**B**

Figure 91. Test d'efflux du bromure d'éthidium.

A. Principe. Le CCCP (carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone) est un agent découplant qui dissipe la force proton motrice. En agissant de cette manière, le CCCP bloque les processus énergétiques dépendants de gradients de protons dont les pompes à efflux. Le bromure d'éthidium (BET) est une drogue expulsée hors des cellules bactériennes par l'activité de pompes à efflux. En présence de CCCP, l'activité des pompes à efflux étant bloquée le bromure d'éthidium n'est plus refoulé et s'accumule dans les cellules. Ce faisant le BET, qui est un agent intercalant, se fixe sur les acides nucléiques de la cellule et fluoresce plus intensément : une mesure de l'intensité de fluorescence permet de suivre l'accumulation du bromure d'éthidium.

B. Accumulation du bromure d'éthidium chez *L. pneumophila* Lens et les souches dérivées. Les bactéries ont été cultivées en milieu liquide à 30°C jusqu'en phase stationnaire. L'accumulation du bromure d'éthidium (0,5 mg/L de bromure d'éthidium, ajouté aux cellules au début de l'incubation) dans les cellules bactériennes a été mesurée par fluorescence après ajout ou non de CCCP (2,5 mg/L).

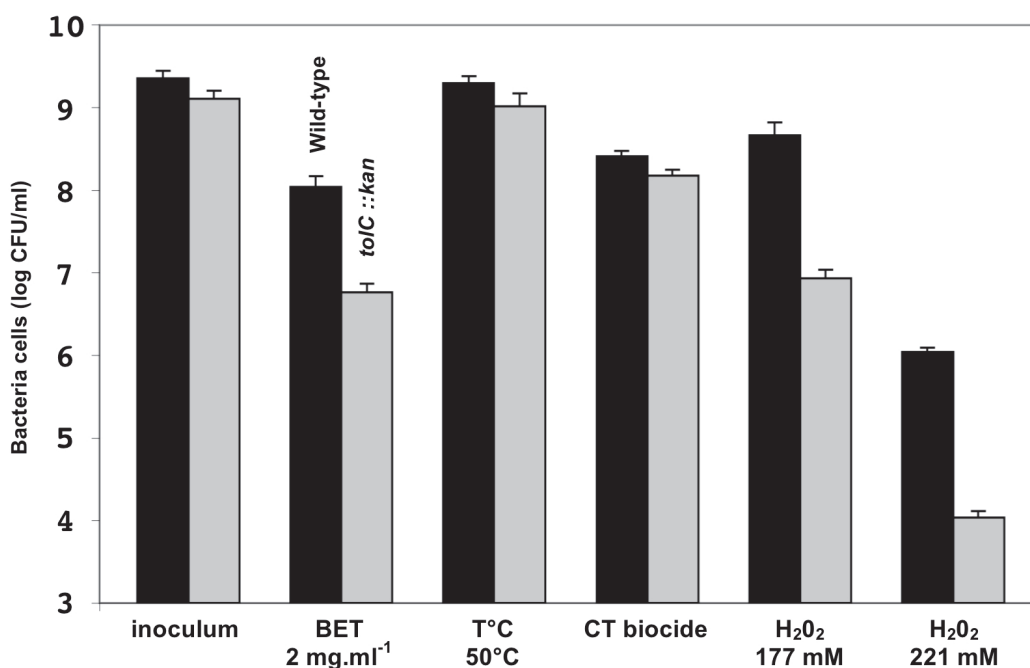
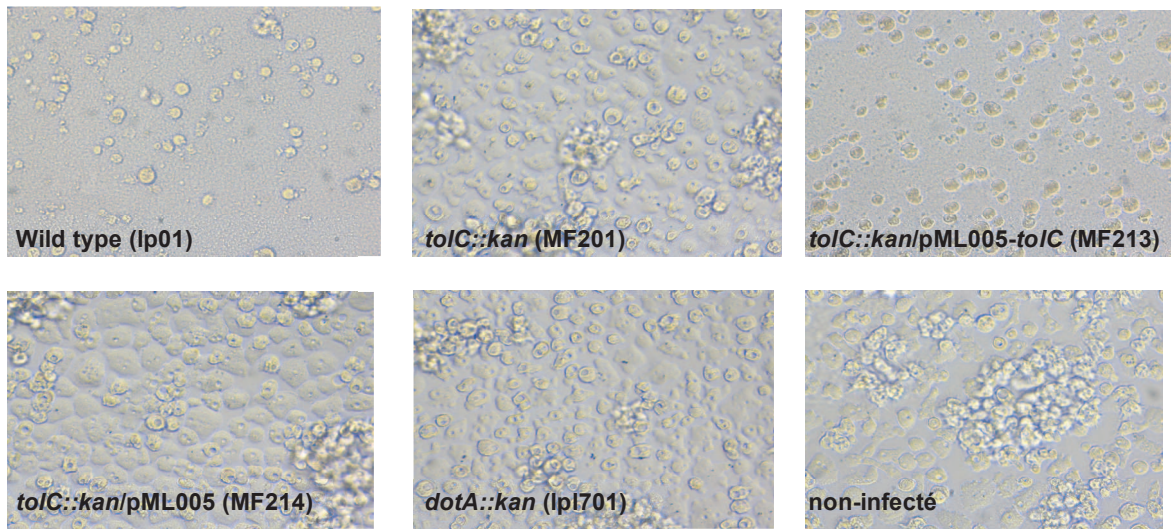


Figure 92. Survie de cellules bactériennes de *Legionella* après une exposition à des stress.

Les cellules bactériennes correspondant à la souche parentale (« wild-type » ; histogrammes en noir) ou au mutant *toIC* (*toIC::kan*; histogrammes en gris) ont été exposées à différents agents stressants : stress oxydant (H₂O₂), stress thermique et exposition à un biocide utilisé dans le traitement des tours aéroréfrigérées (CT pour « cooling tower biocide »). Après 1 heure de contact, les cellules bactériennes sont lavées, diluées puis déposées sur le milieu de croissance gélosé BCYE afin de numérer les cellules vivantes formant des colonies (CFU pour « colony forming unit »). Les données ont été traitées statistiquement grâce à un test de student effectué par le logiciel R (<http://www.R-project.org>). Les valeurs de p-value obtenues sont indiquées dans le texte.

A. *Acanthamoeba castellanii*



B. *Dictyostelium discoideum*

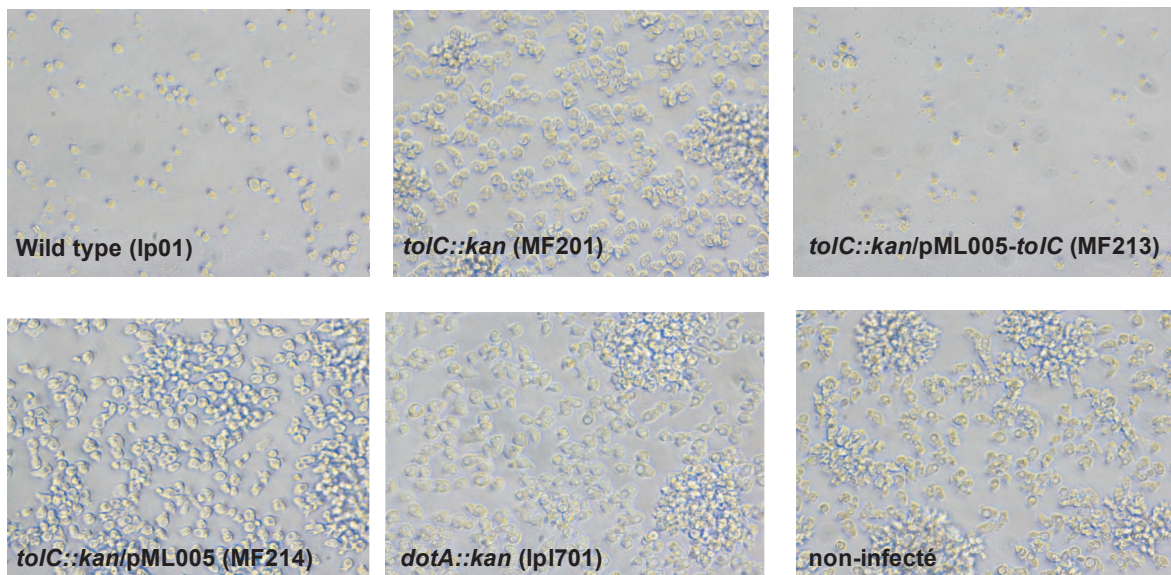


Figure 93. Observation au microscope de cellules d'*A. castellanii* (A) ou de *D. discoideum* (B) infectées avec *Legionella* 72 heures après infection (grossissement X 20).
Les observations ont été faites avec un microscope inversé (Nikon) couplé à une caméra (olympus DP120).

Cependant, le mutant MF201 n'est pas sensible au stress thermique ou au biocide utilisé dans les tours aéroréfrigérantes testé. L'absence d'effet du stress thermique sur la viabilité du mutant confirme le fait que l'inactivation de *tolC* ne semble pas influencer sur l'intégrité de l'enveloppe de *Legionella*. De ce fait la plus grande sensibilité aux drogues observée n'est pas due à une altération de l'intégrité de l'enveloppe bactérienne causée par la délétion de *tolC*.

3.5. TolC est essentiel à la virulence de *Legionella* chez les macrophages et les protozoaires

3.5.1. Observations microscopiques

Du fait du rôle de TolC dans la sécrétion possible de facteurs de virulence, il nous a semblé intéressant de tester notre mutant en conditions d'infection afin de vérifier si TolC participe à la virulence. Les infections ont été réalisées dans des hôtes eucaryotes comme les protozoaires *A. castellanii* qui serait un hôte environnemental de *Legionella* et *D. discoideum*, amibe modèle, ou encore dans les cellules humaines comme les macrophages humains U937. Les infections ont été réalisées en plaques 96 puits en mettant en contact les cellules eucaryotes avec les cellules bactériennes (MOI = 10). Les premières observations d'infections réalisées chez les hôtes *A. castellanii* et *D. discoideum* montrent que, contrairement à la souche sauvage, le mutant MF201 ne lyse pas les cellules eucaryotes, même 72h après infection (Figure 93). Ce défaut de virulence est assez similaire à celui observé avec le mutant LPL701 (*dotA* :: *kan*) utilisé comme contrôle d'avirulence. Cette souche est inactivée au niveau du gène *dotA* codant pour un composant structural de l'appareil de sécrétion de type IV de *Legionella* impliqué de façon majeur dans la virulence. Le défaut de virulence observé chez le mutant MF201 a pu être restauré par complémentation comme le montre le suivi de l'infection par la souche MF213, qui comme la souche parentale, lyse les cellules au bout de 72 h après infection.

3.5.2. Capacité de multiplication

Lors de son cycle infectieux *L. pneumophila* se multiplie au sein de la cellule eucaryote hôte (bactéries intracellulaires) avant de lyser l'hôte pour être libérée (bactéries extracellulaires). Nous avons donc suivi, par dénombrement sur milieu BCYE, les bactéries intracellulaires et extracellulaires lors de la cinétique d'infection.

3.5.2.1. Bactéries extracellulaires

Pour numérer les bactéries extracellulaires, un aliquot du surnageant a été prélevé à 24, 48 et 72 h post-infection d'*A. castellanii*, de *D. discoideum* et des cellules U937 (Figure 94). Comme attendu, on assiste à une augmentation du nombre de bactéries extracellulaires concernant la souche parentale Lp01 entre 0 et 24h après infection (augmentation d'un facteur 580 ; 2,9 et 4 par rapport au temps référence t_0 chez *A. castellanii*, *D. discoideum* et cellules U937, respectivement). Cette augmentation subite du nombre de bactéries est à corrélérer avec la transition vers le phénotype infectieux qui se produit suite à la multiplication bactérienne. Il est à souligner que 48 h après l'infection, le nombre de bactéries libérées ne progresse plus car l'essentiel des cellules eucaryotes sont lysées.

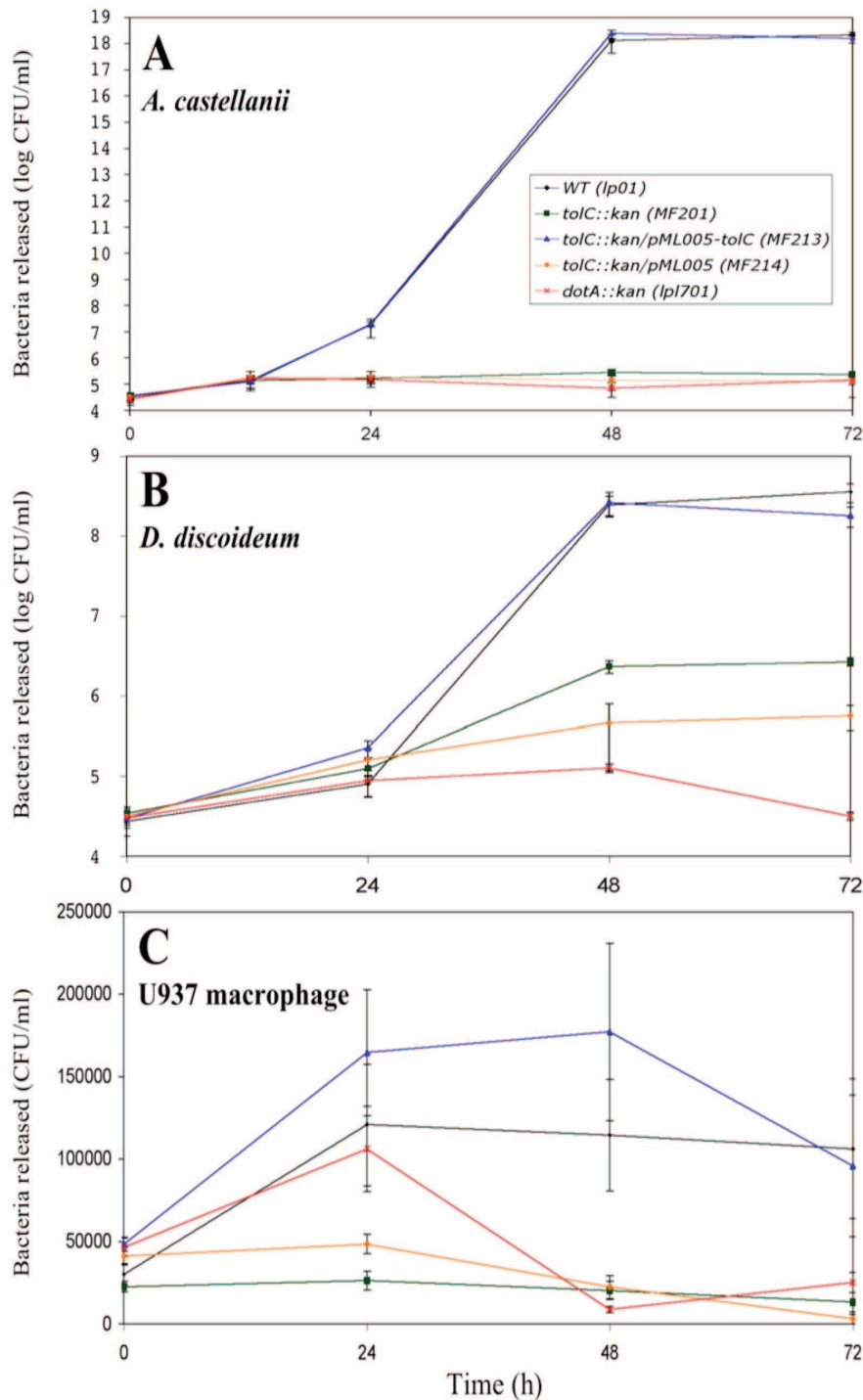


Figure 94. Cinétique de libération des cellules bactériennes au cours de l'infection de protozoaires et de macrophages.

Les hôtes *A. castellanii* (A), *D. discoideum* (B) et les macrophages U937 (C) ont été infectés avec les souches de *Legionella* Lp01 (WT), MF201 (*tolC::kan*), MF213 (*tolC::kan/pML005-tolC*), MF214 (*tolC::kan/pML005*) et lpl701 (*dotA::kan*). Le rapport d'infection est de 10 cellules bactériennes pour une cellule eucaryote (MOI 10). A différents temps après l'infection les bactéries présentes dans le surnageant ont été diluées puis déposées sur le milieu gélosé BCYE pour numérer les colonies. Le temps t=0 comprend la durée du temps de contact entre les cellules bactériennes et les cellules eucaryotes (1 heure). Les résultats proviennent d'une expérience répétée deux fois avec chaque fois le dépôt en triplicat pour chaque point de la cinétique. Les barres d'erreurs représentent les déviations standard obtenues. Les données ont été traitées statistiquement grâce à un test de student effectué par le logiciel R (<http://www.R-project.org>). Les valeurs de p-value obtenues sont indiquées dans le texte.

Concernant le mutant MF201, nous avons observé un important défaut de libération des cellules bactériennes comparé à la souche parentale aux temps 24 h (400 fois moins de bactéries libérées chez *A. castellanii* (p-value = 0,015) et 4 fois moins de bactéries libérées chez les cellules U937 (p-value = $9 \cdot 10^{-4}$) comparé à la souche parentale) et 48 h (on observe une diminution d'un facteur 5,6 chez les cellules U937 (p-value = $3 \cdot 10^{-4}$) et de 12 log chez *A. castellanii* et *D. discoideum* (p-value = 0,015). Ce défaut de libération du mutant MF201 est similaire à celui observé chez le mutant avirulent *dotA*. Ce défaut de virulence a pu être restauré par complémentation comme en témoigne la cinétique de libération de la souche complémentée MF213.

3.5.2.2. Viabilité des cellules eucaryotes après infection.

L'« Alamar blue » est une molécule capable de colorer les cellules eucaryotes vivantes. Il s'agit d'un composé de couleur bleue qui vire au rose après réduction par l'activité d'enzymes métaboliques rédox des cellules vivantes. Le degré de réduction est mesuré par un rapport d'absorbance entre la forme oxydée et réduite. Ceci nous permet d'estimer l'effet cytotoxique de *Legionella* c'est-à-dire le pourcentage de cellules eucaryotes mortes après l'infection. Les résultats obtenus indiquent que la cytotoxicité de la souche parentale vis-à-vis d'*A. castellanii*, de *D. discoideum* et des macrophages U937 est de 95%, 64% et de 67% (Figure 95). Comparé à la souche parentale la cytotoxicité du mutant MF201 est significativement réduite : cytotoxicité réduite à 23%, 29% et 28% comparé à la souche parentale vis-à-vis d'*A. castellanii*, *D. dicoideum* et du macrophage U937 respectivement. Comme attendu, la cytotoxicité est restaurée par complémentation (souche MF213). Il est à noter que les résultats obtenus avec les macrophages sont plus variables que ceux obtenus avec les amibes.

3.5.2.3. Bactéries intracellulaires

Le défaut de libération du mutant MF201 peut être du, soit à un défaut de multiplication intracellulaire, soit à un défaut de lyse de l'hôte. Pour numérer les bactéries intracellulaires, nous avons lysé les cellules eucaryotes à différents temps après infection par l'action d'un détergent (cas de la lyse d'*A. castellanii* et de *D. discoideum*) ou par lyse hypotonique (cas des macrophages U937). Chez la souche parentale, on observe une augmentation du nombre de bactéries intracellulaires chez l'hôte *A. castellanii* : cette augmentation est d'un facteur 52 durant les premières 24 h et d'un facteur 14 entre 24 h et 48 h (Figure 96). En revanche, aucune augmentation du nombre de bactéries intracellulaires n'est observée dans le cas du mutant MF201, même 72 h après infection d'*A. castellanii* et des macrophages U937. Le déficit est sévère comparé à la souche parentale : 72 h après infection, le nombre de bactérie intracellulaires de MF201 est 6000 fois plus bas dans *A. castellanii* (p-value = $2,5 \cdot 10^{-3}$) et 6,5 fois plus bas chez les macrophages U937 (p-value = $5,2 \cdot 10^{-5}$) comparé à la souche parentale Lp01.

3.5.3. Capacité d'invasion

Tout indique que le mutant MF201 est altéré dans sa virulence. Afin de savoir si le défaut de virulence est du à un défaut lors des étapes précoces de l'infection nous avons testé la capacité d'invasion de nos souches. Les cellules eucaryotes, après avoir été mises en contact avec les cellules bactériennes, ont été traitées à la gentamycine afin de tuer les bactéries non adhérentes puis lysées afin de numérer les bactéries intracellulaires. Le nombre de bactéries intracellulaires observé lors de l'infection avec le mutant MF201 correspond à

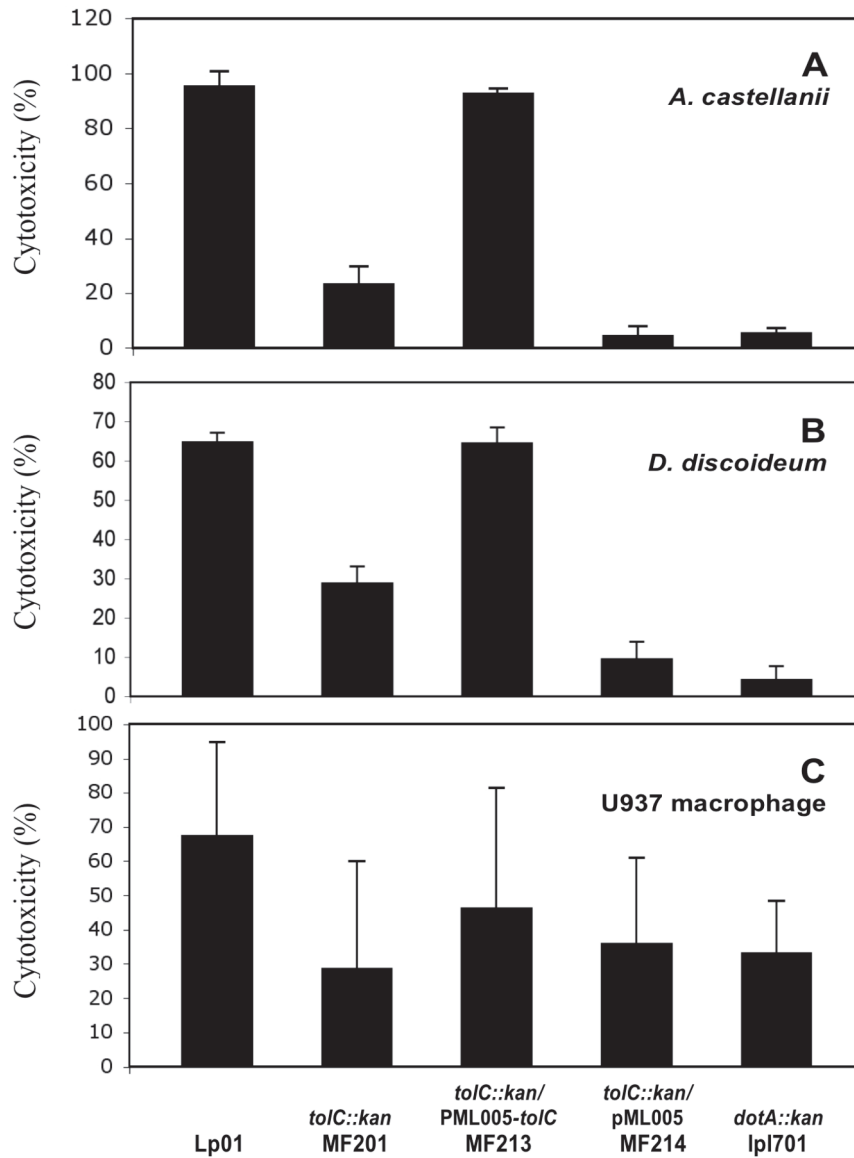


Figure 95. Cytotoxicité de *L. pneumophila* Lens et des souches dérivées vis-à-vis de différents hôtes.

Les hôtes *A. castellanii* (A), *D. discoideum* (B) et les macrophages U937 (C) ont été infectés avec les souches de *Legionella* Lp01 (WT), MF201 (*tolC::kan*), MF213 (*tolC::kan/pML005-tolC*), MF214 (*tolC::kan/pML005*) et lpI701 (*dotA::kan*). Le rapport d'infection est de 10 cellules bactériennes pour une cellule eucaryote (MOI10). Après 48 heures (*D. discoideum*) ou 72 heures (*A. castellanii* et cellules U937) suite à l'infection, les tapis cellulaires eucaryotes ont été lavés et « l'Alamar blue » a été ajouté pour estimer la viabilité des cellules. Le degré de réduction de l'« Alamar blue » par les cellules infectées a été mesuré par spectrophotométrie et comparé à celui de cellules non infectées (dans ce second cas il a été considéré que 100% des cellules étaient viables). Les résultats proviennent de deux expériences indépendantes où chaque point a été répété trois fois. Les barres d'erreurs représentent les écarts-types obtenus. Les données ont été traitées statistiquement grâce à un test de student effectué par le logiciel R (<http://www.R-project.org>). Les valeurs de p-value obtenues sont indiquées dans le texte.

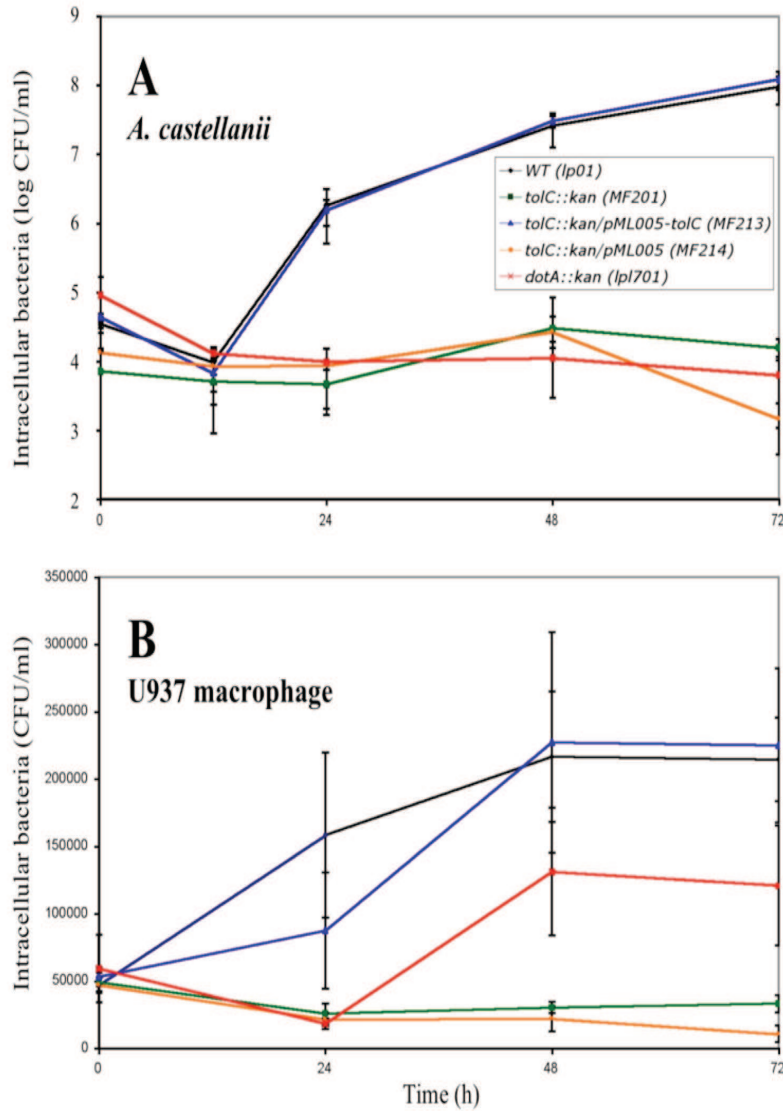


Figure 96. Croissance intracellulaire de *L. pneumophila* Lens et des souches dérivées.

Les graphiques représentent la cinétique de croissance intracellulaire des souches Lp01 (WT), MF201 (*tolC::kan*), MF213 (*tolC::kan/pML005-tolC*), MF214 (*tolC::kan/pML005*) et lpl701 (*dotA::kan*) dans les hôtes *A. castellanii* (A) et les macrophages U937 (B). Les cellules eucaryotes ont été infectées à une MOI de 1 pendant 1 heure avec *L. pneumophila*. A différents temps post-infection, les tapis cellulaires eucaryotes ont été lysés soit par l'action de la pression osmotique (lyse en présence d'eau pour les cellules U937) soit par l'action d'un détergent (lyse en présence de Triton X-100 à 0,04% pour *A. castellanii*). Des aliquots du lysats ont alors été prélevés, dilués puis déposés sur le milieu gélosé BCYE pour numérer les cellules bactériennes). Les résultats proviennent de deux expériences indépendantes où chaque point a été répété trois fois. Les barres d'erreurs représentent les écarts-types obtenus. Les données ont été traitées statistiquement grâce à un test de student effectué par le logiciel R (<http://www.R-project.org>). Les valeurs de p-value obtenues sont indiquées dans le texte.

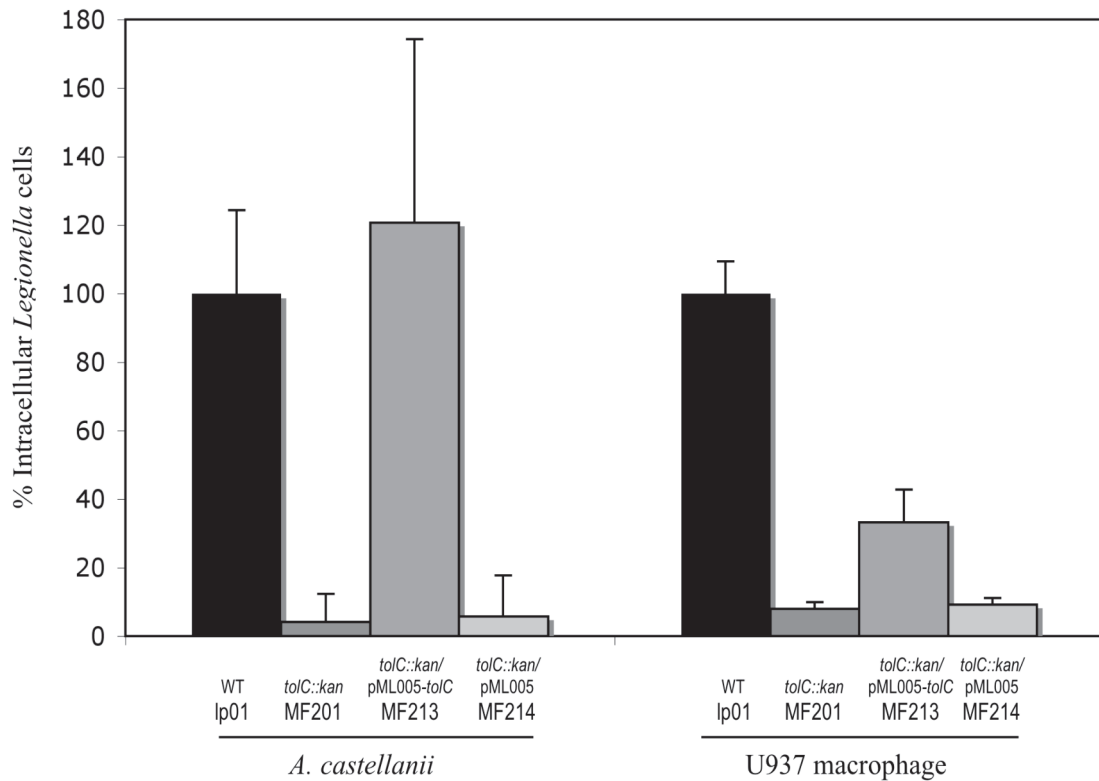


Figure 97. Capacité d'invasion de *L. pneumophila* Lens et des souches dérivées.

Les cellules hôtes eucaryotes ont été infectées à une MOI de 10 avec les souches Lp01 (WT), MF201 (*tolC::kan*), MF213 (*tolC::kan/pML005-tolC*), MF214 (*tolC::kan/pML005*) et lp1701 (*dotA::kan*). 1 heure après le contact avec *Legionella*, les tapis cellulaires ont été traités pendant 1 heure avec de la gentamycine pour tuer les cellules bactériennes adhérentes mais n'ayant pas encore pénétré dans les cellules eucaryotes. Les cellules eucaryotes ont ensuite été lysées en présence d'eau (cas des cellules U937) ou en présence de Triton 0,04% (cas de *A. castellanii*). Les bactéries intracellulaires ont été diluées puis déposées sur le milieu gélosé BCYE afin d'effectuer une numération. Les résultats proviennent de deux expériences indépendantes où chaque point a été répété trois fois. Les barres d'erreurs représentent les écarts-types obtenus. Les données ont été traitées statistiquement grâce à un test de student effectué par le logiciel R (<http://www.R-project.org>). Les valeurs de p-value obtenues sont indiquées dans le texte.

moins de 10% de celui obtenu avec la souche parentale chez *A. castellanii* (p -value = $3,1 \cdot 10^{-6}$) ou les macrophages U937 (p value = $3,1 \cdot 10^{-6}$) (Figure 97). Ceci démontre que la protéine TolC est essentielle dans les phases précoces de l'infection. Mais, si la complémentation a pu restaurer la capacité d'invasion du mutant MF201 chez *A. castellanii*, ceci n'était pas le cas des cellules U937. Ceci peut s'expliquer par le fait que *tolC* est placé sous un promoteur constitutif dans la souche complétementée. Aussi, il n'est pas à exclure que l'expression du gène *tolC* dans la souche sauvage puisse être soumise à des signaux perçus dans les macrophages qui sont différents de ceux rencontrés chez *A. castellanii*. De fait, il se peut que chez le macrophage, la présence de tels signaux induise une expression du gène *tolC* chez la souche parentale qui soit d'un niveau supérieur à l'expression de *tolC* chez la souche complétementée. En effet, dans le cas de la souche parentale, le gène *tolC* est sous son promoteur natif contrairement à l'expression constitutive dans le cas de la souche complétementée.

III Etude de l'expression des gènes codant pour des pompes à efflux

1. Intérêt de la démarche

Lorsqu'elle infecte sa cellule hôte, *L. pneumophila* passe par deux phases : la phase de multiplication qui permet aux cellules bactériennes de se diviser et d'établir leur vacuole au sein de la cellule hôte et la phase de transmission où les cellules bactériennes, devenues plus virulentes et plus mobiles, lysent leur cellule hôte et sont prêtes à en infecter d'autres. La transition entre ces deux phases, dite conversion phénotypique, se traduit notamment par des modifications profondes touchant à la morphologie des cellules bactériennes sous-tendues par une variation de l'expression des gènes. Cette transition de phase observée au cours de l'infection semble reproduire la transition phase exponentielle/phase stationnaire en milieu de culture comme en atteste les études du transcriptome à ce sujet (Cazalet *et al.*, 2004).

Ces études ont notamment mis en évidence le fait que la plupart des facteurs de virulence sont exprimés en phase transmissive (ou stationnaire). Cette phase, dite infectieuse, se caractérise notamment par la virulence accrue et par une augmentation de la résistance aux drogues et aux biocides. Il nous a donc paru intéressant, dans notre cas, d'étudier l'expression de gènes codant pour des pompes à efflux potentielles précédemment identifiées. Cette étude, élargie à tous les gènes sortis par l'étude bioinformatique, n'est pas limitée aux gènes que nous avons invalidés. Cette approche a l'intérêt de pouvoir mieux cibler de futurs gènes à invalider en fonction des profils d'expression des gènes observés.

2. Choix de la méthode

L'analyse de l'expression des gènes est devenue incontournable pour révéler et affiner la compréhension de mécanismes biologiques en recherche. La RT-qPCR est devenue la méthode de référence pour l'étude de l'expression des gènes et permet de valider les résultats de transcriptomique obtenus avec les puces. L'approche de RT-qPCR consiste à « rétrotranscrire » les ARN en ADN complémentaire (ADNc) avant d'amplifier chaque ADNc obtenu par PCR quantitative en temps réel à l'aide d'amorces spécifiques.

L'approche choisie repose donc sur la dissociation entre l'étape de transcription inverse et l'étape de PCR quantitative. Ceci permet d'étudier plusieurs transcrits à partir d'un ADNc provenant d'une seule réaction de transcription inverse (RT) et limite donc la variabilité. Pour ce faire, les ADN complémentaires ont été synthétisés à l'aide d'amorces aléatoires (hexamères dans notre cas) capables de s'hybrider à l'ensemble des ARNm présents dans les échantillons d'ARN totaux. Pour mesurer l'expression transcriptionnelle de gènes par RT-PCR, nous avons eu recours à trois étapes : les ARN totaux ont été extraits de cultures (étape 1) pour être convertis en ADNc (étape 2) et finalement, la quantité de transcrits dans un échantillon d'ADNc a été estimée par PCR quantitative en temps réel (étape 3).

3. Choix des gènes à étudier

D'après l'étude bioinformatique, sur les 116 gènes identifiés chez la souche Lens via l'approche bioinformatique, une liste de 48 gènes codant pour des pompes à efflux a été retenue (Tableau 16). Pour cela nous avons sélectionné les gènes dont les protéines codées

Tableau 16. Liste des gènes retenus pour l'étude par RT-qPCR
MFP : Membrane Fusion Protein ; OMF : Outer Membrane Factor ; IMP : Inner Membrane Protein

Gene (L.p.Lens)	proteine codée ou description
Gènes codant pour des protéines d'efflux	
<i>lpl15</i>	MFP
<i>lpl18</i>	OMP
<i>lpl278</i>	IMP (famille ABC)
<i>lpl308</i>	OMP
<i>lpl472</i>	OMP
<i>lpl696</i>	IMP (famille ABC)
<i>lpl697</i>	IMP (famille ABC)
<i>lpl736</i>	OMP (<i>toIC</i>)
<i>lpl757</i>	IMP (famille RND)
<i>lpl858</i>	OMP
<i>lpl880</i>	IMP (famille ABC)
<i>lpl881</i>	IMP (famille ABC)
<i>lpl1046</i>	IMP (famille RND)
<i>lpl1148</i>	IMP (famille ABC)
<i>lpl1510</i>	IMP (famille ABC)
<i>lpl2062</i>	IMP (famille MFS)
<i>lpl2063</i>	IMP (famille RND)
<i>lpl2104</i>	IMP (famille RND)
<i>lpl2434</i>	IMP (famille RND)
<i>lpl2438</i>	IMP (famille MFS)
<i>lpl2849</i>	IMP (famille ABC)
<i>lpl2850</i>	IMP (famille ABC)
<i>lpl216</i>	IMP (famille ABC)
<i>lpl217</i>	IMP (famille ABC)
<i>lpl719</i>	IMP (famille ABC)
<i>lpl2024</i>	IMP (famille ABC)
<i>lpl1407</i>	IMP (famille ABC)
<i>lpl1408</i>	IMP (famille ABC)
<i>lpl595</i>	IMP (famille SMR)
<i>lpl1167</i>	IMP (famille SMR)
<i>lpl2401</i>	IMP (famille SMR)
<i>lpl2469</i>	IMP (famille SMR)
<i>lpl2359</i>	IMP (famille MFS)
<i>lpl1277</i>	IMP (famille MFS)
<i>lpl1278</i>	IMP (famille MFS)
Gènes contrôles	
<i>lpl1247</i>	<i>rpoS</i> (gène de phase stationnaire)
<i>lpl1746</i>	<i>fliA</i> (gène de phase transmissive)
<i>lpl1293</i>	<i>flaA</i> (gène de phase transmissive)
<i>lpl820</i>	<i>csrA</i> (gène de phase réplivative)
<i>lpl362</i>	<i>rpoB</i> (gène de phase réplivative)
<i>lpl5002</i>	<i>16s rRNA</i> (gène de ménage)

étaient identifiées par une approche BLAST et PSI-BLAST. De plus, nous avons privilégié les structures regroupant plusieurs gènes côte-à-côte dans l'idée que les protéines codées feraient partie d'un même système d'efflux. Sur ces 48 gènes nous avons décidé d'en étudier 35, les 13 autres ayant été écartés car pouvant faire partie d'un opéron avec les gènes retenus. Nous avons, de plus, ajouté à l'étude des gènes contrôles. Il s'agit de gènes codant pour des facteurs de virulence de *Legionella*, pour des régulateurs ou des gènes de « ménage ».

4. Dessin d'amorces

Les gènes cibles identifiés, nous avons dessiné les amorces pour amplifier des séquences cibles de l'ADN complémentaire après sa synthèse. Pour cela, nous avons utilisé l'application « probe finder qPCR assay design software » disponible sur le site www.universalprobelibrary.com. Ce logiciel est adapté au dessin d'amorces pour la PCR quantitative. Certaines des amorces n'ayant pu être obtenues à l'aide de ce logiciel, elles ont été dessinées avec le logiciel « Cprimer » (Bristol, G., Anderson R.D., 1995. « A program for the estimation of the binding of oligonucleotides to DNA ». Department of medicine and department of biochemistry, school of medicine, University of California, Los Angeles, California). Les amorces dessinées ont la particularité de posséder un T_m voisin de 60°C et d'amplifier des fragments de taille assez proche (entre 60 et 107 pb) permettant d'utiliser un seul et même programme de PCR quantitative lorsque plusieurs gènes seront analysés. Avant la qPCR, la spécificité des couples d'amorce doit également être testée. Ces couples retenus ne doivent pas générer plusieurs produits de PCR (parasites) pouvant gêner l'analyse en PCR quantitative. Pour cela, les amorces ont été utilisées pour amplifier des séquences cibles de l'ADN chromosomique de *Legionella*. Les produits de PCR ont été contrôlés sur gel d'agarose. L'ensemble des amorces retenues après contrôle est rassemblé dans le tableau 17.

5. RT-qPCR

5.1. Extraction de l'ARN et synthèse de l'ADN complémentaire (RT)

L'ARN total a été extrait de 4 mL cultures bactériennes en phase exponentielle ($DO_{600nm}=1,5$) ou stationnaire ($DO_{600nm}=4,3$) de croissance (Tableau 18 regroupant les extraits analysés). L'ARN extrait a été contrôlé par mesure d'absorbance au « nanodrop ND-100 » (Thermo Scientific) et s'est révélé avoir de bons rapports A260/A280 et A260/230 (Figure 98). Un contrôle sur gel a permis de vérifier l'intégrité de l'ARN utilisé. L'ARN ainsi obtenu a ensuite été traité avec une DNase de façon à éliminer toute contamination résiduelle en ADN. 500 ng d'ARN ont ensuite servi à la réaction de transcription inverse. L'ADN complémentaire obtenu a ensuite été congelé par aliquots à -20°C avant la réaction de PCR quantitative.

Tableau 17. Amorces utilisées pour la PCR quantitative.* Numéro d'accès des gènes disponible sur le site <http://genolist.pasteur.fr/Legiolist/>

Gene* (<i>L.p.Lens</i>)	Amorce	Séquence (5'-3')	Amplicon (pb)
<i>lpl15</i>	Sens Reverse	ggggtgtgtcaactcgta tgaattgactcttggagcag	65
<i>lpl18</i>	Sens Reverse	accaaggaggattaagttctgaaa tcgcttgatcaaattgacc	70
<i>lpl278</i>	Sens Reverse	tcaaacatcaaatcggttttaca accccaataaaaggctactgg	60
<i>lpl308</i>	Sens Reverse	ctttgccagggattaatttagg ggcgccatcgacattaga	60
<i>lpl472</i>	Sens Reverse	cggtcgaatcaggtcca atcaagggtcaaacgcaaacc	62
<i>lpl696</i>	Sens Reverse	ttcaatttgcggtttcc gggtattaaggcattcatc	64
<i>lpl697</i>	Sens Reverse	gcttcgcaattggcttaat tcaaaaataaaccggaaagaa	65
<i>lpl736</i>	Sens Reverse	tggatgccatcactctgtc ctgtcgctatggattgatcg	60
<i>lpl757</i>	Sens Reverse	gcagccggaagtactaaaagtg caaatcggtttagccgtga	60
<i>lpl858</i>	Sens Reverse	cgaattaaggcagcgattgt ttggttcgctcacttcata	61
<i>lpl880</i>	Sens Reverse	tccattttctattgccgaat ttgccagacgttgcatag	67
<i>lpl881</i>	Sens Reverse	cagggggctgaaaaagatt cgatgattgtgatgtggtgaa	64
<i>lpl1046</i>	Sens Reverse	aaggaagtggtttgggtacg agacacagtcggctgtttt	60
<i>lpl1148</i>	Sens Reverse	catcaatgctcggagtttt gtacccaaacggttcatgg	74
<i>lpl1510</i>	Sens Reverse	cgaggccgtgcttctagt ttgctgggatcaaggattg	61
<i>lpl2062</i>	Sens Reverse	cggttgtgggggtatttta gaattggttgagggatcagg	60
<i>lpl2063</i>	Sens Reverse	ttatccttggaaagtgccatt ggttttgagcgaacactgg	61
<i>lpl2104</i>	Sens Reverse	atcaaggaagccctcatcgt ccacctgcattccaatacc	65
<i>lpl2434</i>	Sens Reverse	atcatgggggtatgccttt aattgagcgacgagaattgg	63
<i>lpl2438</i>	Sens Reverse	atgttctgagagttatgcccaata caaaaattatggcatcaatgtgaa	75
<i>lpl2849</i>	Sens Reverse	ttgctggcttctggttct gtcgggccggataaaatc	60
<i>lpl2850</i>	Sens Reverse	tgaccgaccacaggttatt tcgctacctgttctgaaacc	67
<i>lpl216</i>	Sens Reverse	ggcaatagccaaaaatcctg cacaatcaagtgcgctgt	62
<i>lpl217</i>	Sens Reverse	ccacttatatccgcctgttt cgtctgtcaccaaatcaa	64

<i>lpl719</i>	Sens Reverse	cagcacacagcatatggatga ttctccggcggacatataaa	64
<i>lpl2024</i>	Sens Reverse	ctcaccgtagagaggggtga gcgcaatatggtggtttg	72
<i>lpl1407</i>	Sens Reverse	gatgaaagagcaggagcgtaa ttcggtgggctatctctt	66
<i>lpl1408</i>	Sens Reverse	tttgtgaatctgatttacgactt ggcaaggtttgaccatca	73
<i>lpl595</i>	Sens Reverse	gcagccaagccttttacag tcctaccataccgcatag	107
<i>lpl1167</i>	Sens Reverse	tgggagtgttattatgctttgc acctctgcaactttgcatgt	72
<i>lpl2401</i>	Sens Reverse	ttttattggtttgcgtgtgg gcactgcatgagtaaagaagc	60
<i>lpl2469</i>	Sens Reverse	ttgccagacagttgatggag tgttgccaaaggcattacag	61
<i>lpl2359</i>	Sens Reverse	ggcattgattttgcacgta aagcatagtaaataggtccacagg	63
<i>lpl1277</i>	Sens Reverse	ccacaaaatactttgcgtggt aatggaagaagcaaataaacagc	61
<i>lpl1278</i>	Sens Reverse	ccttgggattagccaattcat gaccaccaataacaatccaa	63
<i>lpl1247</i>	Sens Reverse	cgaggattccgttttcaac tgcgcgctcaatagtttg	60
<i>lpl1746</i>	Sens Reverse	ccctcgtaaagagagactggtg ccccgatttcctcaaattc	68
<i>lpl1293</i>	Sens Reverse	ctgacggttaactgtgactgg tgatcgataaagtaccgctaa	63
<i>lpl820</i>	Sens Reverse	tcgcttaggaattaatgctccg gcaaataaattcttcacgatgaaca	61
<i>lpl362</i>	Sens Reverse	ggagtttcagttgttgcaag caatacgagaagcatcaaccag	63
<i>lpl5002</i>	Sens Reverse	cgggaggcagcagtggtg cgcggttcattgctgga	62

Tableau 18. Concentration et rapport d'absorbance A260/280 et A260/230 des deux extraits d'ARN indépendants utilisés pour l'étude de RT-qPCR (valeurs obtenues grâce au nanodrop).

L'ARN est bien pur car le rapport A260/280 a une valeur de 2,0. Il n'y a pas d'interférence avec d'éventuelles protéines absorbant à 280 nm. L'absorption à 230 nm reflète la contamination par des hydrates de carbone, les peptides, les composés aromatiques ou les phénols. Là encore, le ratio A260/230 proche de 2,0 dans les cas signe l'absence d'une telle contamination.

Extrait	Phase de l'extraction	Concentration (ng/μl)	A260/280	A260/230
Extraction ARN 1	Exponentielle	735,2	2,05	2,46
	Stationnaire	584,0	2,05	2,44
Extraction ARN 2	Exponentielle	652,1	2,04	2,35
	Stationnaire	365,0	1,99	2,33

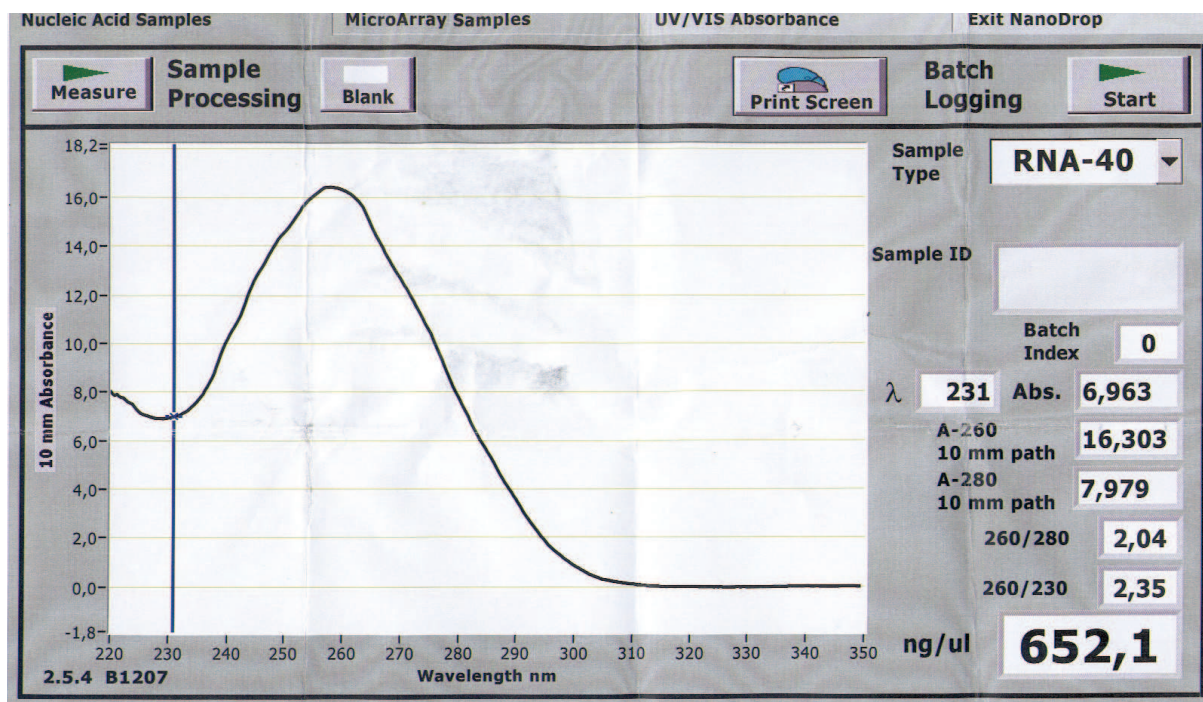


Figure 98. Exemple de spectre d'absorption obtenu à l'aide du « nanodrop » avec un extrait d'ARN. On observe un unique pic à 260 nm.

5.2. PCR quantitative sur l'ADN complémentaire

5.2.1. Principe de la PCR quantitative

5.2.1.1. Format de détection des amplicons

La PCR quantitative a été effectuée à l'aide d'amorces spécifiques correspondant à chaque gène. Les PCR quantitatives sont effectuées sur l'appareil LightCycler LC480 (Roche). Cet appareil possède plusieurs formats de détection de la fluorescence permettant de suivre la formation des amplicons lors de la PCR en temps réel et de manière quantifiable ; la mesure de la fluorescence étant proportionnelle à la quantité d'amplicon générée. Dans notre cas, vu le nombre de gènes à étudier, il nous a semblé plus pertinent d'utiliser la détection par le SYBR Green. Incorporé dans le mélange réactionnel, cet agent intercalant est capable d'aller se fixer entre les bases de l'ADN et d'émettre un signal de fluorescence lorsqu'il est lié au double brin d'ADN. L'intensité de fluorescence émise est donc proportionnelle à la quantité de doubles brins générés et permet une quantification du nombre d'amplicons présents à chaque cycle. Le LightCycler permet l'analyse des données grâce à deux types de courbes : la courbe d'amplification et la courbe de fusion.

5.2.1.2 Analyse

a. Courbe d'amplification

Le logiciel « LightCycler Software 1.50 » permet de récolter les données de fluorescence à la fin de chaque cycle d'amplification (lors de l'élongation). Ces données sont présentées sous la forme de la courbe d'amplification (Figure 99). La courbe d'amplification est établie sur la base de la mesure de la fluorescence à chaque cycle. D'allure sigmoïde, elle présente trois parties très distinctes : la phase d'amorce, où l'intensité du signal se confond avec le bruit de fond; la phase exponentielle, où la quantité d'amplicon générée fournit un signal fluorescent supérieur dépassant le bruit de fond puis double à chaque cycle; et enfin, la phase de plateau (ou de saturation) où la quantité de réactifs comme la Taq polymérase devient limitante pour l'amplification. Le cycle correspondant au moment où le signal de fluorescence dépasse le bruit de fond se nomme C_p (« crossing point ») : celui-ci est calculé de façon précise par un modèle mathématique utilisé par le logiciel. On comprend alors que la valeur du C_p est corrélée et inversement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés. C'est donc la valeur du C_p qui permet de quantifier l'ADN.

b. Courbe de fusion

Suite à la PCR, la température est progressivement augmentée afin de dissocier les doubles brins d'ADN formés (Figure 100). La chute brutale de la fluorescence donne une indication sur le T_m du produit amplifié (température à partir de laquelle 50% de l'ADN est sous forme simple brin). Le T_m exact correspondant au « melting peak » est visible sur la dérivée de cette courbe. Or comme le T_m dépend de la séquence nucléique, cette analyse s'avère intéressante afin de vérifier non seulement qu'un unique produit de PCR est généré (un seul pic) et qu'il correspond bien au produit attendu. Ce test sur la spécificité de la PCR remplace une analyse sur gel d'agarose.

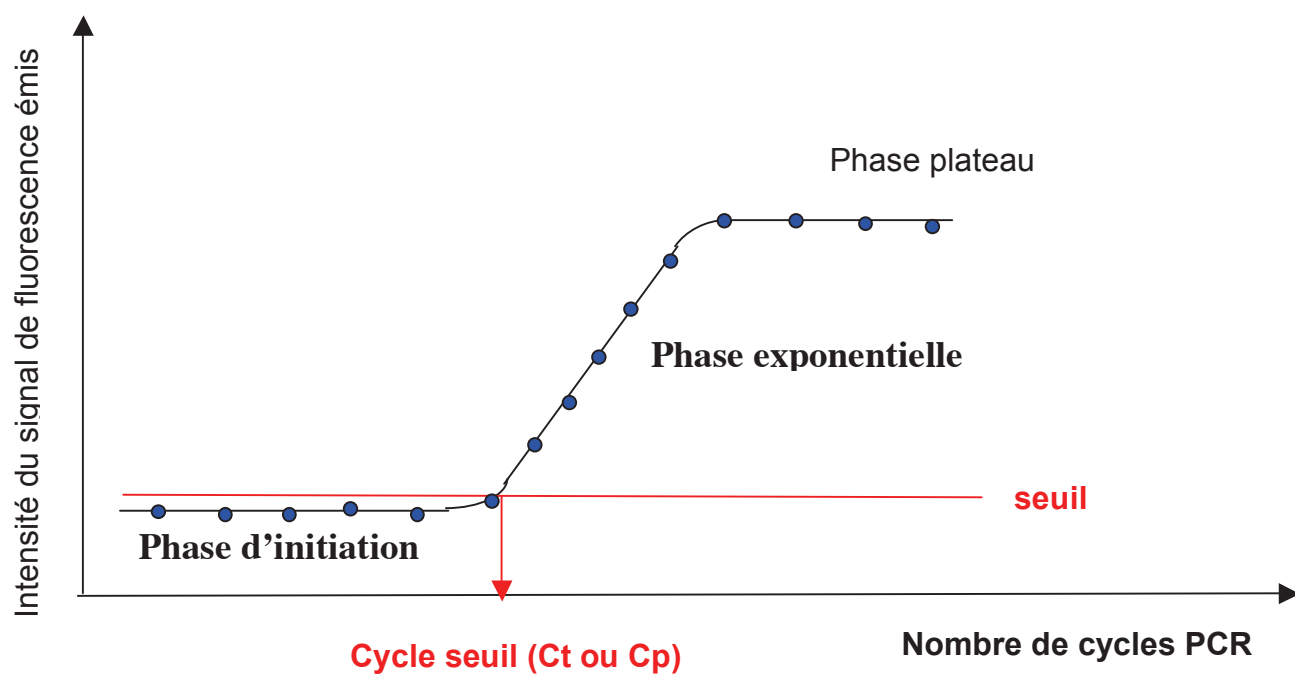


Figure 99. Allure type d'une courbe d'amplification telle qu'obtenue sur le Lightcycler

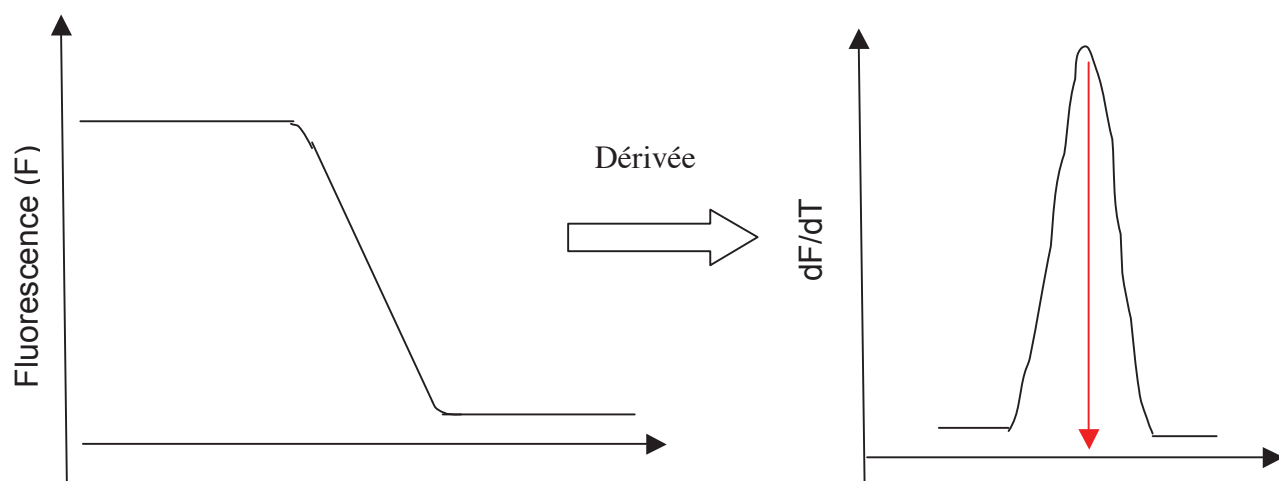


Figure 100. Allure type d'une courbe de fusion telle qu'obtenue sur le Lightcycler

c. Quantification

Les PCR quantitatives ont été réalisées pour chacun des 40 gènes testés (incluant les gènes contrôles). Pour chaque gène, une gamme étalon réalisée avec une gamme de dilution d'un produit de PCR a été effectuée en parallèle (Figure 101). Le produit de PCR provient de l'amplification de la séquence du gène cible sur de l'ADN chromosomique. Cette gamme sert à déterminer l'efficacité E de la PCR à partir de la pente de la droite étalon via la formule $E = (10^{(-1/pente)})$. Pour chaque réaction d'amplification, nous avons vérifié par la courbe de fusion que les produits amplifiés correspondent bien à un seul produit ce qui est visualisable par la présence d'un seul et unique pic sur la courbe.

Toutes ces vérifications faites, les données ont été traitées à l'aide du logiciel REST (Pfaffl *et al.*, 2002) pour déterminer le changement de niveau d'expression de chaque transcrite entre les deux phases (phase exponentielle/ phase stationnaire). Ce logiciel permettant le traitement des données de RT-PCR quantitative est basé sur le modèle mathématique développé par Pfaffl (Pfaffl, 2001).

Ce logiciel permet de calculer le ratio d'expression relative de chaque gène suivant la formule :

$$R = \frac{(E_{\text{Cible}})^{\Delta C_p \text{ cible (moyenne controle- moyenne test)}}}{(E_{\text{Référence}})^{\Delta C_p \text{ référence (moyenne controle- moyenne test)}}$$

où R représente le ratio d'expression relative normalisé

E représente l'efficacité de la PCR déduite de la valeur de la pente de la droite étalon par la formule $10^{(-1/pente)}$. Celle-ci est déterminée pour le gène cible (E_{Cible}) et pour le gène de référence 16S ($E_{\text{Référence}}$) servant à la normalisation dans notre cas.

ΔC_p (moyenne controle-moyenne échantillon) représente la différence entre la valeur moyenne des C_p du groupe « controle » (phase exponentielle dans notre cas) et du groupe « test » (phase stationnaire dans notre cas). $\Delta C_{p_{\text{cible}}}$ correspond à la différence des C_p dans le cas du gène cible (=gène à étudier) et $\Delta C_{p_{\text{référence}}}$ correspond à la différence des C_p dans le cas du gène de référence (=gène 16S).

En plus de définir le ratio d'expression relative, le logiciel intègre un traitement statistique des données. Ce traitement statistique repose sur un test de « randomisation » (facteur aléatoire) en prenant les deux groupes définis comme contrôle (phase exponentielle dans notre cas) et test (phase stationnaire dans notre cas). Ce traitement statistique permet, à partir du calcul de la « p-value » de savoir si les différences observées entre les C_p du groupe controle et du groupe test sont significativement différentes. Dans le cas d'une « p-value » inférieure à 0,05 (indice de confiance de 95%), le logiciel donne un facteur de régulation normalisé.

La valeur de ce facteur de régulation correspond :

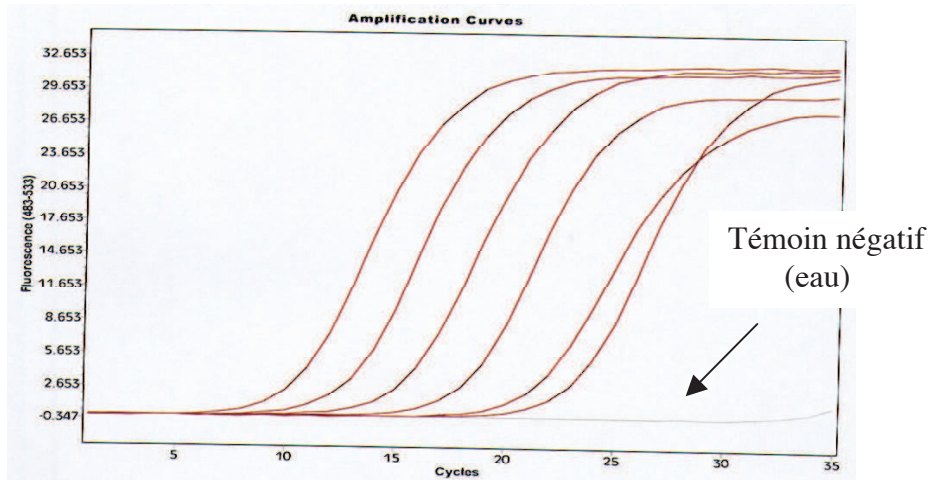
- au ratio d'expression dans le cas d'une « up-régulation » c'est-à-dire d'une plus grande expression du gène dans le groupe test (phase stationnaire) par rapport au groupe contrôle (phase exponentielle).

- à 1/ratio d'expression dans le cas d'une « down-regulation » c'est-à-dire d'une plus faible expression du gène dans le groupe test (phase stationnaire) par rapport au groupe controle (phase exponentielle).

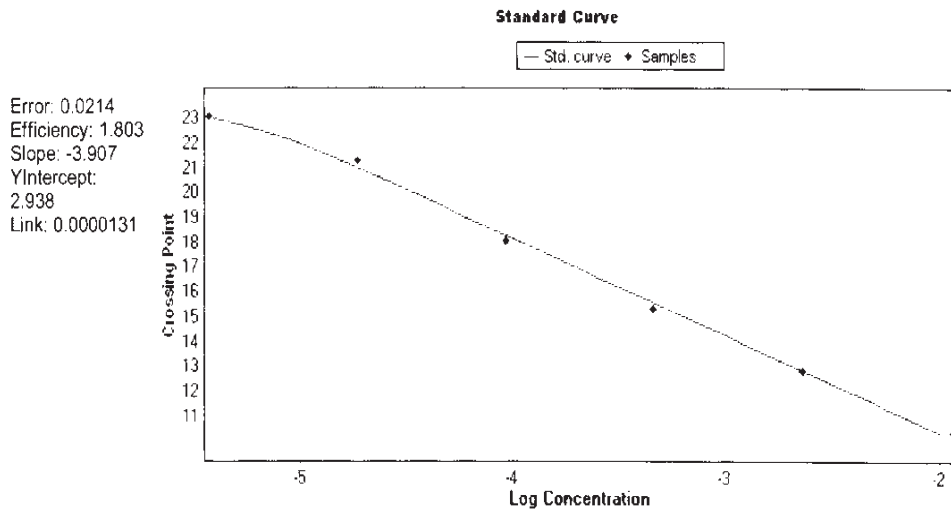
$1,2 \cdot 10^{-2}$

$3,7 \cdot 10^{-6}$

A



B



C

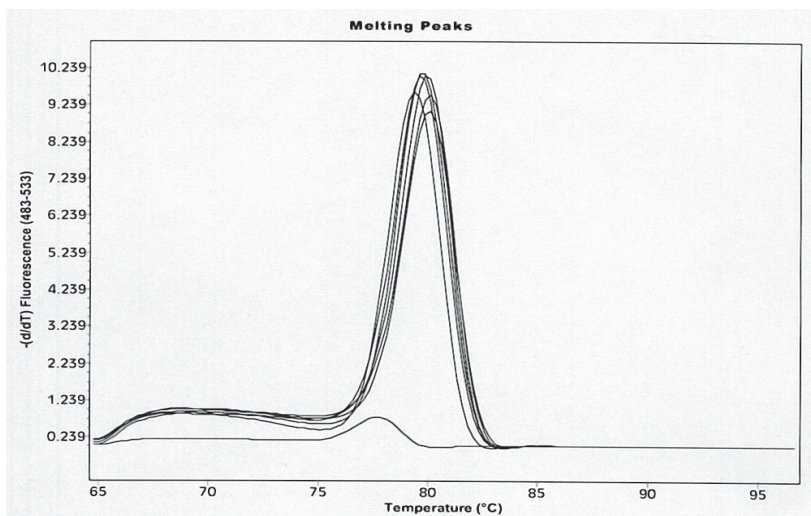


Figure 101. Exemple de résultats d'analyses obtenus avec le LightCycler.

A. Courbes d'amplifications obtenues avec différentes dilutions d'un ADN matrice provenant de l'amplification du gène *lpl736 (tolC)* par PCR. Les dilutions au 1/5 vont de $1,2 \cdot 10^{-2}$ à $3,7 \cdot 10^{-6}$ ng/μl.

B. Tracé de la droite étalon.

C. Courbe de fusion.

Les facteurs de régulation obtenus pour les différents gènes dans le cas de notre étude ont été regroupés dans le Tableau 19. Dans le cas d'une variation d'expression significative des gènes, les facteurs de régulation ont été représentés sous forme d'un graphique dans la Figure 102. De façon arbitraire, les facteurs ont été représentés avec une valeur positive dans le cas de gènes plus exprimés en phase stationnaire qu'en phase exponentielle. Un facteur négatif signifie que le gène est, au contraire, plus exprimé en phase exponentielle. Ceci conduit donc à discriminer des gènes dits de phase exponentielle (facteur négatif) de ceux de phase stationnaire (facteur positif).

De façon intéressante, l'analyse de l'expression des gènes, révèle que, sur les 40 gènes (incluant les gènes de contrôle) 32 montrent une différence d'expression significative entre la phase exponentielle et la phase stationnaire de croissance. 7 des gènes ne montrent pas de différence d'expression significative et un gène (*lpl1277*) s'est révélé ne pas être exprimé (« Crossing point » ou Cp supérieur à 35) dans nos conditions. La plupart des gènes que nous avons étudié sont de façon majoritaire des gènes plus exprimés lors de la phase exponentielle puisque cela concerne 23 gènes (plus les trois gènes de contrôle qui porte le total à 26) avec des facteurs variant de $-1,6$ à -5 (facteur de -9 si on tient compte du gène *csrA*). Seulement six gènes se sont avérés être des gènes de phase stationnaire incluant entre autres les gènes de contrôle *fliA*, *flaA* et *rpoS*. Il est à souligner que les gènes de contrôle inclus dans l'étude ont eu le profil d'expression attendu : *csrA* et *rpoB* sont exprimés en phase exponentielle de croissance alors que les gènes *rpoS*, régulateur de la phase stationnaire, *fliA* régulateur globale de *Legionella* et *flaA* qui code pour la flagelline associée à la plus forte mobilité observée au cours de la phase stationnaire sont bien exprimés en phase stationnaire. De plus, les résultats obtenus avec les gènes contrôles confirment les résultats observés par microarray (Cazalet *et al.*, 2004). Ainsi, si l'on compare à ce qui a été observé dans le cas d'une culture de la souche Paris, on constate que les facteurs de régulation sont assez voisins de ceux que nous avons trouvés.

Pour le gène *tolC* (*lpl736*), son expression est plus forte lors de la phase exponentielle, ce qui correspondrait à la phase répllicative lors de l'infection. Ces résultats ne sont pas complètement en accord avec le fait que les cellules de *Legionella* présenteraient une résistance accrue en sortie d'une cellule eucaryote (phase transmissive). Evidemment, dans notre cas, nous avons assimilé la phase stationnaire à la phase transmissive retrouvée lors de l'infection, ce qui n'est peut-être pas le cas physiologiquement.

Nos premiers essais pour réaliser cette étude d'expression de gènes chez *Legionella* au cours du cycle d'infection d'*A. castellanii* se sont heurtés à de nombreux problèmes techniques, en particulier à la très faible quantité d'ARNm bactériens isolés à partir des amibes infectés. En effet, dans ce cas, la grande quantité d'ARN eucaryotes contaminants ne nous a pas permis d'obtenir des valeurs de qPCR exploitables (Cp>30). Des mises au point pour résoudre ces problèmes sont en cours.

Tableau 19. Tableau récapitulatif des facteurs de régulation obtenus (entre parenthèses) ainsi que les différents gènes testés.

Gènes « DOWN-régulés » en phase stationnaire PHASE REPLICATIVE	Gènes « UP-régulés » en phase stationnaire PHASE TRANSMISSIVE	Gènes non régulés par le changement de phase
820 / <i>csrA</i> (-9)	1247 <i>rpoS</i> (+1,301)	18
2438 / <i>smlA</i> (-7,9)	1046 / <i>helA</i> (+1,905)	216
2469 (-5)	1510 / <i>lssB</i> (+4,914)	217
736 / <i>tolC</i> (-3,114)	2104 (+4,864)	697
362 / <i>rpoB</i> (-4,2)	1746 / <i>fliA</i> (+8,050)	1167
757 (-4,017)	1293 / <i>flaA</i> (+58,171)	1407
595 / <i>sugE</i> (-3,998)		2062 / <i>tphB</i>
308 (-3,998)		
858 (-3,42)		
696 (-3,385)		
1278 (-3,0)		NON EXPRIME (CP>35) :
719 (-2,97)		1277
2850 (-2,658)		
15 (-2,638)		
472 (-2,628)		
2359 / <i>sflR</i> (-2,481)		
2849 (-2,48)		
278 (-2,4)		
2401 (-2,39)		
2024 (-2,111)		
2063 / <i>ceaA</i> (-2,043)		
1148 / <i>potA</i> (-1,917)		
881 (-1,89)		
1408 (-1,8)		
880 (-1,677)		
2434 / <i>lmxF</i> (-1,612)		

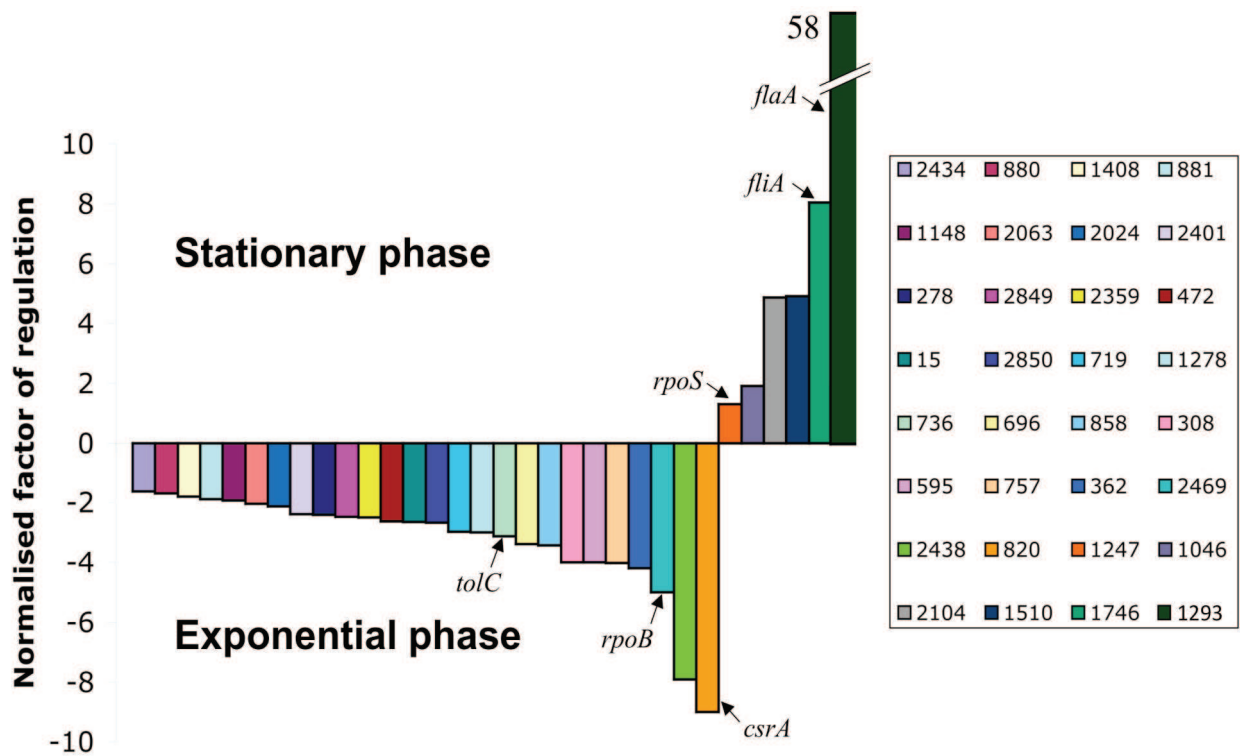


Figure 102. Graphique représentant les facteurs de régulation obtenus pour les différents gènes étudiés par RT-qPCR.

Les facteurs de régulations ont été obtenus avec le logiciel REST. Les facteurs positifs correspondent aux gènes dont l'expression est augmentée en phase stationnaire alors que les facteurs négatifs correspondent aux gènes dont l'expression est plus forte en phase exponentielle. A droite, le cadre regroupe sous forme d'un code couleur les numéros des différents gènes étudiés tels qu'ils sont accessibles sur le site de l'institut pasteur. Les noms de gènes sur le graphique correspondent à ceux des gènes contrôles (*rpoS*, *fliA*, *flaA*, *csrA*, *rpoB*) exception faite du gène *tolC*.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

I. Conclusion

Lorsque j'ai débuté ma thèse, la thématique *Legionella* venait tout juste de démarrer au laboratoire. Bactérie pathogène pour l'Homme, *Legionella pneumophila* est un modèle d'étude qui permet d'appréhender plusieurs aspects de la pathogénie intracellulaire, l'un des buts étant de comprendre les mécanismes de virulence de cette bactérie. Une approche originale du laboratoire a été développée par Christophe GILBERT : il s'agit de l'étude des mécanismes de résistance aux drogues (biocides et antibiotiques) de *Legionella*. En effet, un des problèmes majeurs concernant cette bactérie est sa résistance aux biocides causant des problèmes dans le traitement des tours aérorefrigérantes et autres systèmes générant des aérosols, impliqués dans des cas de contamination humaine par dissémination. Ce problème est amplifié par le fait que *Legionella* est capable d'infecter et de se multiplier dans des cellules eucaryotes présentes dans l'environnement comme les amibes qui peuvent adopter une forme particulièrement résistante aux stress environnementaux qui est nommée kyste (Kilvington & Price, 1990). Des cas de résistance aux biocides des amibes *Acanthamoeba hatchetti* et *Cochliopodium bilimbosum* isolées de tours aérorefrigérantes (comparés aux souches de référence provenant de l'ATCC) ont été constatés (Srikanth & Berk, 1993). Il a même été observé une stimulation de la multiplication des amibes en présence de biocides. De plus, l'amibe *A. polyphaga* peut héberger les formes viables mais non-cultivables (VBNC) : au sein du protozoaire, *Legionella* peut retrouver un état viable, expliquant par là les épisodes de réémergence de legionelles après le traitement des tours aérorefrigérés (Garcia *et al.*, 2007). Ainsi, dans les tours aérorefrigérés les cellules bactériennes peuvent être protégées de l'action des biocides par les amibes (Pagnier *et al.*, 2009). De plus, l'étude de la résistance aux drogues s'avère importante afin de mieux appréhender les cas de résistance observés en clinique. Enfin, il est frappant de voir que cette bactérie possède au sein de son génome un nombre assez important de gènes codant pour des protéines à domaine eucaryote que l'on pense avoir été acquis par un transfert de gènes horizontal vu les nombreux remaniements génétiques dont est capable cette bactérie.

Dans notre approche, nous avons ciblé un mécanisme de résistance aux drogues particulier : les pompes à efflux, qui interviennent de façon majeure dans la multi-résistance aux drogues associée à de nombreux cas de résistance clinique. Chez les bactéries à Gram négatif dont fait partie *Legionella*, les pompes d'efflux sont des protéines localisées dans la membrane interne et capables de s'associer à des partenaires périplamiques et parfois même à une protéine de la membrane externe (on parle dans ce cas de pompe à efflux tripartite) pour refouler un composé hors de la cellule bactérienne. Des informations importantes sur le fonctionnement de ces pompes nous sont parvenues de l'étude de la pompe à efflux AcrA/AcrB/TolC chez *E. coli*, l'archétype des pompes d'efflux. Le particularisme de cette pompe d'efflux tient à la protéine TolC qui, formant un canal dans la membrane externe, est capable d'assurer l'efflux de drogues mais également la sécrétion de facteurs de virulence comme l'hémolysine chez *E. coli* en s'associant à d'autres protéines (système de sécrétion de type I : HlyB/HlyD/TolC) (Gentschev *et al.*, 2002). Il n'est donc pas étonnant que la délétion du gène *tolC* ou de gènes codant pour des protéines d'efflux affecte la virulence bactérienne. Chez *Legionella*, la première preuve d'un lien entre résistance aux drogues et virulence est venu de l'étude de Barker *et al.* montrant une augmentation de la résistance aux drogues de *Legionella* sous sa forme infectieuse, c'est-à-dire suite à la multiplication dans *A. castellanii* (Barker *et al.*, 1995). Par la suite, le lien entre résistance aux drogues et virulence a été le fil rouge de nos études concernant *Legionella*. D'autres approches pour appréhender les

mécanismes de virulence de *Legionella* ont ensuite vu le jour au sein de notre laboratoire avec l'étude de l'implication des sérines thréonines kinases ou encore des protéines à motif GGDEF/EAL.

Pour étudier le rôle des pompes d'efflux chez *Legionella*, une étude bioinformatique exhaustive a été menée avec Fanny COFFIN et christophe GILBERT. Il a s'agi de répertorier l'ensemble des gènes codant pour des protéines d'efflux potentielles à partir des génomes des souches séquencées alors disponibles à savoir *Legionella pneumophila* Lens, Paris et Philadelphia. Actuellement, la séquence de la souche Corby est disponible et celle de la souche *longbeache* isolée en Australie vient d'être publiée (Cazalet *et al.*, 2010).

Les protéines d'efflux ont été recherchées sur la base d'homologies avec des protéines connues chez *E. coli* et faisant partie de l'une des cinq familles présentes chez les bactéries à Gram négatif, à savoir les familles RND, MFS, ABC, MATE et SMR. Les résultats de cette analyse bioinformatique nous ont fourni de nombreuses informations mais ont aussi montré leurs limites. Ainsi, il n'a été retrouvé aucune protéine de la famille MATE et aucune porine. Ce résultat peut paraître surprenant, mais à ce jour une seule protéine semble avoir été annotée comme une porine chez *Legionella*, la protéine OmpS (Hoffman *et al.*, 1992). L'analyse de la structure potentielle ne semble pas correspondre aux structures de porines classiques. La structure des protéines de type porine ou MATE chez *Legionella* est peut-être trop particulière et difficile à identifier par homologie de séquence. Il sera certainement nécessaire de compléter cette étude par une analyse axée sur des motifs protéiques plutôt que sur des séquences de protéines complètes ou bien de rechercher les fonctions porines par une approche biologique.

Cependant, notre approche a été confortée par le fait que certaines protéines identifiées correspondaient bien, de par les fonctions prédites sur le site de l'Institut Pasteur, à des protéines intervenant dans l'efflux. Ainsi la protéine codée par le gène *lpl736*, que nous avons identifié comme la protéine la plus homologue à TolC chez *E.coli* est annotée TolC sur le site. D'autres protéines sont annotées comme participant à un processus d'efflux. Hormis cela, l'approche bioinformatique nous a permis de constater que certains gènes codant pour des protéines composant des systèmes d'efflux étaient regroupés au sein d'opéron : dans ce cas, on retrouve le gène codant pour la protéine de membrane externe adjacent aux gènes codant pour la protéine périplasmique et au gène codant pour la protéine de la membrane externe. Ce regroupement est retrouvé pour les gènes codant pour les protéines d'un même système d'efflux chez d'autres bactéries : ainsi les gènes codant pour les protéines composant la pompe tripartite MexA/MexB/OprM font partie d'un opéron (Poole *et al.*, 1996). D'autres regroupements de gènes concernent le gène codant pour la protéine de membrane interne et celui codant pour la protéine périplasmique. Dans ce cas, on peut supposer une association avec l'une des protéines de la membrane externe homologues à TolC appartenant à la catégories des protéines dites « orphelines ». Enfin, il apparaît que certaines protéines d'efflux présentes chez une souche peuvent être absentes chez une autre : il existe donc des mutants « naturels ».

Mais, pour valider l'approche bioinformatique, il a fallu démontrer que les gènes identifiés codent pour des pompes d'efflux fonctionnelles chez *Legionella*. Pour cela, nous avons décidé de construire des mutants de *Legionella* invalidés au niveau de gènes codant pour des protéines d'efflux que nous avons ciblés. Nous nous sommes appuyés sur l'approche initiée par Anne VIANNEY au laboratoire qui permet une invalidation de gènes par recombinaison homologue : le gène invalidé est alors remplacé par une cassette de résistance à la kanamycine qui permet la sélection des mutants. Pour l'invalidation, nous avons privilégié les associations de gènes codant pour des pompes les plus « complètes » : associations de deux ou trois gènes. Nous avons également ajouté l'invalidation de deux gènes codant pour deux protéines très homologues à TolC en espérant un rôle majeur de ces

protéines étant donné les multiples rôles joués par TolC dans la virulence et dans la résistance aux drogues. Dans notre cas, l'approche est orientée et on ne peut exclure que l'inactivation de gènes codant pour seulement une protéine puisse avoir un effet sur la multi-résistance aux drogues d'autant plus qu'il vient d'être démontré une coopération entre les pompes d'efflux à un composant et les pompes d'efflux tripartites (Tal & Schuldiner, 2009). On peut alors penser à juste titre que l'inactivation d'une pompe à un composant puisse jouer sur le spectre de drogues effluées par une pompe tripartite. Tous nos mutants ont été construits dans la souche Lens.

Les mutants obtenus ont alors été testés pour leur résistance aux drogues. Le test développé, dérivé d'études antérieures permet d'évaluer la sensibilité aux drogues par la détermination de la concentration minimale inhibant totalement la croissance bactérienne en milieu gélosé BCYE. Ce test ne permet que de tester un mode d'action des drogues : il permet d'évaluer l'effet bactéricide des composés toxiques mais ne donne en revanche aucune information sur l'effet bactériostatique. De plus, le milieu BCYE contient du charbon qui peut inactiver certains antibiotiques comme la tetracycline (Edelstein & Meyer, 1980). Ce n'est pas la valeur de la MIC qui compte dans nos tests mais il s'agissait plutôt de disposer d'un protocole simple afin de mettre en évidence des différences de sensibilités aux drogues entre la souche sauvage et les mutants de pompes à efflux. Les différences de sensibilité aux drogues observées étaient souvent minimales (facteur 2) pour la plupart des mutants testés mais un mutant a particulièrement attiré notre attention; il s'agit du mutant MF201 invalidé pour le gène codant pour la protéine TolC qui présentait une sensibilité aux drogues plus forte (facteur de sensibilité allant jusqu'à 16 comparé à la souche sauvage) et pour un large panel de drogues testées. Le rôle de TolC dans la multi-résistance aux drogues a été observé chez d'autres bactéries (Nishino *et al.*, 2006, Gil *et al.*, 2006). Pour préciser le mécanisme de résistance, nous avons mis au point avec succès un test d'accumulation du bromure d'éthidium en présence ou en absence d'un inhibiteur de pompes à efflux, le CCCP. De fait chez *Legionella*, l'inactivation de *tolC* conduit à l'accumulation de bromure d'éthidium en présence ou non de CCCP alors qu'elle a lieu seulement en présence de l'inhibiteur chez la souche sauvage. Cela signifie que TolC participe à une résistance aux drogues par un mécanisme d'efflux.

Suivant notre ligne directrice du lien entre résistance aux drogues et virulence, nous avons testé notre mutant afin de savoir si sa virulence était altérée. La virulence de ce mutant a été testée dans trois hôtes eucaryotes (*A. castellanii*, cellules U937 et *D. discoideum*). L'étude de la virulence a concerné la capacité d'invasion, la capacité de multiplication intracellulaire, la libération des bactéries suite à l'infection. Il a dès lors été intéressant de constater que notre mutant était déficient dans sa virulence. Le fait qu'il ait une capacité d'invasion réduite semble signifier que ce défaut de virulence concerne les étapes précoces de l'infection. Comme il n'a été constaté aucun défaut d'adhérence, il semble que cela concerne les étapes intracellulaires précoces concernant la formation de la vacuole de multiplication (inhibition de la fusion phagosome/lysosome ou la sécrétion de facteurs de virulence intervenant dans la formation de la vacuole de multiplication) ou le rejet de composés antimicrobiens délivrés par la cellule hôte eucaryote. Il a été intéressant de constater que dans les différents hôtes, la complémentation par l'apport du gène *tolC* permettait de restaurer la virulence à un niveau sensiblement équivalent à celui de la souche parentale. Seule la capacité d'invasion du mutant *tolC* n'a pu être restaurée dans les macrophages U937 alors qu'elle l'était dans le cas de l'amibe *A. castellanii*. Ceci peut s'expliquer par le fait que dans notre stratégie de complémentation le gène *tolC* a été placé sous le promoteur du gène de résistance à la kanamycine (Pkan) et non sous son promoteur natif. De fait, l'expression de *tolC* est constitutive dans l'hôte. Or, on ne peut exclure que le gène *tolC* puisse être soumis à des régulations par des facteurs de l'hôte : il se peut que certains signaux (stress,...) puissent être

perçus par la cellule et puissent jouer sur l'expression du gène via une action au niveau de son promoteur. De ce fait, il se peut que le niveau d'expression du gène *tolC* dans *A. castellanii* puisse suffire à compléter le mutant alors qu'il s'avère insuffisant dans les cellules U937 du fait de l'induction de l'expression du gène *tolC* par des signaux intracellulaires dans le cas du promoteur sauvage. Ceci est intéressant car il supposerait que des signaux intracellulaires différents suivant l'hôte puissent jouer sur l'expression de *tolC*. Ces signaux peuvent être des signaux de stress : ainsi le gène *tolC* chez *E. coli* peut être induit par l'activateur transcriptionnel SoxS dont la synthèse répond au stress oxydant (l'activateur transcriptionnel de SoxS, la protéine SoxR passe sous sa forme active en présence de dérivés toxiques de l'oxygène comme O₂⁻) (Grkovic *et al.*, 2002). On ne peut cependant exclure que d'autres signaux puissent jouer sur l'expression de *tolC* comme par exemple le pH ou la carence en nutriments.

L'étude de l'expression des gènes en condition de culture et lors d'une infection a donc été envisagée. D'une part, il s'agissait de vérifier que nos gènes étaient bien exprimés, et d'autre part il fallait mieux cibler la construction de nouveaux mutants. En effet, dans notre approche nous sommes partis d'informations sur la base de l'analyse bioinformatique et nous avons arbitrairement privilégié d'invalider certains gènes ou groupes de gènes d'après des fonctions supposées : en particulier nous avons privilégié d'inactiver des gènes codant pour des pompes d'efflux les plus complètes (tripartites) qui appartiennent essentiellement à la famille RND vu l'importance de cette famille dans la multi-résistance aux drogues. Nous avons également privilégié des gènes codant pour des protéines homologues à TolC. Mais, au fur et à mesure que notre étude s'est affinée, il nous a semblé opportun de cibler l'inactivation des gènes sur la base de données transcriptomiques. Il s'agit alors de déterminer quelle pompe à efflux est induite au cours de l'infection et surtout à quelle phase (phase précoce ou tardive de l'infection). Pour étudier cette expression, nous avons privilégié une approche de RT-qPCR. Cependant, si l'on compare à ce qui a été observé *in vivo* dans le cas d'une infection d'*Acanthamoeba castellanii* (Brüggermann *et al.*, 2006) par la souche Lens (temps après infection 8h et 14 h) en assimilant la phase exponentielle à la phase répliative et la phase stationnaire à la phase transmissive, on constate que sur les 40 gènes que nous avons étudiés, 19 avaient un comportement différent. Il s'agit essentiellement de gènes de la phase exponentielle (gènes *lpl820*, *lpl2438*, *lpl308*, *lpl858*, *lpl1278*, *lpl719*, *lpl2850*, *lpl472*, *lpl3359*, *lpl2849*, *lpl2401*, *lpl2024*, *lpl881*, *lpl1408* et *lpl880*) pour lesquels aucune différence d'expression n'a été trouvée par microarray. La différence concerne également les gènes non régulés comme les gènes *lpl697* (facteur de -1,99 dans l'étude *in vivo*) et le gène *lpl1167* (facteur de -1,05). De manière intéressante il n'y a pas de différence concernant les gènes de phase stationnaire : ils correspondent aux gènes considérés comme gènes de phase transmissive par « microarray ». En fait, si l'on considère la valeur absolue des facteurs de régulation trouvés par « microarray » on constate que la valeur de ces facteurs était très importante pour les gènes de la phase transmissive (facteurs allant de 3 pour le gène *lpl2104* jusqu'à 103, 53 pour le gène *flaA* par exemple) alors que les facteurs des gènes de phase répliative étaient voisins de 1. Lorsque le facteur était voisin de 2 (par exemple -1,95 retrouvé pour le gène *sugE* en « microarray ») on constate une correspondance systématique entre les gènes de phase répliative et les gènes de phase exponentielle. Il semble donc que la moindre concordance concernant la phase répliative soit due à une variation d'expression qui n'est pas assez significative en « microarray » mais qui est détectée par RT-qPCR : alors que l'approche par microarray a tendance à sous-estimer les différences, la RT-qPCR apparaîtrait plus sensible. Au-delà de la simple différence de technologie employée, il semblerait que les amorces utilisées pourrait jouer un rôle dans les différences observées. Si l'on compare les résultats que nous avons obtenus avec les résultats obtenus en condition de culture *in vitro*

obtenus chez la souche Paris on constate que les différences se situent toutes au niveau de la phase exponentielles puisque les gènes *lpl2348*, *lpl308*, *lpl858*, *lpl719*, *lpl2850*, *lpl115*, *lpl472*, *lpl2849*, *lpl2401*, *lpl2024*, *lpl2063*, *lpl881*, *lpl1408*, *lpl2434* ont un comportement différent chez la souche Paris ce qui représente 14 gènes sur les 26 étudiés en phase exponentielle. Concernant la phase exponentielle on observe une absolue concordance car tous les gènes de phase stationnaire chez Lens sont ceux retrouvés chez Paris. Cependant si cette approche a été menée avec succès concernant l'étude de l'expression des gènes en condition de culture *in vitro*, des problèmes se sont posés concernant l'étude en condition d'infection c'est-à-dire *in vivo*. Si nous arrivons à extraire des ARN de bonne qualité, il n'en demeure pas moins que le signal obtenu en qPCR pour les gènes est très faible (Cp au-delà de 30) alors qu'il y a une bonne quantité d'ARN 16S. Or comme nous faisons une extraction d'ARN totaux, il n'est pas à exclure que la réaction de transcription inverse soit parasitée par des ARN eucaryotes (notamment les ARN ribosomiaux très abondants). Ainsi, comme nous travaillons avec des amorces aléatoires lors de la réaction de RT, il se peut que ces amorces, devant la trop grande concentration en ARN eucaryotes, puissent s'hybrider à ces mêmes ARN et ce de manière non-spécifique. C'est d'ailleurs le même problème qui a été posé lors de l'étude de l'expression des gènes de *Salmonella* lors d'une infection de macrophages. Une technique nommée SCOTS (« selective capture of transcribed sequences ») a été utilisée avec succès : elle a entre autres permis l'expression *in vivo* des gènes de bactéries pathogènes telles que *Mycobacterium*, *Actinobacillus*, *H. pylori* et *E. coli* (Faucher *et al.*, 2006). Dans cette technique les ARN sont rétrotranscrits en ADN complémentaire (ADNc) puis l'ADNc est hybridé à l'ADN génomique bactérien. L'ADNc capturé est ensuite séparé de l'ADN génomique et soumis à une amplification par PCR. C'est pourquoi nous sommes en train de mettre cette technique au point chez *Legionella* afin de corréliser nos résultats d'expression en cultures liquides avec des résultats d'expression lors de l'infection d'une amibe ou d'un macrophage.

Néanmoins, il semble intéressant de rappeler à ce stade que la transition entre phase exponentielle et phase stationnaire de croissance reproduit la transition phase répllicative/phase transmissive observée en cours d'infection. Cela est intéressant car nous pouvons apporter un éclairage à nos résultats obtenus même s'il ne s'agit pas de résultats *in vivo*. Il serait donc plausible que la plupart des gènes exprimés en phase exponentielle participent aux phases précoces de l'infection. Cette phase comprend l'invasion des cellules hôtes, l'évasion à la voie de dégradation lysosomiale et le détournement du trafic intracellulaire en vue de l'établissement de la vacuole répllicative. En particulier, TolC dont le gène est plus exprimé lors de la phase exponentielle pourrait participer à l'efflux de composés toxiques dès les phases précoces de l'infection (efflux d'espèces réactives de l'oxygène ou des peptides antimicrobiens). Il est intéressant également de constater que peu de gènes sont exprimés en phase stationnaire; une phase mimant la phase transmissive ou infectieuse *in vivo*. On peut penser dans ce cas que les pompes d'efflux participeraient à d'autres fonctions comme en particulier la sécrétion de protéines dont on peut penser que certaines ; dans le cas de la sécrétion de type I, participeraient à la lyse de la cellule hôte.

II Perspectives

Pour continuer l'étude concernant le rôle des pompes à efflux chez *Legionella*, plusieurs axes sont actuellement poursuivis : ceux-ci concernent essentiellement le rôle des pompes à efflux dans la virulence de *Legionella*.

Tout d'abord, l'étude de la virulence de tous les mutants a mis en évidence que les souches MF201, MF202 et MF204 étaient déficientes. Il est intéressant de rappeler que le mutant MF201 est invalidé pour un gène très homologue à TolC, que le mutant MF202 est invalidé pour les gènes codant les trois composants d'une pompe d'efflux potentielle de la famille ABC et que le mutant MF205 est invalidé pour les gènes codant pour deux composants d'une pompe à efflux de type RND très similaires à AcrA et AcrB. Si le mutant MF201 a fait l'objet d'une étude de virulence exhaustive, il n'en demeure pas moins qu'il reste à étudier la cytotoxicité, la multiplication intracellulaire et la capacité d'invasion des mutants MF202 et MF205. Cette étude pour être complète nécessite aussi la construction des souches complémentées. Comme nous n'avons pas invalidé tous les gènes codant pour des protéines d'efflux obtenus lors de l'analyse bioinformatique, il faudra également prévoir la construction d'autres mutants. Mais pour cela, il faut cibler leur construction. A cette fin, l'approche de RT-qPCR qui est démarrée nous apportera des réponses sur l'expression de ces gènes au cours de l'infection. Cela permettra de nous orienter vers des niveaux de régulation génétiques et aussi d'envisager la construction de doubles mutants suivant les profils d'expression obtenus (identification d'une pompe d'efflux majeure chez *Legionella* masquant l'activité d'autres pompes ?). La mise au point de l'extraction et de « l'enrichissement » en ARNm bactérien à différents stades d'un cycle infectieux de l'amibe est actuellement en cours : nous envisageons de séparer les ARN eucaryotes des ARN procaryotes et ce, selon la technique SCOTS (Faucher *et al.*, 2006).

Concernant le mutant *tolC*, pour lequel de nombreuses études ont déjà été menées, nous envisageons plusieurs développements à court ou à plus long terme. Concernant le défaut de virulence observé, il est clair qu'il peut être mieux caractérisé. Sur ce dernier point, le défaut d'invasion tel que nous le caractérisons peut tout aussi bien provenir d'un défaut de survie intracellulaire (la bactérie peut être tuée par des agents antimicrobiens produits par la cellule hôte) que d'un défaut de contournement de la voie de dégradation lysosomiale (dans ce cas, TolC permettrait la sécrétion de facteurs de virulence). Mais il se peut également, vu le défaut de virulence sévère observé, que TolC, au cours de l'infection, ait les deux fonctions, servant à la fois à la résistance aux composés toxiques et à la sécrétion de facteurs de virulence. Nous envisageons donc de mener une étude physiologique (étude de la résistance du mutant de *Legionella* à des peptides antimicrobiens des cellules eucaryotes) et une étude au niveau de la biologie cellulaire (suivi de marqueurs de maturation de la voie d'endocytose). Les observations par microscopie électronique des phases précoces de l'infection combinées au suivi de recrutement de marqueurs du réticulum (protéines comme la calnexine et la calréticuline) nous permettra aussi de voir s'il y a un défaut de remodelage de la vacuole de *Legionella*.

Des études sont aussi actuellement en cours afin d'identifier les partenaires protéiques de TolC. La protéine TolC, du fait de son architecture moléculaire en forme de canal traversant la membrane externe, pourrait avoir plusieurs rôles dans la virulence. Les premiers

résultats obtenus avec notre mutant altéré dans le gène codant pour la protéine homologue à TolC chez *Legionella* suggère un rôle analogue à TolC chez *E. coli*. Ainsi, outre le rôle de la protéine « TolC-like » de *Legionella* dans la résistance aux stress et dans l'efflux, on peut penser à son rôle dans la sécrétion de toxines. Chez *E. coli*, TolC participe à la sécrétion d'une toxine nommée l' α -hémolysine (HlyA) : cette toxine produite par des formes pathogènes d'*E. coli* (forme EPEC) est capable de former des pores dans les membranes. L'hémolysine fait partie de la famille RTX (« repeats in toxin ») qui compte des toxines capables de former des pores dans les membranes (Lally *et al.*, 1999). Ces toxines peuvent avoir d'autres effets. Ainsi, l'effet cytotoxique de la toxine Cya produite par *Bordetella pertussis* vis-à-vis des macrophages implique la formation de pores membranaires mais également l'accumulation d'AMP cyclique (AMPc) dans la cellule hôte du fait du domaine catalytique adénylate cyclase (Hewlett *et al.*, 2006). D'autres toxines n'appartenant pas à la famille RTX peuvent agir comme des effecteurs en ciblant les voies de signalisation intracellulaire de l'hôte : c'est le cas, par exemple, du facteur cytotoxique nécrosant (CNF) produit par les souches d'*E. coli* uropathogènes et enthéropathogènes, une toxine qui active les protéines G Rho, Rac et Cdc42 (Essler *et al.*, 2003). Dans le cas de la sécrétion de l' α -hémolysine, TolC est associé à deux autres protéines, une protéine périplasmique HlyB et une protéine de membrane interne HlyD. Ainsi, chez *Legionella* on ne peut exclure que TolC puisse participer à la sécrétion de toxines, ce rôle ayant été démontré chez d'autres bactéries pathogènes de l'Homme (Kamal *et al.*, 2007) (Crosby & Kachlany, 2007). De plus, il a été identifié dans le génome de *Legionella* le gène *lly* codant pour une legiolysine très proche de l' α -hémolysine d'*E. coli*. Si la délétion du gène *lly* n'altère pas la virulence (Wintermeyer *et al.*, 1994), la legiolysine est à l'origine de la pigmentation brune observée en phase stationnaire de culture et possède une activité hémolytique (Steinert *et al.*, 2001). Toujours chez *Legionella*, il a été identifié des gènes codant pour des toxines essentielles appartenant à la famille RTX (D'Auria *et al.*, 2008). Chez la souche Lens qui est l'objet de notre étude, les gènes *lpl681* et *lpl2437* pourraient coder (dans une moindre mesure) pour des toxines de type RTX dont il a été démontré le rôle dans l'adhérence, la cytotoxicité et l'entrée au cours de l'infection. On peut penser que d'autres protéines puissent transiter via TolC chez *Legionella* et capables de manipuler les protéines G, et donc altérer les voies de signalisation qui prennent place lors de la phagocytose comme les remaniements du cytosquelette. Nous envisageons de réaliser une étude différentielle du sécrétome de *L. pneumophila* Lens sauvage et du mutant TolC⁻ (MF201). Notre but est d'identifier des protéines dont la sécrétion serait altérée chez la souche mutant. Ce travail d'analyse protéomique conduira à caractériser les protéines potentielles dont la sécrétion nécessite une protéine TolC fonctionnelle chez *Legionella*. Ces protéines identifiées pourront alors être étiquetées et suivies pour leur sécrétion dans un système de reconstruction hétérologue du système I chez *E. coli*. Outre son rôle dans la sécrétion de type I, TolC nécessite aussi des partenaires périplasmiques lors des mécanismes d'efflux. Aussi, un travail a débuté concernant l'identification de partenaires protéiques à TolC chez *Legionella*. Reposant sur le principe du double hybride, il s'agit de fusionner chacune des deux protéines à étudier à une β -galactosidase (domaine ω délété de la partie N-terminale ou domaine α délété de la partie C-terminale). Si interaction entre les deux protéines il y a, alors la β -galactosidase fonctionnelle est reconstituée et son activité enzymatique est mesurée (Borloo *et al.*, 2007). Grâce à ces travaux, nous espérons identifier les partenaires périplasmiques de TolC et ainsi proposer une reconstruction de pompes d'efflux complètes TolC-dépendantes ou bien d'un système de sécrétion de type I. Nous avons d'ores et déjà mis au point des systèmes biologiques permettant d'étudier la fonctionnalité des pompes d'efflux. En effet, nous avons montré que la protéine TolC de *Legionella* ne complémente pas un mutant *tolC* d'*E. coli* pour l'efflux de BET. Ainsi nous pourrions reconstruire et tester la fonctionnalité de pompes

d'efflux TolC-dépendante dans un hôte *E. coli* TolC⁻ en clonant simultanément le gène *tolC* et les gènes des partenaires potentiels (1 IMP + 1 MFP). Notre test d'efflux de BET traduira la fonctionnalité pour ces pompes. L'augmentation de la résistance à un ou plusieurs composés toxiques pourra aussi être utilisée comme test.

On peut également envisager un rôle de la protéine TolC de *Legionella* dans la sécrétion de facteurs de « quorum sensing ». Ces molécules intervenant dans la communication cellule à cellule entre les bactéries pourraient bien avoir un rôle dans la communication avec la cellule eucaryote hôte (influence sur les voies de signalisation et l'apoptose). Nous pourrions donc étudier la sécrétion de molécules de « quorum sensing » chez le mutant MF201 obtenu. Dans un deuxième temps, l'effet de ces molécules sur les cellules eucaryotes sera étudié.

Il semble aussi que TolC puisse participer à la formation de biofilms comme le suggèrent des études récentes menées chez *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Webber M., Burrows C. : « The AcrAB-TolC efflux system contributes to biofilm formation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium », 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Barcelona, Spain, 19–22 April 2008). Or, les biofilms sont importants pour la dissémination des legionelles. Ces biofilms se forment dans les tours aérorefrigérantes industrielles et dans les conduits d'eau et expliquent de nombreux épisodes de contaminations survenus dans l'environnement hospitalier ou à proximité de certains complexes industriels. De plus, l'étude de « l'état biofilm » pourrait amener de nouvelles vues sur leur rôle dans la virulence.

Enfin, il ne faut pas exclure un rôle indirect dans l'expression d'autres gènes impliqués dans la virulence. Cette hypothèse est portée par la démonstration faite par Vigorleux-Payant *et al.* : la délétion du gène codant pour TolC chez *Salmonella* conduit à une réduction de la transcription de gènes impliqués dans la biosynthèse du système de sécrétion de type III qui est requis pour la sécrétion de facteurs de virulence au rang desquels figurent les protéines SipA et SipC (Virlogeux-Payant *et al.*, 2008). Une perspective de travail sur les mécanismes de régulation transcriptionnels engendrés par la protéine TolC pourra être envisagée. Il s'agirait pour nous par exemple de vérifier l'expression de gènes de virulence en contexte *tolC* par RT-qPCR.

Tous ces travaux contribueront à la connaissance moléculaire des mécanismes d'efflux ou de la sécrétion de type I chez *L. pneumophila* en lien avec la multi-résistance aux drogues et avec la virulence dans l'hôte eucaryote. Ils apporteront de nouvelles perspectives de lutte contre cet agent pathogène opportuniste, tant au niveau environnemental qu'au niveau médical.

FICHES TECHNIQUES

Fiche technique 1 : Souches bactériennes et plasmides

Souches / plasmides	Génotype	Référence
Souches		
<i>E. coli</i>		
DH5 α		Laboratoire
13100	DH5 α /p696	Laboratoire
13101	DH5 α /p697	Laboratoire
13102	DH5 α /pMF1 clone 1 (dérivé de p696)	Laboratoire
13103	DH5 α /pMF1 clone 2	Laboratoire
13104	DH5 α /pMF1 clone 3	Laboratoire
13105	DH5 α /pMF1 clone 1 (dérivé de p697)	Laboratoire
13106	DH5 α /pMF1 clone 2	Laboratoire
13107	DH5 α /pMF1 clone 3	Laboratoire
13108	DH5 α /p698 clone 1	Laboratoire
13109	DH5 α /p698 clone 2	Laboratoire
13110	DH5 α /pMF5	Laboratoire
13111	DH5 α /p699 clone 1	Laboratoire
13112	DH5 α /p699 clone 2	Laboratoire
13113	DH5 α /p699 clone 3	Laboratoire
13114	DH5 α /p700	Laboratoire
13115	DH5 α /p701 clone 1	Laboratoire
13116	DH5 α /p701 clone 2	Laboratoire
13117	DH5 α /p701 clone 3	Laboratoire
13118	DH5 α /p702	Laboratoire
13119	DH5 α /p703	Laboratoire
13120	DH5 α /p704	Laboratoire
13121	DH5 α /pMF6 clone 1	Laboratoire
13122	DH5 α /pMF6 clone 2	Laboratoire
13123	DH5 α /pMF6 clone 3	Laboratoire
13124	DH5 α /pMF11 clone 1	Laboratoire
13125	DH5 α /pMF11 clone 2	Laboratoire
13126	DH5 α /pMF8 clone 1	Laboratoire
13127	DH5 α /pMF8 clone 2	Laboratoire
13128	DH5 α /pMF7 clone 1	Laboratoire
13129	DH5 α /pMF7 clone 2	Laboratoire
13130	DH5 α /pMF7 clone 3	Laboratoire
13131	DH5 α /pMF7 clone 4	Laboratoire
13132	DH5 α /pMF3 clone 1	Laboratoire
13133	DH5 α /pMF3 clone 2	Laboratoire
13134	DH5 α /pMF3 clone 3	Laboratoire
13135	DH5 α /pMF3 clone 4	Laboratoire
13136	DH5 α /p705	Laboratoire
13137	DH5 α /p706	Laboratoire
13138	DH5 α /p707	Laboratoire
13139	DH5 α /pMF2 clone 1	Laboratoire
13140	DH5 α /pMF2 clone 2	Laboratoire

13141	DH5 α /pMF2 clone 3	Laboratoire
13142	DH5 α /pMF4 clone 1	Laboratoire
13143	DH5 α /pMF4 clone 2	Laboratoire
13144	DH5 α /pMF9 clone 1	Laboratoire
13145	DH5 α /pMF9 clone 2	Laboratoire
13146	DH5 α /pMF9 clone 3	Laboratoire
13147	DH5 α /pMF9 clone 4	Laboratoire
13148	DH5 α /p736 clone 1	Laboratoire
13149	DH5 α /p736 clone 2	Laboratoire
13150	DH5 α /p736 clone 3	Laboratoire
13151	DH5 α /p736 clone 4	Laboratoire
13152	DH5 α /p736 clone 5	Laboratoire
13153	DH5 α /p736 clone 6	Laboratoire
13154	DH5 α /p708 clone 1	Laboratoire
13155	DH5 α /p708 clone 2	Laboratoire
13156	DH5 α /p708 clone 3	Laboratoire
13157	DH5 α /p709 clone 1	Laboratoire
13158	DH5 α /p709 clone 2	Laboratoire
13159	DH5 α /p709 clone 3	Laboratoire
13160	DH5 α /pKan	Laboratoire
13161	DH5 α /pMF10 clone 1 (kan FRT)	Laboratoire
13162	DH5 α /pMF10 clone 2 (kan FRT)	Laboratoire
13163	DH5 α /pMF13 (kan FRT)	Laboratoire
13164	DH5 α /pMF12 (kan FRT)	Laboratoire
13165	DH5 α /pMF12 (kan FRT)	Laboratoire
13166	DH5 α /pK736 clone 1	Laboratoire
13167	DH5 α /pK736 clone 2	Laboratoire
13168	DH5 α / pMLtolLp clone 1	Laboratoire
13169	DH5 α / pMLtolLp clone 2	Laboratoire
<i>Legionella pneumophila</i> Lens		
Lp01	<i>Legionella pneumophila</i> Lens	CNRL
Mutants de <i>Legionella</i>		
MF200	Lp01 Δ (<i>lpl2850</i> \rightarrow 2852)::kan	Laboratoire
MF201	Lp01 <i>tolC</i> ::kan	Laboratoire
MF202	Lp01 Δ (<i>lpl880</i> \rightarrow 882)::kan	Laboratoire
MF203	Lp01 Δ (<i>lpl1509-1510</i>)::kan	Laboratoire
MF204	Lp01 <i>lpl858</i> ::kan	Laboratoire
MF205	Lp01 Δ (<i>lpl757-758</i>)::kan	Laboratoire
MF206	Lp01 Δ (<i>lpl2103-2104</i>)::kan	Laboratoire
MF207	Lp01 Δ (<i>lpxF</i> \rightarrow <i>lprN</i>)::kan	Laboratoire
MF208	Lp01 Δ (<i>helC</i> \rightarrow <i>helA</i>)::kan	Laboratoire
MF209	Lp01 Δ (<i>ceaA</i> \rightarrow <i>ceaC</i>)::kan	Laboratoire
MF210	Lp01 Δ (<i>lpl695</i> \rightarrow 699)::kan	Laboratoire
MF211	Lp01 Δ (<i>lpl1818</i>)::kan	Laboratoire
MF212	Lp01 Δ (<i>lpl278</i> \rightarrow 280)::kan	Laboratoire
MF213	Lp01 <i>tolC</i> ::kan/ pML005- <i>tolC</i>	Laboratoire

MF214	Lp01 <i>tolC::kan</i> / pML005	Laboratoire
Lpl701	Lp01 <i>dotA::kan</i>	Laboratoire
Plasmides		
pCDPO5	<i>sacB</i> , <i>atsIats2</i> , <i>OriT OriV</i> , Cm, Km (la cassette de résistance à la kanamycine est flanquée de sequences IS10)	Ciancotto et al.
p695	<i>sacB</i> , <i>OriT OriV</i> , Cm (pCPO5 délété d'une region de 4,3 kb fragment permettant l'insertion aléatoire de la cassette de résistance à la kanamycine)	Laboratoire
p696 et p697	p695 avec insert NotI de 500 pb en 5' et 500 pb en 3' du gène <i>tolC</i> de <i>Legionella pneumophila</i> Lens (ligués par un site Sall).	Laboratoire
p698	p695 avec insert NotI de 500 pb en 5' et 500 pb en 3' du gène <i>lpl858</i> (<i>tolC</i> -like) de <i>Legionella pneumophila</i> Lens (ligués par un site Sall).	Laboratoire
p699	p695 avec insert NotI de 500 pb en 5' et 500 pb en 3' des gènes <i>lpl880</i> et <i>lpl882</i> (respectivement) de <i>Legionella pneumophila</i> Lens (ligués par un site Sall).	Laboratoire
p700	p695 avec insert NotI de 500 pb en 5' et 500 pb en 3' des gènes <i>lpl757</i> et <i>lpl758</i> (respectivement) de <i>Legionella pneumophila</i> Lens (ligués par un site Sall).	Laboratoire
p701	p695 avec insert NotI de 500 pb en 5' et 500 pb en 3' du gène <i>tolC</i> de <i>Legionella pneumophila</i> Lens (ligués par un site Sall).	Laboratoire
p702	p695 avec insert NotI de 500 pb en 5' et 500 pb en 3' des gènes <i>lpl2103</i> et <i>lpl2104</i> de <i>Legionella pneumophila</i> Lens (ligués par un site Sall).	Laboratoire
p703	p695 avec insert NotI de 500 pb en 5' et 500 pb en 3' des gènes <i>lpl696</i> et <i>lpl699</i> de <i>Legionella pneumophila</i> Lens (ligués par un site Sall).	Laboratoire
p704	p695 avec insert NotI de 500 pb en 5' et 500 pb en 3' du gene <i>lp858</i> (phosphatase alcaline) de <i>Legionella pneumophila</i> Lens (ligués par un site Sall).	Laboratoire
p705	p695 avec insert NotI de 500 pb en 5' et 500 pb en 3' des gènes <i>helA</i> et <i>helC</i> de <i>Legionella pneumophila</i> Lens (ligués par un site Sall).	Laboratoire
p706	p695 avec insert NotI de 500 pb en 5' et 500 pb en 3' des genes <i>lpl2849</i> et <i>lpl2852</i> de <i>Legionella pneumophila</i> Lens (ligués par un site Sall).	Laboratoire
p707	p695 avec insert NotI de 500 pb en 5' et 500 pb en 3' des gènes <i>lssD</i> et <i>lssB</i> de <i>Legionella pneumophila</i> Lens (ligués par un site Sall).	Laboratoire
p708	p695 avec insert NotI de 500 pb en 5' et 500 pb en 3' des genes <i>lpl278</i> et <i>lpl280</i> de <i>Legionella pneumophila</i> Lens (ligués par un site Sall).	Laboratoire
p709	p695 avec insert NotI de 500 pb en 5' et 500 pb en 3' des genes <i>ceaA</i> et <i>ceaC</i> de <i>Legionella pneumophila</i> Lens (ligués par un site Sall).	Laboratoire
Plasmides utilisés pour la recombinaison chez <i>Legionella</i>		
pMF1	plasmide p696 (ou p697) avec insertion de la cassette de résistance à la kanamycine au site Sall liant les regions d'homologies 5' et 3'.	Laboratoire
pMF2	plasmide p706 avec insertion de la cassette de résistance à la kanamycine au site Sall liant les regions d'homologies 5' et 3'.	Laboratoire
pMF3	plasmide p699 avec insertion de la cassette de résistance à la kanamycine au site Sall liant les regions d'homologies 5' et 3'.	Laboratoire
pMF4	plasmide p707 avec insertion de la cassette de résistance à la kanamycine au site Sall liant les regions d'homologies 5' et 3'.	Laboratoire
pMF5	plasmide p698 avec insertion de la cassette de résistance à la kanamycine au site Sall liant les regions d'homologies 5' et 3'.	Laboratoire
pMF6	plasmide p700 avec insertion de la cassette de résistance à la kanamycine au site Sall liant les regions d'homologies 5' et 3'.	Laboratoire
pMF7	plasmide p702 avec insertion de la cassette de résistance à la kanamycine au site Sall liant les regions d'homologies 5' et 3'.	Laboratoire
pMF8	plasmide p701 avec insertion de la cassette de résistance à la kanamycine au	Laboratoire

pMF8	plasmide p701 avec insertion de la cassette de résistance à la kanamycine au site Sall liant les regions d'homologies 5' et 3'.	Laboratoire
pMF9	plasmide p705 avec insertion de la cassette de résistance à la kanamycine au site Sall liant les regions d'homologies 5' et 3'.	Laboratoire
pMF10	plasmide p709 avec insertion de la cassette de résistance à la kanamycine au site Sall liant les regions d'homologies 5' et 3'.	Laboratoire
pMF11	plasmide p703 avec insertion de la cassette de résistance à la kanamycine au site Sall liant les regions d'homologies 5' et 3'.	Laboratoire
pMF12	plasmide p704 avec insertion de la cassette de résistance à la kanamycine au site Sall liant les regions d'homologies 5' et 3'.	Laboratoire
Plasmides utilisés pour l'étude du mutant <i>tolC</i>		
p736	pUC18 contenant le gène <i>tolC</i> cloné	Laboratoire
pKan	pUC18 contenant le promoteur de la cassette de résistance à la kanamycine (pKan) cloné.	
pML005	Cm (pUC18chl avec la deletion d'un site BstUI à la position 1476 conférant une stabilité du plamide sans pression de selection chez <i>Legionella</i>).	Laboratoire
pK736	pUC18chl avec l'insertion du gène <i>tolC</i> de <i>L. pneumophila</i> sous le controle du promoteur pKan.	Laboratoire
pML005- <i>tolC</i>	<i>L.pneumophila</i> Lens <i>tolC</i> (de pK736) dans pML005 (insertion entre les sites de restriction BamH1/Sall).	Laboratoire

Fiche technique 2 : Milieux de culture et conditions de croissance des bactéries

1. Milieux

Les milieux de cultures utilisés (milieu liquide ou gélosé) répondent aux exigences nutritionnelles des deux espèces bactériennes utilisées. Les milieux de cultures de *Legionella* sont les milieux liquide LGM et son milieu gélosé BCYE qui ont la particularité de satisfaire aux exigences en fer et en cystéine de cette souche. La bactérie *E. coli* se développe sur le milieu liquide LB et son dérivé gélosé GL.

1.1. Compositions

. **Milieu riche LB (« Luria Broth »)** : Tryptone (Biokar) 10 g.L⁻¹, extrait de levure (Biokar) 5 g.L⁻¹, NaCl : 5 g.L⁻¹, pH 7. Le milieu solide GL est obtenu après ajout d'une solution d'agar à 12 g.L⁻¹ autoclavé (20 minutes à 120°C) et maintenu en surfusion (ajout volume à volume avec du milieu LB concentré deux fois).

. **Milieu riche LGM (« Legionella Growth Medium »)** : α -cétoglutarate (Sigma) 1g.L⁻¹, extrait de levure (Difco) 12 g.L⁻¹, L-cystéine (Euromedex) 0,5 g.L⁻¹ et Pyrophosphate de fer (Pyrophosphate de fer III, Sigma) 0,3 g.L⁻¹, pH 6,9 ajusté avec du KOH 1 N. Le milieu est autoclavé à 120°C pendant 20 minutes.

Le milieu de culture solide est le milieu **BCYE** (« Buffered Charcoal Yeast Extract ») est reconstitué à partir du milieu commercial « *Legionella* CYE Agar Base » (OXOID) : Charbon activé 2 g.L⁻¹, extrait de levure : 10 g.L⁻¹, Agar 13 g.L⁻¹, pH : 6,9 . Après autoclavage et attente du refroidissement à la surfusion, le milieu est supplémenté en cystéine 0,5 g.L⁻¹ (ACROS organics®) et en fer 0,3 g.L⁻¹.

Dans les milieux ci-dessus, l'ajout de composés comme les antibiotiques permet la sélection de bactéries recombinantes ou possédant un plasmide :

- les milieux de cultures LB et GL peut être additionné de chloramphénicol (20 et 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivement) et/ou en ampicilline (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) et/ou en kanamycine (50 et 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivement) pour les rendre sélectifs.

- les milieux BCYE contenant de la kanamycine (BCYE Kan) ou du chloramphénicol (BCYE kan) sont préparés en ajoutant l'antibiotique à la concentration adéquate (kanamycine : 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, chloramphénicol : 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) au milieu BCYE en surfusion après stérilisation par autoclavage.

- les milieux LGM contenant de la kanamycine (LGM Kan) ou du chloramphénicol (LGM chl) sont préparés en ajoutant l'antibiotique à la concentration adéquate (kanamycine : 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, chloramphénicol : 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) au milieu LGM à température ambiante.

- le milieu BCYE contenant du saccharose (BCYE Kan Sac) est préparé en ajoutant volume à volume du Saccharose 10% stérile et du milieu BCYE concentré deux fois en surfusion autoclavé et supplémenté en fer et cystéine.

1.2. Stérilisation

La stérilisation des milieux se fait par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes pour la plupart des composés et les milieux, les solutions de sucre et pour les solutions d'acides aminés. Les solutions d'antibiotiques sont stérilisées par filtration sur une membrane Millipore 0,45 μm .

2. Culture et conservation des souches bactériennes

2.1. *Escherichia coli*

Les souches d' *E. coli* utilisées dans ce travail sont répertoriées dans le tableau de la Fiche technique 1. Concernant *E. coli*, toutes les cultures en milieu liquide sont effectuées à 37°C sous agitation. Cette incubation se fait sur la nuit lorsqu'il s'agit de faire une extraction plasmidique, mais se réduit à une heure pour la culture d'expression précédant l'étalement suite à une électroporation. La densité cellulaire d'une culture liquide est obtenue par la mesure de l'absorbance à 600 nm : une absorbance de 0,4 équivaut à 3×10^8 bactéries.mL⁻¹. Les cultures sur milieu gélosé en boîte de pétri sont également incubées à 37°C généralement sur la nuit lorsqu'il s'agit d'obtenir des colonies isolées lors d'un étalement ou suite à un réisolement.

Les souches contenant des constructions plasmidiques sont mises en conservation dans des cryotubes en ajoutant 900 µL de glycérol 30 % stérile au même volume de culture liquideensemencée la veille.

2.2. *Legionella pneumophila*

2.2.1. Culture et conservation

Les souches de *Legionella pneumophila* utilisées lors de ce travail sont répertoriées dans le tableau de la Fiche technique 1. Concernant *Legionella pneumophila*, toutes les manipulations sont effectuées sous un PSM de type 2 (Poste de sécurité Microbiologique) capable de délivrer un flux laminaire permettant de travailler dans un champ stérile et d'éviter toute contamination pour le manipulateur (non-dispersion d'aérosols, voie de contamination privilégiée de ce type de bactérie causant des infections de type respiratoire). 4 PSM équipent notre laboratoire de type L2.

Les cultures en milieu liquide sont effectuées à 30°C sous agitation, en aérobiose. La densité cellulaire d'une culture liquide est obtenue par la mesure de l'absorbance à 600 nm : une absorbance de 1 équivaut à 1×10^9 bactéries.mL⁻¹. De même les cultures sur milieux gélosés se font à 30°C (meilleure viabilité des bactéries transformées après électroporation) ou à 37°C lorsqu'il s'agit de la préparation de cellules compétentes. La durée d'incubation varie suivant les expériences menées : cette durée peut être de cinq jours lorsqu'il s'agit d'infecter un hôte eucaryote (*Acanthamoeba*, *Dictyostelium*), de 3 jours pour la préparation de cellules compétentes, et d'environ 4 jours lorsqu'il s'agit d'obtenir des bactéries transformées avec un plasmide.

La souche *L. pneumophila* Lens provenant de la collection du CNR (ainsi que les souches Paris et Philadelphia et les souches construites lors de ce travail) est conservée à -80°C après ajout de 0,5 mL d'une suspension richementensemencée (absorbance d'environ 2 à 600 nm) dans des cryotubes avec billes (Roti-store®, Carl Roth).

2.2.2. Etablissement d'une courbe de croissance de *Legionella*

2.2.2.1. Préculture

A partir de legionelles développées sur milieu BCYE (croissance de 4 jours après sorties de congélation à -20°C) des tubes de culture contenant 1 mL de LGM sontensemencés de manière à être à une DO = 0,2. La préculture est mise en agitation (150 rpm) sur la nuit à 30°C.

2.2.2.2. Ensemencement de la plaque 24 puits et mesure des points pour la cinétique

Le lendemain, les précultures sont diluées de façon à être à une DO de 0,2 dans 1 mL de LGM. Une plaque 24 puits est remplie avec 1mL par puit de la suspension à DO = 0,2. Une première mesure de DO à 600 nm est faite en utilisant le « µquant plate reader » puis la plaque est mise à agiter à 150 rpm à 30°C et des mesures sont prises toutes les 2 heures. Pour chaque temps plusieurs mesures sont faites et les valeurs de DO sont corrigées par le blanc (milieu LGM non ensemencé).

1. Transformation d' *E.coli*

1.1. Préparation de cellules compétentes

La veille, une préculture de 5 mL de milieu BL estensemencée puis laissée en agitation à 37°C une nuit. Le jour de l'expérience, un volume de 100 ml est alors inoculé avec de la préculture fraîche de façon à avoir une absorbance à 600 nm de 0,05 ; cette culture est alors placée sous agitation à 37°C pendant environ 2 heures de façon à atteindre une absorbance comprise entre 0,4 et 0,6. La croissance est alors stoppée dans la glace jusqu'à ce que le milieu soit froid. Les cellules de la culture sont recueillies par centrifugation. Le culot cellulaire est lavé deux fois par 50 ml d'eau stérile froide et est finalement repris dans 2ml d'une solution froide de glycérol 10%.

Les cellules sont finalement réparties par volume de 100 µl par tube et congelées à -80°C jusqu'à leur utilisation.

1.2. Transformation

La transformation est effectuée par électroporation qui consiste à appliquer un choc électrique pour perméabiliser les cellules et faciliter la pénétration de l'ADN. Cette technique rapide dans sa mise en œuvre est cependant accompagnée d'une forte létalité cellulaire.

Au moment de l'électroporation, 100 µL de cellules compétentes sont décongelées sur la glace et mélangées à la totalité du produit de ligature purifié. Le mélange est ensuite introduit dans une cuve d'électroporation froide puis soumis à un champ électrique de 2,5 kV.cm⁻¹ pendant quelques millisecondes (Electroporateur Biorad : 600 Ohms, 25 µF). Une culture d'expression est ensuite réalisée en additionnant 1 mL de BL et en réalisant une incubation de 1 heure à 37°C sous agitation.

2. Transformation de *Legionella*

2.1. Préparation des cellules compétentes

2.1.1. A partir de culture sur milieu gélosé

Trois jours à l'avance 3 boîtes BCYE sont incubées à 37°C avec *Legionella*. A partir de ces boîtes une suspension de *Legionella* est faite dans 200 mL d'eau UP stérile froide (agrégats longs à se dissoudre) de façon à obtenir une densité optique à 600 nm comprise entre 0,5 et 1.

La suspension est ensuite répartie dans 4 tubes « falcon » qui sont centrifugés pendant 10 min à 4500 rpm à 4°C. Le surnageant est alors éliminé et les culots bactériens sont lavés trois fois par remise en suspension dans 30 mL d'eau stérile froide.

A la fin des lavages, le culot est remis en suspension dans 1mL de glycérol 20 % froid. La suspension de cellules compétentes ainsi obtenue est répartie par 100 µL dans des tubes eppendorfs stériles et les aliquots sont congelés à -80°C.

2.1.2. A partir de cultures liquides

Une culture liquide est d'abordensemencée en milieu LGM à partir d'une culture sur boîte BCYE fraîche (datant d'au minimum trois jours) puis laissée en agitation à 37°C pendant environ 24 heures de façon à obtenir une absorbance comprise entre 1 et 1,8 (ne pas dépasser une DO de 2). Les cellules sont alors récoltées par centrifugation à 4000 rpm pendant 10 minutes. Le culot est ensuite lavé deux fois avec 30 mL d'eau distillée stérile froide et finalement repris dans 1 mL de glycérol 20% froid. Les cellules sont réparties par aliquots de 100 µL avant d'être utilisées immédiatement ou sont conservées -80°C.

2.2. Electroporation

Lors de l'électroporation, 100 µL de cellules électrocompétentes sont mises à décongeler sur la glace avant d'ajouter l'ADN. Le mélange est alors introduit dans une cuve d'électroporation qui est soumise à un champ électrique de 2,5 kV.cm⁻¹ (électroporateur Biorad : 600 ohm et 25 µF). Après une remise en suspension dans 1mL de LGM, le mélange est transféré dans un tube puis laissé au moins une heure à 30°C le temps de la culture d'expression. Un volume de la culture d'expression peut ensuite être étalé sur les milieux sélectifs appropriés jusqu'à adsorption.

1. Extraction et purification de l'ADN plasmidique

L'extraction d'ADN plasmidique repose sur la technique de la lyse alcaline : la paroi bactérienne est perméabilisée par traitement au lysozyme, suivie par un traitement avec un détergent en milieu alcalin (Birnboim & Doly, 1979). La colonie à analyser est inoculée dans une culture de 2 ml de BL, supplémentée avec le ou les antibiotiques appropriés et incubée à 37°C pendant 16 heures environ (une nuit) sous agitation.

Après incubation, un volume de 1,5mL de culture est transféré dans un tube eppendorf puis les cellules sont récoltées par centrifugation (10 min, 13000 rpm). Le culot est ensuite resuspendu dans 200 µL de solution I (Tris-HCl 25mM, EDTA 10 mM, glucose 50 mM pH 8,0) additionnée de lysozyme (2 mg. mL⁻¹) et de RNase (10 µg.mL⁻¹). Les bactéries sont ensuite lysées après l'ajout de 200 µL de solution II (NaOH 0,2 M ; SDS 1%) dans le tube qui est agité par retournements. L'ajout de 200 µL de solution III (acétate de potassium 5M ; acide acétique glacial 11,5%) permet la renaturation de l'ADN plasmidique qui a été dénaturé en présence de soude à l'étape précédente, l'ADN chromosomique restant dénaturé. Une centrifugation du mélange (10 min ; 13000 rpm) permet de récupérer le surnageant contenant l'ADN plasmidique qui est transféré dans un nouveau tube eppendorf. L'ADN est alors adsorbé sur silice (200 µL d'une solution à 2 g dans 30 mL d'eau distillée, sigma) pendant 10 min sous agitation rotative. Une centrifugation de 30 secondes à la vitesse maximale permet alors d'éliminer le surnageant afin de garder la silice avec l'ADN adsorbé. La silice est ensuite lavée deux fois avec 500 µL d'une solution de lavage (Et-OH 50%, NaCl 0,1M, EDTA 1mM et Tris-HCL 10 mM pH 7,5). Le culot est ensuite séché au speed vac (Savant instruments, Inc., Farmingdale, NY). La récupération de l'ADN est faite en resuspendant la silice dans 30 µL de Tris 10 mM pH 8,0 (ou eau distillée) puis en l'incubant 10-15 minutes à 55°C, en resuspendant de temps à autre. Après une centrifugation le surnageant contenant de l'ADN est enfin récupéré.

2. Digestion de l'ADN aux enzymes de restriction

Les digestions sont réalisées dans un tampon de restriction standard approprié (fourni avec l'enzyme) en présence d'une unité d'enzyme pour un volume réactionnel de 20 µL lors d'une digestion totale. Une unité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire à l'hydrolyse totale de 1 mg d'ADN du phage λ en une heure dans un volume réactionnel de 50 µL.

Des digestions avec les enzymes de restrictions ont été réalisées sur de l'ADN plasmidique ou sur les produits de PCR provenant de l'amplification de séquences de l'ADN chromosomique des souches de *Legionella* sauvages ou mutantes.

Pour cela, 5 µl d'ADN plasmidique pur ou de produit de PCR sont ajoutés à un mélange comprenant 1 µL d'enzyme appropriées (SalI ou NotI à 10 U.µL⁻¹, Fermentas), 2µl de tampon adéquat (50 mM Tris-HCL pH7,5 ; 10 mM Mgcl2, 100 mM NaCL ; 0,1 mg.mL⁻¹ BSA) et complété à 20 µL avec de l'eau ultrapure. Le mélange est ensuite incubé à 37°C pendant une heure puis dans le cas de l'utilisation ultérieure des fragments digérés (ligature) une inactivation de l'enzyme 20 minutes à 65°C est réalisée.

3. Extraction de l'ADN chromosomique chez *Legionella*

L'extraction chromosomique est effectuée à partir d'une culture obtenue sur boîte BCYE de 3 jours ou sur BCYE supplémenté (en saccharose avec le ou les antibiotiques appropriés) quand il s'agit d'analyser des transformants ou les recombinants obtenus.

A partir de la culture en milieu gélosé, une suspension est réalisée dans 2 x 1,5 mL d'eau distillée stérile. Après une centrifugation 10 minutes à 7000 rpm le surnageant est éliminé et le culot est repris dans 1,6 mL de tampon NTE (NaCl 100 mM ; EDTA 10 mM ; Tris HCl 50 mM pH : 7) et la suspension est répartie dans 4 tubes de 2mL. Les cellules sont ensuite lysées en ajoutant 20 μ L de SDS 10 % filtré et 200 μ L d'une solution de protéinase K à 20 mg.mL⁻¹. Les tubes sont alors mélangés par retournement et incubés pendant 1 heure à 37°C. Un traitement avec 1 μ L de RNase à 100 mg.mL⁻¹ (RNase A, Qiagen) est alors réalisé et les tubes sont de nouveau incubés une heure à 37°C. Chaque tube est alors additionné de 800 μ L d'un mélange phénol/chloroforme/isoamylalcool (25/24/1). Le mélange homogénéisé par retournements doux, est centrifugé 5 minutes à 10 000 rpm. La phase aqueuse est alors extraite, soumise à une deuxième extraction au chloroforme/alcool isoamylique (24/1) et une nouvelle centrifugation est effectuée. 2 volumes d'éthanol 100 % (1,4 mL) et 1/10e de volume de solution III (soit 70 μ L) sont alors ajoutés à la phase aqueuse récoltée pour faire précipiter l'ADN. Après agitation par retournements délicats, l'ADN chromosomique est enfin visible sous la forme d'une pelotte et récupéré à l'aide d'un fil de platine avant d'être séché puis remis en suspension dans 50 μ L d'eau ultrapure et la concentration dosée.

4. Analyse électrophorétique de l'ADN sur gel d'agarose

L'électrophorèse horizontale en gel d'agarose permet la séparation de fragment linéaires d'ADN dont la taille est comprise entre 300 et 20000 paires de bases. Les gels d'agarose sont préparés à la concentration de 0,8 ou 1% par dissolution à chaud de l'agarose en tampon TAE (Tris-HCl 40 mM, CH₃COONa 20 mM, EDTA 2mM ajusté à pH 7,8 par du CH₃COOH. Du BET (1mg.mL⁻¹) est inclus dans le gel en surfusion : il permettra la visualisation de l'ADN sous l'irradiation à la longueur de 312 nm.

L'analyse de l'ADN est effectuée en déposant 5 μ L de l'ADN mélangé à un tampon de dépôt 5X sur gel d'agarose (0,8 g/100mL d'agarose Appligene dans un tampon Tris Acétate 0,04M ; EDTA 10mM, pH 7,7 contenant 0,5 μ g.mL⁻¹ de BET) avec ou sans digestion préalable à l'aide d'une ou plusieurs enzymes appropriées. La migration est effectuée à 100 V pendant environ 30 min. A chaque migration, 5 μ L de marqueur préparé selon les recommandations du fournisseur ont été déposés sur gel pour évaluer la taille des bandes. Deux marqueurs de taille ont été utilisés : les marqueurs « GeneRuler 1kb DNA ladder » (Fermentas) permettant de visualiser des fragments d'ADN de 100 à 10000 pb et « Gene ruler DNA ladder Mix » (taille visible : de 250 à 10000 pb) .

5. Purification des fragments d'ADN

La purification permet d'éliminer des sels et des nucléotides des préparations d'ADN. L'ADN est purifié lorsqu'il s'agit de l'utiliser à des fins de transformation (élimination des sels gênant pour l'électroporation), pour réaliser des clonages (purification des fragments après digestion avant la ligation) et pour les ADN matrices utilisés lors de la RT-qPCR. Dans ce dernier cas il s'agit d'isoler le fragment à partir du gel d'agarose.

Deux types de purification ont donc été employés : la purification d'ADN à partir de solution et la purification d'ADN inclus dans un gel d'agarose. Pour la purification de fragments d'ADN en solution (produits de PCR après digestion) nous avons utilisé le kit « QIAquick PCR purification kit » (Qiagen). Dans cette procédure l'ADN est fixé sur une colonne de silice qui est ensuite lavée avant l'élution de l'ADN dans un volume de 50 µL d'eau. Pour la purification de fragments d'ADN inclus dans un gel d'agarose, nous avons suivi la procédure du kit « GenClean kit » (Q-BIOgene).

6. Utilisation d'enzymes de modification de l'ADN

6.1. Remplissage par le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I d' *E. coli*

Cette technique permet notamment la transformation d'extrémités cohésives incompatibles en extrémités à bord francs, ce qui rend leur ligation possible. Pour cela, les fragments d'ADN sont incubés pendant 20 min à 37°C dans un mélange réactionnel (Tris-HCl 10 mM pH 7,5 ; MgCl₂ 5 mM ; DTT 7,5 mM ; dNTP 0,1 mM) contenant 0,5 unité d'ADN polymérase par mg d'ADN.

6.2. Traitement de l'ADN par la phosphatase alcaline d' *E. coli*

Afin de limiter leur recircularisation, les vecteurs utilisés lors des différentes constructions sont traités pendant ou après digestion aux enzymes de restriction, par la phosphatase alcaline (« Calf intestine alkaline phosphate » ou CIAP, NEBiolabs) : 5 mg d'ADN sont incubés pendant 1 heure à 37°C en présence de 0,1 unité d'enzyme, dans un tampon Tris-HCl 1 M, pH 8. L'enzyme est alors inactivée par purification ou par incubation 10 min à 85°C.

7. Ligation de fragments d'ADN

Une ligation a été réalisée dans le cadre de la réalisation des constructions plasmidiques afin de lier deux fragments de PCR, de cloner les inserts dans le plasmide et de cloner le gène de résistance à la kanamycine. Les extrémités générées étant cohésives nous avons utilisé la T4 DNA ligase à 1 U.µL⁻¹ (1 µL, Fermentas) dans un volume réactionnel final de 20 µL complété avec de l'eau ultrapure comprenant 2 µL de tampon de ligation 10 X (400 mM, Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 5 mM ATP, pH 7,8) et 5 µL de chacun des deux solutions d'ADN dans le cas de la ligation de deux fragments de PCR digérés. Le tout est alors incubé pendant 1 heure à 22°C et l'enzyme est inactivée pendant 10 minutes à 65°C.

Dans le cas du clonage dans un plasmide un rapport 1 pour 4 entre la quantité de vecteur et d'insert (estimé après migration sur gel d'agarose 0,8 %) a été respecté. Dans ce cas, le plasmide recevant l'insert est d'abord déphosphorylé en 5' grâce à un traitement CIAP (« Calf Intestine alkaline Phosphatase », NEBiolabs) en mettant 50 µl de vecteur digéré, 10µL de tampon NEBiolabs 1 X (100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCL, 10mM MgCl₂, 1mM dithiothréitol, ph 7,5), 1µl d'enzyme (à 10000 U.mL⁻¹) et le tout est complété à 100 µL avec de l'eau Ultrapure. Une purification du plasmide (30 µL purifié sur colonne de silice selon la procédure du kit « QIAquick PCR purification kit », Qiagen) est alors nécessaire avant son utilisation pour une transformation par électroporation.

8. Amplification d'un fragment d'ADN chromosomique par PCR

La technique d'amplification de l'ADN par PCR (« Polymerase Chain Reaction ») permet d'obtenir en peu de temps et de manière spécifique une grande quantité d'un fragment d'ADN définit comme cible. Elle nécessite deux amorces oligonucléotidiques complémentaires aux séquences délimitant la séquence à amplifier. Des cycles répétés de dénaturation thermique de l'ADN sont réalisées et comprennent la dénaturation de l'ADN chromosomique double brin en ADN simple brin, l'appariement des amorces à leur séquence complémentaire et l'extension des amorces par une ADN polymérase thermostable. Toutes les réactions PCR ont été réalisées dans l'appareil « Mastercycler epgradient » .

8.1. Amplification de séquences pour les PCR de contrôle et la réalisation des constructions

Chaque amplification a été réalisée à partir de 100 ng d'ADN chromosomique de *Legionella pneumophila* Lens et dans un volume réactionnel final de 50 µL contenant : 5 µl de tampon Dynazyme EXT Buffer (FINZYMES), des dNTPs (1µL d'un mélange dNTPs à 100mM), 2 µL de chaque amorce à 10 µM et 1µL de Taq polymérase « Dynazyme EXT™ DNA polymérase » (FINZYMES) à 1 U.µL⁻¹.

Le programme employé et standardisé pour l'amplification de tous les fragments est le suivant :

Étape		durée	Température	Nombre de Cycles
Prédénaturation		2 min	94°C	1
Amplification	dénaturation	30 sec	94°C	30
	hybridation	45 sec	60°C	
	élongation	X min (1kb/min)	72°C	
Elongation finale		10 min	72°C	1

La durée de l'étape d'élongation a été ajustée à la taille des fragments amplifiés (1 kb/min). Pour réaliser les PCR de contrôle sur l'ADN chromosomique de Lens afin de contrôler la validité des constructions nous avons utilisé le kit « 2X PCR Master Mix », Fermentas. Ce kit a l'avantage d'utiliser une solution, le « master Mix », contenant déjà la Taq polymérase, le tampon réactionnel et les dNTPs : 5 µL d'ADN cible et 2 µL d'une dilution de chaque amorce à 10µM sont alors ajoutés à 12,5 µL de Master Mix (MgCl₂ 4mM, dNTPS 0,4 mM chacun, Taq polymérase 0,05 U.µL⁻¹) et le tout est complété avec de l'eau UP à 25 µL.

8.2. Amplification de la cassette de résistance à la kanamycine

Nous avons également utilisé la PCR pour disposer de grandes quantités de cassette de résistance à la kanamycine avant clonage à partir de la séquence du plasmide PUC18 kan en utilisant l'amorce CasKan (5'-ATCCGTCGACCTGCAGGGACCAG-3').

Les conditions d'amplification de la cassette de résistance à la kanamycine sont les suivantes :

Etape		durée	Température	Nombre de Cycles
Prédénaturation		30 sec	98°C	1
Amplification	dénaturation	15 sec	98°C	30
	hybridation	15 sec	66,5°C	
	élongation	30 sec	72°C	
Elongation finale		5 sec	72°C	1

La PCR est réalisée grâce à l'enzyme PHUision (FINZYMES) dans un mélange de 50 µL final comprenant 5 µL de l'amorce CasKan à 10 µM, 10 µl du tampon commercial, 1µL de dNTPs à 100 mM et 1µL de l'ADN plasmidique PUC18 Kan.

Fiche technique 5: Transfert d'ADN sur membrane de nitrocellulose-hybridation spécifique à l'aide d'une sonde marqué à la digoxigénine

1. Transfert d'ADN d'un gel d'agarose sur membrane de nitrocellulose

Cette technique consiste en un transfert à sec.

1.1. Traitement du gel

Le gel d'agarose est immergé 15 minutes sous légère agitation dans un bain de HCL 0,25 M (solution de dépurination) jusqu'à virage du bleu de bromophénol (coloration jaune au bout de 10 à 12 minutes). Après rinçage à l'eau déminéralisée, le gel est baigné dans une solution de dénaturation (NaCl 1,5 M, NaOH 0,5M) pendant environ 45 minutes. Après un dernier rinçage, le gel est finalement placé dans dans une solution de neutralisation (NaCl 1,5 M, Tris-Hcl 0,5 M pH 7,5) pendant 30 minutes.

1.2. Transfert par capillarité et fixation de l'ADN

Les membranes de nitrocellulose sont humidifiées dans la solution de neutralisation (45 minutes) et le transfert est réalisé comme décrit dans la figure. Le transfert se fait sur la nuit puis l'ADN est fixé par dépôt de la membrane sur deux papiers Whatman imbibés de NaOH 0,4 N pendant 20 minutes.

2. Détection à l'aide de sondes nucléiques marquées à la digoxygénine

Le principe de détection repose sur un marquage des sondes à la peroxydase. Le kit de marquage de « Amersham » est basé sur la méthode de marquage de sondes à la peroxidase. Il fait appel aux différentes étapes décrites ci-dessous.

2.1. Synthèse et préparation de la sonde

La sonde est fabriquée par un PCR classique. Dans notre cas, nous avons réalisé une PCR amplifiant la séquence correspondant à la cassette de résistance à la kanamycine. Le fragment obtenu doit avoir une taille d'au minimum 300 pb et une concentration de 10 ng.µL⁻¹. Environ 50 ng du fragment choisi comme matrice de la sonde sont purifiés après électrophorèse sur gel.

La sonde est ensuite dénaturée par chauffage en plaçant 10 µL d'ADN (100 ng) pendant 5 minutes à 100 °C. Le refroidissement brutal pendant 5 minutes dans la glace empêche la reconstitution des doubles brins. L'ADN simple brin ainsi obtenu est ensuite marqué par ajout successif de 20 µL de « labelling reagent », de solution de glutaraldéhyde puis est incubée 20 minute à 37°C. La sonde marquée est ensuite stockée dans la glace 15 minutes au maximum avant l'utilisation.

2.2. Hybridation de la sonde

Après fixation, la membrane est préparée pour l'hybridation. Pendant la préhybridation, la membrane est placée dans un four à hybridation sous agitation rotative et incubée pendant une heure à 42°C dans le tampon d'hybridation. S'ensuit alors l'hybridation ou la sonde est ajoutée à la solution d'hybridation. L'hybridation se poursuit sur la nuit à 42°C.

2.3. Détection

L'hybridation est stoppée par des lavages en solution SSC : la membrane est ainsi lavée 2 fois 20 minutes en tampon SSC 0,5X, SDS 0,4% puis 2 fois cinq minutes en tampon SSC 2X.

La révélation se fait en chambre noire suivant la méthode du fournisseur en recouvrant la membrane d'un mélange fait de volumes équivalents de réactifs de détection 1 et 2 fournis. La membrane est ensuite protégée avec un film plastique et un film autoradiographique est ensuite appliqué durant quelques minutes (durée à déterminer).

Fiche technique 6 : Milieux de culture et conditions de croissance des cellules eucaryotes

La bactérie *Legionella* a la particularité de pouvoir survivre dans l'amibe qui est son hôte naturel dans l'environnement. L'amibe est un modèle d'étude de choix pour comprendre les mécanismes de virulence, les mécanismes de survie à l'intérieur de la cellule hôte eucaryote. L'infection des amibes peut être reproduite en laboratoire : pour cela il faut cultiver la bactérie en présence de la cellule hôte, l'amibe, afin que cette dernière ait une chance de la capturer par phagocytose : on parle de coculture.

1. Milieux de cultures

1.1. Milieux

. **Milieu PY** : MgSO_4 : 0,4M, CaCl_2 : 50 mM, Citrate de Sodium : 0,1M, $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$: 5 mM, Na_2HPO_4 : 0,25 M, KH_2PO_4 : 0,25 M.

. **HL5**: Peptone 14,3 g.L⁻¹ ; « Yeast extract » : 7,15 g. L⁻¹ ; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0,64 g. L⁻¹ ; KH_2PO_4 : 0,48 g. L⁻¹ ; Maltose : 18 g. L⁻¹; pH : 6,5).

. **MB** : Peptone 14,3 g. L⁻¹; Yeast extract : 7,15 g. L⁻¹ ; MES : 3,9g. L⁻¹, pH : 6,9).

. **Milieu RPMI 1640 Gibco** : milieu complexe commercial comprenant des acides aminés des sels inorganiques des vitamines et du glucose. Le rouge de phénol ajouté au milieu est un indicateur coloré qui a la particularité de réagir à pH acide (virage au jaune), l'acidification du milieu de culture pouvant être causée par la sécrétion de déchets du métabolisme par les cellules eucaryotes.

1.2. Supplémentations

Le milieu PY qui est utilisé tel quel pour les lavages lors d'une infection, est supplémenté en glucose pour donner le milieu de culture d'*Acanthamoeba castellanii* : le milieu PYG. Lors des cultures d'entretien de routine au laboratoire l'ajout d'un mélange d'antibiotiques (mélange pénicilline/streptomycine) permet d'obtenir des cultures axéniques c'est-à-dire dépourvu de germes.

Du sérum de veau foetal est additionné au milieu RPMI (10 % final de sérum de veau) pour permettre la croissance des macrophages.

1.3. Stérilisation

La stérilisation des milieux se fait par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes pour la plupart des composés et les milieux, les solutions de sucres et pour les solutions d'acides aminés. Les solutions d'antibiotiques sont stérilisées par filtration sur une membrane Millipore 0,45 µm.

2. Conditions de cultures des cellules eucaryotes

2.1. *Acanthamoeba castellanii*

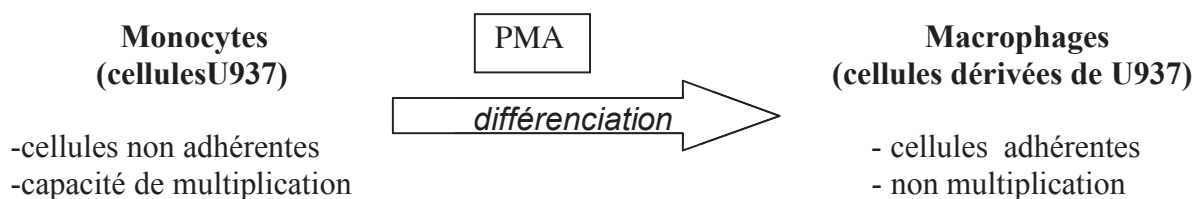
Les cultures sont effectuées dans des flasques stériles en milieu PYG dans un volume de 7 ml et incubées à 30°C. La densité de cellules atteinte au bout de trois jours de culture est d'environ 1×10^6 cellules.mL⁻¹. Chaque semaine, le milieu PYG est renouvelé afin d'entretenir les cultures. Pour cela, les cellules sont décollées du support de culture en incubant les flasques 5 minutes dans la glace. Le décollement observé au microscope inversé (grossissement X 40) puis 500 µL de culture est prélevé et placé dans une nouvelle flasque contenant 7 mL de milieu PYG stérile.

2.2. *Dictyostelium discoideum* (Axenic strain, AX3) :

Dictyostelium discoideum est cultivée en milieu HL5 à 25°C. La mise en conservation est effectuée à partir d'une culture de 40 mLensemencée au 1/10^e et incubée pendant 4 jours à 25°C. La culture est centrifugée à 1400 rpm pendant 5 minutes puis le surnageant est enlevé et le culot est repris dans 2 mL de milieu HL5 supplémenté avec 10% de DMSO. La conservation est effectuée dans des tubes de 1 mL placés à -80°C. Pour démarrer une préculture, le tube de conservation est décongelé sur la glace et 19 mL de milieu HL5 sont ajoutés au contenu du tube. Le tout est incubé à 25°C dans une boîte de pétri stérile. Deux jours avant une infection par *Legionella*, une flasque de 20 ml de milieu HL5 estensemencée à température ambiante avec 2 mL d'une préculture de *Dictyostelium* sortie de conservation et incubée à 25°C.

2.3. Cellules U937 (« Human leukemic monocyte lymphoma cell line »)

La cellules de la lignée U937 proviennent d'un lymphome humain. Ces cellules peuvent être différenciées en macrophages en présence de PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate).



2.3.1. Culture des cellules U937

Les cellules U937 à l'état de monocyte sontensemencées dans des flasques et cultivées en milieu RPMI supplémenté en Sérum de Veau Fétal (SVF) à 10 % (v/v). Les flasques sont incubés 37°C dans un incubateur CO₂.

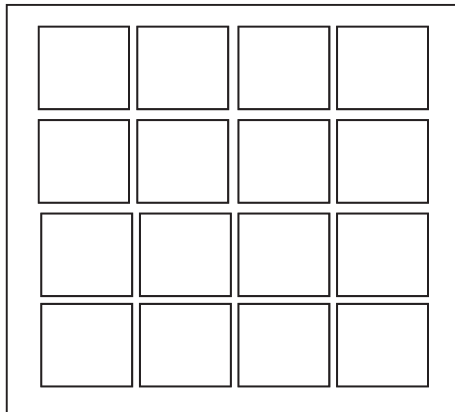
Au contraire des amibes, les cellules U937 qui sont à l'état de monocytes en suspension doivent être différenciées en macrophages afin d'obtenir des cellules adhérentes à la plaque de culture cellulaire. De ce fait il devient primordial de différencier ces cellules avant de réaliser une infection. Trois jours avant la différenciation des flasques sont

ensemencés avec 30 ml d'une préculture de cellules U937 sorties de conservation et sont incubés à 37°C.

2.3.2. Différenciation des cellules U937 en macrophages

Les monocytes en suspension sont récupérés dans un tube falcon comptés à l'hématimètre (moyenne des grands carrés = nombre de cellules x 10^4) en prenant soin de noter le volume. Pour la numération, 15 μL de la suspension sont déposés dans la cellule de numération. Les tubes falcons sont centrifugés pendant 5 min à 1500 rpm et les culots sont remis en suspension dans le volume approprié de RPMI + SVF pour avoir une suspension à 5×10^5 cellules. mL^{-1} . Le PMA (sensible à la lumière) est ajouté à la concentration finale de 100 $\text{ng}.\text{mL}^{-1}$. Une plaque 96 puits est ensuite ensemencée à raison de 200 μL par puits (10^5 cellules/puit) et incubée pendant 2 jours à 37 °C (temps de la différenciation).

Numération à l'hématimètre



$$\begin{aligned} & \textit{Nombre de cellules/grand carré} \\ & = \\ & \textit{Nombre de cellules } 10^4/\textit{ml} \end{aligned}$$



Un grand carré

Fiche technique 7 : Infection des cellules eucaryotes

Le principe de toutes les procédures d'infections est le même. Les cellules eucaryotes hôtes sont mises en contact avec les cellules bactériennes dans une plaque de culture cellulaire. Une centrifugation permet de phaser les infections. Puis, après un temps d'incubation défini, des lavages permettent d'éliminer les bactéries non adhérentes. Finalement, des numérations des cellules bactériennes permettent d'avoir une idée quantitative de la capacité de multiplication bactérienne à l'intérieur de la cellule hôte et donc d'estimer la capacité de virulence. Dans nos tests de virulence, la souche mutante a systématiquement été comparée à la souche sauvage, c'est-à-dire celle ne possédant pas la mutation.

1. Procédure d'infection en plaques 96 puits

Le jour de l'infection, les cellules issues de précultures d'*Acanthamoeba* et de *Dictyostelium* sont tout d'abord décollées des flasques. Le décollement s'effectue après incubation des flasques 10 minutes dans la glace (cas d'*Acanthamoeba castellanii*) ou par simple agitation du flasque (cas de *Dictyostelium*). Les cellules sont ensuite numérées afin de réaliser une suspension cellulaire à 5×10^5 cellules/mL⁻¹. Les cellules sont ensuite ensemencées dans une plaque 96 puits à raison de 200 µL par puit (10^5 cellules/puit).

Dans le cas des cellules U937 le décollement des cellules et leur ensemencement a déjà été réalisé lors de la procédure de différenciation (voir procédure avant).

Suite à l'ensemencement, une incubation de deux heures des plaques 96 puits a lieu à 25°C dans le cas de *Dyctiostelium* et à 30°C dans le cas d'*Acanthamoeba* (sauf pour les cellules U937 déjà incubées pendant deux jour avant l'infection pendant la différenciation).

Après cette période d'incubation, les cellules adhèrent au fond des puits de la plaque et forment un tapis. Les cellules non adhérentes sont éliminées suite à deux lavages des puits dans les milieux respectifs (MB pour *Dictyostelium*, PY pour *Acanthamoeba* et RPMI pour les cellules U937).

Les cellules eucaryotes sont ensuite mises en contact avec les cellules bactériennes de *Legionella* issues de cultures sur milieu BCYE effectuées au préalable (culture de cinq jours avant infection à 30°C pour une infection d'*Acanthamoeba* ou de *Dyctiostelium*, culture de trois jours avant infection pour une infection de cellules U937). Pour cela, une suspension de *Legionella pneumophila* est effectuée en milieu MB, PY ou RPMI de façon à avoir 5×10^6 cellules/mL (soit 1×10^6 cellules/200 µL c'est-à-dire par puit ce qui équivaut à une MOI de $10 = 10$ fois plus de bactéries que de cellules de *Dictyostelium*). Pour quantifier les cellules bactériennes par mesure de la densité optique on utilise l'équivalence suivante : 1 unité de DO à 600 nm = 1×10^9 legionelles.mL⁻¹. Les puits de la plaque sont ensuite ensemencés avec 200 µL de cette suspension bactérienne.

Les plaques sont ensuite soumises à une centrifugation à 2000 rpm pendant 10 minutes (pour phaser l'infection) puis incubées pendant 1 heure à 25°C (*Dyctiostelium*), 30°C (*Acanthamoeba*) ou à 37°C (U937).

A la fin de l'incubation, les tapis sont lavés 4 fois avec le milieu de culture afin d'éliminer les bactéries non adhérentes et les plaques sont incubées aux températures respectives. Le temps correspondant à la fin des quatre lavages a été pris comme point initial (T₀) lors des cinétiques d'infection visant à quantifier l'infection.

2. Quantification de l'infection

Au cours de l'infection, *Legionella pneumophila*, se multiplie dans la cellule eucaryote avant de la lyser à un stade tardif. La numération des cellules bactériennes encore à l'intérieur de la cellule eucaryote (bactéries intracellulaires) ou libérées à la suite de la lyse de la cellule hôte est un excellent moyen d'estimer la capacité de virulence d'une souche.

A différents temps après infection (0, 12, 24, 48, 72 heures), des aliquots du surnageant ont été dilués puis les dilutions ont été déposées sur milieu BCYE afin de dénombrer les bactéries extracellulaires (= libérées suite à la lyse de l'hôte). Pour numérer les bactéries encore présentes dans les cellules eucaryotes (bactéries intracellulaires), les tapis ont été lavés puis les cellules eucaryotes lysés de façon hypotonique (remplacement du milieu par de l'eau stérile pour les cellules U937) ou par l'ajout d'un détergent (Triton X100 0,04% pour lyser *Acanthamoeba* et *Dictyostelium*). Suite à la lyse, les bactéries sont diluées puis déposées sur milieu BCYE pour la numération.

3. Evaluation de la cytotoxicité

Legionella pneumophila est capable de déclencher la mort de sa cellule hôte au cours du cycle infectieux : il s'agit de l'effet cytotoxique. Différentes techniques permettent d'évaluer cet effet délétère : ces techniques reposent sur l'évaluation du nombre de cellules viables. Dans notre cas nous avons choisi d'utiliser la méthode colorimétrique reposant sur l'utilisation de l'« Alamar Blue » : ce composé de couleur bleu est réduit en un composé de couleur rouge en présence de l'activité des enzymes redox des cellules. L'activité de ces enzymes est signe d'une activité métabolique et témoigne de la viabilité des cellules.

Pour cela, les puits infectés ont été traités avec 10% d'« Alamar blue ». Aux temps indiqués après infection, les tapis cellulaires ont été lavés quatre fois avec le milieu de culture afin d'éliminer les bactéries et de réduire au maximum le bruit de fond d'une activité qui serait due à la présence de bactéries résiduelles. A la suite des lavages, 100 µL de milieu contenant 10% (v/v) d'« Alamar blue » a été ajouté dans chaque puits. Après une incubation de quelques heures (4 heures pour les macrophages, 9 heures pour *A. castellanii* et approximativement 48 heures pour *Dictyostelium*) la densité optique a été mesurée à 570 nm et à 600 nm avec un lecteur de microplaques µquant. Le degré de cytotoxicité a été calculé grâce à la formule $\{1 - (\text{mean OD value of infected} / \text{mean OD value of uninfected})\} \times 100 \%$.

4. Etude de l'invasion

L'étude de l'étape d'invasion peut fournir des informations sur l'origine de défaut de multiplication observés dans une cellule hôte. Méthode très utilisée, l'essai de protection à la gentamycine fournit une information sur la capacité d'invasion des cellules bactériennes pathogènes.

Brièvement après deux temps d'incubation des bactéries avec les cellules eucaryotes (30 et 60 min), les tapis ont été lavés et traités avec la gentamycine (50 µg.mL⁻¹) pour 1 heure. Puis les tapis ont été lavés pour éliminer la gentamycine et les tapis ont été lysés (de manière hypotonique pour les macrophages ou avec du triton 0,04% pour les amibes) pour récupérer les bactéries intracellulaires. Les bactéries ont ensuite été diluées dans de l'eau stérile et déposées sur BCYE pour la numération.

Fiche technique 8: Test de la sensibilité de *Legionella pneumophila* a des drogues

1. Test de la sensibilité sur un milieu gélosé BCYE en plaque 24 puits

1.1. Matériel biologique

Les souches de legionelles sont prélevées d'un tube de conservation (-20°C) et incubées sur milieu BCYE gélosé à 30°C pendant 3 à 5 jours avant le test (remarque : la souche de référence et le mutant doivent être ressortis le même jour).

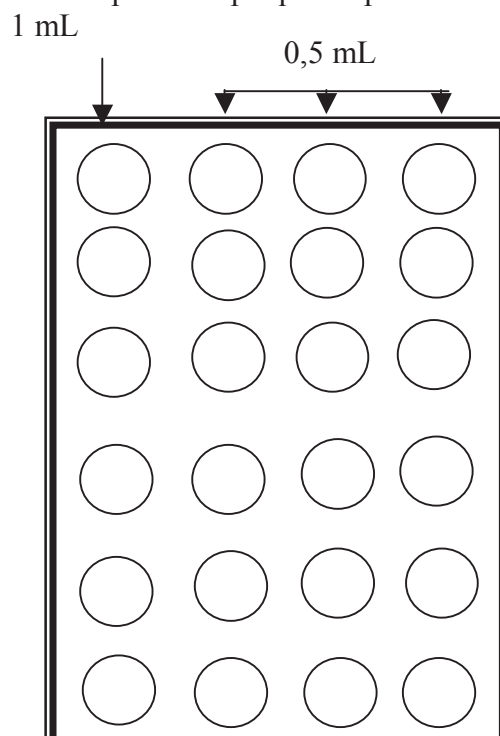
1.2. Milieux

. **Milieu « CYE X 2 »** : « Legionella CYE base » (oxoïd CM0655) : 11,1 g pour 120 mL d'eau déminéralisée. L'ensemble est homogénéisé puis autoclavé à 120°C pendant 20 minutes. Le jour de l'utilisation, l'agar est fondu puis 80 mL de solution AC (voir composition ci-dessous) est ajoutée à la surfusion pour 120 mL de CYE X 2.

. **Solution de Supplémentation AC (ACES, Cystéine, Pyrophosphate de fer, α -cétoglutarate)** Pour 80 mL : ACES (Roth 9138.2) : 4 g , Pyrophosphate de fer (Sigma P6256) : 0,1 g ; Cystéine HCl (Euromedex 1622-B) : 0,16 g ; α -cétoglutarate (Sigma K-3752) : 0,4 g. Le mélange est dissous en eau déminéralisé puis ajusté à pH : 6,9 avant d'être autoclavé à 120 °C pendant 20 minutes.

1.3. Préparation des plaques 24 puits

Le milieu « base oxoid » concentré deux fois que nous appellerons CYE X 2 (composition en annexe) est stérilisé par autoclavage (120°C pendant 20 minutes) et conservé à 55°C (surfusion). Juste avant l'utilisation, il faut ajouter la supplémentation en cystéine et fer. De l'eau distillée stérile est répartie en plaque 24 puits comme présenté ci-dessous :



Gamme de :	Volume à ajouter dans le premier puit (1mL)	Concentration finale premier puit
SDS	2,5 µL à 10 % (eau)	0,125 µg.mL ⁻¹
Tetracycline hypochloride	160 µL à 10 mg.mL ⁻¹ (eau)	800 µg.mL ⁻¹
BET	20 µL à 10 mg.mL ⁻¹ (eau)	100 µg.mL ⁻¹
Deoxycholic acid	40 µL à 10 mg.mL ⁻¹ (éthanol)	200 µg.mL ⁻¹
Novobiocine	12,5 µL à 2 mg.mL ⁻¹ (eau)	12,5 µg.mL ⁻¹
Erythromycine	2,5 µL à 0,8 mg.mL ⁻¹ (éthanol)	1 µg.mL ⁻¹
Acide Nalidixique	40 µL à 0,5 mg.mL ⁻¹ (éthanol)	10 µg.mL ⁻¹
Ampicilline	10 µL à 40 mg.mL ⁻¹ (eau)	200 µg.mL ⁻¹
Chloramphénicol	1,25 µL à 8 mg.mL ⁻¹ (éthanol)	5 µg.mL ⁻¹
Kanamycine	8 µL à 2,5 mg.mL ⁻¹ (eau)	10 µg.mL ⁻¹
Zinc sulfate	160 µL à 10 mg.mL ⁻¹ (eau)	800 µg.mL ⁻¹
Cobalt	160 µL à 10 mg.mL ⁻¹ (eau)	800 µg.mL ⁻¹
Nickel sulfate hexahydrate	160 µL à 10 mg.mL ⁻¹ (eau)	800 µg.mL ⁻¹
Polymixine B sulfate	160 µL à 4 mg.mL ⁻¹ (eau)	320 µg.mL ⁻¹
Norfloxacin	160 µL à 0,15 mg.mL ⁻¹ (éthanol)	12 µg.mL ⁻¹
Acridine orange	160 µL à 10 mg.mL ⁻¹ (eau)	800 µg.mL ⁻¹
Bleu de méthylène *	160 µL à 10 mg.mL ⁻¹ (eau)	800 µg.mL ⁻¹
CTAB *	160 µL à 10 mg.mL ⁻¹ (éthanol)	800 µg.mL ⁻¹
Benzalkonium chloride *	160 µL à 10 mg.mL ⁻¹ (eau)	800 µg.mL ⁻¹
Rhodamine 6 G *	160 µL à 10 mg.mL ⁻¹ (eau)	800 µg.mL ⁻¹
Manganèse sulfate *	160 µL à 10 mg.mL ⁻¹ (eau)	800 µg.mL ⁻¹

Les solutions de biocides réalisées dans l'eau ou l'éthanol sont filtrées avant utilisation.

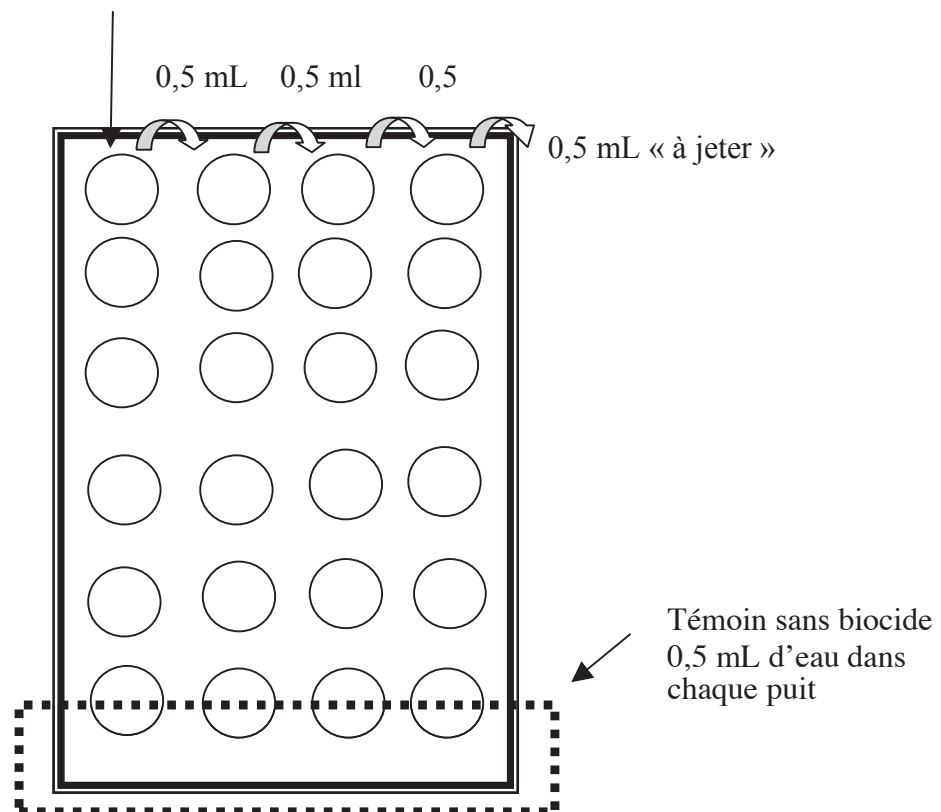
* : Pour les cinq derniers biocides deux lignes de dilutions sont réalisées.

Biocide	Fournisseur	Référence
SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)	Euromedex	1012-D
Tetracycline hypochloride	Sigma	T-3383
BET (Ethidium Bromide)	Sigma	E-8751
Deoxycholic acid	Sigma	D-6750
Novobiocin sodium salt	Sigma	N-1628
Erythromycine	Sigma	E-6376
Acide Nalidixique	Serva	29971
Ampicillin sodium salt	Roth	K0292
Chloramphénicol	Serva	16785
Kanamycine sulfate	Amresco	A0/040813
Zinc sulfate heptahydrate	Prolabo	29 247.292
Cobalt (Co(II) chloride hexahydrate)	Acros organics	192091000
Nickel sulfate hexahydrate	Sigma	N-4882
Polymixine B sulfate	Sigma	P-1004
Norfloxacin	Sigma	N 9890-5G
Acridine orange	Sigma	A6014
Bleu de méthylène (Prolabo)	Prolabo	X-144
CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide)	Sigma	H-5882
Benzalkonium chloride	Sigma	B-1383
Rhodamine 6 G (SIGMA)	Sigma	R4127-5G
Manganèse sulfate	Sigma	M-6528

Ensuite, le volume de biocide nécessaire (cf tableau en face) est ajouté dans le premier puits et homogénéisé par aspiration-refoulement. Un témoin sans biocide où seul 0,5 mL d'eau est déposé dans le puit devra être ajouté (témoin sans drogue pour vérifier la croissance de la souche).

Des dilutions de deux en deux sont réalisées à partir du premier puits (passages par 0,5 mL et « jeter les derniers 0,5 mL »).

Volume du biocide ajouté dans le premier puits



La plaque est incubée pendant 10 minutes à 55°C, puis 0,5 mL de BCYE X 2 supplémenté en fer et cystéine est ajouté dans chaque puits de la plaque contenant les dilutions de biocides dans l'eau.

Les plaques sont laissées à température ambiante jusqu'à la solidification du milieu gélosé puis peuvent être conservées à 4°C pour une utilisation ultérieure.

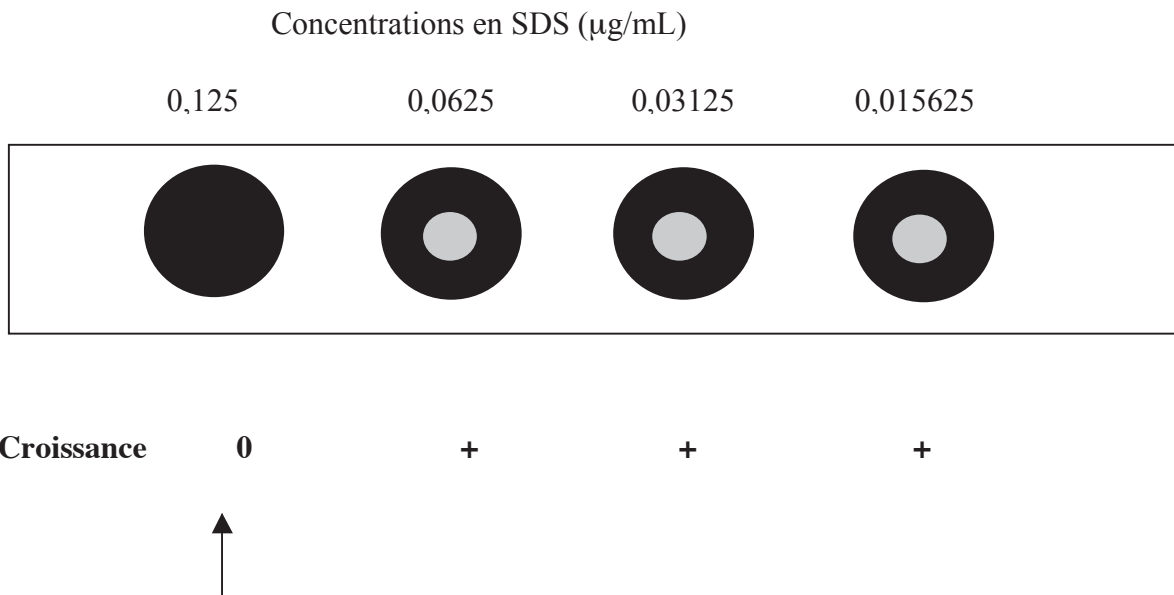
1.4. Ensemencement des plaques avec *Legionella*, lecture et rendu des résultats

Des suspensions de legionelles sont préparées dans de l'eau stérile à partir des cultures sur milieu gélosé BCYE (suspension finale à une DO = 0,5 à 600 nm).

Un dépôt de 10 µL est fait dans chaque puits de la plaque puis les plaques sont incubées à 30°C, puis lues au bout de 7 jours de croissance.

Les résultats sont rendus en indiquant la CMI 100 : concentration minimale du biocide conduisant à l'inhibition totale (100 %) de la croissance bactérienne.

Exemple avec une gamme de SDS :



CMI 100 = 0,125 µg/mL

2. Test de sensibilité par exposition ponctuelle (stress)

2.1. Matériel biologique

Les souches de legionelles sont prélevées dans un tube de conservation (-20°C) et incubées sur milieu BCYE gélosé à 30°C pendant 3 à 5 jours avant le test (remarque : la souche de référence et le mutant doivent être ressortis le même jour).

2.2. Procédure

A partir de la culture sur milieu gélosé, une suspension bactérienne de 1 mL à DO = 1 (600nm) dans de l'eau stérile (tube eppendorff de 1,5 mL) est réalisée. Les cellules bactériennes sont lavées dans de l'eau stérile puis une solution de 1 mL de biocide est ajoutée. Les dilutions du biocide sont réalisées dans l'eau (exemple pour le Bromure d'éthidium 200 µL d'une solution à 10 mg.mL⁻¹ est ajouté à 800 µL d'eau). Après ajout du biocide, les cellules bactériennes sont incubées pendant une heure à 30°C puis sont lavées avec 1mL d'eau distillée. Pour estimer la survie après l'exposition au stress, les suspensions contenant les cellules bactériennes sont diluées puis 10 µl de chaque dilution est déposé sur milieu gélosé BCYE. L'incubation est réalisée à 30 °C et les lectures sont faites après 7 jours.

Fiche technique 9 : Test d'accumulation du bromure d'éthidium chez *Legionella*

Les bactéries ont été mises en culture dans le milieu liquide LGM à 30°C jusqu'à atteinte de la phase stationnaire de croissance (DO : 3,6-3,9). Les cellules bactériennes sont ensuite lavées deux fois dans de l'eau distillée stérile. La suspension bactérienne est ajustée à une DO de 0,3 dans 1 mL d'eau stérile puis du CCCP (carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone) à la concentration finale de 2,5 mg.mL⁻¹ est ajouté ou non. Après une incubation pendant 30 minutes, le bromure d'éthidium est ajouté à la concentration finale de 0,005 mg.mL⁻¹. Les suspensions bactériennes sont ensuite distribuées à raison de 100 µL dans les puits d'une microplaque. La fluorescence est ensuite lue toutes les deux minutes grâce au spectrofluorimètre « Xenius » (Safas) avec comme longueurs d'ondes : 518 nm pour l'excitation et 605 nm pour l'émission).

Fiche technique 10 : Etude de l'expression des gènes par RT PCR quantitative

Les solutions d'eau sont traitées au DEPC 0,1% (diéthylpyrocarbonate) puis autoclavés à 120°C pendant 20 min. Le matériel est passé à l'éthanol 70° avant utilisation.

1. Extraction des ARN totaux

Une culture de cellules (rassemblant deux cultures de 2 ml) en phase exponentielle (DO 1,5) ou stationnaire de croissance (DO : 4,3) est centrifugée 10 minutes à 13 000rpm à 4°C. Le surnageant est ensuite éliminé et le culot est repris dans 1ml de tampon TE additionné de lysozyme (10 mg.mL⁻¹). Après la lyse, l'ARN est extrait en suivant la procédure du kit « Rneasy Midi kit » (Qiagen) puis traité à la Dnase du kit « TURBO DNA-free kit » (Ambion) afin d'éliminer l'ADN génomique résiduel. L'ARN est dosé par spectrophotométrie au Nanodrop ND-100 puis conservé à 80°C.

2. Synthèse de l'ADN complémentaire

La synthèse d'ADN complémentaire est effectuée à partir de 500 ng d'ARN total grâce à des amorces aléatoires (« random hexamers » : 100 pmol) et à 200 U de reverse transcriptase (« RevertaidTM M-MuLV reverse transcriptase, Fermentas). L'ARN synthétique pAW109 (Applied biosystems) a été utilisé ajouté à chaque échantillon d'ARN comme contrôle interne de la réaction de RT PCR. Après une incubation à 65°C puis à 4°C pour favoriser l'hybridation des amorces, la synthèse de l'ADN complémentaire est initiée par une incubation 10 minutes à 25°C, suivi par une incubation 10 minutes à 42°C. L'enzyme est enfin inactivée 70°C pendant 10 minutes. L'ADN complémentaire est conservé à -20°C.

3. PCR quantitative

3.1. Dessin des amorces

Les amorces sont dessinées grâce au logiciel www.universalprobelibrary.com. Avant la PCR quantitative, toutes les amorces ont été testées sur de l'ADN génomique.

3.2. PCR quantitative

Les PCR ont été effectuées sur l'ADNc grâce à l'appareil LightCycler 480 (Roche) en utilisant le kit SYBR GreenI pour la synthèse et la détection des amplicons. Les réactions sont effectuées dans des mélanges réactionnels de 10 µL contenant 0,5 µM de chaque amorce, 2 µL d'ADNc et 5 µL du mélange réactionnel « DNA Master SYBR Green I Mix » (Roche). Les conditions d'amplification sont les suivantes : prédénaturation de 2 minutes à 94°C et 40 cycles d'amplification : 94°C pendant 30 secondes, 60°C pendant 30 secondes et 72°C pendant 6 secondes. L'appareil est programmée de manière qu'une mesure de fluorescence est prise après chaque cycle d'amplification. A la fin de tous les cycles d'amplification, les amplicons sont dissociés par une augmentation de température progressive entre 65°C et 97°C.

3.3. Analyse des résultats de la PCR quantitative

Pour chaque gène étudié, une gamme étalon réalisée avec une gamme de dilution d'un produit de PCR a été effectuée en parallèle. Le produit de PCR provient de l'amplification de la séquence du gène cible sur de l'ADN chromosomique. Cette gamme sert à déterminer l'efficacité E de la PCR à partir de la pente de la droite étalon via la formule $E = (10^{(-1/\text{pente})})$. Pour chaque réaction d'amplification, nous avons vérifié par la courbe de fusion que les produits amplifiés correspondent bien à un seul produit ce qui est visualisable par la présence d'un seul et unique pic sur la courbe.

Toutes ces vérifications faites, les données ont été traitées à l'aide du logiciel REST (Pfaffl *et al.*, 2002) pour déterminer le changement de niveau d'expression de chaque transcrite entre les deux phases (phase exponentielle/ phase stationnaire). Ce logiciel permettant le traitement des données de RT-PCR quantitative est basé sur le modèle mathématique développé par Pfaffl (Pfaffl, 2001).

Ce logiciel permet de calculer le ratio d'expression relative de chaque gène suivant la formule :

$$R = \frac{(E_{\text{Cible}})^{\Delta C_p \text{ cible (moyenne controle- moyenne test)}}}{(E_{\text{Référence}})^{\Delta C_p \text{ référence (moyenne controle- moyenne test)}}$$

où R représente le ratio d'expression relative normalisé

E représente l'efficacité de la PCR déduite de la valeur de la pente de la droite étalon par la formule $10^{(-1/\text{pente})}$. Celle-ci est déterminée pour le gène cible (E_{Cible}) et pour le gène de référence 16S ($E_{\text{Référence}}$) servant à la normalisation dans notre cas.

ΔC_p (moyenne contrôle-moyenne échantillon) représente la différence entre la valeur moyenne des C_p du groupe « contrôle » (phase exponentielle dans notre cas) et du groupe « test » (phase stationnaire dans notre cas). $\Delta C_{p\text{cible}}$ correspond à la différence des C_p dans le cas du gène cible (=gène à étudier) et $\Delta C_{p\text{référence}}$ correspond à la différence des C_p dans le cas du gène de référence (=gène 16S).

En plus de définir le ratio d'expression relative, le logiciel intègre un traitement statistique des données. Ce traitement statistique repose sur un test de « randomisation » (facteur aléatoire) en prenant les deux groupes définis comme contrôle (phase exponentielle dans notre cas) et test (phase stationnaire dans notre cas). Ce traitement statistique permet, à partir du calcul de la « p-value » de savoir si les différences observées entre les C_p du groupe contrôle et du groupe test sont significativement différentes. Dans le cas d'une « p-value » inférieure à 0,05 (indice de confiance de 95%), le logiciel donne un facteur de régulation normalisé.

La valeur de ce facteur de régulation correspond :

- au ratio d'expression dans le cas d'une « up-régulation » c'est-à-dire d'une plus grande expression du gène dans le groupe test (phase stationnaire) par rapport au groupe contrôle (phase exponentielle).
- à 1/ratio d'expression dans le cas d'une « down-regulation » c'est-à-dire d'une plus faible expression du gène dans le groupe test (phase stationnaire) par rapport au groupe contrôle (phase exponentielle).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdallah, A. M., N. C. Gey van Pittius, P. A. Champion, J. Cox, J. Luirink, C. M. Vandenbroucke-Grauls, B. J. Appelmek & W. Bitter. (2007) Type VII secretion-mycobacteria show the way. *Nat Rev Microbiol* **5**: 883-891.
- Aberg, A., V. Shingler & C. Balsalobre. (2006) (p)ppGpp regulates type 1 fimbriation of *Escherichia coli* by modulating the expression of the site-specific recombinase FimB. *Molecular Microbiology* **60**: 1520-1533.
- Abu-Zant, A., S. Jones, R. Asare, J. Suttles, C. Price, J. Graham & Y. A. Kwaik. (2007) Anti-apoptotic signalling by the Dot/Icm secretion system of *L. pneumophila*. *Cell Microbiol* **9**: 246-264.
- Akama, H., T. Matsuura, S. Kashiwagi, H. Yoneyama, S. I. Narita, T. Tsukihara, A. Nakagawa & T. Nakae. (2004) Crystal structure of the membrane fusion protein, MexA, of the multidrug transporter in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 25939-25942.
- Albers, U., K. Reus, H. A. Shuman & H. Hilbi. (2005) The amoebae plate test implicates a paralogue of LpxB in the interaction of *Legionella pneumophila* with *Acanthamoeba castellanii*. *Microbiology* **151**: 167-182.
- Albert-Weissenberger, C., C. Cazalet & C. Buchrieser. (2007) *Legionella pneumophila* - a human pathogen that co-evolved with fresh water protozoa. *Cell Mol Life Sci* **64**: 432-448.
- Alekshun, M. N. & S. B. Levy. (1999) The mar regulon: multiple resistance to antibiotics and other toxic chemicals. *Trends Microbiol* **7**: 410-413.
- Alonso, A. & F. Garcia-del Portillo. (2004) Hijacking of eukaryotic functions by intracellular bacterial pathogens. *Int Microbiol* **7**: 181-191.
- Alvarez-Martinez, C. E. & P. J. Christie. (2009) Biological Diversity of Prokaryotic Type IV Secretion Systems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **73**: 775-808.
- Amer, A. O. & M. S. Swanson. (2002) A phagosome of one's own: a microbial guide to life in the macrophage. *Curr Opin Microbiol* **5**: 56-61.
- Amor, J. C., J. Swails, X. Zhu, C. R. Roy, H. Nagai, A. Ingmundson, X. Cheng & R. A. Kahn. (2005) The structure of RalF, an ADP-ribosylation factor guanine nucleotide exchange factor from *Legionella pneumophila*, reveals the presence of a cap over the active site. *J Biol Chem* **280**: 1392-1400.
- Andersen, C., C. Hughes & V. Koronakis. (2000) Channel vision. Export and efflux through bacterial channel-tunnels. *EMBO Rep* **1**: 313-318.
- Andersen-Nissen, E., K. D. Smith, K. L. Strobe, S. L. Barrett, B. T. Cookson, S. M. Logan & A. Aderem. (2005) Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 9247-9252.
- Aurell, H., J. Etienne, F. Forey, M. Reyrolle, P. Girardo, P. Farge, B. Decludt, C. Campese, F. Vandenesch & S. Jarraud. (2003) *Legionella pneumophila* serogroup 1 strain Paris: Endemic distribution throughout France. *Journal of Clinical Microbiology* **41**: 3320-3322.
- Avila, M., N. Said & D. M. Ojcius. (2008) The book reopened on infectious diseases. *Microbes and Infection* **10**: 942-947.
- Banga, S., P. Gao, X. H. Shen, V. Fiscus, W. X. Zong, L. L. Chen & Z. Q. Luo. (2007) *Legionella pneumophila* inhibits macrophage apoptosis by targeting pro-death members of the Bcl2 protein family. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 5121-5126.
- Barker, J., H. Scaife & M. R. W. Brown. (1995) Intraphagocytic growth induces an antibiotic-resistant phenotype of *Legionella-pneumophila*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **39**: 2684-2688.
- Barreto, M. L., M. G. Teixeira & E. H. Carmo. (2006) Infectious diseases epidemiology. *Journal of Epidemiology and Community Health* **60**: 192-195.
- Baucheron, S., S. Tyler, D. Boyd, M. R. Mulvey, E. Chaslus-Dancla & A. Cloeckart. (2004) AcrAB-TolC directs efflux-mediated multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT104. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 3729-3735.
- Bavro, V. N., Z. Pietras, N. Furnham, L. Perez-Cano, J. Fernandez-Recio, X. Y. Pei, R. Misra & B. Luisi. (2008) Assembly and channel opening in a bacterial drug efflux machine. *Molecular Cell* **30**: 114-121.
- Bay, D. C., K. L. Rommens & R. J. Turner. (2008) Small multidrug resistance proteins: a multidrug transporter family that continues to grow. *Biochim Biophys Acta* **1778**: 1814-1838.
- Behnia, R. & S. Munro. (2005) Organelle identity and the signposts for membrane traffic. *Nature* **438**: 597-604.

- Belyi, Y., I. Tabakova, M. Stahl & K. Aktories. (2008) Lgt: a family of cytotoxic glucosyltransferases produced by *Legionella pneumophila*. *J Bacteriol* **190**: 3026-3035.
- Belyi, Y., R. Niggeweg, B. Opitz, M. Vogelsgesang, S. Hippenstiel, M. Wilm & K. Aktories. (2006) *Legionella pneumophila* glucosyltransferase inhibits host elongation factor 1A. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 16953-16958.
- Berk, S. G., G. Faulkner, E. Garduno, M. C. Joy, M. A. Ortiz-Jimenez & R. A. Garduno. (2008) Packaging of live *Legionella pneumophila* into pellets expelled by *Tetrahymena spp.* does not require bacterial replication and depends on a Dot/Icm-mediated survival mechanism. *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 2187-2199.
- Bierne, H., C. Sabet, N. Personnic & R. Cossart. (2007) Internalins: a complex family of leucine-rich repeat-containing proteins in *Listeria monocytogenes*. *Microbes and Infection* **9**: 1156-1166.
- Bingle, L. E., C. M. Bailey & M. J. Pallen. (2008) Type VI secretion: a beginner's guide. *Curr Opin Microbiol* **11**: 3-8.
- Birnboim, H. C. & J. Doly. (1979) Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* **7**: 1513-1523.
- Bitar, D. M., M. Molmeret & Y. Abu Kwaik. (2004) Molecular and cell biology of *Legionella pneumophila*. *Int J Med Microbiol* **293**: 519-527.
- Blocker, A., K. Komoriya & S. Aizawa. (2003) Type III secretion systems and bacterial flagella: insights into their function from structural similarities. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 3027-3030.
- Borloo, J., L. De Smet, B. Vergauwen, J. J. Van Beeumen & B. Devreese. (2007) A beta-galactosidase-based bacterial two-hybrid system to assess protein-protein interactions in the correct cellular environment. *Journal of Proteome Research* **6**: 2587-2595.
- Brown, M. H. & R. A. Skurray. (2001) Staphylococcal multidrug efflux protein QacA. *J Mol Microbiol Biotechnol* **3**: 163-170.
- Brüggerman H., Hagman A., Jules M., Sismeiro O., Dillies M. A., Gouyette C., kunst F., Steinert M., Heuner K., Coppée J. Y. & Buchrieser C. (2006) Virulence strategies for infecting phagocytes deduced from the *in vivo* transcriptional program of *Legionella pneumophila*. *Cell Microbiol.* **8** : 1228-1240.
- Buchanan, S. K. (2001) Type I secretion and multidrug efflux: transport through the TolC channel-tunnel. *Trends Biochem Sci* **26**: 3-6.
- Buckley, A. M., M. A. Webber, S. Cooles, L. P. Randall, R. M. La Ragione, M. J. Woodward & L. J. Piddock. (2006) The AcrAB-TolC efflux system of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium plays a role in pathogenesis. *Cell Microbiol* **8**: 847-856.
- Burse, A., H. Weingart & M. S. Ullrich. (2004) The phytoalexin-inducible multidrug efflux pump AcrAB contributes to virulence in the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **17**: 43-54.
- Campodonico, E. M., L. Chesnel & C. R. Roy. (2005) A yeast genetic system for the identification and characterization of substrate proteins transferred into host cells by the *Legionella pneumophila* Dot/Icm system. *Mol Microbiol* **56**: 918-933.
- Carducci, A., M. Verani & R. Battistini. (2010) *Legionella* in industrial cooling towers: monitoring and control strategies. *Letters in Applied Microbiology* **50**: 24-29.
- Casadevall, A., E. Dadachova & L. Pirofski. (2004) Passive antibody therapy for infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology* **2**: 695-703.
- Cascales, E. & P. J. Christie. (2003) The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nat Rev Microbiol* **1**: 137-149.
- Cattoir, V. (2004) Efflux-mediated antibiotics resistance in bacteria. *Pathol Biol (Paris)* **52**: 607-616.
- Cazalet C., Gomez-Valero L., Rusniok C., Lomma M., Dervins-Ravault D., et al. (2010) Analysis of the *Legionella longbeache* genome and transcriptome uncovers unique strategies to cause Legionnaires' disease. *Plos Genet* **6** : 1-15.
- Cazalet, C., C. Rusniok, H. Bruggemann, N. Zidane, A. Magnier, L. Ma, M. Tichit, S. Jarraud, C. Bouchier, F. Vandenesch, F. Kunst, J. Etienne, P. Glaser & C. Buchrieser. (2004) Evidence in the *Legionella pneumophila* genome for exploitation of host cell functions and high genome plasticity. *Nat Genet* **36**: 1165-1173.
- Celli, J. & B. B. Finlay. (2002) Bacterial avoidance of phagocytosis. *Trends Microbiol* **10**: 232-237.

- Celli, J. & J. P. Gorvel. (2004) Organelle robbery: *Brucella* interactions with the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Microbiol* **7**: 93-97.
- Celli, J., M. Olivier & B. B. Finlay. (2001) Enteropathogenic *Escherichia coli* mediates antiphagocytosis through the inhibition of PI 3-kinase-dependent pathways. *Embo J* **20**: 1245-1258.
- Chen, D. Q., X. C. Zheng & Y. J. Lu. (2006) Identification and characterization of novel ColE1-type, high-copy number plasmid mutants in *Legionella pneumophila*. *Plasmid* **56**: 167-178.
- Chen, Y. J., O. Pornillos, S. Lieu, C. Ma, A. P. Chen & G. Chang. (2007) X-ray structure of EmrE supports dual topology model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 18999-19004.
- Chien, M. C., I. Morozova, S. D. Shi, H. T. Sheng, J. Chen, S. M. Gomez, G. Asamani, K. Hill, J. Nuara, M. Feder, J. Rineer, J. J. Greenberg, V. Steshenko, S. H. Park, B. H. Zhao, E. Teplitskaya, J. R. Edwards, S. Pampou, A. Georghiou, I. C. Chou, W. Iannuccilli, M. E. Ulz, D. H. Kim, A. Geringer-Sameth, C. Goldsberry, P. Morozov, S. G. Fischer, G. Segal, X. Y. Qu, A. Rzhetsky, P. S. Zhang, E. Cayanis, P. J. De Jong, J. Y. Ju, S. Kalachikov, H. A. Shuman & J. J. Russo. (2004) The genomic sequence of the accidental pathogen *Legionella pneumophila*. *Science* **305**: 1966-1968.
- Choudhuri, S. & C. D. Klaassen. (2006) Structure, function, expression, genomic organization, and single nucleotide polymorphisms of human ABCB1 (MDR1), ABCC (MRP), and ABCG2 (BCRP) efflux transporters. *Int J Toxicol* **25**: 231-259.
- Christie, P. J. & E. Cascales. (2005) Structural and dynamic properties of bacterial type IV secretion systems (review). *Mol Membr Biol* **22**: 51-61.
- Christie, P. J. & J. P. Vogel. (2000) Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trends Microbiol* **8**: 354-360.
- Chung, Y. J. & M. H. Saier. (2002) Overexpression of the *Escherichia coli* sugE gene confers resistance to a narrow range of quaternary ammonium compounds. *Journal of Bacteriology* **184**: 2543-2545.
- Ciancotto, N. P. (2009) Many substrates and functions of type II secretion : lessons learned from *Legionella pneumophila*. *Future Microbiol.* **4** : 797-805.
- Ciancotto, N. P. & B. S. Fields. (1992) *Legionella-pneumophila*-mip gene potentiates intracellular infection of protozoa and human macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 5188-5191.
- Cirillo, J. D., S. Falkow & L. S. Tompkins. (1994) Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion. *Infect Immun* **62**: 3254-3261.
- Comstock, L. E. & D. L. Kasper. (2006) Bacterial glycans: key mediators of diverse host immune responses. *Cell* **126**: 847-850.
- Conover, G. M., I. Derre, J. P. Vogel & R. R. Isberg, (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.
- Cornelis, G. R. (2002) The Yersinia Ysc-Yop 'type III' weaponry. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 742-752.
- Cossart, P. & P. J. Sansonetti. (2004) Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science* **304**: 242-248.
- Crosby, J. A. & S. C. Kachlany. (2007) TdeA, a TolC-like protein required for toxin and drug export in *Aggregatibacter* (*Actinobaeillus*) *actinomycetemcomitans*. *Gene* **388**: 83-92.
- Dalebroux, Z. D., R. L. Edwards & M. S. Swanson. (2009) SpoT governs *Legionella pneumophila* differentiation in host macrophages. *Mol Microbiol* **71**: 640-658.
- D'Auria, G., N. Jimenez, F. Peris-Bondia, C. Pelaz, A. Latorre & A. Moya. (2008) Virulence factor rtx in *Legionella pneumophila*, evidence suggesting it is a modular multifunctional protein. *BMC Genomics* **9**.
- Davidson, A. L. & J. Chen. (2004) ATP-binding cassette transporters in bacteria. *Annu Rev Biochem* **73**: 241-268.
- De Buck, E., E. Lammertyn & J. Anne. (2008) The importance of the twin-arginine translocation pathway for bacterial virulence. *Trends in Microbiology* **16**: 442-453.
- De Felipe, K. S., R. T. Glover, X. Charpentier, O. R. Anderson, M. Reyes, C. D. Pericone & H. A. Shuman. (2008) *Legionella* eukaryotic-like type IV substrates interfere with organelle trafficking. *PLoS Pathog* **4**: 1-16.
- Dean, P. & B. Kenny. (2009) The effector repertoire of enteropathogenic *E. coli*: ganging up on the host cell. *Curr Opin Microbiol* **12**: 101-109.

Dean, P., M. Maresca & B. Kenny. (2005) EPEC's weapons of mass subversion. *Curr Opin Microbiol* **8**: 28-34.

DebRoy S., Aragon V., Kurtz S., Ciancotto N. P. (2006) *Legionella pneumophila* Mip, a surface-exposed peptidylproline cis-trans-isomerase, promotes of phospholipase C-like activity in culture supernatants. *Infect. Immun.* **74** : 5152-5160.

DebRoy S., Dao J., Sorderberg M., Rossier O., Ciancotto N. P. (2006) *Legionella pneumophila* type II secretome reveals unique exoproteins and a chitinase that promotes bacterial persistence in the lung. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103** : 19146-19151.

Denyer, S. P. & J. Y. Maillard, (2002) Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-negative bacteria. *J Appl Microbiol* **92** **Suppl**: 35S-45S.

Derre, I. & R. R. Isberg. (2005) LidA, a translocated substrate of the *Legionella pneumophila* type IV secretion system, interferes with the early secretory pathway. *Infection and Immunity* **73**: 4370-4380.

Desvaux, M., N. J. Parham, A. Scott-Tucker & I. R. Henderson. (2004) The general secretory pathway: a general misnomer? *Trends Microbiol* **12**: 306-309.

DiGiuseppe Champion, P. A. & J. S. Cox. (2007) Protein secretion systems in Mycobacteria. *Cell Microbiol* **9**: 1376-1384.

Dobrindt, U., B. Hochhut, U. Hentschel & J. Hacker. (2004) Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat Rev Microbiol* **2**: 414-424.

Doleans-Jordheim, A., M. Akermi, C. Ginevra, C. Cazalet, E. Kay, D. Schneider, C. Buchrieser, D. Atlan, F. Vandenesch, J. Etienne & S. Jarraud. (2006) Growth-phase-dependent mobility of the Ivh-encoding region in *Legionella pneumophila* strain Paris. *Microbiology* **152**: 3561-3568.

Drotman, D. P. (1998) Emerging infectious diseases: A brief biographical heritage. *Emerging Infectious Diseases* **4**: 372-373.

Duclos, S. & M. Desjardins. (2000) Subversion of a young phagosome: the survival strategies of intracellular pathogens. *Cell Microbiol* **2**: 365-377.

Dussurget, O., J. Pizarro-Cerda & P. Cossart. (2004) Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* virulence. *Annual Review of Microbiology* **58**: 587-610.

Economou, A. (1999) Following the leader: bacterial protein export through the Sec pathway. *Trends Microbiol* **7**: 315-320.

Edelstein, P. H. & R. D. Meyer. (1980) Susceptibility of *Legionella-pneumophila* to 20 anti-microbial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **18**: 403-408.

Elkins, C. A. & H. Nikaido. (2003) 3D structure of AcrB: the archetypal multidrug efflux transporter of *Escherichia coli* likely captures substrates from periplasm. *Drug Resist Updat* **6**: 9-13.

Ensminger, A. W. & R. R. Isberg. (2009) *Legionella pneumophila* Dot/Icm translocated substrates: a sum of parts. *Curr Opin Microbiol* **12**: 67-73.

Erickson, D. L., J. L. Lines, E. C. Pesci, V. Venturi & D. G. Storey. (2004) *Pseudomonas aeruginosa* relA contributes to virulence in *Drosophila melanogaster*. *Infection and Immunity* **72**: 5638-5645.

Ernst, J. D. (2000) Bacterial inhibition of phagocytosis. *Cell Microbiol* **2**: 379-386.

Essler, M., S. Linder, B. Schell, K. Hufner, A. Wiedemann, K. Randhahn, J. M. Staddon & M. Aepfelbacher. (2003) Cytotoxic necrotizing factor 1 of *Escherichia coli* stimulates Rho/Rho-kinase-dependent myosin light-chain phosphorylation without inactivating myosin light-chain phosphatase in endothelial cells. *Infection and Immunity* **71**: 5188-5193.

Evans, K., L. Passador, R. Srikumar, E. Tsang, J. Nezezon & K. Poole. (1998) Influence of the MexAB-OprM multidrug efflux system on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **180**: 5443-5447.

Falkow, S., (1991) Bacterial entry into eukaryotic cells. *Cell* **65**: 1099-1102.

Faucher, S. P., S. Porwollik, C. M. Dozois, M. McClelland & F. Daigle. (2006) Transcriptome of *Salmonella enterica* serovar Typhi within macrophages revealed through the selective capture of transcribed sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 1906-1911.

Faulkner, G., S. G. Berk, E. Garduno, M. A. Ortiz-Jimenez & R. A. Garduno. (2008) Passage through *Tetrahymena tropicalis* Triggers a Rapid Morphological Differentiation in *Legionella pneumophila*. *Journal of Bacteriology* **190**: 7728-7738.

Ferhat, M., D. Atlan, A. Vianney, J. C. Lazzaroni, P. Doublet & C. Gilbert. (2009) The TolC Protein of *Legionella pneumophila* Plays a Major Role in Multi-Drug Resistance and the Early Steps of Host Invasion. *Plos One* **4** : 1-10.

Fields, B. S., R. F. Benson & R. E. Besser. (2002) *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clinical Microbiology Reviews* **15**: 506-526.

Filloux, A., A. Hachani & S. Bleves. (2008) The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes. *Microbiology* **154**: 1570-1583.

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

Franco, I. S., H. A. Shuman & X. Charpentier. (2009) The perplexing functions and surprising origins of *Legionella pneumophila* type IV secretion effectors. *Cell Microbiol* **11** : 1435-1443.

Fraser, D. W., T. R. Tsai, W. Orenstein, W. E. Parkin, H. J. Beecham, R. G. Sharrar, J. Harris, G. F. Mallison, S. M. Martin, J. E. McDade, C. C. Shepard & P. S. Brachman. (1977) Legionnaires disease - description of an epidemic of pneumonia. *New England Journal of Medicine* **297**: 1189-1197.

Fronzes, R., P. J. Christie & G. Waksman. (2009) The structural biology of type IV secretion systems. *Nature Reviews Microbiology* **7**: 703-714.

Garcia, M. T., S. Jones, C. Pelaz, R. D. Millar & Y. Abu Kwaik. (2007) *Acanthamoeba polyphaga* resuscitates viable non-culturable *Legionella pneumophila* after disinfection. *Environmental Microbiology* **9**: 1267-1277.

Garduno, R. A., E. Garduno, M. Hiltz & P. S. Hoffman. (2002) Intracellular growth of *Legionella pneumophila* gives rise to a differentiated form dissimilar to stationary-phase forms. *Infection and Immunity* **70**: 6273-6283.

Gaynor, E. C., D. H. Wells, J. K. MacKichan & S. Falkow. (2005) The *Campylobacter jejuni* stringent response controls specific stress survival and virulence-associated phenotypes. *Molecular Microbiology* **56**: 8-27.

Gentschev, I., G. Dietrich & W. Goebel. (2002) The *E-coli* alpha-hemolysin secretion system and its use in vaccine development. *Trends in Microbiology* **10**: 39-45.

Ghosh, P. (2004) Process of protein transport by the type III secretion system. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 771-795.

Gil, H., G. J. Platz, C. A. Forestal, M. Monfett, C. S. Bakshi, T. J. Sellati, M. B. Furie, J. L. Benach & D. G. Thanassi. (2006) Deletion of TolC orthologs in *Francisella tularensis* identifies roles in multidrug resistance and virulence. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 12897-12902.

Gorvel, J. P. & E. Moreno. (2002) *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Vet Microbiol* **90**: 281-297.

Gouin, E., M. D. Welch & P. Cossart. (2005) Actin-based motility of intracellular pathogens. *Curr Opin Microbiol* **8**: 35-45.

Greener, T., D. Govezensky & A. Zamir. (1993) A novel multicopy suppressor of a groEl mutation includes 2 nested open reading frames transcribed from different promoters. *Embo Journal* **12**: 889-896.

Grkovic, S., M. H. Brown & R. A. Skurray. (2002) Regulation of bacterial drug export systems. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 671-701.

Gruenheid, S. & B. B. Finlay. (2003) Microbial pathogenesis and cytoskeletal function. *Nature* **422**: 775-781.

Guiney, D. G. & M. Lesnick. (2005) Targeting of the actin cytoskeleton during infection by *Salmonella* strains. *Clin Immunol* **114**: 248-255.

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

Hajishengallis, G., M. Wang, S. Liang, M. A. K. Shakhathreh, D. James, S. Nishiyama, F. Yoshimura & D. R. Demuth. (2008) Subversion of Innate Immunity by Periodontopathic Bacteria via Exploitation of Complement Receptor-3. *Current Topics in Complement* **632**: 203-219.

Hales L. M., 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.

- Hamilton, H. L., N. M. Dominguez, K. J. Schwartz, K. T. Hackett & J. P. Dillard. (2005) *Neisseria gonorrhoeae* secretes chromosomal DNA via a novel type IV secretion system. *Molecular Microbiology* **55**: 1704-1721.
- Hansen-Wester, I. & M. Hensel. (2001) *Salmonella* pathogenicity islands encoding type III secretion systems. *Microbes Infect* **3**: 549-559.
- Hashim, S., K. Mukherjee, M. Raje, S. K. Basu & A. Mukhopadhyay. (2000) Live *Salmonella* modulate expression of Rab proteins to persist in a specialized compartment and escape transport to lysosomes. *J Biol Chem* **275**: 16281-16288.
- Heidtman, M., E. J. Chen, M. Y. Moy & R. R. Isberg. (2009) Large-scale identification of *Legionella pneumophila* Dot/Icm substrates that modulate host cell vesicle trafficking pathways. *Cell Microbiol* **11**: 230-248.
- Hellwig, S. M. M., H. van Oirschot, W. L. W. Hazenbos, A. B. van Spriel, F. R. Mooi & J. G. J. van de Winkel. (2001) Targeting to Fc gamma receptors, but not CR3 (CD11b/CD18), increases clearance of *Bordetella pertussis*. *Journal of Infectious Diseases* **183**: 871-879.
- Henderson, I. R., F. Navarro-Garcia & J. P. Nataro. (1998) The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. *Trends Microbiol* **6**: 370-378.
- Henderson, I. R., F. Navarro-Garcia, M. Desvaux, R. C. Fernandez & D. Ala'Aldeen. (2004) Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 692-744.
- Hestvik, A. L., Z. Hmama & Y. Av-Gay. (2005) Mycobacterial manipulation of the host cell. *FEMS Microbiol Rev* **29**: 1041-1050.
- Heuner, K. & M. Steinert. (2003) The flagellum of *Legionella pneumophila* and its link to the expression of the virulent phenotype. *International Journal of Medical Microbiology* **293**: 133-143.
- Hewlett, E. L., G. M. Donato & M. C. Gray. (2006) Macrophage cytotoxicity produced by adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*: more than just making cyclic AMP! *Molecular Microbiology* **59**: 447-459.
- Higgins, M. K., E. Bokma, E. Koronakis, C. Hughes & V. Koronakis. (2004) Structure of the periplasmic component of a bacterial drug efflux pump. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 9994-9999.
- Hoffman, P. S., M. Ripley & R. Weeratna. (1992) Cloning and nucleotide-sequence of a gene (omps) encoding the major outer-membrane protein of *Legionella-pneumophila*. *Journal of Bacteriology* **174**: 914-920.
- Holland, I. B., L. Schmitt & J. Young. (2005) Type 1 protein secretion in bacteria, the ABC-transporter dependent pathway (review). *Mol Membr Biol* **22**: 29-39.
- Horwitz, M. A. (1983) The Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes. *J Exp Med* **158**: 2108-2126.
- Hueck, C. J. (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 379-433.
- Ingmundson, A., A. Delprato, D. G. Lambright & C. R. Roy. (2007) *Legionella pneumophila* proteins that regulate Rab1 membrane cycling. *Nature* **450**: 365-369.
- Isberg, R. R., T. J. O'Connor & M. Heidtman. (2009) The *Legionella pneumophila* replication vacuole: making a cosy niche inside host cells. *Nat Rev Microbiol* **7**: 13-24.
- Jackson, C. L. & J. E. Casanova. (2000) Turning on ARF: the Sec7 family of guanine-nucleotide-exchange factors. *Trends Cell Biol* **10**: 60-67.
- Jacobi S. & Heuner K. (2003). Description of a putative type I secretion system in *Legionella pneumophila*. *Int. J. Med. Microbiol.* **293** : 349-358.
- Jeannin, P., S. Jaillon & Y. Delneste. (2008) Pattern recognition receptors in the immune response against dying cells. *Curr Opin Immunol* **20**: 530-537.
- Journet, L., K. T. Hughes & G. R. Cornelis. (2005) Type III secretion: a secretory pathway serving both motility and virulence (review). *Mol Membr Biol* **22**: 41-50.
- Jules, M. & C. Buchrieser. (2007) *Legionella pneumophila* adaptation to intracellular life and the host response: clues from genomics and transcriptomics. *FEBS Lett* **581**: 2829-2838.
- Kagan, J. C. & C. R. Roy. (2002) *Legionella* phagosomes intercept vesicular traffic from endoplasmic reticulum exit sites. *Nat Cell Biol* **4**: 945-954.
- Kagan, J. C., M. P. Stein, M. Pypaert & C. R. Roy. (2004) *Legionella* subvert the functions of Rab1 and Sec22b to create a replicative organelle. *J Exp Med* **199**: 1201-1211.

- Kamal, N., C. Rouquette-Loughlin & W. M. Shafer. (2007) The TolC-like protein of *Neisseria meningitidis* is required for extracellular production of the repeats-in-toxin toxin FrpC but not for resistance to antimicrobials recognized by the mtr efflux pump system. *Infection and Immunity* **75**: 6008-6012.
- Kapsenberg, M. L. (2003) Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol* **3**: 984-993.
- Kerrigan, A. M. & G. D. Brown. (2009) C-type lectins and phagocytosis. *Immunobiology* **214** : 562-575.
- Kilvington, S. & J. Price. (1990) Survival of *Legionella-pneumophila* within cysts of *Acanthamoeba-polyphaga* following chlorine exposure. *Journal of Applied Bacteriology* **68**: 519-525.
- Knodler, L. A., J. Celli & B. B. Finlay. (2001) Pathogenic trickery: deception of host cell processes. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 578-588.
- Kubori, T., A. Hyakutake & H. Nagai. (2008) *Legionella* translocates an E3 ubiquitin ligase that has multiple U-boxes with distinct functions. *Mol Microbiol* **67**: 1307-1319.
- Kubori, T., A. Sukhan, S. I. Aizawa & J. E. Galan. (2000) Molecular characterization and assembly of the needle complex of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 10225-10230.
- Kubori, T., Y. Matsushima, D. Nakamura, J. Uralil, M. Lara-Tejero, A. Sukhan, J. E. Galan & S. I. Aizawa. (1998) Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science* **280**: 602-605.
- Kumar, H., T. Kawai & S. Akira. (2009) Pathogen recognition in the innate immune response. *Biochem J* **420**: 1-16.
- Kuroda, T. & T. Tsuchiya. (2009) Multidrug efflux transporters in the MATE family. *Biochim Biophys Acta* **1794**: 763-768.
- Laguna, R. K., E. A. Creasey, Z. Li, N. Valtz & R. R. Isberg. (2006) A *Legionella pneumophila*-translocated substrate that is required for growth within macrophages and protection from host cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 18745-18750.
- Lally, E. T., R. B. Hill, L. R. Kieba & J. Korostoff. (1999) The interaction between RTX toxins and target cells. *Trends in Microbiology* **7**: 356-361.
- Langton, K. P., P. J. Henderson & R. B. Herbert. (2005) Antibiotic resistance: multidrug efflux proteins, a common transport mechanism? *Nat Prod Rep* **22**: 439-451.
- Lau, S. Y. & H. I. Zgurskaya. (2005) Cell division defects in *Escherichia coli* deficient in the multidrug efflux transporter AcrEF-TolC. *Journal of Bacteriology* **187**: 7815-7825.
- Lavigne, J. P., E. Botella & D. O'Callaghan. (2006) [Type IV secretion system and their effectors: an update]. *Pathol Biol* **54**: 296-303.
- Law, C. J., P. C. Maloney & D. N. Wang. (2008) Ins and outs of major facilitator superfamily antiporters. *Annu Rev Microbiol* **62**: 289-305.
- Leiman, P. G., M. Basler, U. A. Ramagopal, J. B. Bonanno, J. M. Sauder, S. Pukatzki, S. K. Burley, S. C. Almo & J. J. Mekalanos. (2009) Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein complexes share a common evolutionary origin. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 4154-4159.
- Lilic, M. & C. E. Stebbins. (2004) Re-structuring the host cell: up close with *Salmonella's* molecular machinery. *Microbes Infect* **6**: 1205-1211.
- Linehan, S. A. & D. W. Holden. (2003) The interplay between *Salmonella typhimurium* and its macrophage host--what can it teach us about innate immunity? *Immunol Lett* **85**: 183-192.
- Liu, Y. & Z. Q. Luo. (2007) The *Legionella pneumophila* effector SidJ is required for efficient recruitment of endoplasmic reticulum proteins to the bacterial phagosome. *Infect Immun* **75**: 592-603.
- Llosa, M., C. Roy & C. Dehio. (2009) Bacterial type IV secretion systems in human disease. *Mol Microbiol* **73** : 141-151.
- Lomovskaya, O., H. I. Zgurskaya, M. Totrov & W. J. Watkins. (2007) Waltzing transporters and 'the dance macabre' between humans and bacteria. *Nat Rev Drug Discov* **6**: 56-65.
- Losick, V. P. & R. R. Isberg. (2006) NF-kappaB translocation prevents host cell death after low-dose challenge by *Legionella pneumophila*. *J Exp Med* **203**: 2177-2189.
- Lostroh, C. P. & C. A. Lee. (2001) The *Salmonella* pathogenicity island-1 type III secretion system. *Microbes Infect* **3**: 1281-1291.

- Luo, Z. Q. & R. R. Isberg. (2004) Multiple substrates of the *Legionella pneumophila* Dot/Icm system identified by interbacterial protein transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 841-846.
- Ma, A. T., S. McAuley, S. Pukatzki & J. J. Mekalanos. (2009) Translocation of a *Vibrio cholerae* Type VI Secretion Effector Requires Bacterial Endocytosis by Host Cells. *Cell Host & Microbe* **5**: 234-243.
- Machner, M. P. & R. R. Isberg. (2006) Targeting of host Rab GTPase function by the intravacuolar pathogen *Legionella pneumophila*. *Dev Cell* **11**: 47-56.
- Machner, M. P. & R. R. Isberg. (2007) A bifunctional bacterial protein links GDI displacement to Rab1 activation. *Science* **318**: 974-977.
- Macnab, R. M. (2004) Type III flagellar protein export and flagellar assembly. *Biochim Biophys Acta* **1694**: 207-217.
- Marches, O., V. Covarelli, S. Dahan, C. Cougoule, P. Bhatta, G. Frankel & E. Caron. (2008) EspJ of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* inhibits opsono-phagocytosis. *Cell Microbiol* **10**: 1104-1115.
- Marchler-Bauer, A., J. B. Anderson, M. K. Derbyshire, C. DeWeese-Scott, N. R. Gonzales, M. Gwadz, L. N. Hao, S. Q. He, D. I. Hurwitz, J. D. Jackson, Z. X. Ke, D. Krylov, C. J. Lanczycki, C. A. Liebert, C. L. Liu, F. Lu, S. N. Lu, G. H. Marchler, M. Mullokandov, J. S. Song, N. Thanki, R. A. Yamashita, J. J. Yin, D. C. Zhang & S. H. Bryant. (2007) CDD: a conserved domain database for interactive domain family analysis. *Nucleic Acids Research* **35**: D237-D240.
- Markiewski, M. M. & J. D. Lambris. (2007) The role of complement in inflammatory diseases from behind the scenes into the spotlight. *American Journal of Pathology* **171**: 715-727.
- Marlovits, T. C., T. Kubori, A. Sukhan, D. R. Thomas, J. E. Galan & V. M. Unger. (2004) Structural insights into the assembly of the type III secretion needle complex. *Science* **306**: 1040-1042.
- Marshall, A. J., R. J. Miles & L. Richards. (1995) The phagocytosis of Mycoplasmas. *Journal of Medical Microbiology* **43**: 239-250.
- Maruyama, F., K. Tani, T. Kenzaka, N. Yamaguchi & M. Nasu. (2006) Quantitative determination of free-DNA uptake in river bacteria at the single-cell level by in situ rolling-circle amplification. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 6248-6256.
- Matsumoto, H. & G. M. Young. (2009) Translocated effectors of *Yersinia*. *Curr Opin Microbiol* **12**: 94-100.
- McDade, J. E., C. C. Shepard, D. W. Fraser, T. R. Tsai, M. A. Redus & W. R. Dowdle. (1977) Legionnaires disease - isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory-disease. *New England Journal of Medicine* **297**: 1197-1203.
- McDonnell, G. & A. D. Russell. (1999) Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev* **12**: 147-179.
- Meresse, S., O. Steele-Mortimer, E. Moreno, M. Desjardins, B. Finlay & J. P. Gorvel. (1999) Controlling the maturation of pathogen-containing vacuoles: a matter of life and death. *Nat Cell Biol* **1**: E183-188.
- Miller, S. I., R. K. Ernst & M. W. Bader. (2005) LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nature Reviews Microbiology* **3**: 36-46.
- Milton, D. L. (2006) Quorum sensing in vibrios: Complexity for diversification. *International Journal of Medical Microbiology* **296**: 61-71.
- Mistry, D. & R. A. Stockley. (2006) IgA1 protease. *Int J Biochem Cell Biol* **38**: 1244-1248.
- Molmeret, M., M. Horn, M. Wagner, M. Santic & Y. Abu Kwaik. (2005) Amoebae as training grounds for intracellular bacterial pathogens. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 20-28.
- Molofsky, A. B. & M. S. Swanson. (2003) *Legionella pneumophila* CsrA is a pivotal repressor of transmission traits and activator of replication. *Molecular Microbiology* **50**: 445-461.
- Molofsky, A. B. & M. S. Swanson. (2004) Differentiate to thrive: lessons from the *Legionella pneumophila* life cycle. *Mol Microbiol* **53**: 29-40.
- Mota, L. J., I. Sorg & G. R. Cornelis. (2005) Type III secretion: the bacteria-eukaryotic cell express. *FEMS Microbiol Lett* **252**: 1-10.
- Moussatova, A., C. Kandt, M. L. O'Mara & D. P. Tieleman. (2008) ATP-binding cassette transporters in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **1778**: 1757-1771.
- Muller, M. & R. B. Klossgen. (2005) The Tat pathway in bacteria and chloroplasts (review). *Mol Membr Biol* **22**: 113-121.

- Murakami, S. & A. Yamaguchi. (2003) Multidrug-exporting secondary transporters. *Curr Opin Struct Biol* **13**: 443-452.
- Murakami, S., R. Nakashima, E. Yamashita, T. Matsumoto & A. Yamaguchi. (2006) Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism. *Nature* **443**: 173-179.
- Murata, K. & W. M. Baldwin, 3rd. (2009) Mechanisms of complement activation, C4d deposition, and their contribution to the pathogenesis of antibody-mediated rejection. *Transplant Rev* **23**: 139-150.
- Murata, T., A. Delprato, A. Ingmundson, D. K. Toomre, D. G. Lambright & C. R. Roy. (2006) The *Legionella pneumophila* effector protein DrrA is a Rab1 guanine nucleotide-exchange factor. *Nat Cell Biol* **8**: 971-977.
- Muth, T. R. & S. Schuldiner. (2000) A membrane-embedded glutamate is required for ligand binding to the multidrug transporter EmrE. *Embo Journal* **19**: 234-240.
- Nagai, H., E. D. Cambronne, J. C. Kagan, J. C. Amor, R. A. Kahn & C. R. Roy. (2005) A C-terminal translocation signal required for Dot/Icm-dependent delivery of the *Legionella* RalF protein to host cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 826-831.
- Nagai, H., J. C. Kagan, X. Zhu, R. A. Kahn & C. R. Roy. (2002) A bacterial guanine nucleotide exchange factor activates ARF on *Legionella* phagosomes. *Science* **295**: 679-682.
- Natale, P., T. Bruser & A. J. Driessen. (2008) Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane--distinct translocases and mechanisms. *Biochim Biophys Acta* **1778**: 1735-1756.
- Nguyen, L. & J. Pieters. (2005) The Trojan horse: survival tactics of pathogenic mycobacteria in macrophages. *Trends Cell Biol* **15**: 269-276.
- Nhieu, G. T., J. Enninga, P. Sansonetti & G. Grompone. (2005) Tyrosine kinase signaling and type III effectors orchestrating *Shigella* invasion. *Curr Opin Microbiol* **8**: 16-20.
- Nikaido, H. (2009) Multidrug resistance in bacteria. *Annu Rev Biochem* **78**: 119-146.
- Ninio, S. & C. R. Roy. (2007) Effector proteins translocated by *Legionella pneumophila*: strength in numbers. *Trends Microbiol* **15**: 372-380.
- Nishino, K. & A. Yamaguchi. (2001) Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183**: 5803-5812.
- Nishino, K., T. Latifi & E. A. Groisman. (2006) Virulence and drug resistance roles of multidrug efflux systems of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* **59**: 126-141.
- Omote, H., M. Hiasa, T. Matsumoto, M. Otsuka & Y. Moriyama. (2006) The MATE proteins as fundamental transporters of metabolic and xenobiotic organic cations. *Trends in Pharmacological Sciences* **27**: 587-593.
- Pagnier, I., M. Merchat & B. La Scola. (2009) Potentially pathogenic amoeba-associated microorganisms in cooling towers and their control. *Future Microbiology* **4**: 615-629.
- Pan, X., A. Luhrmann, A. Satoh, M. A. Laskowski-Arce & C. R. Roy. (2008) Ankyrin repeat proteins comprise a diverse family of bacterial type IV effectors. *Science* **320**: 1651-1654.
- Papanikou, E., S. Karamanou & A. Economou. (2007) Bacterial protein secretion through the translocase nanomachine. *Nat Rev Microbiol* **5**: 839-851.
- Patel, J. C., O. W. Rossanese & J. E. Galan. (2005) The functional interface between *Salmonella* and its host cell: opportunities for therapeutic intervention. *Trends Pharmacol Sci* **26**: 564-570.
- Paulsen, I. T., M. H. Brown, T. G. Littlejohn, B. A. Mitchell & R. A. Skurray. (1996) Multidrug resistance proteins QacA and QacB from *Staphylococcus aureus*: membrane topology and identification of residues involved in substrate specificity. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 3630-3635.
- Payne, N. R. & M. A. Horwitz. (1987) Phagocytosis of *Legionella-pneumophila* is mediated by human monocyte complement receptors. *Journal of Experimental Medicine* **166**: 1377-1389.
- Petri, B. & M. G. Bixel. (2006) Molecular events during leukocyte diapedesis. *Febs J* **273**: 4399-4407.
- Pfaffl, M. W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* **29** : e45.
- Pfaffl, M. W., G. W. Horgan & L. Dempfle. (2002) Relative expression software tool (REST (c)) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research* **30** : 1-10.
- Piddock, L. J. (2006) Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. *Nat Rev Microbiol* **4**: 629-636.

- Pieters, J. (2001) Evasion of host cell defense mechanisms by pathogenic bacteria. *Curr Opin Immunol* **13**: 37-44.
- Piper, R. C. & J. P. Luzio. (2007) Ubiquitin-dependent sorting of integral membrane proteins for degradation in lysosomes. *Curr Opin Cell Biol* **19**: 459-465.
- Poole, K. (2002) Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. *Symp Ser Soc Appl Microbiol*: 55S-64S.
- Poole, K. (2004) Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect* **10**: 12-26.
- Poole, K. (2005) Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother* **56**: 20-51.
- Poole, K., K. Tetro, Q. X. Zhao, S. Neshat, D. E. Heinrichs & N. Bianco. (1996) Expression of the multidrug resistance operon mexA-mexB-oprM in *Pseudomonas aeruginosa*: mexR encodes a regulator of operon expression. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **40**: 2021-2028.
- Pope, C. D., L. Dhand & N. P. Cianciotto. (1994) Random mutagenesis of *Legionella-pneumophila* with mini-tn10. *Fems Microbiology Letters* **124**: 107-111.
- Pos, K. M. (2009) Drug transport mechanism of the AcrB efflux pump. *Biochim Biophys Acta* **1794**: 782-793.
- Posadas, D. M., F. A. Martin, J. Garcia, J. M. Spera, M. V. Delpino, P. Baldi, E. Campos, S. L. Cravero & A. Zorreguieta. (2007) The TolC homologue of *Brucella suis* is involved in resistance to antimicrobial compounds and virulence. *Infection and Immunity* **75**: 379-389.
- Prevotat, A., M. Bure, C. Bergoin, J. Y. Tavernier, N. Van Grunderbeeck, Y. Yazdanpanah & C. Lamblin. (2008) Factors predicting mortality during an outbreak of legionnaire's disease in the North of France. *Revue Des Maladies Respiratoires* **25**: 285-294.
- Pukatzki, S., S. B. McAuley & S. T. Miyata. (2009) The type VI secretion system: translocation of effectors and effector-domains. *Current Opinion in Microbiology* **12**: 11-17.
- Putman, M., H. W. van Veen & W. N. Konings. (2000) Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**: 672-693.
- Ragaz, C., H. Pietsch, S. Urwyler, A. Tieden, S. S. Weber & H. Hilbi. (2008) The *Legionella pneumophila* phosphatidylinositol-4 phosphate-binding type IV substrate SidC recruits endoplasmic reticulum vesicles to a replication-permissive vacuole. *Cellular Microbiology* **10**: 2416-2433.
- Rambukkana, A. (2001) Molecular basis for the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. *Curr Opin Microbiol* **4**: 21-27.
- Randall, L. P. & M. J. Woodward. (2002) The multiple antibiotic resistance (mar) locus and its significance. *Res Vet Sci* **72**: 87-93.
- Recorbet, G., C. Robert, A. Givaudan, B. Kudla, P. Normand & G. Faurie. (1993) Conditional suicide system of *Escherichia-coli* released into soil that uses the *Bacillus subtilis sacB* gene. *Applied and Environmental Microbiology* **59**: 1361-1366.
- Remaut, H. & G. Waksman. (2004) Structural biology of bacterial pathogenesis. *Curr Opin Struct Biol* **14**: 161-170.
- Revankar, S. G., J. E. Patterson, D. A. Sutton, R. Pullen & M. G. Rinaldi. (2002) Disseminated phaeohyphomycosis: Review of an emerging mycosis. *Clinical Infectious Diseases* **34**: 467-476.
- Reyrat, J. M., V. Pelicic, B. Gicquel & R. Rappuoli. (1998) Countersselectable markers: Untapped tools for bacterial genetics and pathogenesis. *Infection and Immunity* **66**: 4011-4017.
- Roch, N. & M. Maurin. (2005) Antibiotic susceptibilities of *Legionella pneumophila* strain Paris in THP-1 cells as determined by real-time PCR assay. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **55**: 866-871.
- Rossier O., Ciancotto N. P. (2001) *Legionella pneumophila* type II protein secretion promotes virulence in the A/J mouse model of Legionnaires' disease pneumonia. *Infect Immun.* **72** : 310-321.
- Rossier O., Dao J., Ciancotto N. P. (2009) A type II secreted ribonuclease of *Legionella pneumophila* facilitates optimal intracellular infection of *Hartmanella vermiformis*. *Microbiology.* **155** : 882-890.
- Rossier O., Dao J., Ciancotto N. P. (2008). The type II secretion system of *Legionella pneumophila* elaborates two aminopeptidases as well as a metalloprotease that contributes to differential infection among protozoan hosts. *Appl. Environ. Microbiol.* **74** : 753-761.
- Rottner, K., S. Lommel, J. Wehland & T. E. Stradal. (2004) Pathogen-induced actin filament rearrangement in infectious diseases. *J Pathol* **204**: 396-406.

- Roy, C. R. & E. S. Mocarski. (2007) Pathogen subversion of cell-intrinsic innate immunity. *Nat Immunol* **8**: 1179-1187.
- Roy, C. R. & L. G. Tilney. (2002) The road less traveled: transport of *Legionella* to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **158**: 415-419.
- Russell, D. G. (1998) What does 'inhibition of phagosome-lysosome fusion' really mean? *Trends Microbiol* **6**: 212-214.
- Saier, M. H., C. H. Ma, L. Rodgers, D. G. Tamang & M. R. Yen. (2008) Protein secretion and membrane insertion systems in bacteria and eukaryotic organelles. *Adv Appl Microbiol* **65**: 141-197.
- Salcedo, S. P. & D. W. Holden. (2005) Bacterial interactions with the eukaryotic secretory pathway. *Curr Opin Microbiol* **8**: 92-98.
- Sandkvist, M. (2001) Biology of type II secretion. *Mol Microbiol* **40**: 271-283.
- Schmidt, H. & M. Hensel. (2004) Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* **17**: 14-56.
- Scott, C. C., R. J. Botelho & S. Grinstein. (2003) Phagosome maturation: a few bugs in the system. *J Membr Biol* **193**: 137-152.
- Seeger, M. A., A. Schiefner, T. Eicher, F. Verrey, K. Diederichs & K. M. Pos. (2006) Structural asymmetry of AcrB trimer suggests a peristaltic pump mechanism. *Science* **313**: 1295-1298.
- Segal, G., J. J. Russo & H. A. Shuman. (1999) Relationships between a new type IV secretion system and the icm/dot virulence system of *Legionella pneumophila*. *Molecular Microbiology* **34**: 799-809.
- Segal, G., M. Feldman & T. Zusman. (2005) The Icm/Dot type-IV secretion systems of *Legionella pneumophila* and *Coxiella burnetii*. *FEMS Microbiol Rev* **29**: 65-81.
- Serhan, C. N., N. Chiang & T. E. Van Dyke. (2008) Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nature Reviews Immunology* **8**: 349-361.
- Sexton, J. A. & J. P. Vogel. (2002) Type IVB secretion by intracellular pathogens. *Traffic* **3**: 178-185.
- Shafer, W. M., X. D. Qu, A. J. Waring & R. I. Lehrer. (1998) Modulation of *Neisseria gonorrhoeae* susceptibility to vertebrate antibacterial peptides due to a member of the resistance/nodulation/division efflux pump family. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 1829-1833.
- Shao, F. (2008) Biochemical functions of Yersinia type III effectors. *Curr Opin Microbiol* **11**: 21-29.
- Shin, S. & C. R. Roy. (2008) Host cell processes that influence the intracellular survival of *Legionella pneumophila*. *Cell Microbiol* **10**: 1209-1220.
- Shohdy, N., J. A. Efe, S. D. Emr & H. A. Shuman. (2005) Pathogen effector protein screening in yeast identifies *Legionella* factors that interfere with membrane trafficking. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 4866-4871.
- Shrivastava, S. & S. S. Mande. (2008) Identification and functional characterization of gene components of Type VI Secretion system in bacterial genomes. *PLoS One* **3**: e2955.
- Simeone, R., D. Bottai & R. Brosch. (2009) ESX/type VII secretion systems and their role in host-pathogen interaction. *Curr Opin Microbiol* **12**: 4-10.
- Sousa, S., M. Lecuit & P. Cossart. (2005) Microbial strategies to target, cross or disrupt epithelia. *Curr Opin Cell Biol* **17**: 489-498.
- Srikanth, S. & S. G. Berk. (1993) Stimulatory effect of cooling-tower biocides on amoebas. *Applied and Environmental Microbiology* **59**: 3245-3249.
- Stebbins, C. E. & J. E. Galan. (2001) Structural mimicry in bacterial virulence. *Nature* **412**: 701-705.
- Stebbins, C. E. (2004) Structural insights into bacterial modulation of the host cytoskeleton. *Curr Opin Struct Biol* **14**: 731-740.
- Steinert, M., M. Flugel, M. Schuppler, J. H. Helbig, A. Supriyono, P. Proksch & P. C. Luck. (2001) The Lly protein is essential for p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase activity in *Legionella pneumophila*. *Fems Microbiology Letters* **203**: 41-47.
- Stephenson, K. (2005) Sec-dependent protein translocation across biological membranes: evolutionary conservation of an essential protein transport pathway (review). *Mol Membr Biol* **22**: 17-28.
- Sulavik, M. C., C. Houseweart, C. Cramer, N. Jiwani, N. Murgolo, J. Greene, B. DiDomenico, K. J. Shaw, G. H. Miller, R. Hare & G. Shimer. (2001) Antibiotic susceptibility profiles of *Escherichia coli* strains lacking multidrug efflux pump genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**: 1126-1136.
- Stewart C. R., Rossier O., Ciancotto N. P. (2009) Surface translocation by *Legionella pneumophila* : a form of sliding motility that is dependent upon type II protein secretion. *J. Bacteriol.* **191** : 1537-1546.

- Swanson, M. S. & B. K. Hammer. (2000) *Legionella pneumophila* pathogenesis: a fateful journey from amoebae to macrophages. *Annu Rev Microbiol* **54**: 567-613.
- Swanson, M. S. & E. Fernandez-Moreira. (2002) A microbial strategy to multiply in macrophages: the pregnant pause. *Traffic* **3**: 170-177.
- Swanson, M. S. & R. R. Isberg. (1995) Association of *Legionella pneumophila* with the macrophage endoplasmic reticulum. *Infect Immun* **63**: 3609-3620.
- Symmons, M. F., E. Bokma, E. Koronakis, C. Hughes & V. Koronakis. (2009) The assembled structure of a complete tripartite bacterial multidrug efflux pump. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 7173-7178.
- Tal, N. & S. Schuldiner. (2009) A coordinated network of transporters with overlapping specificities provides a robust survival strategy. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 9051-9056.
- Tampakaki, A. P., V. E. Fadouloglou, A. D. Gazi, N. J. Panopoulos & M. Kokkinidis. (2004) Conserved features of type III secretion. *Cell Microbiol* **6**: 805-816.
- Taylor L.H., Latham S.M., Woolhouse M.E.J. (2001). Risks factors for human disease emergence. *Philosophical Transactions of the Royal Society London*. **356** : 983-989.
- Taylor, M., K. Ross & R. Bentham. (2009) *Legionella*, Protozoa, and Biofilms: Interactions Within Complex Microbial Systems. *Microb Ecol* **58** : 538-547.
- Taylor, P. R., L. Martinez-Pomares, M. Stacey, H. H. Lin, G. D. Brown & S. Gordon. (2005) Macrophage receptors and immune recognition. *Annu Rev Immunol* **23**: 901-944.
- Thanassi, D. G., C. Stathopoulos, A. Karkal & H. Li. (2005) Protein secretion in the absence of ATP: the autotransporter, two-partner secretion and chaperone/usher pathways of gram-negative bacteria (review). *Mol Membr Biol* **22**: 63-72.
- Thomas, V., T. Bouchez, V. Nicolas, S. Robert, J. F. Loret & Y. Levi. (2004) Amoebae in domestic water systems: resistance to disinfection treatments and implication in *Legionella* persistence. *Journal of Applied Microbiology* **97**: 950-963.
- Tilney, L. G., O. S. Harb, P. S. Connelly, C. G. Robinson & C. R. Roy. (2001) How the parasitic bacterium *Legionella pneumophila* modifies its phagosome and transforms it into rough ER: implications for conversion of plasma membrane to the ER membrane. *J Cell Sci* **114**: 4637-4650.
- Trosky, J. E., A. D. Liverman & K. Orth. (2008) *Yersinia* outer proteins: Yops. *Cell Microbiol* **10**: 557-565.
- Tseng, T. T., B. M. Tyler & J. C. Setubal. (2009) Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. *BMC Microbiol* **9** Suppl 1: S2.
- Urwyler, S., E. Brombacher & H. Hilbi. (2009) Endosomal and secretory markers of the *Legionella*-containing vacuole. *Commun Integr Biol* **2**: 107-109.
- Van Bambeke, F., E. Balzi & P. M. Tulkens. (2000) Antibiotic efflux pumps. *Biochem Pharmacol* **60**: 457-470.
- Van Bambeke, F., Y. Glupczynski, P. Plesiat, J. C. Pechere & P. M. Tulkens. (2003) Antibiotic efflux pumps in prokaryotic cells: occurrence, impact on resistance and strategies for the future of antimicrobial therapy. *J Antimicrob Chemother* **51**: 1055-1065.
- Vestweber, D. (2007) Adhesion and signaling molecules controlling the transmigration of leukocytes through endothelium. *Immunol Rev* **218**: 178-196.
- Vignali, D. A. A., L. W. Collison & C. J. Workman. (2008) How regulatory T cells work. *Nature Reviews Immunology* **8**: 523-532.
- Vijayachari, P., A. P. Sugunan & A. N. Shriram. (2008) Leptospirosis: an emerging global public health problem. *J Biosci* **33**: 557-569.
- Virlogeux-Payant, I., S. Baucheron, J. Pelet, J. Trotureau, E. Bottreau, P. Velge & A. Cloeckart. (2008) TolC, but not AcrB, is involved in the invasiveness of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by increasing type III secretion system-1 expression. *Int J Med Microbiol* **298**: 561-569.
- Voulhoux, R., G. Ball, B. Ize, M. L. Vasil, A. Lazdunski, L. F. Wu & A. Filloux. (2001) Involvement of the twin-arginine translocation system in protein secretion via the type II pathway. *Embo J* **20**: 6735-6741.
- Watarai, M., H. L. Andrews & R. R. Isberg. (2001) Formation of a fibrous structure on the surface of *Legionella pneumophila* associated with exposure of DotH and DotO proteins after intracellular growth. *Molecular Microbiology* **39**: 313-329.

- Weber, S. S., C. Ragaz & H. Hilbi. (2009) Pathogen trafficking pathways and host phosphoinositide metabolism. *Molecular Microbiology* **71**: 1341-1352.
- Wiener, M. C. (2000) Bacterial export takes its Tol. *Structure* **8**: R171-175.
- Wintermeyer, E., M. Flugel, M. Ott, M. Steinert, U. Rdest, K. H. Mann & J. Hacker. (1994) Sequence determination and mutational analysis of the lly locus of *Legionella-pneumophila*. *Infection and Immunity* **62**: 1109-1117.
- Wright, S. D. & S. C. Silverstein. (1983) Receptors for C3b and C3bi promote phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes. *Journal of Experimental Medicine* **158**: 2016-2023.
- Wu, J. & J. P. Xie. (2009) Magic Spot: (p) ppGpp. *Journal of Cellular Physiology* **220**: 297-302.
- Yamanaka, H., T. Nomura, N. Morisada, S. Shinoda & K. Okamoto. (2002) Site-directed mutagenesis studies of the amino acid residue at position 412 of *Escherichia coli* TolC which is required for the activity. *Microbial Pathogenesis* **33**: 81-89.
- Yang, S., C. R. Lopez & E. L. Zechiedrich. (2006) Quorum sensing and multidrug transporters in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 2386-2391.
- Yeo, H. J. & G. Waksman. (2004) Unveiling molecular scaffolds of the type IV secretion system. *J Bacteriol* **186**: 1919-1926.
- Yin, Y., X. He, P. Szewczyk, T. Nguyen & G. Chang. (2006) Structure of the multidrug transporter EmrD from *Escherichia coli*. *Science* **312**: 741-744.
- Yokoyama, W. M. (2005) Natural killer cell immune responses. *Immunol Res* **32**: 317-325.
- Young, G. M., D. H. Schmiel & V. L. Miller. (1999) A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: The flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 6456-6461.
- Yu, E. W., J. R. Aires, G. McDermott & H. Nikaido. (2005) A periplasmic drug-binding site of the AcrB multidrug efflux pump: a crystallographic and site-directed mutagenesis study. *J Bacteriol* **187**: 6804-6815.
- Yu, V. L., J. F. Plouffe, M. C. Pastoris, J. E. Stout, M. Schousboe, A. Widmer, J. Summersgill, T. File, C. M. Heath, D. L. Paterson & A. Cheresky. (2002) Distribution of *Legionella* species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: An international collaborative survey. *Journal of Infectious Diseases* **186**: 127-128.
- Zhang, J.-M. & J. An. (2007) Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin* **45**: 27-37.
- Zipfel, P. F., R. Wurzner & C. Skerka. (2007) Complement evasion of pathogens: common strategies are shared by diverse organisms. *Mol Immunol* **44**: 3850-3857.
- Zusman, T., G. Aloni, E. Halperin, H. Kotzer, E. Degtyar, M. Feldman & G. Segal. (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.

PUBLICATION

The TolC Protein of *Legionella pneumophila* Plays a Major Role in Multi-Drug Resistance and the Early Steps of Host Invasion

Mourad Ferhat^{1,2,3,4,5}, Danièle Atlan^{1,2,3,4,5}, Anne Vianney^{1,2,3,4,5}, Jean-Claude Lazzaroni^{1,2,3,4,5}, Patricia Doublet^{1,2,3,4,5}, Christophe Gilbert^{1,2,3,4,5*}

1 Université de Lyon, Lyon, France, **2** Université Lyon 1, Lyon, France, **3** INSA de Lyon, Villeurbanne, France, **4** Bayer CropScience, Lyon, France, **5** CNRS, UMR5240, Unité Microbiologie, Adaptation et Pathogénie, Villeurbanne, France

Abstract

Pneumonia associated with legionnaires's disease is initiated in humans after inhalation of contaminated aerosols. In the environment, *Legionella pneumophila* is thought to survive and multiply as an intracellular parasite within free-living amoeba. In the genome of *L. pneumophila* Lens, we identified a unique gene, *tolC*, encoding a protein that is highly homologous to the outer membrane protein TolC of *Escherichia coli*. Deletion of *tolC* by allelic exchange in *L. pneumophila* caused increased sensitivity to various drugs. The complementation of the *tolC* mutation in trans restored drug resistance, indicating that TolC is involved in multi-drug efflux machinery. In addition, deletion of *tolC* caused a significant attenuation of virulence towards both amoebae and macrophages. Thus, the TolC protein appears to play a crucial role in virulence which could be mediated by its involvement in efflux pump mechanisms. These findings will be helpful in unraveling the pathogenic mechanisms of *L. pneumophila* as well as in developing new therapeutic agents affecting the efflux of toxic compounds.

Citation: Ferhat M, Atlan D, Vianney A, Lazzaroni J-C, Doublet P, et al. (2009) The TolC Protein of *Legionella pneumophila* Plays a Major Role in Multi-Drug Resistance and the Early Steps of Host Invasion. PLoS ONE 4(11): e7732. doi:10.1371/journal.pone.0007732

Editor: Stefan Bereswill, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Germany

Received: July 20, 2009; **Accepted:** September 29, 2009; **Published:** November 4, 2009

Copyright: © 2009 Ferhat et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Université Lyon 1, Lyon, F-69003, France, <http://www.univ-lyon1.fr/> Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), France, <http://www.cnrs.fr/> Cluster Infectiologie region Rhone-Alpes 2007, France, <http://www.cluster-infectiologie.fr/> The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: One team in the authors' Laboratory is working in association with a research team belonging to Bayer CropScience. However, the team does not have any research program in association with Bayer CropScience. Dr. Gilbert confirms that it does not alter his adherence to all the PLoS ONE policies on sharing data and materials, as detailed online in the guide for authors.

* E-mail: gilbert@biomserv.univ-lyon1.fr

Introduction

Legionella pneumophila (*L. pneumophila*), the main causative agent of the Legionnaire's disease in humans is commonly found in freshwater environments where it can replicate within protozoa [1]. Development of air-conditioning systems, cooling towers and other water aerosols has created conditions for the direct access of this opportunistic bacterium to human lungs, where it can multiply within alveolar macrophages [2]. During the intracellular infectious cycle in amoeba and macrophages, *L. pneumophila* evades the phagolysosome fusion and establishes a replicative vacuole studded with ribosomes [1,3,4]. The subsequent modified vacuole offers a nutrient rich environment, which allows the bacteria to replicate. When nutrients become scarce, the bacteria undergo a phenotypic switch leading to the expression of virulent traits including flagella expression and an increased resistance to antibiotics and stress. Finally, *Legionellae* lyse the vacuole and the membrane host, probably by secreting pore-forming toxins [5].

Up to date, prevention of legionellosis outbreaks has been based on the control of the legionellae population in cooling towers by using chemical treatments. Little is known about the resistance of *L. pneumophila* to these biocides. One universal mechanism underlying drug resistance to various toxic compounds, namely multi-drug resistance (MDR; [6]), is the expression of efflux pumps

that drive drugs outside the target cell. Five families of efflux pumps have been described on the basis of the inner membrane protein structure: the major facilitator (MF) superfamily, the ATP-binding cassette (ABC) family, the resistance-nodulation-division (RND) family, the small multi-drug resistance (SMR) family and the multi-drug and toxic compound extrusion (MATE) family [7,8]. The ABC-efflux pump system is ATP-dependent whereas MF, RND and SMR systems use the proton motive force. MATE-family transporters are mainly Na⁺/substrate antiporters, but few members have been described as H⁺/drug antiporters.

SMR and MATE systems have been described to transport drugs from the cytoplasm to the periplasm, then releasing them to the extracellular medium via porins of the outer membrane. Tripartite systems (MFS, ABC and RND) have also been described, such as the AcrA-like/AcrB-like/TolC efflux pump belonging to the RND family [9,10]. TolC is a protein found in all Gram-negative bacteria, forming a channel through the outer membrane and interacting with the AcrA periplasmic protein. This AcrA lipoprotein anchored to the inner membrane via a lipid motif also interacts with AcrB, an integral inner membrane translocase acting as a proton/drug antiporter [11].

Besides its role in the efflux of various molecules, TolC has been recently reported to play a key role in bacterial virulence in the Gram negative bacteria such as *Francisella tularensis* [12], *Brucella*

suis [13], *Salmonella enterica* serovar Typhimurium [14] and *Salmonella enteritidis* [15]. Here we report that *L. pneumophila* Lens encodes a protein homologous to *Escherichia coli* TolC. We demonstrate that the TolC protein is involved in multidrug-resistance of *L. pneumophila* and that it plays an essential role in virulence.

Results

L. pneumophila Encodes a TolC Ortholog

Using BLAST and PSI-BLAST analysis of the *L. pneumophila* Lens genome (<http://genolist.pasteur.fr/LegioList/>) [16], 116 ORFs were identified by significant homology with known proteins involved in efflux pump machineries of many bacteria species: 12 outer membrane factors (OMF), 16 periplasmic membrane fusion proteins (MFP) and 88 inner membrane proteins (IMP) belonging to four classes of efflux pumps (MF, ABC, RND and SMR) [8]. No member of the multi-drug and toxic compound extrusion (MATE) family was identified. Among the 12 OMF proteins identified, one shares a significant homology (36% identity and 55% similarity) with the *Escherichia coli* TolC protein and will be referred to here as *L. pneumophila* TolC.

L. pneumophila TolC contains a predicted leader sequence with the cleavage site located between residues 20 and 21 (VFA↓TD) and, as a consequence is predicted to be localized in the outer membrane. TolC contains duplicate pfam02321 domains forming trimeric channels that allow export of a variety of substrates in Gram-negative bacteria [17]. The trimeric channel is composed of a 12-stranded beta sheet barrel that spans the outer membrane, and a long helical barrel that spans the periplasm. These domains are part of the TolC family domain (COG1538; [17]).

Inactivation of the *tolC* Gene Has No Effect on Growth of *L. pneumophila* Lens

In order to identify the role of the TolC protein in *L. pneumophila*, a *tolC* mutant was constructed as described in Materials and Methods. This mutant, called MF201, is partially deleted for *tolC* by a unique insertion of a kanamycine cassette (*tolC::kan*), verified by PCR and Southern hybridization (data not shown).

A pUC18 derivative vector, namely pML005, was constructed by site-directed mutagenesis to obtain a plasmid that displays a previously described mutation which enhances its stability in *L. pneumophila* [18] and allows complementation experiments in derivative strains. A preliminary bioluminescence assay indeed

confirmed the stability of a *lux* cassette expressing pML005 during 30 generations without selection pressure (data not shown). The strain MF201 was transformed by plasmid pML005-*tolC*, which efficiently expressed the *L. pneumophila* Lens *tolC* gene, to obtain the MF213 strain.

Because the *tolC* mutation has been shown to affect bacterial cell division in *E. coli* [19], the growth kinetics of the *tolC* mutant (MF201) was compared to that of the parental (Lp01) and complemented strains (MF213). MF201, MF213 and MF214 exhibited no growth defects either in liquid media (Figure S1) or on solid media (data not shown). Thus, *L. pneumophila* behaved as *Francisella tularensis* for which the deletion of *tolC* had no effect on bacterial growth [12].

TolC Is Involved in MDR of *L. pneumophila* Lens

The sensitivity of strain MF201 compared to the wild type was tested towards 17 toxic compounds. The drugs were chosen from a wide range of toxic compounds which have been identified to be expelled by efflux [20]: detergents (SDS, CTAB), antibiotics (erythromycin, novobiocin, nalidixic acid, norfloxacin and tetracycline), dyes (methylene blue, acridine orange and rhodamine), quaternary ammonium or benzalkonium chloride, intercalating agents (ethidium bromide), bile salts (sodium deoxycholate) and heavy metals (nickel, zinc and manganese). Interestingly, strain MF201 (*tolC::kan*) showed an increased sensitivity towards 11 compounds over the 17 tested, with a reduced MIC ranging from 2 to 16-fold (erythromycin) compared to that of the wild-type strain Lp01 (Table 1). No difference in MIC was observed in the presence of cobalt, tetracycline, nalidixic acid, acridine orange, zinc and manganese (data not shown). These results ruled out the possibility of a bacterial envelope defect leading to a non-specific release of all tested drugs, but favored an alteration of the drug efflux mechanism of the *tolC* mutant. As expected, the complemented strain MF213 displayed similar drug sensitivity compared to the parental strain. Taking together, these results support that MF201 phenotype was the result of *tolC* inactivation.

It is commonly assumed that ethidium bromide is a substrate of TolC-dependent efflux pumps [13]. Therefore, the accumulation of ethidium bromide in bacteria was measured in *L. pneumophila* Lens and derivatives (Figure 1). A stable level of ethidium bromide (close to 4 units of fluorescence) was observed in *L. pneumophila* Lens over a period of 120 min. The addition of carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP; 2.5 mg/L), known to disrupt the proton motive force, resulted in a rapid increase of ethidium bromide concentration inside bacterial cells. High accumulation of

Table 1. Drugs susceptibility of *L. pneumophila* Lens grown on BCYE Agar.

Strain ^a	Genotype	MIC 100 (µg/mL) ^b										
		SDS	CTAB	ERY	BENZ	NOV	DEO	NOR	ETB	MB	R6G	Ni
Lp01	WT	0,125	50	0,5	100	6,25	100	12	100	100	50	800
MF201	<i>tolC::kan</i>	0,031	25	0,031	25	3,125	12,5	6	25	50	25	400
MF213	<i>tolC::kan/pML005-tolC</i>	0,125	50	0,5	100	6,25	100	12	100	100	50	800
MF214	<i>tolC::kan/pML005</i>	0,031	25	0,031	25	3,125	12,5	6	25	50	25	400
Lpl701	<i>dotA::kan</i>	0,125	50	0,5	100	6,25	100	12	100	100	50	800

^aStrains used are described in Materials and Methods.

^bMIC 100 were determined as the minimal inhibitory concentration leading to a complete inhibition of bacterial growth using agar dilution method (see Materials and Methods). Results were reproduced three times.

Abbreviations: SDS: Sodium dodecyl sulfate, CTAB: hexadecyltrimethylammonium bromide, ERY: Erythromycin, BENZ: Benzalkonium chloride, NOV: Novobiocin, DEO: Sodium Deoxycholate, NOR: Norfloxacin, ETB: Ethidium bromide, MB: Methylene Blue, R6G: Rhodamine 6G, Ni: nickel sulfate. WT: wild type.

doi:10.1371/journal.pone.0007732.t001

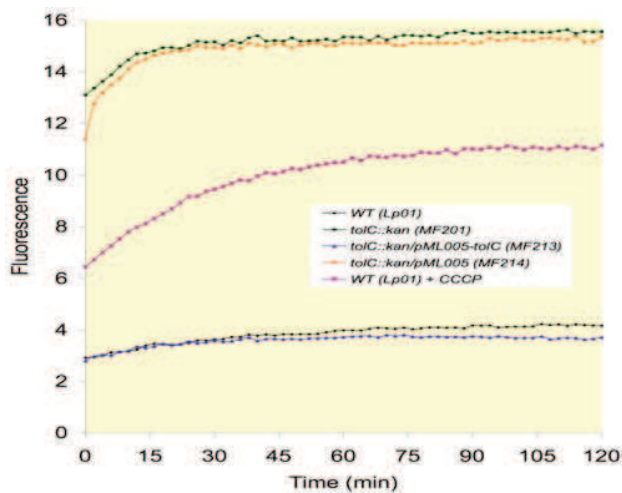


Figure 1. Ethidium bromide accumulation in *L. pneumophila* Lens derivatives. Bacteria were grown in liquid medium (BYE medium) at 30°C until stationary phase. The accumulation assay was done as described in Materials and Methods in presence of 0.5 mg/l of ethidium bromide. When indicated, carbonyl cyanide m-chlorophenyl-hydrazine (CCCP) was added (2.5 mg/l). doi:10.1371/journal.pone.0007732.g001

ethidium bromide was observed in the TolC defective mutant (MF201), which was fully reversed by the *tolC* complementation (strain MF213) (Fig. 1). This accumulation was even higher than that observed in the wild type in presence of CCCP. However, the concentration of CCCP used was low (2.5 mg) in order to limit cellular death [21] and might result in partial inhibition of efflux pump systems, which may explain the mild level of inhibition.

All these results confirm that TolC of *L. pneumophila* Lens is a component part of a functional efflux pump with wide substrate specificity and driven by the proton motive force.

TolC Contributes to Stress Resistance in *L. pneumophila* Lens

Legionellae were exposed to chemical compounds (ethidium bromide, H₂O₂, cooling tower biocides) or high temperature

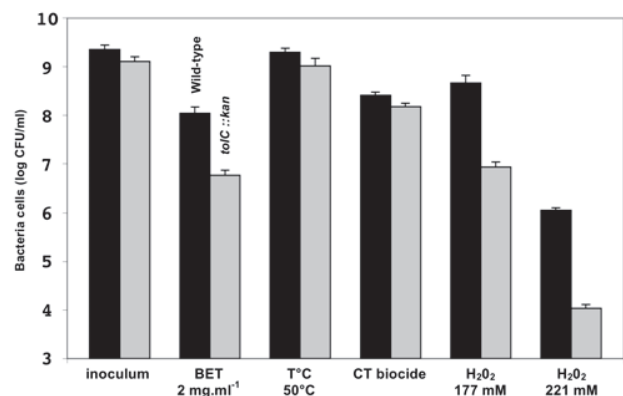


Figure 2. Cultivable surviving bacteria after exposition to different types of stress. Strains Lens (WT; back bars) and MF201 (*tolC::kan*; grey bars) were subjected to oxidative stress (H₂O₂), to thermal stress, and to the effect of a cooling tower biocide (CT) for 1 hour. Bacteria were then washed and diluted for colony enumeration on BCYE agar. doi:10.1371/journal.pone.0007732.g002

(50°C) for 1 hour in liquid medium. After ethidium bromide stress, the viability of MF201 was 18-fold lower (p -value = 0.0014) than that of the parental strain (Fig. 2). The sensitivity of MF201 increased as a function of the hydrogen peroxide concentration (53- (p -value = 0.003) and 102-fold (p -value = 9×10^{-6}) decrease with 177 and 221 mM H₂O₂, respectively). In contrast, strain MF201 displayed similar resistance as the parental strain towards thermal stress and biocides used as disinfectants in cooling towers. Therefore, TolC contributes to oxidative stress resistance. Besides, these results also confirmed that the deficiency in TolC protein is not correlated with a bacterial envelope alteration inducing a general sensitivity of bacterial cells.

The *tolC* Gene Is Essential for Virulence of *Legionella* towards Protozoa and Macrophages

The microscopic observations infections conducted in *Acanthamoeba castellanii* and *Dicystostelium discoideum* showed that strain MF201 failed to “stress” the protozoan cells, which remained adherent even after 72 hours post-infection (Fig. 3). At this time,

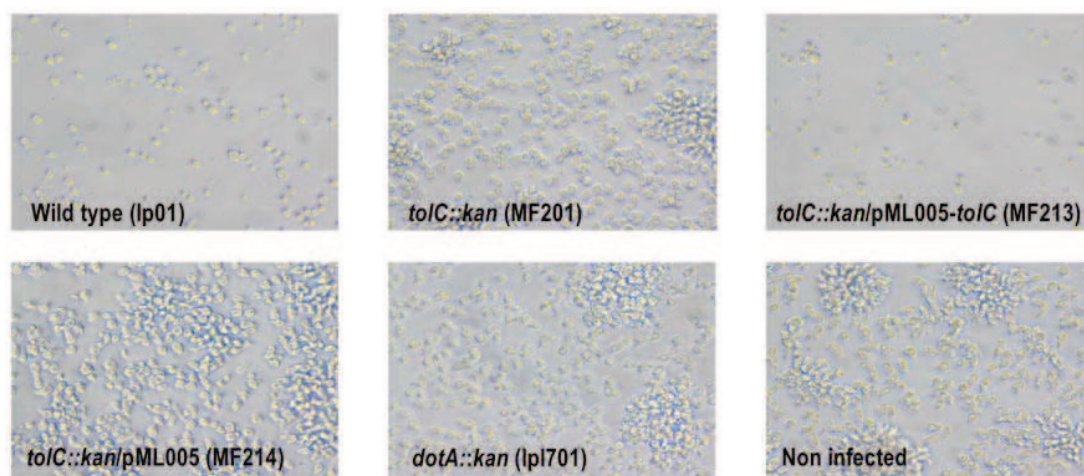


Figure 3. Infected monolayers of *D. discoideum* at 72 hours post-infection (X20). Monolayers were observed with a Nikon inverted microscope coupled with an Olympus camera (DP120). doi:10.1371/journal.pone.0007732.g003

the wild type strain was able to lyse almost all amoebae present in the monolayer (the remaining amoebae were round) and many highly motile bacteria (virulent phenotype) were present in the media. Interestingly, the defect in virulence observed with strain MF201 was similar to that observed with strain lpl701 (avirulent control strain) known to be defective for virulence secretion factors [5]. The restoration of the virulent phenotype after complementation (strain MF213) and the fact that the empty plasmid could not restore this phenotype ruled out the possibility that the defective virulence observed with strain MF201 was due to spontaneous or secondary mutations.

The amoebae *A. castellanii* and *D. discoideum* as well as U937 macrophages were infected with the parental strain Lp01, the TolC defective strain MF201, the complemented strain MF213, the corresponding plasmid-control strain MF214, or the avirulent *dotA* mutant. Extracellular *Legionellae* were counted at 24, 48 and 72 h (Fig. 4). As expected, infections of the three eukaryotic cell monolayers with the parental strain Lp01 showed an increase of extracellular *Legionellae* between 0 and 24 h post-infection (580-, 2.9- and 4-fold increase, respectively). Between 24 and 48 hours after infection, there was a significant increase of bacterial egress from the amoeba *A. castellanii* and to a lesser extent from *D. discoideum* (10 and 3 log increase, respectively). This burst in bacterial egress can be correlated with the switch to a virulent phenotype after multiplication within a eukaryotic host. It must be underlined that beyond 48 h of post-infection the level of bacterial egress from amoebae and macrophages remains stable.

Compared to the parental strain, there was a severe defect of egress of MF201 cells at 24 h (400-fold less bacteria from *A. castellanii* (p-value = 0.015) and 4-fold difference from U937 (p-value = 9×10^{-4}) and at 48 h (12 log less bacteria from *A. castellanii* (p-value = 0.015), 2 log less bacteria from *D. discoideum* (p-value = 2.8×10^{-4}) and 5.6 fold less bacteria from U937 (p-value = 3×10^{-4}). This defect of MF201 cell egress was similar to the one observed with the avirulent *dotA* strain at 72 h (p-value > 0.05) in *A. castellanii* and in U937 cells. The *tolC* complementation restored the *Legionellae* egress from the three tested eukaryotic cells (Fig. 4) and no significant difference was observed between the toxicity of parental strain (Lp01) and complemented strain MF213 (p-value > 0.05) after 72 h of *A. castellanii* or U937 infections.

In addition, Alamar blue dye was used to quantify the viability of eukaryotic cells present in the infected monolayers. The cytotoxicity of the parental strain towards *A. castellanii*, *D. discoideum* and U937 macrophages was respectively estimated at 95%, 64% and 67%, (Fig. 5). Compared to the wild type strain, the cytotoxicity of the *tolC* mutant was significantly lower: 23% (p-value = 1.2×10^{-6}), 29% (p-value = 1.2×10^{-7}) or 28% (p-value = 0.017) towards *A. castellanii*, *D. discoideum* or U937 macrophages, respectively. As expected, the cytotoxicity level was fully restored in the complemented strain MF213 (p-value > 0.05) in the three hosts.

Taken together, these results confirm a severe defect of virulence and cytotoxicity correlated with the absence of the TolC protein in *L. pneumophila*.

TolC Is Required for Multiplication of *L. pneumophila* at the Onset of Early Steps of the Intracellular Infectious Cycle

Intracellular *Legionellae* were followed during 72 h of infection to differentiate between two possible consequences of the TolC deficiency: a defect in intracellular multiplication or in the capacity to lyse eukaryotic cells. The intracellular concentration of the *L. pneumophila* Lens cells within *A. castellanii* was increased 52- and 14-fold during the first 24 h and the 24–48 h period, respectively

(Fig. 6A). In contrast, the level of MF201 cells did not significantly increase over the 72 h of post-infection within *A. castellanii* and U937 macrophages (Fig. 6). Therefore, at 72 h post-infection, the number of MF201 intracellular bacteria was 6000 fold lower (p-value = 2.5×10^{-3}) in *A. castellanii* and 6.5 fold lower (p-value = 5.2×10^{-3}) in U937 macrophages compared to the parental strain Lp01. Similar results were observed using *D. discoideum* as host (data not shown). This low level of intracellular MF201 *Legionellae* could not be explained by a defect in host adherence because no difference was observed between the numbers of non-adherent parental or mutant cells (data not shown).

Thus, our results reveal that *Legionellae* could not efficiently initiate an infectious cycle without the TolC protein. This statement was confirmed by the results obtained after a treatment of extracellular *Legionellae* with gentamicin at the onset of host infection: the intracellular level of the mutant MF201 corresponded to less than 10% of the parental strain amount within *A. castellanii* (p-value = 3.1×10^{-6}) or U937 macrophages (p-value = 0.039) (Fig. 7). This result points out the major role of TolC in the early steps of eukaryotic cell infection. However, the reference level of bacteria (Lp01) was fully recovered by the complemented strain MF213 in *A. castellanii* infection (p-value > 0.05), but only partially recovered during macrophage invasion. In that case, the number of *Legionella* MF213 cells is still significantly different from the control level (Lp01) (p-value = 0.019). This latter result might be due to the genetic system we used: *tolC* gene expression in trans was under the control of a constitutive promoter, therefore expression may have been at a lower level than the parental *tolC* gene, whose expression may be fully induced by host stress signals at some steps of the infectious cycle. As a consequence, a lower level of TolC in the complemented strain compared to the wild type during macrophage infection cannot be ruled out.

Discussion

Our analysis of the *L. pneumophila* Lens genome revealed a unique ORF sharing significant homology with the TolC protein from *Escherichia coli*, which is the prototypical outer membrane channel component involved in MDR and type I secretion [22,23,24]. The *L. pneumophila* Lens *tolC::kan* mutant was sensitive to a variety of compounds including antibiotics and detergents, which supports the involvement of the TolC protein in a functional MDR machinery with wide substrate specificity. The TolC pump activity was clearly demonstrated by the increase of ethidium bromide accumulation in the TolC deficient strain compared to the parental strain. The trans-complementation of *tolC* restored the pumping efficiency suggesting that the drug sensitivities were specifically due to the *tolC* knockout. Thus, our work confirms the role of *L. pneumophila* TolC in drug efflux mechanisms.

Moreover, the *tolC* mutant of *L. pneumophila* was clearly more sensitive to H₂O₂ than the wild type, which shows that TolC protects *L. pneumophila* against oxidative stress. This result is in agreement with the newly identified role of TolC protein in *S. meliloti* and *S. enterica* [25,26]. Actually, oxidative stress occurs when organisms encounter reactive oxygen species (ROS) such as superoxide anion, hydrogen peroxide and hydroxyl radical. ROS are known to be produced during the oxidative burst of professional phagocytes to kill intracellular bacteria during an infection [27,28]. Therefore, in phagocytic cells, bacteria have to cop with a stressful and hostile environment (ROS, antimicrobial peptides, degradative enzyme for example) in which multi-drug and stress resistance mechanisms can confer a selective advantage for intracellular survival in the host. The exact role of TolC in response to oxidative stress is still unclear, but it could participate

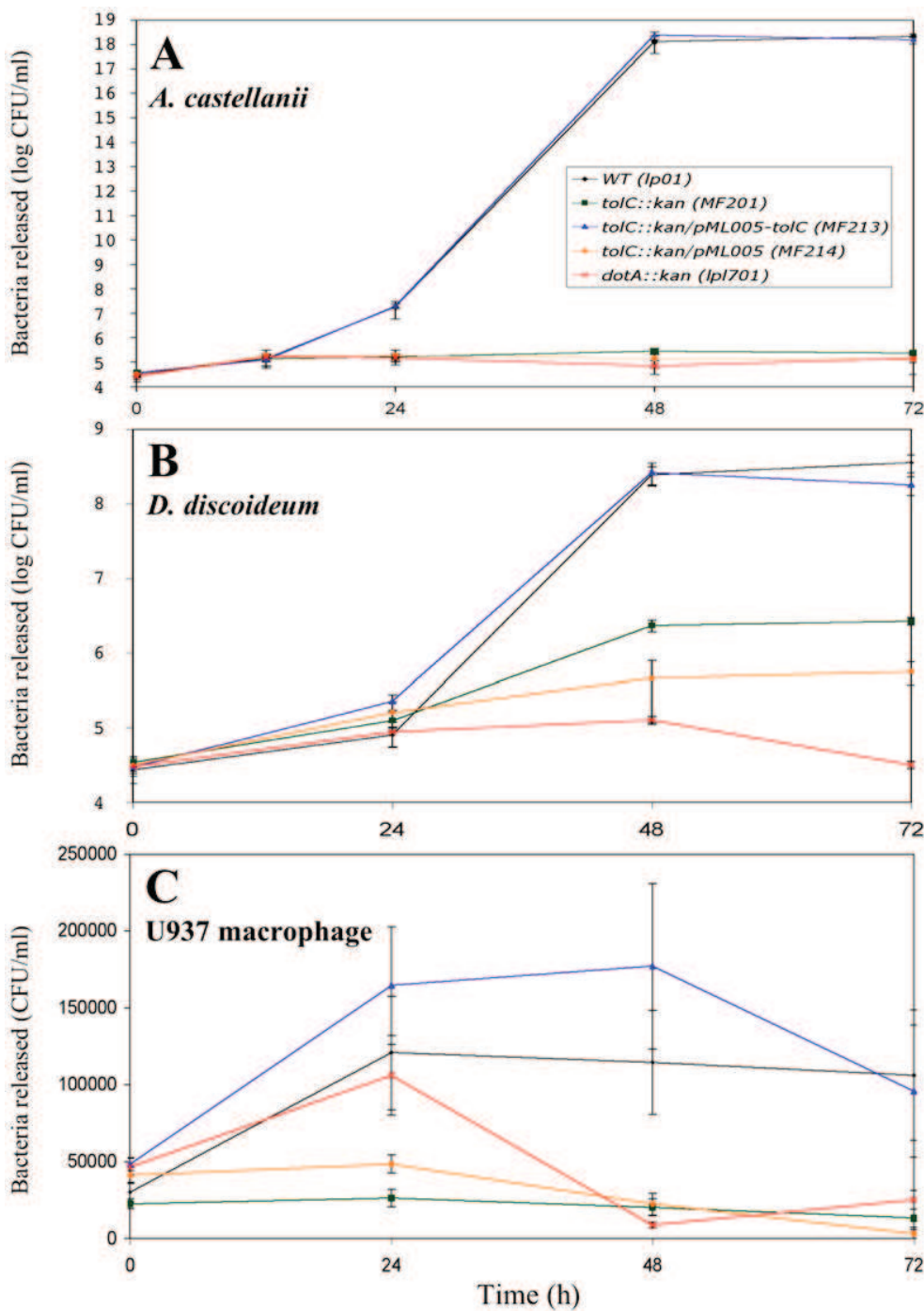


Figure 4. Legionella cells released from protozoa and macrophages. *A. castellanii* (A), *D. discoideum* (B) and U937 human monocyte-derived macrophages (C) were infected at an MOI of 10 for 1 h with *L. pneumophila* strains Lp01 (WT), MF201 (*tolC::kan*), MF213 (*tolC::kan/pML005-tolC*), MF214 (*tolC::kan/pML005*) and lpl701 (*dotA::kan*). At different times post-infection, the bacteria released in the supernatants were diluted in the appropriate medium (see material and methods) and spread on BCYE agar plates for colony enumeration. The initial time points (t=0) represent the number of extracellular bacteria after 1 hour of infection. The data are representative of two independent experiments performed in triplicate and error bars represent standard deviations. doi:10.1371/journal.pone.0007732.g004

in the efflux of toxic ROS in addition to ROS degradation by the bacterial periplasmic and cytoplasmic catalases and dismutases [29,30,31]. Moreover, in *E. coli*, *tolC* belongs to the *marA/soxS/rob* regulon including over 40 genes that promote resistance to

multiple antibiotics and to superoxides [32]. Four *tolC* promoters have been described in *E. coli*, suggesting the involvement of multiple transcriptional regulatory elements in response to different environments [33].

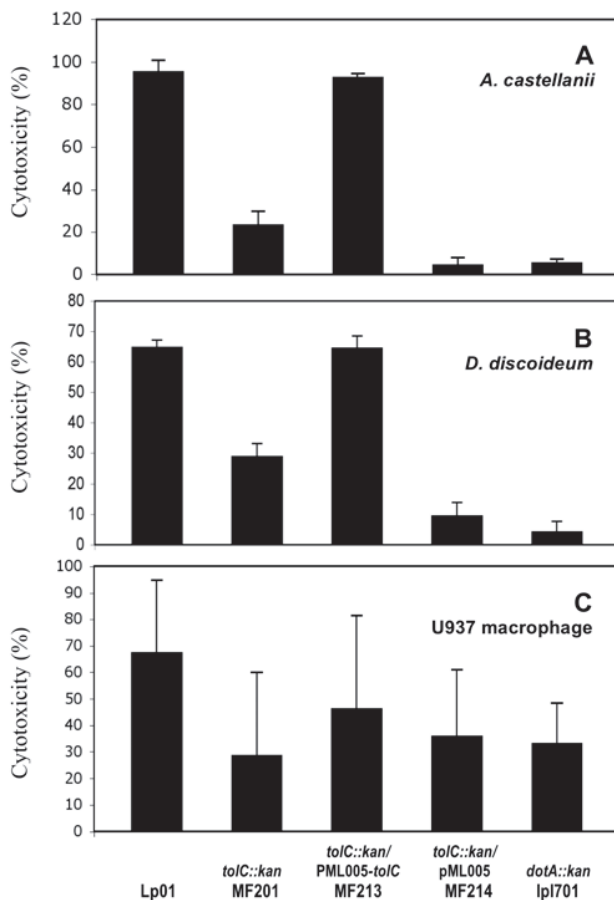


Figure 5. Cytotoxicity of *L. pneumophila* Lens derivatives towards different hosts. *A. castellanii* (A), *D. discoideum* (B) and U937 human monocyte-derived macrophages (C) cells were infected at an MOI of 10 for 1 h with *L. pneumophila* strains: Lp01 (WT), MF201 (*tolC::kan*), MF213 (*tolC::kan/pML005-toIC*), MF214 (*tolC::kan/pML005*) and lp1701 (*dotA::kan*). After 48 h (*D. discoideum*) or 72 h (*A. castellanii* and U937) of infection, the monolayers were washed and the reduction of the Alamar blue dye was measured and compared to non-infected cells (100%). These data are representative of two independent experiments done in triplicate (error bars represents standard deviations). doi:10.1371/journal.pone.0007732.g005

In addition to increased drug sensitivity, the *L. pneumophila* Lens TolC defective mutant was highly attenuated for virulence in amoebae and macrophages. Actually, the TolC defective mutant was unable to multiply within host cells from the early steps of host invasion. It exhibits the same defect of virulence as that which was described for the model avirulent *dotA* mutant. The DotA protein belongs to the Dot/Icm type IVB secretion system which is required for replication in amoebae and macrophages and today is thought to secrete more than one hundred substrates [34,35]. This result demonstrates for the first time the key role of the TolC protein in virulence of *L. pneumophila*. The attenuated virulence phenotype associated with TolC absence has recently been reported in other Gram-negative bacteria [12,14,36,37].

In conclusion, we have demonstrated the major role of the TolC protein in *L. pneumophila* MDR as a component in efflux pump systems. Moreover, TolC has to be considered as a new virulence factor in *L. pneumophila* by its essential role during the early steps of invasion of both amoebae and macrophages. This role could be due to TolC involvement in type I secretion mechanisms. Further

work will focus on the determination of TolC partners and substrates of TolC-dependent systems in *L. pneumophila*. These findings may contribute to understanding the molecular mechanisms involved in the export of molecules in *L. pneumophila*, and represent a step towards the development of novel therapeutic agents, especially for affecting efflux or secretion systems [38].

Materials and Methods

Bacterial Strains, Plasmids, Media and Growth Conditions

Bacterial strains and plasmids used in this study are summarized in Table S1. *L. pneumophila* serogroup 1 strain Lens (Lp01) was isolated from a patient and is a kind gift of Jérôme Etienne and Sophie Jarraud from the CNRL (Centre National de Référence des Légionelles, Lyon, France). *L. pneumophila* strains were grown at 30°C either on buffered charcoal yeast extract (BCYE) agar (Difco) or in BYE liquid medium; each media supplemented with chloramphenicol (Cm; 5 µg/ml), kanamycin (Km; 10 µg/ml) or sucrose (5%) where appropriate. *Escherichia coli* strains were grown at 37°C in LB medium supplemented with chloramphenicol (Cm; 5 µg/ml) or kanamycin (Km; 50 µg/ml).

Cells Culture

Axenic *Acanthamoeba castellanii* cells were grown on PYG medium (Proteose yeast extract glucose medium) at 30°C and split once or twice a week. *Dyctiostelium discoideum* axenic strain DH1 (ax3; DBS0266325 identification on dictybase <http://dictybase.org/>) was obtained from François Letourneur (Laboratoire de Transport et Compartimentation Intracellulaire, Institut de Biologie et Chimie des Protéines, UMR 5086 CNRS, IFR 128 BioSciences Lyon-Gerland 7, passage du Vercors, 69367, Lyon, France) and were grown at 25°C in HL5 medium. Macrophage-like U937 cells obtained from Maëlle Molmeret (INSERM E230 Faculté de médecine RTH Laennec 7–11 rue Guillaume Paradin 69372 Lyon Cedex 08) were maintained at 37°C and 5% CO₂ in rpmi 1640 tissue culture medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum. Prior to infection, the cells were differentiated in 96 well tissue culture plates for 48 h, using phorbol 12-myristate 13-acetate. Differentiated cells are non replicative, adherent, macrophage-like cells.

Electroporation of *L. pneumophila* and Screening of Transformants

To prepare competent cells, *L. pneumophila* grown on BCYE agar plates were resuspended in 200 ml of sterile water to an OD₆₀₀ between 0.5–1. The suspension was divided in four 50 ml tubes (falcon) that were subjected to centrifugation at 4500 rpm during 10 min at 4°C. The bacterial pellet was washed twice with 30 ml of sterile water and the cells were resuspended in glycerol 30%. Competent cells obtained were immediately used or conserved at –80°C as 100 µl samples for long term storage. For electroporation, 3 µl of a plasmid preparation was added to an aliquot of competent cells and submitted to 2.5 kV 600 Ohms and 25 µF using a Biorad electroporation apparatus. Then cells were inoculated in 900 ml BYE liquid medium and incubated at 30°C for 60 minutes before plating on BCYE agar containing the appropriate antibiotic or sucrose for selection.

Construction of Plasmids

To obtain a *L. pneumophila* Lens mutant defective for *tolC*, a homologous recombination strategy was chosen. A derivative plasmid of pCDP05 was constructed in the laboratory. pCDP05 plasmid is a suicide vector which was used in a previous study to obtain random insertions of a kanamycin resistance cassette on

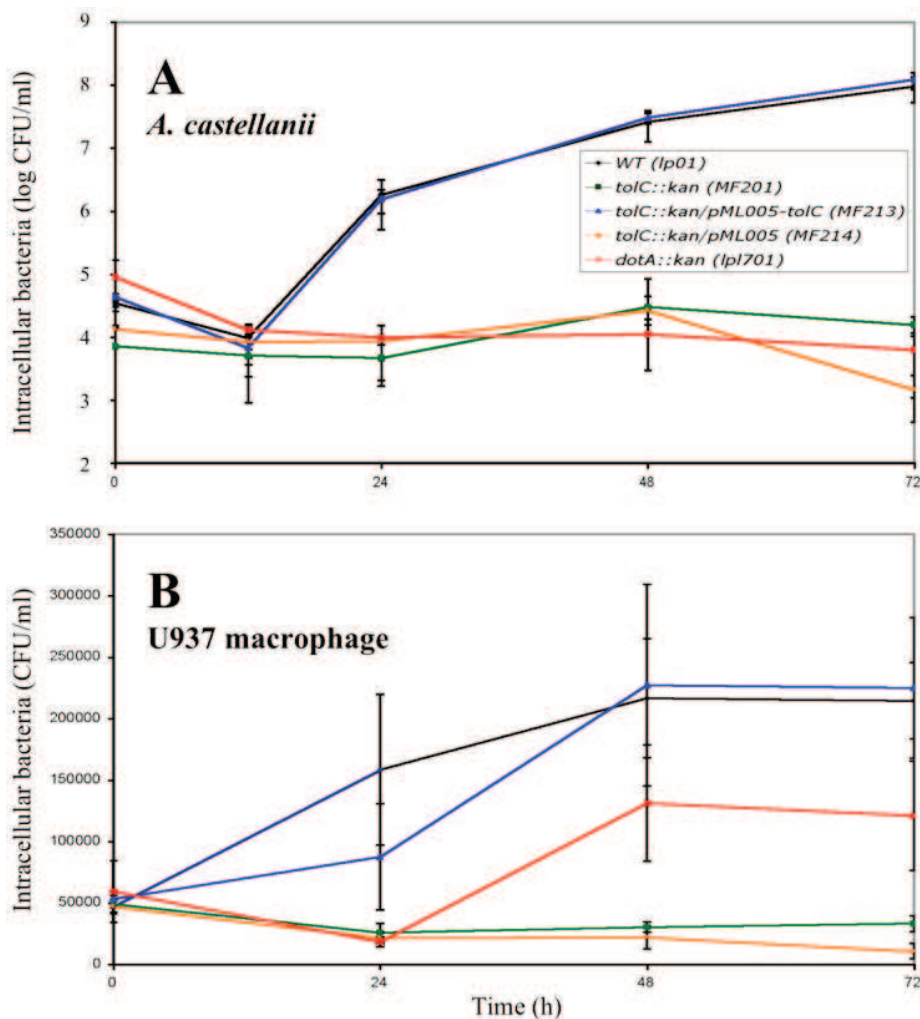


Figure 6. Intracellular growth of *L. pneumophila* Lens derivatives. Intracellular growth kinetics of strains Lp01 (WT), MF201 (*tolC::kan*), MF213 (*tolC::kan/pML005-tolC*), MF214 (*tolC::kan/pML005*) and lp1701 (*dotA::kan*) in *A. castellanii* (A) and U937 human monocyte-derived macrophages (B). These cells were infected at an MOI of 10 for 1 h with *L. pneumophila*. At different times postinfection, *A. castellanii* or U937 monolayers were lysed either hypotonically (sterile water for U937 cells) or with a mild detergent (0.04% Triton X-100 for *A. castellanii*). Aliquots were diluted immediately and plated on BCYE agar plates for enumeration of intracellular bacteria. Each experiment was performed twice in triplicate. Error bars represent standard deviations.

doi:10.1371/journal.pone.0007732.g006

the chromosome of *Legionella pneumophila* [39]. This plasmid bears the *sacB* gene of *Bacillus subtilis* which expression in the presence of sucrose leads to the accumulation of levans at noxious concentrations to Gram-negative bacterial cells when accumulated in periplasmic space. The derivative plasmid was obtained by the deletion of a 4.3 kb *NoI* fragment containing the kanamycine cassette flanked with the two IS10 sequences and *ats1ats2* sequences (alteration of target site recognition). The resulting plasmid, p695, with a unique *NoI* restriction site, confers chloramphenicol resistance and is counter-selectable in presence of sucrose. Two fragments in 5' and 3' region of *tolC* were amplified using the primers pairs P1/P2 (amplification of the 5' region) and primers P3/P4 (amplification of the 3' region) (Table S2). Primers were flanked with *NoI* restriction site for primers P1 and P4 or *SalI* restriction site for P2 and P3. The two fragments generated by couple of primers P1/P2 and P3/P4 were digested with *SalI* enzyme and ligated. PCR was made on the product of ligation using primers P1 and P4. The resulting fragment of

approximately 1 kb was then digested with *NoI* for subcloning in p695. The plasmid p695 with the insertion of P1/P4 fragment was digested with *SalI* enzyme to insert a kanamycine resistance cassette between the two fragments corresponding to 5' and 3' region of *tolC*. The resulted plasmid was named pMF1.

A complementation plasmid was also constructed. The plasmid pML005, derived from PUC18 with Cm cassette in exchange of *bla* gene and a mutation in the ColE1-type replication promoter (Table S1) which was previously shown to confer a stability to the plasmid in *L. pneumophila* [18], was used to clone *tolC* gene under the control of a constitutive promoter (*Pkan*, constitutive promoter of *kan* gene from plasmid pCDP05).

Construction of *L. pneumophila* Lens *tolC::kan* Strain

The plasmid pMF1 was electroporated in *L. pneumophila*. Kanamycine resistant clones of *Legionella* were plated on BCYE agar containing kanamycine and sucrose for selection of recombinants. The recombinants obtained were controlled by

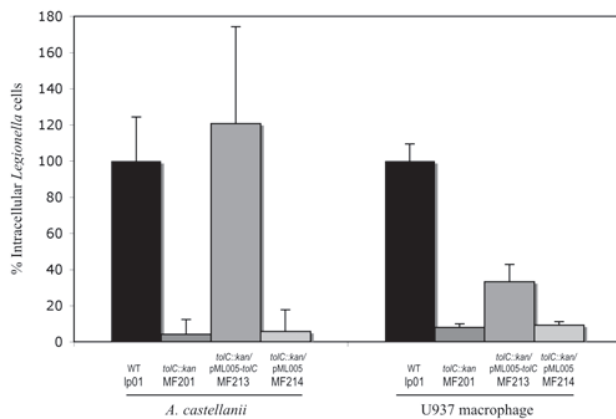


Figure 7. Invasion ability of *L. pneumophila* Lens derivatives strains. Host cells were infected at an MOI of 10 with strains Lp01 (WT), MF201 (*tolC::kan*), MF213 (*tolC::kan/pML005-toIC*), MF214 (*tolC::kan/pML005*) and lpl701 (*dotA::kan*). After 60 minutes of contact with *L. pneumophila*, the monolayers were treated 1 hour with gentamycin to kill adherent bacteria and disrupted with either distilled water (for U937 cells) or Triton 0,04% (for *A. castellanii*). Intracellular bacteria were diluted and plated on BCYE agar plates for colony enumeration. Results are expressed as the relative value (%) compared to control invasion experiment with wild-type strain Lp01. These data are representative of two independent experiments done in triplicate for which error bars represents standard deviations. doi:10.1371/journal.pone.0007732.g007

PCR on chromosome, by sequencing and by southern blot analysis. PCR with primers P1/P4 allowed the amplification of a 2 kb fragment which, after *SalI* restriction, gave two type of fragments: a 1 kb fragment corresponding to the kanamycine cassette and fragments at 500 pb corresponding to the two 5' and 3' region of the *tolC* gene. Southern blot on the chromosome digested by BamHI and BglII restriction enzymes was used to reveal the insertion of the kanamycine cassette.

Multidrug Sensitivity

Sensitivity to different drugs as detergent, dyes, antibiotics and metals was tested by an agar dilution method. Briefly, solution of drug were made in water or ethanol: sodium dodecyl sulfate (SDS; Euromedex), hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB; Sigma-Aldrich), Polymixin B (Sigma-Aldrich), Benzalkonium chlorid (Sigma-Aldrich), Tetracyclin (Sigma-Aldrich), Erythromycin (Sigma-Aldrich), Sodium Déoxycholate (Sigma-Aldrich), Nalidixic acid (Serva), Norfloxacin (Sigma-Aldrich), Ethidium Bromid (Sigma-Aldrich), Acridin Orange (Sigma-Aldrich), Methylene Blue (Prolabo), Rhodamine 6G (Sigma-Aldrich), zinc sulfate heptahydrate (Prolabo), nickel sulfate (Sigma-Aldrich), manganese sulfate (Sigma-Aldrich), Cobalt (Co(II) chloride hexahydrate) (Acros organics). Test drugs were then diluted by twofold in sterile water in a 24 multiwell plate to obtain a final volume of 500 μ l of each dilution. Then 500 μ l of BCYE agar in surfusion (60°C) was added to each drug dilution and immediately mixed.

The day of the test, *L. pneumophila* cells from fresh BCYE agar plates (4 days of growth at 30°C) were resuspended in sterile water and adjusted to a final suspension with an OD_{600nm} of 5. 10 μ l of the bacterial suspension was added into each well of the plate with different dilutions of the drugs. After 5 days at 30°C, the growth into each dilution well was visualized. The well corresponding to the lowest concentration of the drug with no visible sign of growth was reported as MIC 100 for Minimal Inhibitory Concentration of the drug leading to 100% of lethality of bacterial cells.

Ethidium Bromide Accumulation Assay

This method was based on the method already described to study active efflux in *Salmonella enterica* strains [40]. Bacteria were grown in liquid medium (BYE) at 30°C until stationary phase corresponding to an optical density of 3.6–3.9. The cells were centrifuged for 5 min at 13 000 rpm and the pellet was washed twice with sterile water. The OD_{600nm} of the final cellular suspension was adjusted to 0.3 in sterile water and the cells were incubated or not with carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP; 2,5 mg/L) for 30 minutes. After incubation, ethidium bromide was added to the suspension at a final concentration of 0,005 mg/mL and the bacterial suspension was distributed by aliquots of 100 μ L in a 96 multiplate well. The change in fluorescence was recorded every 2 minutes on a « Xenius » (Safas) spectrofluorimeter (excitation 518 nm; emission 605 nm).

Measurement of Bacterial Release and Intracellular Growth

Intracellular growth of *L. pneumophila* strains was assayed using three eukaryotic hosts: two protozoan cells *A. castellanii* and *D. discoideum* and one mammalian cell: U937 macrophages. These hosts were chosen for their implication in environmental spreading of *L. pneumophila* (protozoa, natural host) or for their role in a clinical infection (macrophages, defective host). *L. pneumophila* were grown on BCYE agar for five days at 30°C prior to infection of protozoan cells and three days at 37°C before the infection of U937 macrophages. *A. castellanii* cells, *D. discoideum* cells and U937 macrophages were first seeded in plates of 96 multiwell plate to a final concentration of 1×10^5 cells.mL⁻¹ in PY, MB and RPMI medium respectively. After a two-hour period of adhesion (except for U937 macrophages with a 2 day differentiation prior to infection) cells were washed four times and *L. pneumophila* was added to an MOI of 10 (in triplicate). The plates were spun at 2000 \times g for 10 min followed by an incubation of 1 hour (30°C for *A. castellanii*, 37°C for macrophages and 25°C for *D. discoideum*). At the end of this infection period, monolayers were washed four times with tissue culture medium to remove non-adherent bacteria. The time point at the end of the final wash was the initial time point (T₀). After several times post-infection (0, 12, 24, 48 and 72 h) aliquots of the supernatant were diluted on BCYE agar plates for enumeration of extracellular bacteria. For enumeration of intracellular bacteria the monolayers were washed at different times post-infection and were disrupted either hypotonically (sterile water for U937 cells) or with a mild detergent (0,04% Triton X100 for *A. castellanii* and *D. discoideum*). Bacteria were then diluted in sterile water and plated on BCYE agar for enumeration. We verified that our mutant (strain MF201) exhibited the same sensitivity to detergent at the concentration we used. The experiment was repeated at least twice for each infection.

Cytotoxicity to U937 Cells, *A. castellanii* and *D. discoideum*

For measurement of the number of viable cells remaining, the monolayers were treated with 10% Alamar blue (Invitrogen) as recommended by the manufacturer. Briefly, at the time point indicated monolayers were washed four times with the appropriate medium and then 100 μ l of the medium containing 10% (v/v) of Alamar blue was added in each well. After an incubation of several hours (4 h for macrophages, 9 h for *A. castellanii* and approximately 48 h for *D. discoideum*), measurements of the optical density were performed at a wavelength of 570 nm and corrected for background at 600 nm with a μ quant microplate reader. The relative degree of macrophage or amoeba cytotoxicity was

expressed as the ratio of the optical density value of an infected monolayer to that of uninfected one with the formula $\{1 - (\text{mean OD value of infected} / \text{mean OD value of uninfected})\} \times 100\%$.

Study of Invasion of U937 Cells, *A. castellanii* and *D. discoideum*

The study of levels of invasion were performed using a gentamycin protection assay. Briefly after two times of incubation of bacteria with eukaryotic cells (30 and 60 min), monolayers were washed and treated with gentamycin (50 µg/ml) for 1 hour. Then, monolayers were washed to remove gentamycin and were disrupted (either hypotonically for U937 macrophages or with Triton 0,04% for protozoa) to collect intracellular bacteria. Bacteria were diluted in sterile water and plated on BCYE agar for colony enumeration.

Statistical Analysis

All the results of statistical analysis were obtained using a student's t-test. All the t-test results mentioned correspond to the comparison with the parental strain value in the same conditions. R software (<http://www.R-project.org>) was used.

Acknowledgments

We thank Maëlle Molmeret and Christophe Ginevra (INSERM E230 - Faculté de médecine RTH Laennec 7–11 rue Guillaume

Paradin 69372 Lyon Cedex 08) for the help with the macrophages infection experiments.

Supporting Information

Figure S1 Growth kinetics of *L. pneumophila* Lens derivatives. Strains lp01 (WT), MF201 (*tolC::kan*), MF213 (pML005-*tolC*), MF214 (pML005) and lpl701 (*dotA::kan*) were inoculated to an OD₆₀₀ = 0.2 into BYE medium and grown at 30°C. OD₆₀₀ at the time points were read using a microplate reader. The results are the mean of two experiments performed in triplicate. Error bars represent standard deviation.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0007732.s001 (0.72 MB RTF)

Table S1 Bacterial strains and plasmids

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0007732.s002 (0.02 MB RTF)

Table S2 List of primers used in this study

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0007732.s003 (0.02 MB RTF)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MF DA CG. Performed the experiments: MF DA CG. Analyzed the data: MF DA JCL PD CG. Contributed reagents/materials/analysis tools: MF DA AV PD CG. Wrote the paper: MF DA AV JCL PD CG.

References

- Shin S, Roy CR (2008) Host cell processes that influence the intracellular survival of *Legionella pneumophila*. Cellular Microbiology 10: 1209–1220.
- Swanson MS, Isberg RR (1995) Association of *Legionella pneumophila* with the macrophage endoplasmic-reticulum. Infection and Immunity 63: 3609–3620.
- Tilney LG, Harb OS, Connelly PS, Robinson CG, Roy CR (2001) How the parasitic bacterium *Legionella pneumophila* modifies its phagosome and transforms it into rough ER: implications for conversion of plasma membrane to the ER membrane. Journal of Cell Science 114: 4637–4650.
- Isberg RR, O'Connor TJ, Heidtman M (2009) The *Legionella pneumophila* replication vacuole: making a cosy niche inside host cells. Nature Reviews Microbiology 7: 12–24.
- Molmeret M, Bitar DM, Han LH, Abu Kwaik Y (2004) Cell biology of the intracellular infection by *Legionella pneumophila*. Microbes and Infection 6: 129–139.
- Poole K (2003) Overcoming multidrug resistance in Gram-negative bacteria. Curr Opin Investig Drugs 4: 128–139.
- Li XZ, Nikaïdo H (2004) Efflux-mediated drug resistance in bacteria. Drugs 64: 159–204.
- Poole K (2004) Efflux-mediated multidrug resistance in Gram-negative bacteria. Clinical Microbiology and Infection 10: 12–26.
- Baucheron S, Tyler S, Boyd D, Mulvey MR, Chaslus-Dancla E, et al. (2004) AcrAB-TolC directs efflux-mediated multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 48: 3729–3735.
- Nishino K, Yamada J, Hirakawa H, Hirata T, Yamaguchi A (2003) Roles of TolC-dependent multidrug transporters of *Escherichia coli* in resistance to beta-lactams. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 47: 3030–3033.
- Seeger MA, Diederichs K, Eicher T, Brandstatter L, Schiefner A, et al. (2008) The AcrB Efflux Pump: Conformational Cycling and Peristalsis Lead to Multidrug Resistance. Current Drug Targets 9: 729–749.
- Gil H, Platz GJ, Forestal CA, Monfett M, Bakshi CS, et al. (2006) Deletion of TolC orthologs in *Francisella tularensis* identifies roles in multidrug resistance and virulence. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103: 12897–12902.
- Posadas DM, Martin FA, Garcia J, Spera JM, Delpino MV, et al. (2007) The TolC homologue of *Bruella suis* is involved in resistance to antimicrobial compounds and virulence. Infection and Immunity 75: 379–389.
- Buckley AM, Webber MA, Cooles S, Randall LP, La Ragione RM, et al. (2006) The AcrAB-TolC efflux system of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium plays a role in pathogenesis. Cellular Microbiology 8: 847–856.
- Stone BJ, Miller VL (1995) *Salmonella enteritidis* has a homolog of TolC that is required for virulence in balb/c mice. Molecular Microbiology 17: 701–712.
- Cazalot C, Rusniok C, Bruggemann H, Zidane N, Magnier A, et al. (2004) Evidence in the *Legionella pneumophila* genome for exploitation of host cell functions and high genome plasticity. Nature Genetics 36: 1165–1173.
- Marchler-Bauer A, Anderson JB, Derbyshire MK, DeWeese-Scott C, Gonzales NR, et al. (2007) CDD: a conserved domain database for interactive domain family analysis. Nucleic Acids Research 35: D237–D240.
- Chen DQ, Zheng XC, Lu YJ (2006) Identification and characterization of novel ColE1-type, high-copy number plasmid mutants in *Legionella pneumophila*. Plasmid 56: 167–178.
- Lau SY, Zgurskaya HI (2005) Cell division defects in *Escherichia coli* deficient in the multidrug efflux transporter AcrEF-TolC. Journal of Bacteriology 187: 7815–7825.
- Sulavik MC, Houseweart C, Cramer C, Jiwan N, Murgolo N, et al. (2001) Antibiotic susceptibility profiles of *Escherichia coli* strains lacking multidrug efflux pump genes. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 45: 1126–1136.
- Viveiros M, Martins A, Paixao L, Rodrigues L, Martins M, et al. (2008) Demonstration of intrinsic efflux activity of *Escherichia coli* K-12 AG100 by an automated ethidium bromide method. International Journal of Antimicrobial Agents 31: 458–462.
- Bokma E, Lobedan S, Symmons MF, Koronakis E, Brandstatter H, et al. (2007) Assembly and mechanism of the Type I multi-drug efflux pump AcrAB-TolC from *Escherichia coli*. Amino Acids 33: VIII–IX.
- Lobedan S, Bokma E, Symmons MF, Koronakis E, Hughes C, et al. (2007) A periplasmic coiled-coil interface underlying TolC recruitment and the assembly of bacterial drug efflux pumps. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104: 4612–4617.
- Yamanaka H, Kobayashi H, Takahashi E, Okamoto K (2008) MacAB Is Involved in the Secretion of *Escherichia coli* Heat-Stable Enterotoxin II. Journal of Bacteriology 190: 7693–7698.
- Cosme AM, Becker A, Santos MR, Sharypova LA, Santos PM, et al. (2008) The outer membrane protein TolC from *Sinorhizobium meliloti* affects protein secretion, polysaccharide biosynthesis, antimicrobial resistance, and symbiosis. Molecular Plant-Microbe Interactions 21: 947–957.
- Karatzas KAG, Randall LP, Webber M, Piddock LJV, Humphrey TJ, et al. (2008) Phenotypic and proteomic characterization of multiply antibiotic-resistant variants of *Salmonella enterica* serovar typhimurium selected following exposure to disinfectants. Applied and Environmental Microbiology 74: 1508–1516.
- DeLeo FR, Allen LAH, Apicella M, Nauseef WM (1999) NADPH oxidase activation and assembly during phagocytosis. Journal of Immunology 163: 6732–6740.
- Frohner IE, Bourgeois C, Yatsyk K, Majer O, Kuchler K (2009) Candida albicans cell surface superoxide dismutases degrade host-derived reactive oxygen species to escape innate immune surveillance. Molecular Microbiology 71: 240–252.
- Bandyopadhyay P, Byrne B, Chan Y, Swanson MS, Steinman HM (2003) *Legionella pneumophila* catalase-peroxidases are required for proper trafficking and growth in primary macrophages. Infection and Immunity 71: 4526–4535.

30. Golubeva YA, Slauch JM (2006) *Salmonella enterica* serovar Typhimurium periplasmic superoxide dismutase SodCI is a member of the PhoPQ regulon and is induced in macrophages. *Journal of Bacteriology* 188: 7853–7861.
31. Keith KE, Valvano MA (2007) Characterization of SodC, a periplasmic superoxide dismutase from *Burkholderia cenocepacia*. *Infection and Immunity* 75: 2451–2460.
32. Martin RG, Bartlett ES, Rosner JL, Wall ME (2008) Activation of the *Escherichia coli* *marA/soxS/rob* regulon in response to transcriptional activator concentration. *Journal of Molecular Biology* 380: 278–284.
33. Zhang A, Rosner JL, Martin RG (2008) Transcriptional activation by MarA, SoxS and Rob of two *tolC* promoters using one binding site: a complex promoter configuration for *tolC* in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 69: 1450–1455.
34. Berger KH, Merriam JJ, Isberg RR (1994) Altered intracellular targeting properties associated with mutations in the *Legionella pneumophila dotA* gene. *Molecular Microbiology* 14: 809–822.
35. Molmeret M, Santic M, Asare R, Carabeo RA, Abu Kwaik Y (2007) Rapid escape of the *dot/icm* mutants of *Legionella pneumophila* into the cytosol of mammalian and protozoan cells. *Infection and Immunity* 75: 3290–3304.
36. Virlogeux-Payant I, Baucheron S, Pelet J, Trotereau J, Bottreau E, et al. (2008) TolC, but not AcrB, is involved in the invasiveness of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by increasing type III secretion system-I expression. *International Journal of Medical Microbiology* 298: 561–569.
37. Bunikis I, Denker K, Ostberg Y, Andersen C, Benz R, et al. (2008) An RND-type efflux system in *Borrelia burgdorferi* is involved in virulence and resistance to antimicrobial compounds. *Plos Pathogens* 4.
38. Mahamoud A, Chevalier J, Alibert-Franco S, Kern WV, Pages JM (2007) Antibiotic efflux pumps in Gram-negative bacteria: the inhibitor response strategy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 59: 1223–1229.
39. Pope CD, Dhand L, Cianciotto NP (1994) Random mutagenesis of *Legionella pneumophila* with mini-Tn10. *Fems Microbiology Letters* 124: 107–111.
40. Giraud E, Cloeckert A, Kerboeuf D, Chaslus-Dancla E (2000) Evidence for active efflux as the primary mechanism of resistance to ciprofloxacin in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44: 1223–1228.

RESUME en français

La multi-résistance aux drogues des bactéries est un problème majeur en clinique. L'un des mécanismes de résistance consiste à effluer les composés toxiques hors de la cellule grâce à des protéines de la membrane interne nommées pompes d'efflux. Ces protéines appartiennent à cinq familles (MFS, RND, MATE, SMR et ABC) et peuvent fonctionner en association avec deux autres types de protéines (protéine du périplasme et protéine de la membrane externe) pour former un canal.

Dans le cadre d'une thématique de recherche basée sur l'étude des mécanismes de résistance aux drogues de la bactérie pathogène *Legionella pneumophila*, une approche bioinformatique menée sur les génomes de trois souches séquencés (souches Lens, Paris et Philadelphia) a permis d'identifier des protéines pouvant participer à l'efflux. Notre but a été de vérifier l'implication de ces protéines dans la résistance aux drogues et dans la virulence de *Legionella* en ciblant un ou plusieurs gènes codant pour des composants de systèmes d'efflux. Pour inactiver les gènes, nous avons choisi une stratégie de recombinaison homologue. Les recombinants ont été testés pour leur sensibilité à des composés toxiques afin de voir si les gènes ciblés jouent un rôle dans l'efflux d'*E. coli*. Un de ces mutants, le mutant MF201, altéré pour le gène codant pour une protéine homologue à TolC chez *E. coli* s'est avéré être 2 à 16 fois plus sensible aux drogues testées comparé à la souche sauvage. De plus, ce mutant présente un défaut important de virulence dans *Acanthamoeba castellanii*, *Dictyostelium discoideum* et les macrophages U937. Ce premier résultat implique que la protéine TolC-like de *Legionella* aurait un rôle clef dans la relation hôte pathogène et sous-tend un lien entre multi-résistance aux drogues et virulence. Par ailleurs une étude de l'expression des gènes codant pour des pompes à efflux a été initiée afin de comprendre leur rôle au cours du cycle infectieux de *Legionella*.

TITRE en anglais

The role of *Legionella pneumophila* efflux pumps in biocides and host's resistance

RESUME en anglais

Bacterial multi-drug resistance is of major concern in the case of clinic. One of the resistance mechanisms used by bacteria is the efflux of noxious compounds out of the cell thanks to inner membrane proteins called efflux pumps. These proteins belong to five families (MFS, RND, MATE, SMR and ABC) and can function in close association with two partners (periplasmic protein and outer membrane protein) to form a canal.

In our new research axis based on the study of the drug resistance of the bacterium *Legionella pneumophila*, we conducted a bioinformatical approach to identify efflux pump proteins coded by the sequenced genome of three strains (strains Lens, Paris and Philadelphia). Our goal was to study the role of these proteins in *Legionella* drug resistance and in its virulence. The bioinformatic approach data allowed us to choose one or several genes coding for potential efflux pump components for genetic invalidation by a homologous recombination strategy. The bacterial mutants were exposed to different noxious compounds in order to know if the target genes invalidated were implicated in the efflux of drugs. One of these mutants, strain MF201, which is deleted for the gene encoding a protein homologous to *E. coli* TolC protein, revealed to be 2 to 16 times more sensitive to the drug tested compared to the wild-type strain. Furthermore, this mutant showed an important virulence defect in *Acanthamoeba castellanii*, *Dictyostelium discoideum* and U937 macrophages. This first result means that the TolC-like protein of *Legionella* could be a key factor in host-pathogen interaction and strongly suggests a link between multi-drug resistance and virulence. We also initiated a transcriptomic approach to study efflux pump genes expression in order to understand their role during the infectious cycle of *Legionella*.

DISCIPLINE

Microbiologie

MOTS-CLES

Legionella pneumophila, virulence, efflux, relation hôte-pathogène, résistance aux drogues.

INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE

UMR 5240 CNRS - Université Lyon 1- INSA – BayerCropScience, Microbiologie, Adaptation et Pathogénie, Equipe « Mécanismes de virulence et de multi-résistance chez *Legionella* », Université Claude Bernard Lyon 1, Domaine Scientifique de la DOUA, Bât. Lwoff, 10 rue Dubois, F-69622 Villeurbanne cedex, France.